

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Neurobiologijos studijų II kurso studentas

Osvaldas Kaminskas

Magistrinis darbas

Skèrio sparno vyro tempimo receptoriaus adaptacijos tyrimas

Darbo vadovas

Doc. A. Alaburda

Vilnius 2009

Skèrio sparno vyrio tempimo receptoriaus atsistatymo tyrimas

Darbas atliktas Biochemijos ir biofizikos katedroje

Osvaldas Kaminskas

Darbo vadovas

Doc. A. Alaburda

TURINYS

ĮVADAS	3
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	4
LITERATŪROS APŽVALGA	5
1.1 Skėrys <i>Locusta migratoria</i>	5
1.2 Skėrio skrydis	6
1.3 Skėrio nervų sistema.....	6
1.3.1 Temperatūros įtaka nervų sistemos veiklai	7
1.3.2 Nervų sistemos aktyvumo pokyčiai bėstant skėriams	8
1.4 Sparno vyrio tempimo receptorius.	10
1.5 Mechanoreceptorių įtaka skrydžio kontrolėje	11
1.6 Sparno pozicijos kodavimas veikimo potencialais.....	12
1.7 Veikimo potencialų dažnio adaptacija.....	14
1.8 Atsistatymas po adaptacijos.....	16
ĮRANGA IR METODAI	19
2.1 Preparato paruošimas.....	19
2.1 Eksperimento įranga	19
2.3. Duomenų registravimas ir apdorojimas.....	20
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	22
3.1 Atsistatymo po adaptacijos iki pirmo veikimo potencialo tyrimas	22
3.2 Atsistatymo po adaptacijos iki 50% pradinio dažnio tyrimas	24
3.3 Pirmo veikimo potencialo atsiradimo ir 50 % pradinio veikimo potencialių dažnio atsistatymo dinamikų palyginimas	25
3.4 Adaptacijos lūžio taškuose tyrimas	27
3.5 Adaptacijos plasnėjant tyrimas.....	28
IŠVADOS	31
SANTRAUKA	32
SUMMARY	33
LITERATŪROS SĄRAŠAS	34

IVADAS

Vabzdžių skrydis yra sudėtingas aerodinaminis veiksmas, reikalaujantis geros koordinacijos bei nuolatinio prisitaikymo prie besikeičiančių aplinkos sąlygų. Čia labai svarbus vaidmuo tenka nervų sistemai. Nervų sistema atlieka svarbų vaidmenį koordinuojant atskirų raumenų veiklą, priimant duomenis iš jutimo organų, inicijuojant kitus veiksmus.

Skėrių neuroninė architektūra paremta daugybe grįžtamųjų ryšių iš jutimo organų. Vienas iš tokių organų yra sparno vyrio tempimo receptorių, kuris koduoja sparno padėties veikimo potencialų sekomis. Tempimo receptoriaus funkcija yra kontroliuoti aktyvumo fazes skirtingose raumenų grupėse, kompensuoti išorinius trukdžių sukeltus sutrikimus skrydžio metu, kontroliuoti sparno mosto dažnį [26].

Yra žinoma kad sparno vyrio tempimo receptoriui kaip ir daugumai kitų neuronų būdinga adaptacija. Receptorių veikiant stimulu vyksta adaptacija, sumažėja receptoriaus jaudrumas. Stimului pasibaigus, jaudrumas atsistato ne iškart, o palaipsniui. Todėl mes tyrėme, kaip priklauso signalo dažnio iš tempimo receptoriaus atsistatymas po sparno nuleidimo.

Skrydžio metu sparnas periodiškai juda, todėl tempimo receptorių yra veikiamas stimulo ne nuolatos, bet periodiškai, o kaip atsaką generuoja veikimo potencialų pliūpsnius [37]. Sparnui kylant į viršų, tempimo receptorių stimuliuojamas ir jo atsako pavidalui turi įtakos adaptacijos mechanizmai. Sparnui besileidžiant, receptoriaus aktyvavimas mažėja ir čia tampa svarbūs atsistatymo po adaptacijos mechanizmai. Todėl norint suprasti, kaip koduojama sparno pozicija, svarbu žinoti ir adaptacijos, ir atsistatymo po adaptacijos mechanizmus, ir kodavimo ypatumus sparnui periodiškai judant.

Adaptacija sparnui esant pastovioje padėtyje aprašyta literatūroje [14], [26]. Tiriant atsistatymą po adaptacijos, naudotas 4 minutes trunkantis stimulus [14], tačiau neaišku, kaip vyksta atsistatymas po adaptacijos, kai sparnas pakeliamas trumpesnį laiką.

Ankstesniame darbe buvo tirta signalo adaptacija plasnojant sparnui ir nustatyta, kad imant vidutinį dažnį veikimo potencialų pliūpsnyje, dažnis mažėja sparnui plasnojant [42]. Tačiau nėra žinoma, kaip adaptacija paveikia trukmes tarp atskirų veikimo potencialų pliūpsnyje sparnui plasnojant.

Norėdami išsiaiškinti sparno pozicijos kodavimo ypatumus, šiame darbe eksperimentiškai tyrėme, kaip sparnui plasnojant adaptacija įtakoja veikimo potencialų pliūpsnio struktūrą bei, kaip tempimo receptorių atsistato po adaptacijos.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas-ištirti skėrio sparno vyrio tempimo receptoriaus adaptaciją dinaminiam režime bei signalo atsistatymą po sparno nuleidimo.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti, kaip priklauso sparno vyrio tempimo receptoriaus signalo atsistatymas nuo adaptacijos trukmės.
2. Nustatyti, kaip priklauso sparno vyrio tempimo receptoriaus signalo atsistatymo parametrai nuo adaptacijos fazės.
3. Nustatyti, kaip sparnui plasnojant adaptacija įtakoja sparno vyrio tempimo receptoriaus atsaką.

LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Skėrys *Locusta migratoria*

Skėrys *Locusta migratoria* L 1758, priklausantis šeimai Acrididae, pošeimui Oedipodinae, yra plačiai paplitęs Afrikoje, Azijoje, Europoje, Australijoje. Skėriai gyvena įvairiose ekologinėse zonose, todėl turi daug porūšių.

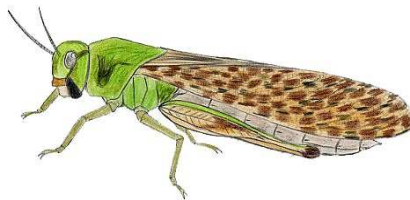
Skėriai pergyvenimo ciklą turi tris pagrindines stadijas: kiaušinėlis, ninfa, subrendęs skėrys. Prie normalios vasaros temperatūros (28-33⁰C) ir optimalaus kritulių kiekio (100 mm/mėnesį) minimalus vystymosi ciklas:

Kiaušinėlis, 11 dienų → Ninfa, 30 dienų → Subrendęs skėrys, 14 dienų.

Tokiomis sąlygomis per metus išauga 4 kartos.

Skėrių patelės deda kiaušinėlius į krūveles, po 30-60 vienetų į dirvožemyje esančias duobutės, kurios yra 100 mm gylio. Kiaušinėliai yra kapsulės pavidalo, nuo geltonų iki silpnai rudų atspalvių. Jie vystosi 12 dienų. Kiaušinėlių vystymosi trukmė svyruoja priklausomai nuo temperatūros, šiuo laikotarpiu jiems reikia šilumos ir drėgmės. Esant tinkamai temperatūrai nimfos išsivysto per 35 dienas. Jos būna pilkai rudos spalvos ir 6-10 mm ilgio. Ninfos prieš pasiekdamos suaugėlio stadiją išsineria 5-6 kartus. Išsivysčiusios nimfos renkasi į keliaujančius būrius ir gali nukeliauti didelius atstumus.

Suaugėliai skėriai subręsta per 14 dienų. Jie yra žalios arba rudos spalvos, patelės 40-65 mm ilgio, o patinėliai 34-45 mm ilgio, pav.1. Skėriai gerai skraido. Kadangi jie yra žolėdžiai, tai skraidydami spiečiais, dažnai padaro žalos javų pasėliams, ar kokiai kitai kultūrai. Skėrių spiečiai gali nukeliauti didelius atstumus. Šių nukeliautų atstumų ilgiai labai priklauso nuo aplinkos sąlygų. Pavyzdžiui, per naktį skėrių spiečiai, esant tinkamomis sąlygom, gali nukeliauti šimtus kilometrų.



Pav. 1. Skėrys *Locusta migratoria*

1.2 Skėrio skrydis

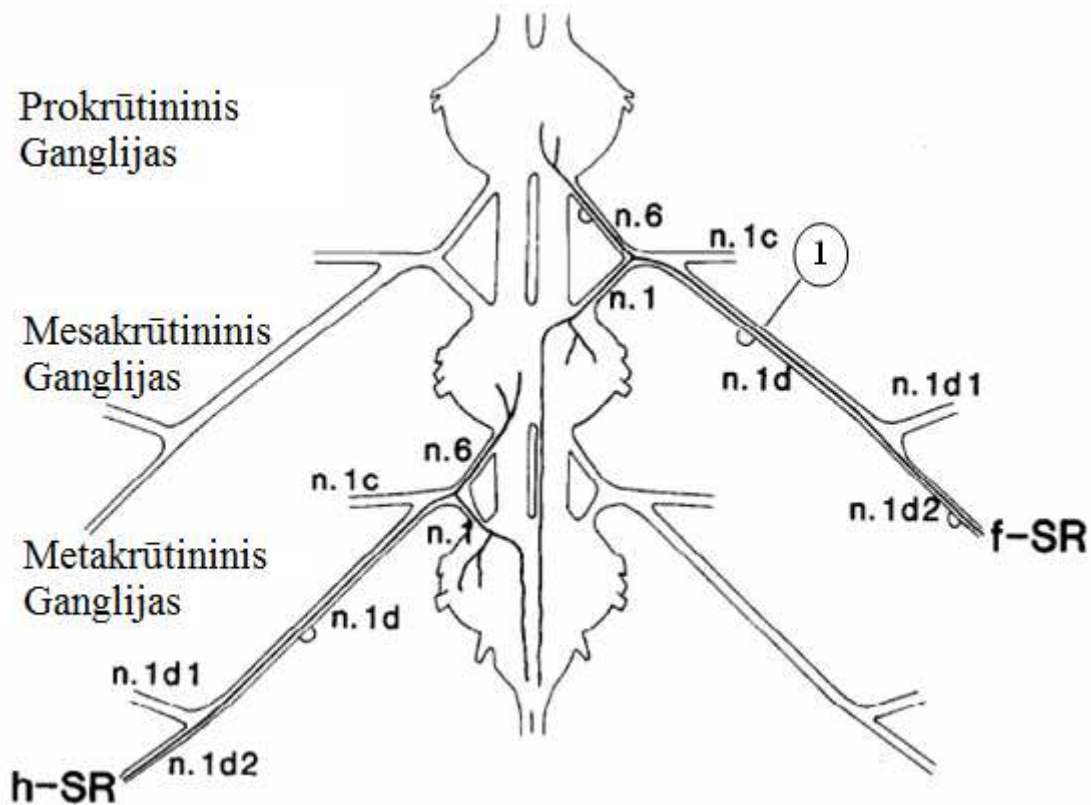
Skėriai skraido dviejų porų sparnų pagalba, kurios yra išsidėsčiusios mesakrūtininiame ir metakrūtininiame kūno segmentuose. Sparnų poros nėra lygiavertės, galinės poros sparnai turi didesnę paviršiaus plotą ir generuoja 70 procentų bendros kilimo jėgos skrydžio metu, priekiniai sparnai yra tvirtesni ir svarbūs atliekant vairavimo manevrus. Skrydžio metu sparnai plasnoja apie 23 Hz dažniu, plasnojimo dažnis kiekvieno skėrio yra individualus ir priklauso nuo lyties ir dydžio [41]. Skėriai skrenda apie 4,6 m/s greičiu [1]. Plasnojimo metu sparnas juda 45-120 laipsnių amplitude nuo žemiausios iki aukščiausios padėties [16]. Sparno pakėlimas užima apie 41% ciklo standartiniame skrydyje [36]. Ritmiški galinių sparnų pakėlimai ir nuleidimai priveda prie lygiaverčių priekinių sparnų judesių. Pakeistas sparno pasvirimas sparno nuleidimo metu suteikia kilimo nukrypimą. Kiekvieną sparną kontroliuoja 10 raumenų, raumenys prisijungę tiesiogiai prie sparno pagrindo ir judina sparną arba netiesiogiai veikia sparną deformuodami krūtinės ertmę. Kai kurie raumenys yra dviejų funkcijų ir veikia judinant kojas vaikščiojimo metu.

1.3 Skėrio nervų sistema

Skėrių centrinė nervų sistema susideda iš cerebraliųjų ganglijų ir smegenų. Smegenys išsidėstę galvoje dorsaliai, o toliau ventraliai seka krūtinės ertmėje į grandinėle susijungę ganglijai. Grandinėle sudaro prokrūtininis, mesakrūtininis, metakrūtininis ganglijai. Jie yra dideli ir lengvai prieinami.

Dalis nervų sistemos, kuri yra atsakinga už skrydžio kontrolę, ir nervinių šakų numeracija, pavaizduota pav. 2. Skrydžiui kontroliuoti reikalingi jutimo mechanizmai, tokie kaip tempimo receptoriai. Sparno vyrio tempimo receptoriai suteikia informacijos apie sparno pozicijos padėtį. Skėrys turi dvi poras sparnų, taigi turi ir dvi poras sparno vyrio tempimo receptorių. Iš ganglijų išeina dvi poros nervų, kuriomis yra kontroliuojami sparnai. Aksonas iš priekinio sparno vyrio tempimo receptoriaus eina n.1d2 nervine atšaka, toliau eina n.1d, n.6 nervine atšaka ir nueina į prokrūtininį gangliją, o n.1 atšaka nueina į mesakrūtininį gangliją ir yra didžiausias nerviniame kamiene [26]. Nervinė atšaka n.1d eina raumens paviršiumi, taigi atlikus nesudėtingą operaciją, aksonas iš tempimo receptoriaus yra nesunkiai pasiekiamas. Todėl elektrodas eksperimento metu buvo 1 padėtyje, pav. 2. Signalas iš tempimo receptoriaus buvo įrašinėjamas ekstraląsteliniu metodu, todėl tai palengvino eksperimento metodiką, nes įrašinėjant ekstraląsteliniu metodu nereikia tiksliai įsmeigti elektrodo, o pakanka

tik priglauti jį prie aksono. Tempimo receptoriaus generuojami veikimo potencialai yra didelės amplitudės, o tai leidžia išskirti tempimo receptoriaus signalą nuo kitų sensorinių organų signalų [4]. Abiejų porų nervinių kamienų atšakų numeracija sutampa, taigi galinio sparno vyrio tempimo receptoriaus taip pat eina n.1d2, n.1d atšakomis, o n.6 atšaka nueina į mesakrūtininį gangliją, n.1 atšaka nueina į metakrūtininį gangliją.

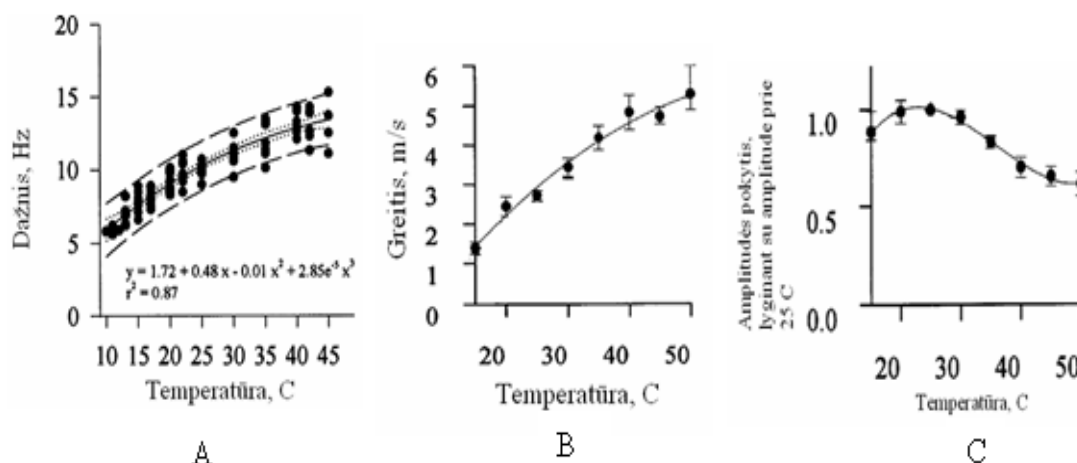


Pav. 2. h-SR, užpakalinio sparno tempimo receptoriaus, f-SR, priekinio sparno tempimo receptoriaus (h-sr ir f-sr sutrumpinimai anglų kalboje). Modifikuota iš [24].

1.3.1 Temperatūros įtaka nervų sistemos veiklai

Skėriai yra poikilotermniai gyvūnai. Poikilotermnių gyvūnų nervų sistema yra daug stipriau įtakojama aplinkos veiksnių nei šiltakraujų gyvūnų. Vienas iš aplinkos veiksnių, kuris turi įtakos poikilotermnių gyvūnų nervų sistemos funkcionavimui, yra temperatūra. Skrydžio metu skėriai negali reguliuoti savo kūno temperatūros, taigi krūtinės ertmės temperatūra pakyla 5-8°C, lyginant su aplinkos [9]. Skėrio krūtininė nervų sistemos dalis gali tinkamai veikti, kai temperatūra yra nuo 24°C iki 42°C [9]. Šiame temperatūros intervale

temperatūros kilimas turi įtakos plasnojimo dažniui (0,3Hz padidėja pakilus tempertūrai 1°C) ir tai yra susiję su centrinio ritmo generatoriaus paveikimu [25]. Pav. 3A pavaizduota deaferentuoto skėrio plasnojimo ritmo priklausomybė nuo temperatūros.

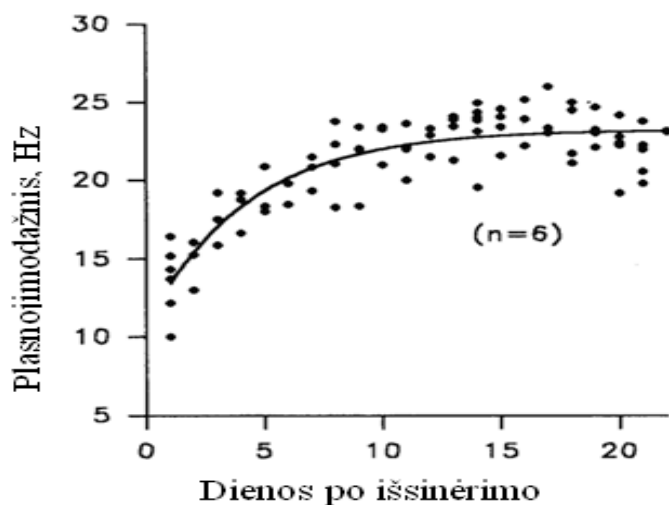


Pav. 3. A: Deaferentuoto skėrio plasnojimo dažnio priklausomybė nuo temperatūros. B: Veikimo potencialo perdavimo greičio priklausomybė nuo temperatūros. C: Veikimo potencialo amplitudės pokytis, lyginant su 25°C amplitude. Modifikuota iš [18].

Taip pat yra žinoma, kad temperatūra įtakoja fSR generuojamų veikimo potencialų sklaidimo greitį ir amplitudę. fSR signalo perdavimo greitis didėja keliant temperatūrą [18], pav. 3B pavaizduota veikimo potencialo sklaidimo greičio priklausomybė nuo temperatūros. fSR generuojamų veikimo potencialų amplitudė padidėja keliant temperatūrą nuo 15°C iki 24°C ir mažėja keliant virš 25°C, pav. 3C. Taigi atliekant eksperimentus svarbu atsižvelgti į galimą temperatūros poveikį.

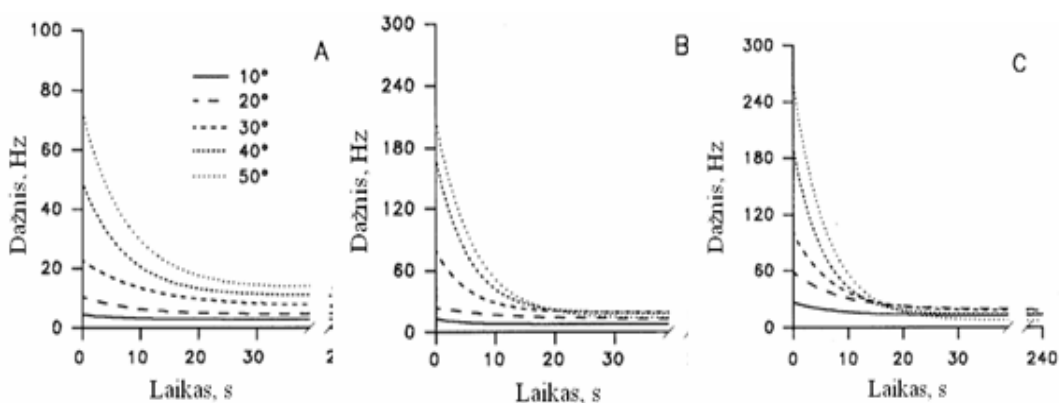
1.3.2 Nervų sistemos aktyvumo pokyčiai bręstant skėriams

Skėriai per gyvenimo ciklą turi tris pagrindines stadijas: kiaušinėlis, ninfa, subrendęs skėrys. Šiose stadijose nervų sistemos išsivystymas yra skirtingas ir net kai ninfa išsineria ir tampa subrendusiu skėriu, nervų sistemos funkcionavimas vis dar kinta. Nervų sistemos vystymasis atsiliepia ir skėrio plasnojimo dažniui skrydžio metu. Per pirmas 2 savaites po išsinerimo, plasnojimo dažnis padvigubėja ir fSR aktyvumas padidėja kaip atsakas į tokio paties intensyvumo stimulą [15]. Pav.4 pavaizduota, kaip kito plasnojimo dažnis po išsinerimo. Plasnojimo dažnis maždaug nuo 13Hz padidėjo per 14 dienų iki 23Hz [14].



Pav. 4. Plasnojimo dažnio kitimas po išsinėrimo. Modifikuota iš [14].

Taip pat bręstant gyvūniui keičiasi ir fSR aktyvumas į tą patį stimulą. Pav. 5 pavaizduota adaptacija fSR aktyvumo į pastovius stimulus, pav. 5A esant skėriui nesubrendusiam, pav. 5B 7 dienų po išsinėrimo, pav. 5C 14 dienų po išsinėrimo. Kaip matome, bręstant signalo dažnis iš fSR didėja. Taip pat yra žinoma apie fSR morfologinius pokyčius. fSR aksono diametro padidėjimas sąlygoja greitesnį signalo perdavimą aksonu subrendusiuose skėriuose nei nesubrendusiuose [14].

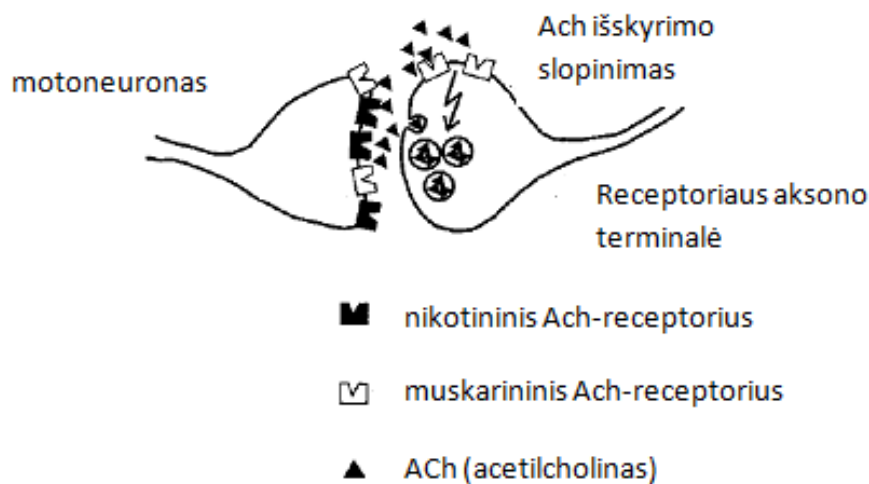


Pav. 5. A: fSR aktyvumo adaptacija į pastovų stimulą, kai skėriai nesubrendę. B: fSR aktyvumo adaptacija į pastovų stimulą, kai skėriai 7 dienų po išsinėrimo. C: fSR aktyvumo adaptacija į pastovų stimulą, kai skėriai 14 dienų po išsinėrimo. Modifikuota iš [14].

Tempimo receptoriaus aksonas turi projekcijas į visus tris ganglijus: prokrutininį, metakrūtininį, mesakrūtininį. Bręstant fSR aksono augimas yra heteromorfinis tarp skirtingų ganglijinių projekcijų ir yra padidėjęs aksono šakojimasis mesakrūtininiame ganglijame [15]. Tai padidina jungčių galimybę su kitais už skrydį atsakingais neuroniais. Taigi, padidėjęs sinapsių skaičius gali padidinti fSR poveikį plasnojimo ritmo centriniam generatoriui. Motorinio ritmo dažnio pakitimai per subrendimą gali būti aiškinami per pasikeitusį propriocepcijos poveikį [13].

1.4 Sparno vyrio tempimo receptoriaus.

Skėriuose sparno tempimo receptoriaus susideda iš jungiamojo audinio pluošto, kuriame yra sensorinis neuronas, jungiamasis audinys jungia sparno atramos tašką su vidine diafragma [40]. Keliant sparną, tempiamas jungiamasis audinys ir sukelia veikimo potencialus sensoriniame neurone. Mosto metu tempimo receptoriaus generuoja 15-20 veikimo potencialų pliūpsnius, kuriuose intervalai tarp veikimo potencialų yra 2 ms arba mažiau [22].

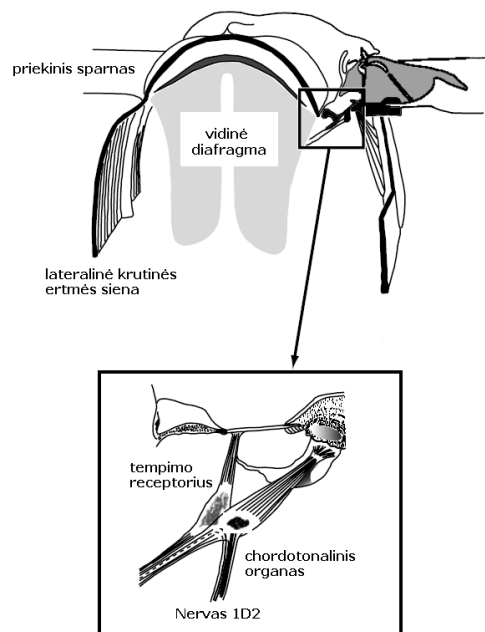


Pav. 6. Neurotransmiterio išskyrimo slopinimo mechanizmas. Išskirtas acetilcholinai į sinapsinį plyšį jungiasi su presinapsinėje membranoje esančiais muskarininiais autoreceptoriais, ko pasekoje, yra slopinamas neurotransmiterio išskyrimas. Modifikuota iš [34].

Skėriuose tempimo receptoriaus formuoja žadinančias sinapses su sparno nuleidžiamųjų raumenų motoneuronais. Tempimo receptoriaus, kaip ir kitų vabzdžių sensoriniai neuronai, yra cholinerginis [20], [34], taigi receptoriaus sinapsėje su motoneuronu

acetilcholiną veikia kaip neurotransmiteris. Kiekvienas sugeneruotas presinaptinis veikimo potencialas įtakoja iki keleto šimtų neurotransmiterio kvantų išskyrimą. Vienas išskirtas neurotransmiterio kvantas įtakoja mažiau nei 0,1mV posinapsinio potencialo [32]. Neurotransmiterio išskyrimas iš tempimo receptoriaus į sinapsę su nuleidžiamųjų raumenų motoneuronu yra moduluojamas presinaptiškai muskarininių autoreceptorių. Pav. 6 pateiktas galimas neurotransmiterio išskyrimo reguliavimo mechanizmas. Išskirtas acetilcholiną į sinapsinį plyšį jungiasi ne tik su posinapsinėje membranoje esančiais receptoriais, bet ir su presinapsinėje membranoje esančiais muskarininiiais autoreceptoriais, ko pasekoje, transmitterio susijungimas su autoreceptoriais slopina neurotransmiterio išskyrimą.

Tempimo receptoriai yra visuose keturiuose skėrio sparnų viršiuose. Pav.7 parodyta receptoriaus vieta skėrio kūne. Tempimo receptorių skrydžio metu atlieka svarbias funkcijas. Viena iš jo funkcijų yra kompensuoti sparno judesio sutrikimus, kuriuos sukelia išoriniai trukdžiai, taip pat tempimo receptorių yra susijęs su fazių aktyvumo skirtingose raumenų grupėse kontroliavimu. Svarbiausia tempimo receptoriaus funkcija - kontroliuoti sparno mostų dažnį [26].



Pav. 7. Tempimo receptoriaus pozicija skėrio kūne. Modifikuota iš [40].

1.5 Mechanoreceptorių įtaka skrydžio kontrolėje

Signalai iš mechanoreceptorių vaidina svarbų vaidmenį judėjimo valdyme. Sparno viršio tempimo receptorių yra intensyviai skėriuose studijuojamas dėl jų didelės

įtakos plasnojimo raumenų motoneuronų ir interneuronų aktyvumui. Signalas iš receptoriaus aktyvumas pasireiškia kylant sparnui į aukštesnes pozicijas. Sparnui plasnojant, tempimo receptoriaus pliūpsniai atsiranda esant sparnui apie aukščiausią sparno pakilimo padėtį ir jis koduoja kinematinis kintamuosius tokius, kaip sparno mosto amplitudė ir sinchronizavimas [12]. Priekinio sparno vyrio tempimo receptorių turi sinapsinę jungtį su motoneuronu m97, kuris inervuoja priekinio sparno nuleidžiamuosius raumenis [37]. Galinio sparno vyrio tempimo receptorių turi jungtį su pirmu bazaliniu m127 motoneuronu. Tempimo receptorių sukelia EPSP su trumpa latencija (4 ms ar mažesnę) nuleidžiamųjų raumenų motoneuronuose [24]. Kitas svarbus receptorių yra tegula. Skrydžio metu tegula receptorių pasižymi aktyvumu, kai sparnas nuleidžiamas žemyn [38]. Tegula receptorių turi jungtį su motoneuronu m83, per jį inervuojami priekinio sparno pakeliamieji raumenys. Galinio sparno tegula turi jungtį su motoneuronu m118. Buvo atrasta, kad fazinis signalas iš tegula receptoriaus yra dalinai atsakingas už sparno pakėlimą, taip pat už sinchronizavimą pakeliamųjų raumenų ir sparno mostų dažnį [6].

Viduje centrinės nervų sistemos yra generavimo mechanizmai, galintys generuoti veikimo potencialus į sparnų nuleidžiamuosius ir pakeliamuosius motoneuronus [4]. Jei sparnų sensoriniai nervai būtų nukirsti, skėrys galėtų duoti ritmiškus signalus skridimo raumenims, bet sumažintu dažniu [4]. Receptorių jungtys veikia neigiamu grįžtamoju ryšiu, sparno pakėlimas jaudina tempimo receptorių, kuris veikia slopinančiai pakeliamuosius motoneuronus ir žadinančiai nuleidžiamuosius motoneuronus [4]. Taigi, sparno nuleidimas jaudina tegula receptorių, kuris veikia žadinančiai pakeliamųjų raumenų motoneuronus ir slopinančiai nuleidžiamųjų raumenų motoneuronus

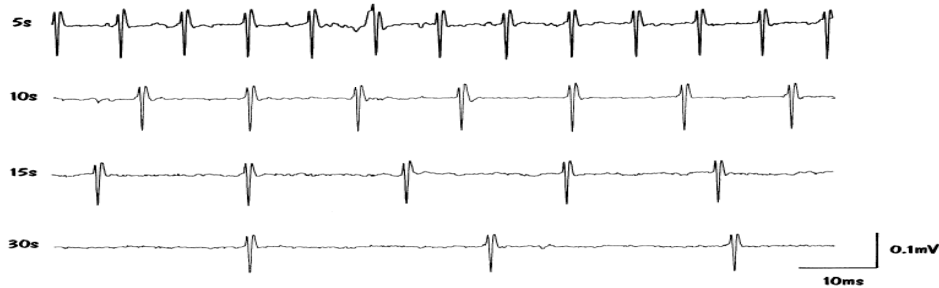
1.6 Sparno pozicijos kodavimas veikimo potencialais

Norint atlikti koordinuotus judesius, reikia, kad nervų sistema turėtų informaciją apie esamą judėjimo organų tikslią padėtį. Apie skėrio sparno poziciją informacija suteikia sparno vyrio tempimo receptorių. Skirtingas sparno padėtis koduojama skirtingo dažnio signalu. Kai sparnas yra horizontalioje padėtyje, tai yra 0^0 , tai signalas iš tempimo receptoriaus yra apie 10 impulsų/s [26]. Keliant sparną į viršų, didėja veikimo potencialų dažnis. Pav. 8 pavaizduoti signalai iš tempimo receptoriaus esant sparnui 10, 20, 30, 40 laipsnių padėtyse. Pav.11 gerai matyti, kad keliant sparną dažnis didėja netiesiškai. Dar yra ir impulsų dažnio adaptacija, todėl koduojant sparno poziciją svarbus yra ir laikas, kuris praėjo, esant sparnui toje pačioje

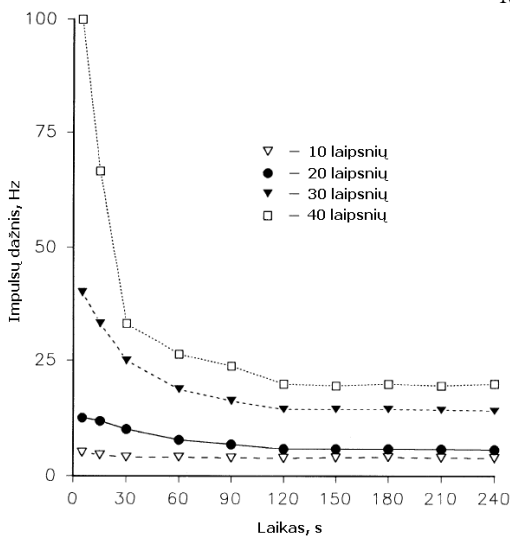
pozicijoje. Pav.9 pavaizduotas signalas iš tempimo receptoriaus, esant sparnui 40 laipsnių padėtyje po 5, 10, 15, 30s. Laikant sparną toje pačioje padėtyje, vyksta adaptacija ir impulsų dažnis mažėja. Kuo didesnis sparno pakėlimo kampas, tuo staigiau vyksta adaptacija. Po kurio laiko impulsų dažnio mažėjimas sulėtėja, tai gerai matyti pav.10.



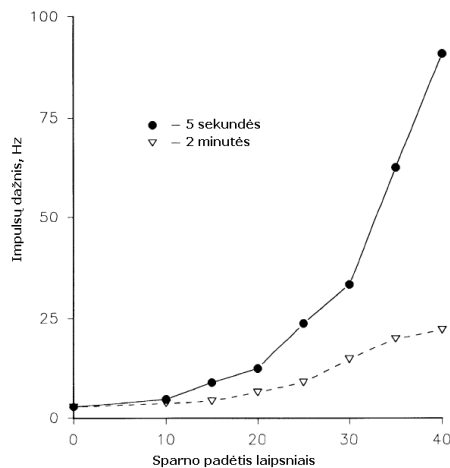
Pav. 8. Signalas iš tempimo receptoriaus, esant 10,20,30,40 laipsnių pakėlimo kampams. Modifikuota iš [26].



Pav. 9. Signalas iš tempimo receptoriaus esant sparnui 40 laipsnių padėtyje po 5,10,15,30 sekundžių. Modifikuota iš [26].



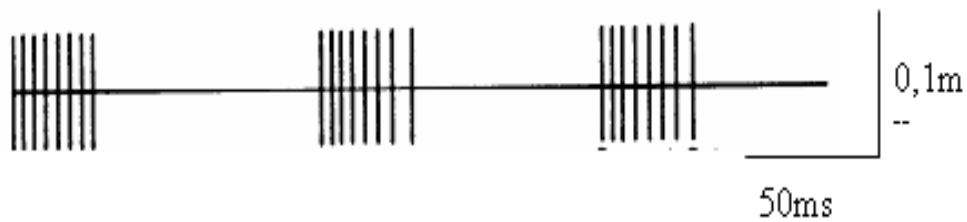
Pav. 10. Skirtingų dažnių signalo adaptacija per 3 minutes. Modifikuota iš [26].



Pav. 11. Signalai esant skirtingoms sparno padėtimis po 5 sekundžių ir po 2 minučių. Modifikuota iš [26].

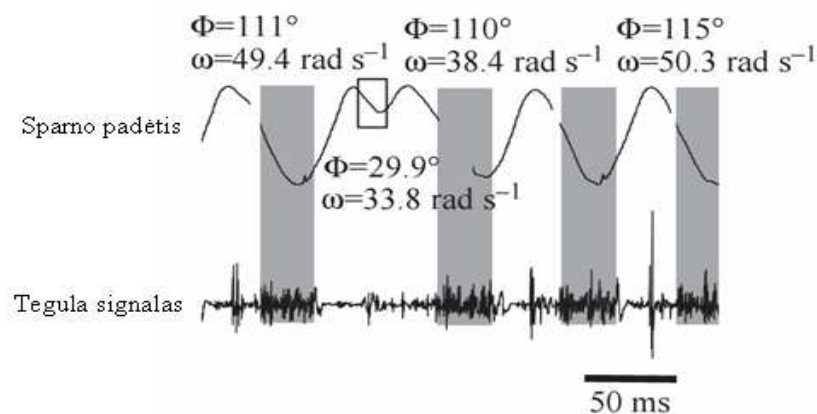
Sparno vyrio tempimo receptoriaus koduoja sparno padėtį ne tik esant pastoviam stimuliui, bet ir skrydžio metu sparnui judant. Tempimo receptoriaus aktyvumas pasireiškia

veikimo potencialų pliūpsniais kiekvieno sparno mosto metu, kai sparnas yra aukščiausioje padėtyje. Signalas iš tempimo receptoriaus, plasnojant sparnui, pavaizduotas pav. 12.



Pav. 12. Signalas iš tempimo receptoriaus, plasnojant sparnui 15 hz dažniu. Modifikuota iš [37].

Veikimo potencialų pliūpsniai suteikia informaciją apie sparno padėtį kiekvieno plasnojimo ciklo metu [7]. Informaciją apie sparno padėtį skrydžio metu taip pat suteikia tegula receptoriaus. Tegula receptoriaus aktyvumas pasireiškia esant sparnui apie žemiausią padėtį, pav. 13. Aktyvumo trukmė ir amplitudė yra susijusi su sparno mosto amplitude [7].

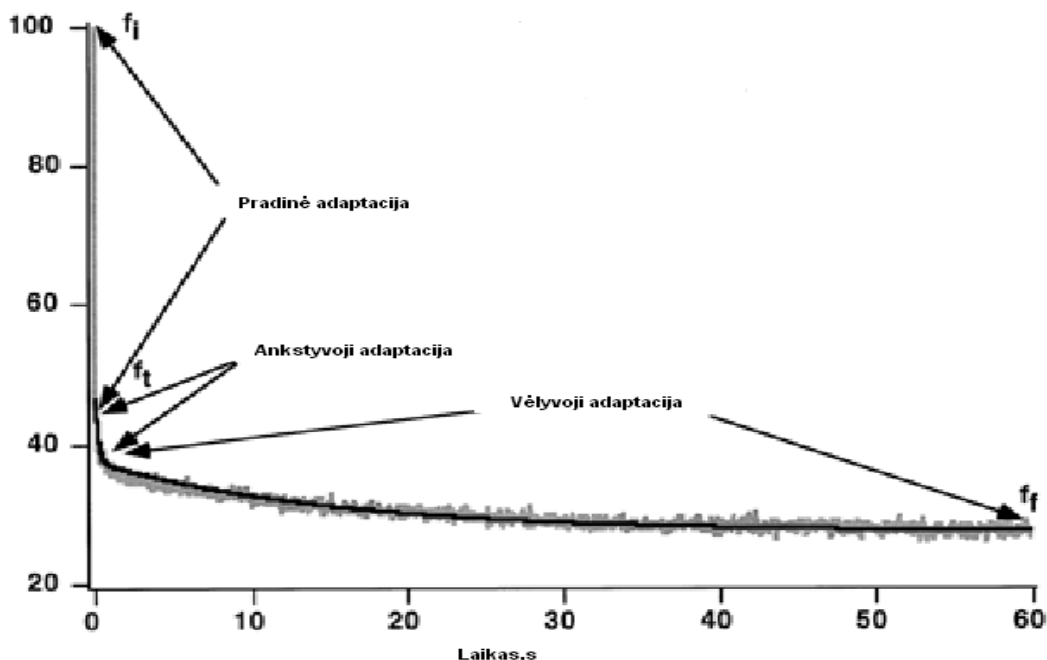


Pav. 13. Tegula receptoriaus aktyvumas plasnojimo metu pažymėtas pilkais stulpeliais. Φ -sparno mosto amplitudė laipsniais. Ω -amplitudė radianais. Modifikuota iš [7].

1.7 Veikimo potencialų dažnio adaptacija

Adaptacija yra veikimo potencialų dažnio mažėjimas, neuroną veikiant pastovaus dydžio stimulu. Veikimo potencialų dažnio adaptacija yra pastebėta beveik visuose neuronuose, kurie generuoja veikimo potencialus. Yra didelė įvairovė mechanizmų atsakingų už veikimo potencialų dažnio adaptaciją. Joninių srovių įtaka ypač svarbi veikimo potencialų dažnio adaptacijoje. Žiurkės hipoglosalinio motoneurono veikimo potencialų dažnio adaptacija turi tris pagrindines fazes: pradinę, ankstyvąją, vėlyvąją [30], pav. 14. Skirtingų tipų neuronai gali pasižymėti ne visomis išvardintomis adaptacijos fazėmis. Pradinė adaptacija yra labai

staigi ir atvaizduojama tiesine funkcija, kuri užsibaigia po kelių pirmų veikimo potencialų. Ankstyvoji ir vėlyvoji adaptacijų fazės aprašomos dviem eksponentinėmis kreivėmis, kurių forma priklauso nuo laiko konstantos τ [31].



Pav. 14. Adaptacijos grafikas žiurkės motoneuronuose, suskirstytas į pagrindines fazes.

Modifikuota iš [30].

Žinoma įvairių adaptacijos mechanizmų. Vienas iš galimų adaptacijos mechanizmų yra M-tipo srovė, kurią sukelia įtampos varstomi aukšto slenksčio kalio kanalai [3]. Kitas adaptacijos mechanizmas, tai AHP srovė, kurią sukelia kalcio valdomi kalio kanalai. Greitoji depoliarizacija veikimo potencialo pradžioje aktyvuoja įtampos varstomus kalcio kanalus, įėję kalcio jonai aktyvuoja kalio jonų kanalus, pro kuriuos išeinantys iš ląstelės kalio jonai sukuria AHP srovę [35]. Taigi, generuojant veikimo potencialus, padidėja ląstelėje kalcio jonų koncentracija, o tai padidina kalio laidumą. Padidėjęs kalio jonų laidumas susijęs su ląstelės hiperpolarizacija ir su veikimo potencialų dažnio mažėjimu. Ilgesnio veikimo potencialų generavimo metu padidėja vidinio kalcio koncentracija, todėl ląstelėje atstatinėjama jonų koncentracija. Vidinės kalcio koncentracijos mažinimas vyksta išstumiant pompų ir surišant viduląstelinius buferiais [27]. Po veikimo potencialo sugeneravimo yra atstatinėjamos jonų koncentracijos tam, kad būtų galima sugeneruoti kitą veikimo potencialą. Natrio įėjimas į ląstelę, veikimo potencialo generavimo metu, aktyvuoja Na-K pompą, kuri atstatinėja Na^+ ir K^+ jonų koncentracijas ląstelėje, tris Na^+ jonus išmesdama iš ląstelės ir du K^+ jonus atnešdama į ląstelę. Taigi, įtakos adaptacijai gali turėti Na/K pompos generuojama išeinanti

srovė, kuri didina ląstelės hiperpolarizaciją [33]. Taip pat adaptaciją gali įtakoti greitųjų Na^+ kanalų bei nuolatinę natrio srovę sukeliančių kanalų inaktyvacija.

Skirtingose adaptacijos fazėse gali veikti skirtingi adaptacijos mechanizmai taip, kaip ir skirtinguose neuronų tipuose. Toje pačioje adaptacijos fazėje gali veikti keli skirtingi adaptacijos mechanizmai. Yra manoma, kad pradinę adaptacijos fazę gali įtakoti mAHP srovė [2], [30], greitų natrio kanalų inaktyvacija [11]. Ankstyvąją fazę gali įtakoti Na/K pompos veikla [10], taip pat greitų Na^+ kanalų inaktyvacija [21], M-tipo srovė [30]. Vėlyvąją fazę gali įtakoti nuolatinės natrio srovės inaktyvacija [39], gali veikti ir tie patys mechanizmai, kaip ir anstyvojoje [30].

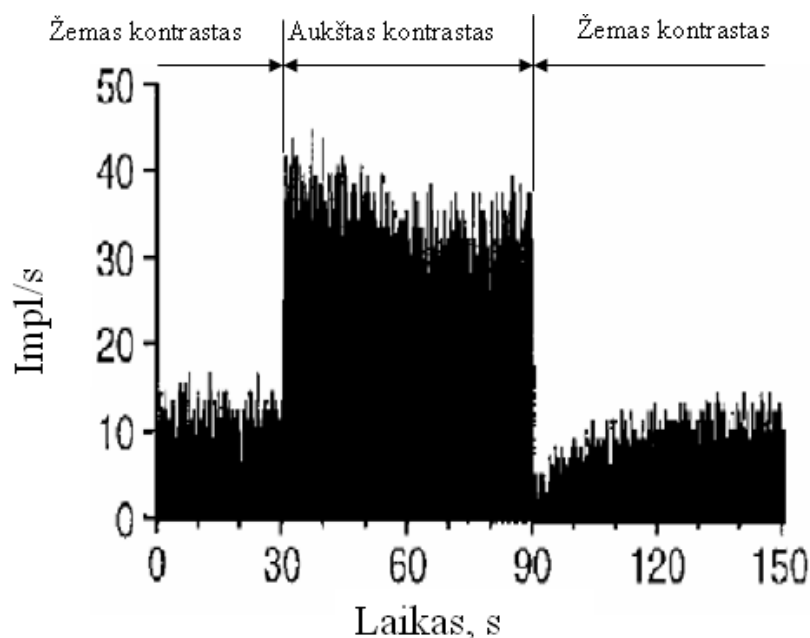
Membranos hiperpolarizacijai didėjant, taip pat didėja ir slenkstis, kurį pasiekus įvyktų veikimo potencialo generacija. Adaptacija neuroną paverčia aukšto slenksčio filtru stimulams [3]. Sumažėjęs veikimo potencialų dažnis turi įtakos motoneuronų sukeliama raumenų aktyvumui.

1.8 Atsistatymas po adaptacijos

Daugeliui neuronų būdingas jautrumo sumažėjimas po intensyvaus stimuliavimo. Kitaip tai vadinama postadaptaciniu slopinimu. Vienas tokių neuronų pavyzdys yra dLGN (dorsalinio lateralinio kelinio branduolio neuronas). Adaptacija į aukšto kontrasto vaizdinį stimulą priveda neuroną prie ląstelės membranos hiperpolarizacijos, o tai daugiausia ir turi įtakos postadaptacinio slopinimo veikimui [29]. Taigi, vykstant adaptacijai ląstelės membrana gali hiperpolarizuotis dėl padidėjusios išeinančios K^+ jonų srovės [5], [19], dėl Ca^{2+} ir Na^+ jonų sukulto K^+ laidumo [28], [23], taip pat ląstelę hiperpolarizuojančią srovę gali generuoti Na/K pompa [23], [17]. Užsitęsusi ląstelės hiperpolarizacija po ląstelės stimuliavimo ir yra postadaptacinio slopinimo pagrindinė priežastis, nes esant hiperpolarizuotai ląstelei pateikus depolarizuojantį stimulą sunkiau pasiekti veikimo potencialo generavimo slenkstį, o tai reiškia ląstelės jautrumo stimulams sumažėjimą [23]. Padidėjusi ląstelės membranos hiperpolarizacija atsistato palaipsniui, kaip ir jautrumas stimului. Taigi, atsistatymas po adaptacijos ir veikimo potencialų dažnio adaptacija yra du to paties proceso pasireiškimai [19]. Kai adaptacija yra K^+ jonų laidumo padidėjimas, tai atsistatymas po adaptacijos yra K^+ jonų laidumo sumažėjimas [19]. Atsistatymas po adaptacijos gali būti nulemtas ne vien ląstelės hiperpolarizacijos sumažėjimo, bet ir depolarizuojančių srovių atsistatymo po inaktyvacijos. Lėtos adaptacijos priežastis gali būti ir

didėjantis inaktyvuotų Na^+ kanalų skaičius [8]. Taigi, ir atsistatymas po adaptacijos bus apspręstas Na^+ kanalų atsistatymo po inaktyvacijos.

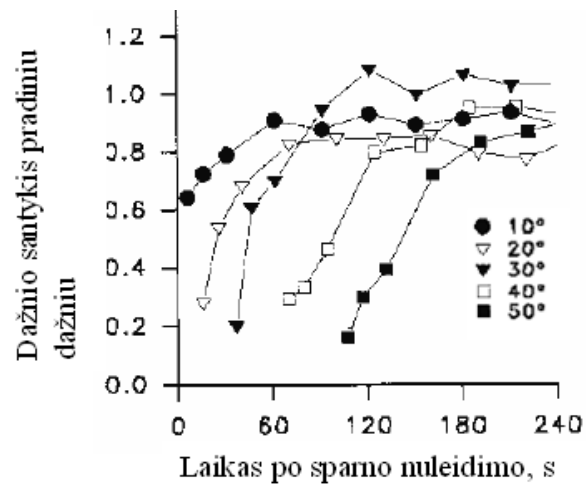
Pav.15 pavaizduota dLGN neurono aktyvumas į pateiktus žemo ir aukšto kontrasto vaizdinius stimulus katėse. Iš pradžių pateikiamas žemo kontrasto stimulus, į jį neuronas atsako tam tikru veikimo potencialų dažniu. Pateikus aukšto kontrasto stimulą dažnis padidėja ir vyksta adaptacija, o vėl pateikus tą patį žemo kontrasto stimulą, neuronas kurį laiką atsako mažesniu dažniu nei atsakydavo prieš adaptaciją. Atsako dažnis palaipsniui didėja ir galiausiai atsistato, o tas laikas, kurį atsako dažnis buvo mažesnis, vadinama postadaptacinio slopinimo trukmė.



Pav. 15. dLGN neurono atsakas į žemo ir aukšto kontrasto stimulus. Modifikuota iš [29].

Skėrio sparno vyrio tempimo receptorių taip pat pasižymi postadaptaciniu slopinimu, tik šiuo atveju stimulo intensyvumas priklauso nuo sparno padėties, tai yra, į kuo aukštesnę padėtį sparnas pakeltas, tuo labiau stimuliuojamas tempimo receptorių. Laikant sparną neutralioje padėtyje tempimo receptorių atsakinėja tam tikru veikimo potencialų dažniu į stimulą, pakėlus sparną dažnis padidėja ir vyksta adaptacija, nuleidus sparną vėl į neutralią padėtį fSR aktyvumas kurį laiką gali nepasireikšti, bet atsiradus pirmam veikimo potencialui palaipsniui atsistato. Pav.16 pavaizduota, kaip atsistato signalo dažnis po sparno nuleidimo iš skirtingų padėčių į neutralią padėtį, po 4 min pakėlimo trukmės. Kaip matome,

po adaptacijos aukštesnėse padėtyse signalo dažnis iš fSR atsistato lėčiau nei po adaptacijos žemesnėse padėtyse.



Pav. 16. Signalo dažnio atsistatymas po sparno nuleidimo iš 10, 20, 30, 40, 50 laipsnių padėčių. Sparnas buvo pakeltas 4 min. Modifikuota iš [14].

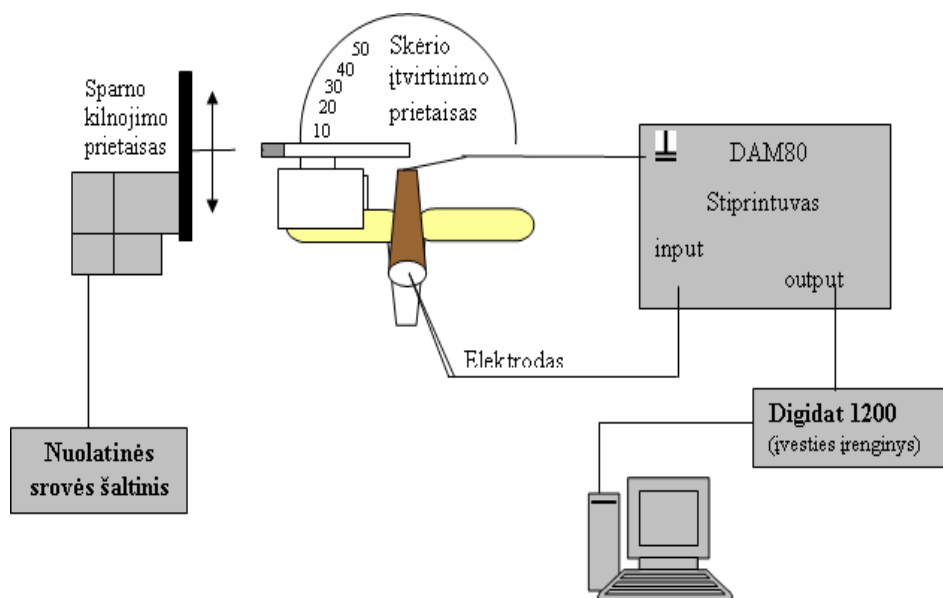
ĮRANGA IR METODAI

2.1 Preparato paruošimas

Eksperimentui skėrys turi būti atitinkamai paruoštas. Skėrys dekapituojamas, nukerpamos visos trys poros kojų, taip pat nukerpami užpakaliniai sparnai, priekiniai sparnai paliekami. Iš krūtinės ertmės pašalinamas nereikalingas tūris, su vata atsargiai pavaloma krūtinės ertmė. Preparatui įtvirtinti prie jam specialaus stovelio naudojami ciano akrilato klijai. Jais preparatas prie stovelio priklijuojamas.

2.1 Eksperimento įranga

Ekstraląsteliniam signalo įrašymui iš tempimo receptoriaus naudojamas sidabro vielos elektrodas, kuris yra izoliuotas stiklu. Šis elektrodas yra sujungiamas su stiprintuvo įėjimu. Naudojamas stiprintuvas DAM 80 (WPI) yra su kintamu stiprinimo koeficientu ir su žemo, aukšto dažnių filtrais. Stiprintuvo stiprinimas nustatytas ties 10000, žemo dažnio filtras nustatytas ties 300 Hz, aukšto dažnio filtras nustatytas tiesa 3 KHz. Kitas sidabro vielos elektrodas, kuris įvestas į pilvą, sujungtas su stiprintuvo žeminiu. Stiprintuvo išėjimas sujungtas su specialiu duomenų įvesties įrenginiu *Digidata 1200* (Axon).



Pav. 17. Eksperimento schema.

Kompiuteryje yra *Clampex10.2* programa duomenims registruoti ir *Origin* bei *Excel* programos duomenims apdoroti. Dalis įrašų buvo užregistruota naudojant *Lab-Trax-4*

duomenų įvesties įrenginį ir *Data-Trax-2* programinę įrangą. Pav.17 pavaizduota eksperimento schema. Skėrio įtvirtinimo prietaise yra laikiklis sparnui išlaikyti pastovioje padėtyje. Laikiklis prijungtas prie svirtelės, kurią kilnojant keičiasi sparno padėtis. Keisti sparno padėtį galima ranka, o imituojant plasnėjimą tai atlieka specialus prietaisas. Šiame prietaise yra nuolatinės srovės variklis, kuris sukdamasis per specialią sistemą priverčia vertikaliai judėti strypelį. Strypelis yra horizontalioje padėtyje, prie jo siūlu pririšamas sparno galas. Kilnojimo prietaiso veikimui naudojamas nuolatinės srovės universalus šaltinis.

2.3. Duomenų registravimas ir apdorojimas

Duomenų registravimui buvo naudojami skėriai, kurie buvo išsinėrę daugiau nei prieš dvi savaites. Visi eksperimentai buvo atlikinėjami kambario temperatūroje (19-21°C). Norint užregistruoti signalą iš tempimo receptoriaus, pirmiausia reikia įsmeigti įžeminimo elektrodą į skėrio pilvelį. Kitas mikroelektrodas stumiamas į pilvo ertmę. Elektrodas priglaudžiamas prie tos pusės sparno nuleidžiamųjų raumenų, kurios pusės sparnas yra užfiksuotas. Priglaustą elektrodą atsargiai judinam išilgai raumens ir stebime signalą. Jeigu elektrodu priartėtume reikiamu atstumu prie aksono, kuris eina iš tempimo receptoriaus, tai ekrane turėtume pamatyti veikimo potencialus. Jei elektrodas būtų tinkamoje vietoje registruoti signalą, tai pakėlus sparną dažnis turėtų padidėti. Jei nepavyksta užregistruoti signalo, tai galima pabandyti užregistruoti signalą iš kito sparno tempimo receptoriaus. Kai jau esame įsitikinę, kad registruojame reikiamą signalą, tada įrašomi signalo atsistatymo po adaptacijos tyrimams reikalingi įrašai. Įrašomas signalas, kai sparnas yra horizontalioje padėtyje, vėliau jis pakeliamas į 40 laipsnių padėtį, ten palaikoma tam tikrą laiką ir nuleidžiama vėl į horizontalią padėtį. Po sparno nuleidimo veikimo potencialų kurį laiką nebūna, o atsiradus atsistatinėja palaipsniui. Užregistruojami įrašai keičiant sparno pakėlimo trukmę. Po kiekvieno įrašo atpalaidavus sparną į natūralią padėtį, laukiama apie 3 minutes, kol atsistatys signalas. Atsidarius įrašus su *Clamfit* programa nustatomi laikai nuo sparno nuleidimo iki atsiradusio pirmo veikimo potencialo.

Pirmo veikimo potencialo atsiradimo ir 50% pradinio dažnio atsistatymo po sparno nuleidimo priklausomybės nuo adaptacijos trukmės lūžio taško radimas.

Pirmiausia nustatomi tiesinių regresijų, einančių per pirmus tris duomenų taškus (1-3 taškai) ir sekančius tris duomenų taškus (3-5 taškus) statumo parametras. Suskaičiuojamas

statumo parametrų pokytis. Sekantys statumo parametrai nustatomi tiesinių regresijų, einančių per 2-4 bei per 4-6 priklausomybės taškus bei suskaičiuojamas statumų skirtumas. Procedūra kartojama slenkant prie sekančio duomenų taško. Lūžio tašku laikomas taškas, per kurį einančios tiesinių regresijų skirtumas didžiausias.

Pradiniams taškams iki lūžio taško pritaikoma tiesė, o tolimesniems nuo lūžio taško pritaikoma eksponentė ir nustatomi jos parametrai. Taip pat tuose pačiuose įrašuose nustatomi laikai, per kuriuos signalas po sparno nuleidimo atsistatė 50 %. Nubraižomas grafikas ir nustatomas lūžio taškas, pirmai grafiko daliai pritaikoma tiesė, antrai pritaikoma eksponentė, nustatomi jos parametrai.

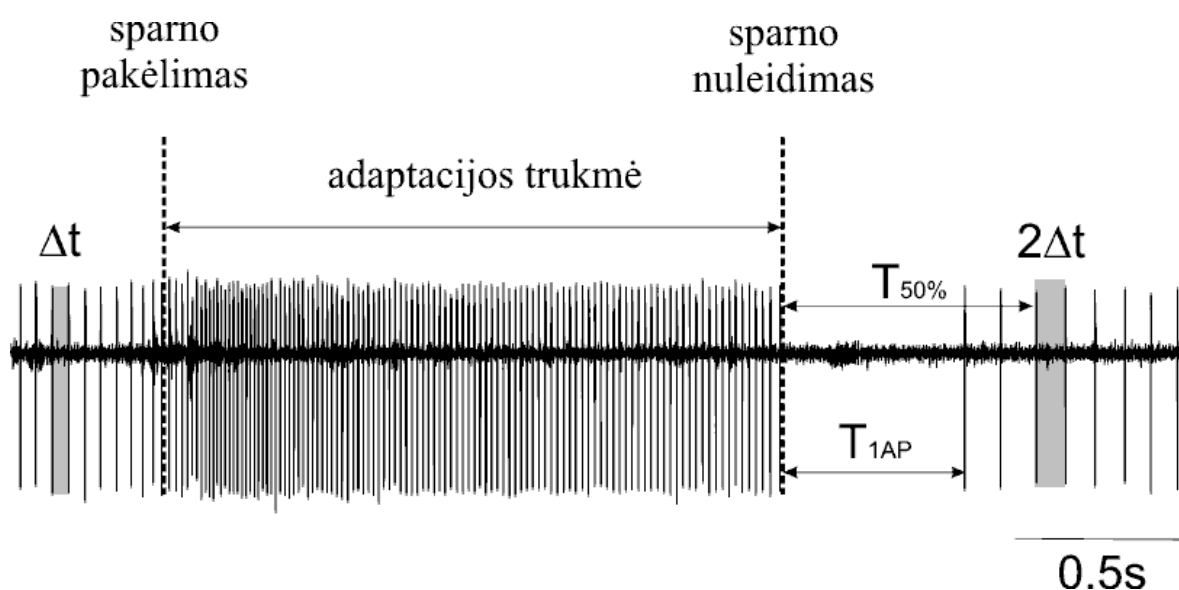
Taip pat buvo įvertinta, kiek veikimo potencialų dažnis adaptuojasi lūžio taškuose. Įrašuose, kurie ilgesni už lūžio tašką, buvo randama veikimo potencialų dažnio priklausomybė nuo sparno pakėlimo laiko, surandamas aukščiausias dažnis pradžioje ir dažnis lūžio taške. Dažnis lūžio taške padalinamas iš aukščiausio dažnio ir padauginama iš 100, taip procentais įvertinama iki kiek adaptavosi dažnis, aukščiausio dažnio atžvilgiu. Veikimo potencialų dažnio adaptacija gerai aproksimuojama dviejų eksponenčių suma [31], taigi, įrašuose, kuriuose adaptacijos laikas ilgiausias, buvo nustatinėjama aproksimacijai naudotų eksponenčių laiko pastoviosios $t1^{ad}$ ir $t2^{ad}$.

Toliau įrašinėjami duomenys plasnojimo tyrimams. Sparno kilnojimo prietaisas yra priderinamas sparnui kilnoti. Sparnas pririšamas prie prietaiso horizontalaus strypelio ir sureguliuojama plasnojimo amplitudė. Plasnojimas vyksta 10 Hz dažniu, apie 30 s, sparno mosto amplitudė nuo -10 laipsnių iki 30 laipsnių. Sparnui plasnojant tempimo receptorius generuoja veikimo potencialų pliūpsnius, kai sparnas yra apie aukščiausią padėtį. Iš užregistruotų plasnojimo duomenų apskaičiuojami veikimo potencialų dažniai pliūpsniuose. Pirmas dažnis yra vienetas padalytas iš laiko skirtumo tarp pirmo ir antro veikimo potencialo. Antras dažnis pliūpsnyje yra vienetas padalytas iš laiko skirtumo tarp antro ir trečio veikimo potencialo ir taip toliau. Atskyrus visus dažnius, nustatomos vertės, kurios bus lyginamos kaip kinta signalo dažniai pliūpsnyje plasnojant 5, 10, 15, 20, 25, 30s. Dažnio vertė tam tikrą plasnojimo sekundę nustatoma apskaičiuojant vidurkį 1s intervale. Duomenų patikimumas buvo tikrinamas poriniu t-testu, duomenys patikimai skiriasi, kai patikimumo lygmuo $p < 0,05$. Rezultatai pateikiami vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

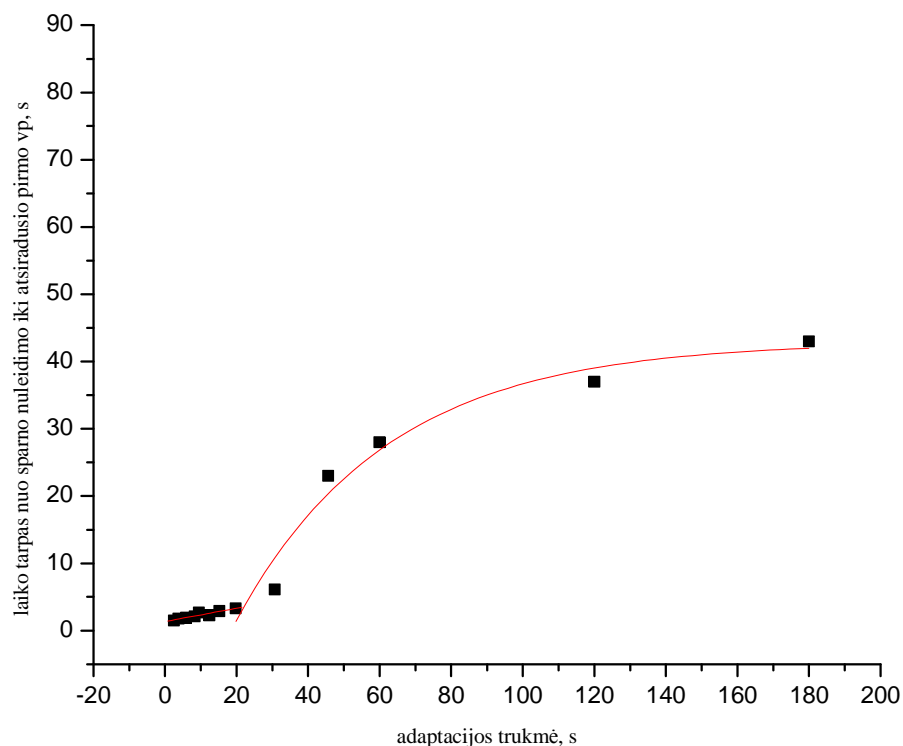
3.1 Atsistatymo po adaptacijos iki pirmo veikimo potencialo tyrimas

Laikant sparną horizontalioje padėtyje signalas iš tempimo receptorių yra apie 10 impl/s, pakėlus sparną į aukštesnę padėtį dažnis padidėja ir adaptuojasi, o nuleidus vėl į horizontalią padėtį, veikimo potencialų kuri laiką nebūna. Atsiradę veikimo potencialai dažnėja ir taip dažnis palaipsniui atsistato. Taigi, pakėlus sparną į aukštesnę padėtį vyksta veikimo potencialų dažnio adaptacija, o nuleidus į horizontalią padėtį vyksta atsistatymas po adaptacijos. Pradžioje signalas buvo registruojamas iš priekinio sparno vyro tempimo receptoriaus, kai sparnas yra horizontalioje (0 laipsnių) padėtyje, tada sparnas pakeliamas į 40 laipsnių padėtį, palaikomas tam tikrą laiką ir nuleidžiamas į horizontalią padėtį, laukiama, kol atsiradęs signalas. Įrašo pavyzdys pav. 18. Laikas, kurį sparnas buvo pakeltas, yra adaptacijos trukmė, o tai ir buvo parametras, kurį mes keitėme. Taigi, mes tyrėme priklausomybę laiko tarpo nuo sparno nuleidimo iki atsiradusio pirmo veikimo potencialo, nuo adaptacijos trukmės.



Pav. 18. Signalas pakeliant sparną iš horizontalios padėties į 40 laipsnių, laikoma tam tikrą laiką ir nuleidžiama. T_{1AP} laiko tarpas nuo sparno nuleidimo iki atsiradusio pirmo veikimo potencialo. $T_{50\%}$ laiko tarpas nuo sparno nuleidimo iki 50% pradinio dažnio atsistatymo. Δt laiko tarpas tarp veikimo potencialų sparnui esant horizontalioje padėtyje. Laiko tarpas tarp dviejų veikimo potencialų atvirkščias dydis dažniui.

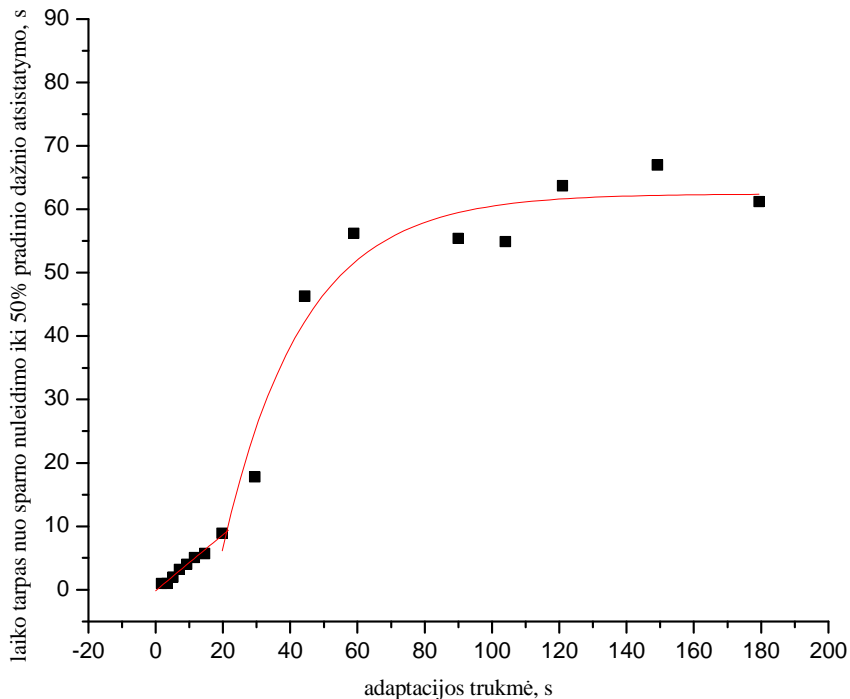
Buvo įrašinėjamas signalas, kai sparnas buvo pakeltas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 180 sekundžių. Įrašuose nustatomas laikas, per kurį po sparno nuleidimo atsirado pirmas veikimo potencialas. Pav. 19 pateikti iš vieno skėrio surinkti duomenys. Kaip matome ilginant adaptacijos trukmę, veikimo potencialo atsiradimo laikas didėja netolygiai. Taškai gerai aproksimuojami tiesės ir eksponentės deriniu, taigi *excel* programos pagalba nustatomas lūžio taškas. Apdorojus visus duomenis nustatyta, kad lūžis įvyksta laikant sparną pakeltą $18 \pm 6,2$ s (n=14). Pirmai grafiko taškų daliai pritaikoma tiesė (*Origin* programos pagalba), kurią aprašo lygtis $y = A+B*x$, ir nustatome jos parametrus. Gautas tiesės statusas $0,143 \pm 0,085$ (minimalus statusas 0,014, maksimalus 0,278), (n=14). Antrai grafiko daliai pritaikome eksponentę, kurią aprašo lygtis $y = A1*\exp(-x/t1) + y0$ ir nustatome jos parametrus. Apdorojus visus duomenis gauta: nusistovėjusį dydį charakterizuojantis parametras $25,7 \pm 20,5$ s (minimalus 2,6 s, maksimalus 45,4 s), eksponentės laiko pastovioji $28,4 \pm 15,9$ s (minimali 8,2 s, maksimali 54,3s), (n=20).



Pav. 19. Pirmo veikimo potencialo atsiradimo po sparno nuleidimo priklausomybė nuo adaptacijos trukmės. Sparnas nuleidinėjamas iš 40 laipsnių padėties į horizontalią. Grafike juodi kvadratėliai tai atidėti duomenų taškai. Raudona spalva iki lūžio taško duomenų taškai aproksimuojami tiese, o tolimesni taškai aproksimuojami eksponente.

3.2 Atsistatymo po adaptacijos iki 50% pradinio dažnio tyrimas

Toliau tyrėme, per kiek laiko atsistato signalo dažnis 50%, priklausomai nuo adaptacijos trukmės. Užregistruotuose įrašuose nustatomas dažnis horizontalioje padėtyje, tada žiūrimas laikas nuo sparno nuleidimo iki tol, kol atsistatys signalo dažnis 50%, lyginant su pradiniu, pav. 18.



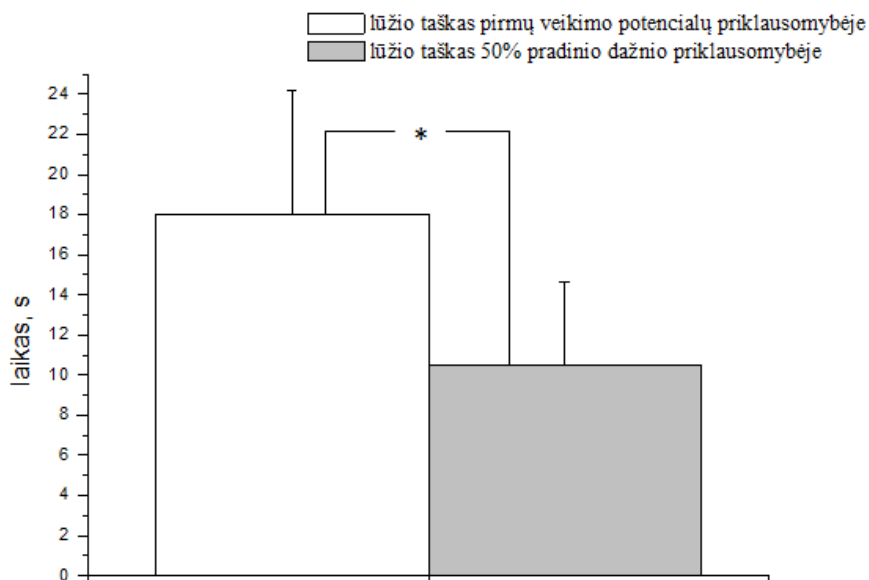
Pav. 20. 50% signalo dažnio atsistatymo priklausomybė nuo adaptacijos trukmės. Sparnas nuleidinėjamas iš 40 laipsnių padėties į horizontalią. Grafike juodi kvadratėliai, tai atidėti duomenų taškai. Raudona spalva iki lūžio taško duomenų taškai aproksimuojami tiese, o tolimesni taškai aproksimuojami eksponente.

Pav. 20 pateikta iš vieno skėrio surinkti duomenys. Kaip matome, laikas, per kurį signalo dažnis atsistato 50% didėja ilginant adaptacijos trukmę. Ilginant adaptacijos trukmę laiko tarpas tarp sparno nuleidimo ir 50% pradinio dažnio atsistatymo taip pat didėja netolygiai. Taškai gerai aproksimuojami tiesės ir eksponentės deriniu, taigi, *excel* programos pagalba nustatomas lūžio taškas. Apdorojus visus duomenis nustatyta, kad lūžis vidutiniškai įvyksta laikant sparną pakeltą $10,5 \pm 4,1$ s, ($n=14$). Pirmai grafiko taškų daliai pritaikome tiesę (*Origin* programos pagalba), kurią aprašo lygtis $y = A+B*x$, ir nustatome jos parametrus. Gautas tiesės statusas $0,557 \pm 0,335$ (minimalus 0,149, maksimalus 1,37), ($n=14$). Antrai grafiko daliai pritaikome eksponentę, kurią aprašo lygtis $y = A1*exp(-x/t1) + y0$ ir nustatome

jos parametrus. Apdorojus visus duomenis gauta: nusistovėjusį dydį charakterizuojantis parametras $79,4 \pm 47,5s$ (minimali 38s, maksimali 222s), eksponentės laiko pastovioji $38 \pm 48,6s$ (minimali 4,3s, maksimali 62,6s), (n=19).

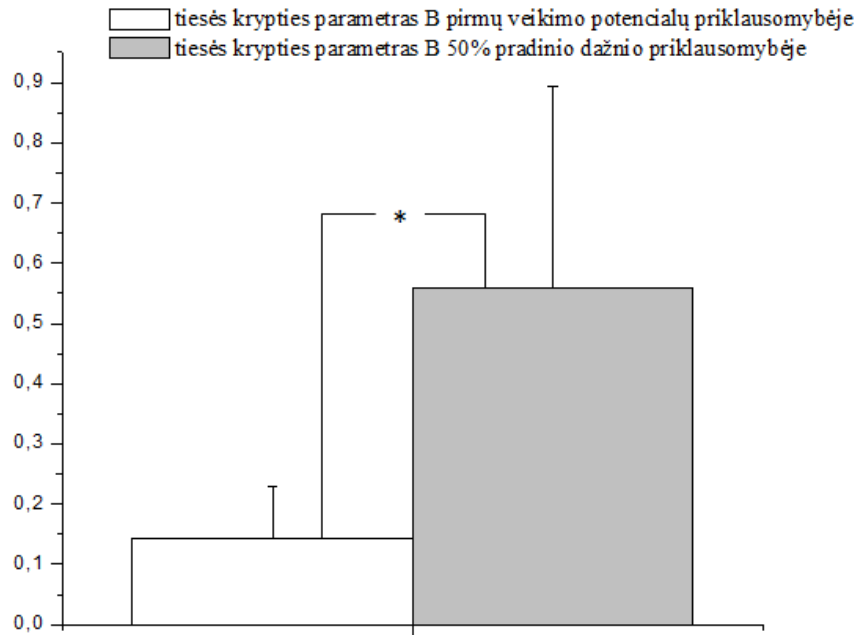
3.3 Pirmo veikimo potencialo atsiradimo ir 50 % pradinio veikimo potencialių dažnio atsistatymo dinamikų palyginimas

Apibendrinant šiuos atsistatymo po adaptacijos tyrimus, galime palyginti gautus parametrus, tiriant pirmo veikimo potencialo atsiradimą ir 50% pradinio dažnio atsistatymą po sparno nuleidimo. Pirmiausia buvo nustatyti lūžio taškų vidurkiai, pirmo veikimo potencialo tyrime tai buvo 18s, o 50% pradinio dažnio tyrime 10,5s, pav.21. Pirmo veikimo potencialo priklausomybės lūžis įvyksta patikimai vėliau nei 50% pradinio dažnio priklausomybės.



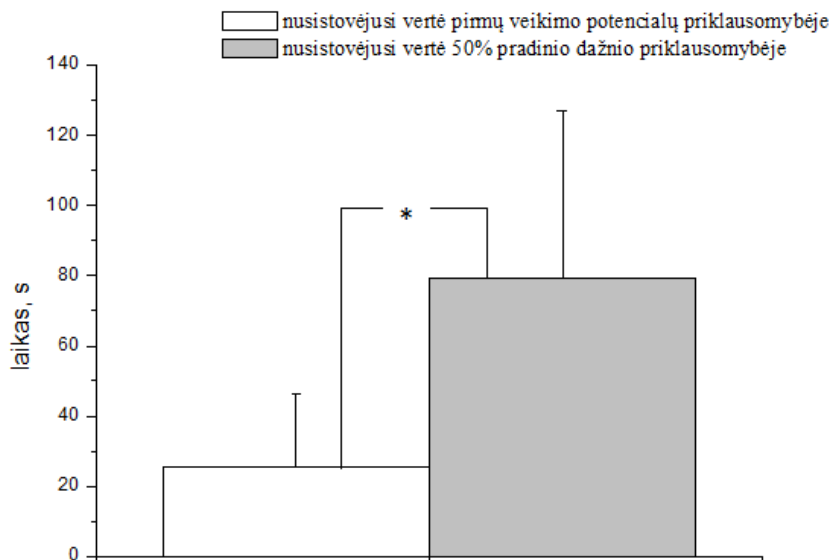
Pav. 21. Lūžio taškų vidurkiai pirmų veikimo potencialų tyrime ir 50% pradinio dažnio tyrime. Lūžio taškas pirmų veikimo potencialų priklausomybėje įvyksta patikimai vėliau nei 50% pradinio dažnio priklausomybėje.

Toliau buvo nustatyta tiesės krypties parametrų B vidurkis, pirmo veikimo potencialo tyrime tai buvo 0,143, o 50% pradinio dažnio tyrime 0,557, pav.22. Tiesės krypties parametras pirmo veikimo potencialo grafikuose yra patikimai mažesnis nei 50% pradinio dažnio grafikuose.



Pav. 22. Tiesės krypties parametro B vidurkiai pirmų veikimo potencialų tyrime ir 50% pradinio dažnio tyrime. Pirmo veikimo potencialo grafikuose tiesės krypties parametras patikimai mažesnis nei 50% pradinio dažnio grafikuose.

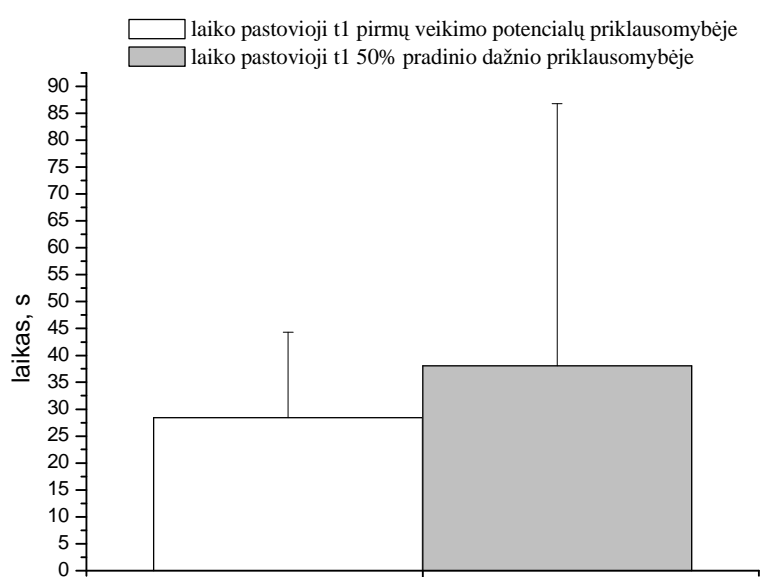
Kitas parametras, kuris yra lyginamas abiejuose tyrimuose, tai yra eksponenčių naudotų aproksimacijai nusistovėjusios vertės Y_0 vidurkiai. Pirmo veikimo potencialo atsistatymo tyrime naudotų aproksimacijai eksponenčių nustovėjusios vertės vidurkis yra $Y_0=25,7s$, o 50% pradinio dažnio tyrime $Y_0=79,4s$, pav.23. Nusistovėjusi vertė pirmo veikimo potencialo grafikuose patikimai mažesnė, 50% pradinio dažnio grafikuose.



Pav. 23. Eksponenčių naudotų aproksimacijai nusistovėjusių verčių Y_0 vidurkiai pirmų veikimo potencialų tyrime ir 50% pradinio dažnio tyrime. Nusistovėjusi vertė pirmo veikimo potencialo grafikuose patikimai mažesnė, 50% pradinio dažnio grafikuose.

Dar palyginame aproksimacijai naudotų eksponenčių t_1 vertes. Pirmo veikimo potencialo tyrime $t_{1\text{vid}}=28,4\text{s}$, o 50% pradinio dažnio tyrime $t_{1\text{vid}}=38\text{s}$, pav.24. Nors vidutinės vertės truputį skiriasi, patikrinus poriniu t-testu duomenų patikimumą, nenustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pirmo veikimo potencialo ir 50% signalo dažnio atsistatymo tyrimuose nustatytų t_1 verčių.

Kaip matome, parametras t_1 , kuris nusako eksponentės formą, yra panašus abiejuose tyrimuose, tai rodo, kad atsistatymas po adaptacijos iki pirmo veikimo potencialo ir 50% pradinio dažnio eksponentinė dalis gali būti apspręstas to paties proceso.



Pav. 24. Eksponenčių naudotų aproksimacijai laiko pastoviosios t_1 vidurkiai pirmų veikimo potencialų tyrime ir 50% pradinio dažnio tyrime. Duomenys patikimai statistiškai nesiskiria, patikrinta poriniu t-testu.

3.4 Adaptacijos lūžio taškuose tyrimas

Atsistatymo po adaptacijos iki pirmo veikimo potencialo ir 50% pradinio dažnio priklausomybėse nuo adaptacijos trukmės tyrimuose buvo nustatyti lūžio taškai, taigi, buvo nuspręsta įvertinti, kiek receptorių būna adaptavęsis per tiek laiko, kol įvyksta lūžis atsistatyme po adaptacijos. Dažnio įvertinimui buvo naudojami įrašai, ilgesni už tam receptoriui būdingus lūžio taškus. Buvo įvertinta, kiek dažnis adaptavosi lūžio taškuose, nustatytuose atsistatymo iki pirmo veikimo potencialo ir 50% pradinio dažnio tyrimuose. Nustatyta, kad pirmo veikimo potencialo atsistatymo lūžio taške dažnis adaptavosi iki 24,5

$\pm 7,8\%$ aukščiausio dažnio. 50% pradinio dažnio atsistatymo lūžio taške adaptavosi iki $36,4 \pm 8,5\%$ aukščiausio dažnio, $n=14$.

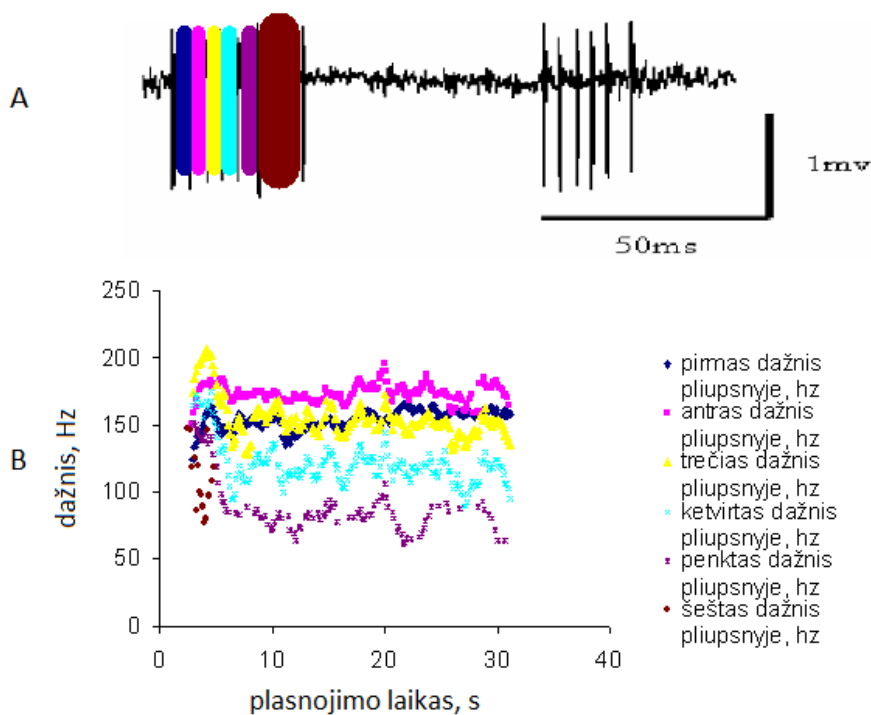
Laikant sparną pakeltą veikimo potencialų dažnis adaptuojasi, o dažnio adaptacija gerai aproksimuojama dviejų eksponenčių suma, kurias aprašo lygtis $y = A1 \cdot \exp(-x/t1) + A2 \cdot \exp(-x/t2) + y0$. Nustatyta dažnio adaptaciją aproksimuojančių eksponenčių laiko pastoviosios $t1^{ad}=5,8 \pm 2,5s$ ir $t2^{ad}=25,8 \pm 11,2s$, ($n=8$). Toliau buvo skaičiuojama, kiek praėjo laiko pastoviųjų $t1^{ad}$ ir $t2^{ad}$ verčių iki lūžio taškų. Gauta, kad praeina $3,5 \pm 1,6 t1^{ad}$ ir $0,6 \pm 0,2 t2^{ad}$ verčių iki lūžio taško nustatyto pirmo veikimo potencialo atstatymo tyrime, $1,9 \pm 1 t1^{ad}$ ir $0,32 \pm 0,11 t2^{ad}$ verčių iki lūžio taško nustatyto 50% pradinio dažnio atsistatymo tyrime, ($n=8$). Kaip žinome, praėjus trims laiko pastoviosioms eksponentė pasiekia daugiau kaip 90% nusistovėjusios vertės. Taigi, atsistatymo priklausomybėse nuo adaptacijos trukmės, lūžis atitinka perėjimą tarp pirmos ir antros adaptacijos fazių. Be to, galima manyti, kad atsistatymo priklausomybės dalis iki lūžio taško, yra daugiausia tų mechanizmų poveikio atstatymas, kurie veikė pirmos eksponentės aproksimuotoje adaptacijos dalyje. Laiko pastovioji gauta aproksimuojant dažnio adaptaciją $t2^{ad}=25,8 \pm 11,2s$, laiko pastovioji gauta aproksimuojant duomenis atsistatymo iki pirmo veikimo potencialo tyrime $t1=28,4 \pm 15,9 s$ ir atsistatymo iki 50% pradinio dažnio tyrime $t1=38 \pm 48,6s$ yra panašios eilės ir statistiškai patikimai nesiskiria ($p=0,36$ bei $p=0,3$). Taigi, galima daryti prielaidą, kad adaptacija aproksimuota antros eksponentės ir atsistatymo po adaptacijos grafikuose priklausomybės dalis esanti toliau nuo lūžio taško apspręsta to paties mechanizmo.

3.5 Adaptacijos plasnojant tyrimas

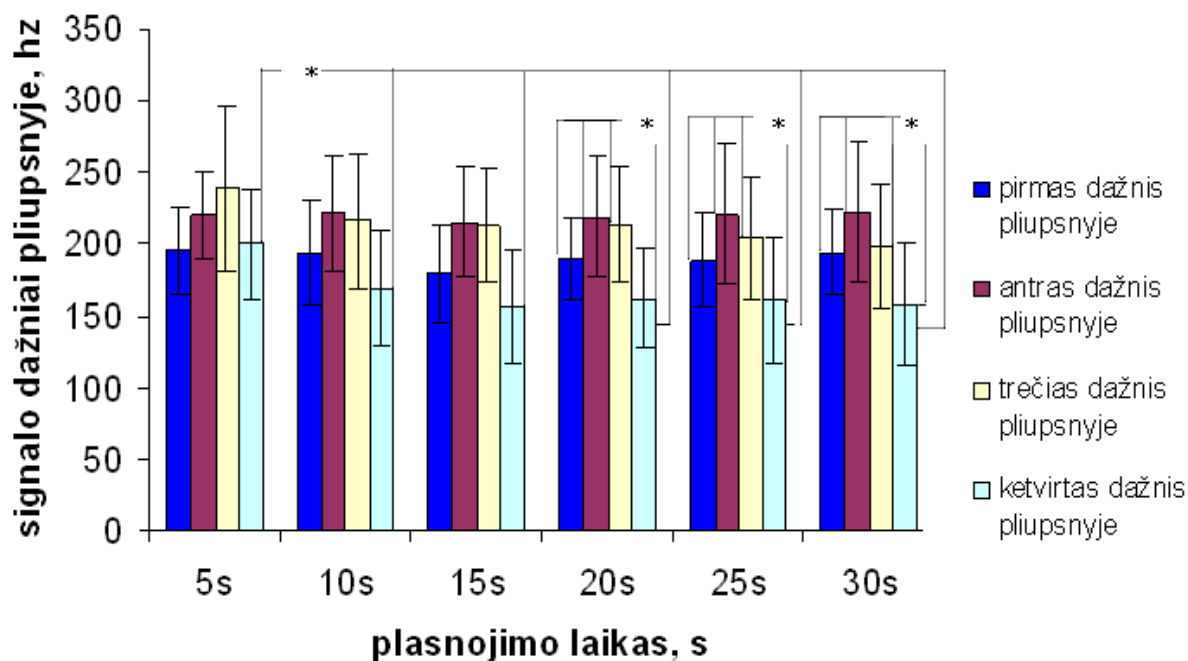
Ankstesniuose tyrimuose buvo tirta, ar vyksta signalo iš tempimo receptoriaus adaptacija sparnui plasnojant ir buvo nustatyta, kad imant vidutinį dažnį pliūpsnyje, jis mažėja sparnui plasnojant. Taigi, įdomu, kaip paveikia adaptacija atskirus dažnius pliūpsnyje.

Toliau tyrėme, kaip vyksta adaptacija signalo iš tempimo receptoriaus sparnui plasnojant. Sparnas buvo plasnojamas 10 HZ dažniu, apie 30s, sparno padėtis kito nuo -10 laipsnių iki 30 laipsnių. Duomenys buvo registruojami iš 4 skėrių.

Užregistravus receptoriaus signalą plasnojimo metu (pav. 25A pateiktas įrašo pavyzdys) apskaičiuojami veikimo potencialų dažniai pliūpsniuose. Viename pliūpsnyje yra 7 veikimo potencialai, tai pav. 25B pavaizduota šešių dažnių kitimas laike sparnui plasnojant. Kaip matome, kai kurie dažniai laike kinta, paskutiniai du atsiranda vis rečiau ir visai išnyksta, todėl kad signalas adaptuojasi ir sumažėja veikimo potencialų skaičius pliūpsnyje.



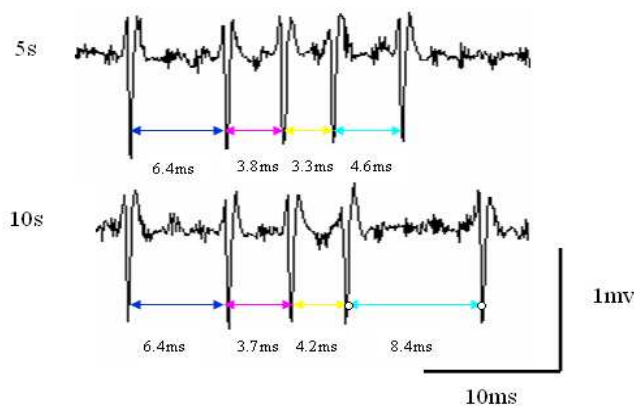
Pav. 25. A: Signalas iš tempimo receptoriaus plasnojant sparną. B: Skirtingomis spalvomis pavaizduota dažnių pliūpsnyje kitimas sparnui plasnojant.



Pav. 26. Signalas dažniai pliūpsnyje plasnojant sparną 5, 10, 15, 20, 25, 30s

Pirmiausia tyrėme, kaip kinta pirmas dažnis pliūpsnyje. Pav. 26 mėlynai pavaizduoti pirmo dažnio vidurkiai iš 1 sekundės intervalo plasnojant sparną 5, 10, 15, 20, 25,

30 sekundes. Palyginus šiuos vidurkius nenustatėme, kad jie reikšmingai kistų, o tai reiškia, kad pirmas dažnis nekinta laike sparnui plasnojant. Palyginus antro dažnio vidurkius taip pat nenustatėme, kad jie reikšmingai kistų. Toliau tyrėme, kaip kinta trečias dažnis pliūpsnyje sparnui plasnojant. Pav. 26 gelsvai pavaizduoti trečio dažnio vidurkiai iš 1 sekundės intervalo plasnojant sparną 5, 10, 15, 20, 25, 30 sekundes. Kaip matome, plasnojant trečiasis dažnis pliūpsnyje mažėjo, bet tai nebuvo statistiškai reikšmingi skirtumai. Ketvirto dažnio mažėjimas pastebimas labiau, pav.26 žydri stulpeliai. Patikrinus duomenų patikimumą nustatyta, kad vidutiniai dažniai plasnojant sparną 30, 25, 20, 15, 10 sekundžių patikimai mažesni nei 5 sekundes. Dėl greito penkto ir šešto dažnių išnykimo, jų vidurkių nelyginome. Taigi, gauti rezultatai rodo, kad sparnui plasnojant veikimo potencialų pliūpsniuose daugiau kinta vėlesni dažniai nei ankstesni. Pav. 27 pavaizduota veikimo potencialų pliūpsniai plasnojant sparną 5 ir 10s. Kaip matome, akivaizdžiai kinta tik paskutinis intervalas tarp veikimo potencialų. Iš gautų rezultatų galime padaryti išvadą, kad sparnui plasnojant adaptacija vyksta, tačiau pirmųjų interspaikinių intervalų pliūpsnyje adaptacija neįtakoja, o kinta tik paskutiniai.



Pav. 27. Veikimo potencialų pliūpsniai plasnojant sparną 5 ir 10s. Kaip matome du pirmi laiko intervalai tarp veikimo potencialų beveik nesiskiria, tolimesni du skiriasi.

IŠVADOS

- Pirmo veikimo potencialo atsiradimo bei 50% pradinio signalo dažnio atsistatymo po sparno nuleidimo priklausomybės nuo adaptacijos trukmės gerai aprašomos tiesės ir eksponentės deriniu.
- Atsistatymo priklausomybėse nuo adaptacijos trukmės, lūžis atitinka perėjimą tarp pirmos ir antros adaptacijos fazių.
- Sparnui plasnėjant, dėl adaptacijos labiausiai pailgėja paskutiniai intervalai, tarp veikimo potencialų, pliūpsnyje.

Skèrio sparno vyrio tempimo receptoriaus adaptacijos tyrimas.

O. Kaminskas
Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas,
Biochemijos ir biofizikos katedra.

Santrauka

Yra žinoma, kad sparno vyrio tempimo receptoriaus signalas esant sparnui pastovioje padėtyje pasižymi adaptacija. Vykstant adaptacijai mažėja receptoriaus jaudrumas, o nuleidus sparną jaudrumas atsistato ne iškart, o palaipsniui. Todėl mes kiekybiškai tyrėme, kaip priklauso receptoriaus signalo dažnio atsistatymas nuo adaptacijos trukmės. Buvo nustatyta, kad atsistatymo po adaptacijos priklausomybės nuo adaptacijos trukmės gerai aproksimuojamos tiesės ir eksponentės deriniu ($n=14$).

Skrydžio metu sparnas periodiškai juda, taigi, svarbu žinoti, kaip elgiasi tempimo receptoriaus dinaminiam režimui. Ekstraląsteliniu įrašymo metodu registruojame signalą iš tempimo receptoriaus sparnui plasnojant ($n=4$) ir tyrėme, kaip kinta veikimo potencialų pliūpsniai sparnui plasnojant. Nustatėme, kad sparnui plasnojant adaptacija labiausiai pailgina intervalus, tarp paskutinių veikimo potencialų, pliūpsnyje.

Investigation of adaptation in locust wing stretch receptor .

O. Kaminskas

Vilnius University, Faculty for Natural Sciences

Department of Biochemistry and Biophysics

Summary

It is known that locust wing stretch receptor exhibit firing frequency adaptation when forewing is lifted to a constant position. Adaptation reduces excitability of stretch receptor. The recovery of stretch receptor from adaptation is gradual. The recovery of locust wing stretch receptor from adaptation was investigated. We found that dependence of recovery from adaptation on the duration of adaptation consists of two phases: an initial linear and following exponential one (n=14).

During flight wing periodically moves and receptor's response properties in dynamic mode may differ from static one. We recorded the response from *locusta migratoria* forewing stretch receptor while wing was periodically lifted (n=4) and investigated an adaptation in dynamic mode. We found that in dynamic mode an adaptation mostly prologs the last interspike interval in the burst.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Baker PS, Gewecke M, Cooter RJ (1981) The natural flight of the migratory locust, *Locusta migratoria* L.111. Wing-beat frequency, flight speed and amplitude. *J Comp Physiol* 141: 233-237
2. Baldissera F, Gustafsson B, Parmiggiani F. Saturating summation of the afterhyperpolarization conductance in spinal motoneurons: a mechanism for 'secondary range' repetitive firing. *Brain Res.* 1978 May 5;146(1):69-82
3. Benda J, Herz AVM (2003) A universal model for spike-frequency adaptation. *Neural Comput* 15: 2523-2564.
4. Burrows M. Monosynaptic connexions between wing stretch receptor and flight motoneurons of the locust. *J. exp. Biol.* (1975), 62, 189-219.
5. Brodwick M S, Junge D. Post-stimulus hyperpolarization and slow potassium conductance increase in aplysia giant neurone. *J. Physiol.* (1972).
6. Fischer H., Ebert E. Tegula function during free locust flight in relation to motor pattern, flight speed and aerodynamic output. *J. exp. Biol.* 202, 711-721 (1999).
7. Fischer H, Wolf H, Buschges A. The locust tegula: kinematic parameters and activity pattern during wing stroke. *J. exp. Biol.* 205, 1531-1545(2002).
8. Fleidervish I A, Friedman A, Gutnick M J. Slow inactivation of Na⁺ current and slow cumulative spike adaptation in mouse and guinea-pig neocortical neurones in slices. *J Physiol.* (1996).
9. Foster J A, Robertson R M. Temperature dependency of wing-beat frequency in intact and deafferented locusts. *J. exp. Biol.* (1992).
10. French A S. Ouabain selectively affects the slow component of sensory adaptation in an insect mechanoreceptor. *Brain Res.* 504: 112–114, 1989
11. French A S. Two components of rapid sensory adaptation in a cockroach mechanoreceptor neuron. *J. Neurophysiol.* (1989).
12. Frye M A. Effects of stretch receptor ablation on the optomotor control of in the hawkmoth *Manduca sexta*. *J. exp. Biol.* 204, 3683-3691(2001).
13. Gee C E, Robertson R M. Effects of maturation on synaptic potentials in the locust flight system. *J. Comp. Physiol.*(1994).
14. Gray J R, Robertson R M. Activity of the forewing stretch receptor in immature and mature adult locusts. *J. Comp. Physiol* (1994).

15. Gray J R, Robertson R M. Structure of the Forewing Stretch Receptor Axon in Immature and Mature Adult Locusts. *The journal of comparative neurology* (1996).
16. Hedwig B, Becher G. Forewing movements and intracellular motoneurone stimulation in tethered flying locusts. *J Exp Biol* 201: 731–744, 1998.
17. Holloway S F, Poppele R E. Post-tetanic hyperpolarization evoked by depolarizing pulse in crayfish stretch receptor neurones in tetrodotoxin. *J. Physiol.* (1984).
18. John R. Gray, R. Meldrum Robertson. Effects of heat stress on axonal conduction in the locust flight system. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. (1997).
19. Jones B R, Thompson S H. Mechanism of postinhibitory rebound in molluscan neurons. *Amer. Zool.*(2001).
20. Leitch B, Pitman R M. Modulation of transmitter release from the terminals of the locust wing stretch receptor neuron by muscarinic antagonists. *Journal of Neurobiology*, (1995).
21. Miles G B, Dai Y, Brownstone R M. Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J. Physiol.* (2005).
22. Möhl, B. The role of proprioception in locust flight control.II. Information signalled by forewing stretch receptor during flight. *J. Comp. Physiol.* (1985). A 156, 103-116.
23. Parker D, Hill R, Grillner S. Electrogenic pump and a Ca⁺ dependent K⁺ conductance contribute to a posttetanic hyperpolarization in lamprey sensory neurons. *J. Neurophysil.* (1996).
24. Pearson KG, Reye DN. Projections of the Wing Stretch Receptors to Central Flight Neurons in the Locust. *J Neuroscience.* 1987; 7(9): 2476-2487.
25. Robertson R M. Modulation of neural circuit operation by prior environmental stress. *Comp. Biol.* (2004).
26. Robertson R M. Sensory adaptation: extracellular recording from locust wing hinge stretch receptor. *Am J Physiol.*1992; 263: S7-S11.
27. Sah P. Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* 1996 Apr; 19(4):150-154.
28. Sanchez-Vives M V, Nowak L G, McCormick D A. Cellular mechanisms of long-lasting adaptation in visual cortical neurons *In Vitro*. *The Journal of Neuroscience* (2000).
29. Sanchez-Vives M V, Nowak L G, McCormick D A. Membrane mechanisms underlying contrast adaptation in cat area 17 *in vivo*. *J neurosci* (2000).

30. Sawczuk A, Powers R K, Binder M D. Contribution of outward currents to spike adaptation in hypoglossal motoneurons of the rat. *J Neurophysiol.* 1997;78: 2246-2253.
31. Sawczuk A, Powers R K, Binder M D. Spike frequency adaptation studied in hypoglossal motoneurons of the rat. *J Neurophysiol.* (1995).
32. Simmons P J. Intrinsic noise at synapses between a wing hinge stretch receptor and flight motor neurons in the locust. *J. Exp. Biol.*(2001)
33. Sokolove P G, Cooke I M. Inhibition of impulse activity in a sensory neuron by an electrogenic pump. *J Gen Physiol.* (1971).
34. Torkkeli P, Panek I. Neuromodulation of arthropod mechanosensory neurons. *Micros. Res. Tech.* 58:299-311 (2002).
35. Viana F, Bayliss D A, Berger A J. Multiple potassium conductances and their role in action potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol.* (1993).
36. Wilson D M. The central nervous control of flight in a locust. *J. Exp. Biol.* (1961).38: 471-490.
37. Wolf H, Pearson K G. Proprioceptive input patterns elevator activity in the locust flight system. *J. Neurophysiol.* (1988). 59, 1831–1853.
38. Wolf H. The locust tegula: significance for flight rhythm generation, wing movement control and aerodynamic force production. *J. exp. Biol.* 182, 229–253 (1993).
39. Zeng J, Powers R K, Newkirk G, Yonkers M, Binder D. Contribution of persistent sodium currents to spike-frequency adaptation in rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* (2004).
40. Frye, M. A., J. Gray. Mechanosensory integration for flight control in insects. In *Advances in Insect Sensory Neuroscience*, ed. T.Christensen, series *Methods and New Frontiers in Neuroscience*. 2005; CRC Press.
41. Robertson R M. Locust flight. In: *Encyclopedia of Neuroscience*, 3rd Edition. Ed. G. Adelman and B. Smith. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. (2004).
42. Kaminskas O. Skėrio sparno vyrio tempimo receptoriaus signalo kodavimo tyrimas dinaminiame rėžime. *Bakalaurinis darbas*. Vilniaus universitetas, GMF, Biochemijos ir biofizikos katedra. 2007.