

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Neurobiologijos studijų programos II kurso studentas

Pavel Korabliov

Magistrinis darbas

**SKÈRIO SPARNO VYRIO TEMPIMO RECEPTORIAUS
DINAMIKOS TYRIMAS**

Darbo vadovas

Doc.Dr. A. Alaburda

Vilnius 2011

SKĖRIO SPARNO VYRIO TEMPIMO RECEPTORIAUS DINAMIKOS TYRIMAS

Darbas atliktas Vilniaus Universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir Biofizikos katedroje, Neurobiologijos laboratorijoje

Pavel KORABLIOV

/parašas/

Darbo Vadovas:

Doc.Dr. A. Alaburda

/parašas/

Recenzentas:

Doc.Dr. V. Sakalauskas

/parašas/

TURINYS

Įvadas.....	4
1. Literatūros apžvalga.....	5
1.1. Skèrys.....	5
1.2. Skèrys keleivis (<i>Locust migratoria</i>).....	6
1.3. Skèrio nervų sistema.....	6
1.4. Skèrio skrydis.....	9
1.5. Proprio ir pusiausvyros receptoriai.....	10
1.6. Skèrio vyrio tempimo receptoriaus tyrimai.....	11
1.7. Veikimo potencialų dažnio adaptacijos ir atsistatymo mechanizmai.....	13
2. Tyrimo metodika.....	16
2.1. Preparato ruošimas.....	16
2.2. Matavimo aparatūra.....	16
2.3. Atsistatymo dinamikos tyrimo eiga.....	17
3. Tyrimo rezultatai.....	19
3.1. Adoptacijos ir atsistatymo dinamika.....	21
Išvados.....	23
Santrauka.....	24
Summary.....	25
Literatūra.....	26
Priedas.....	30

Ivadas

Tyrime Skèrio keleivio (*Locust migratoria*, pav.1.1.) nervų sistemą. Skèrys pigus, lengvai paruošiamas tyrimams, turintis daug skirtingų receptorių, koduojančių skirtingus organų parametrus [4].

Vienas iš nervų sistemos koduojančių organų yra sparno vyrio tempimo receptorius, kuris koduoja sparno padėtį veikimo potencialų sekomis (pliūpsniais). Yra žinoma, kad sparno vyrio tempimo receptoriumi, kaip ir daugumai kitų neuronų, būdinga adaptacija ir atsistatymas. Adaptacija aprašoma dviem eksponentėmis. Adaptacijos pradžioje veikimo potencialų dažnis staigiai didėja, tačiau laikui bėgant mažėja. Sustabdžius adaptaciją, kuri laika neuronas negeneruoja veikimo potencialų, vèliau pradeda generuoti veikimo potencialo sekas, kurios su laiku didėja [22-24;29].

Yra žinoma apie sparno vyrio tempimo receptoriaus veikimo potencialų adaptaciją sparnui esant stacionarioje padėtyje ir skrydžio metu, tačiau nežinoma apie tempimo receptoriaus atsistatymą o taip pat šio proceso dinamiką.

Mūsų darbo tikslas - ištirti skèrio sparno vyrio tempimo receptoriaus adaptacijos ir atsistatymo po adaptacijos dinamiką.

Darbo uždaviniai:

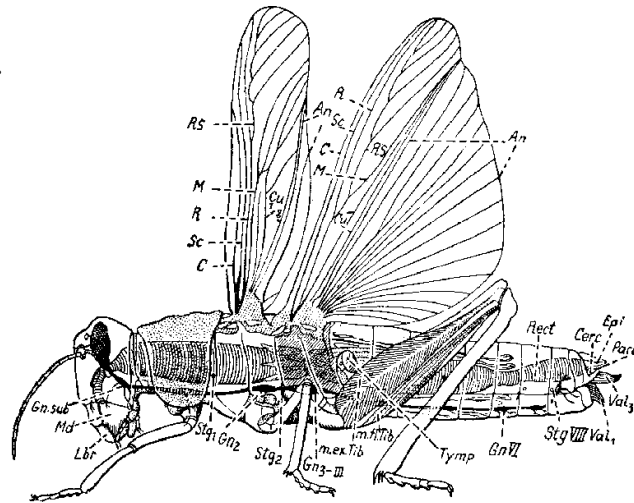
- Įvertinti veikimo potencialų adaptacijos parametrus.
- Įvertinti atsistatymo parametrus.
- Palyginti adaptacijos ir atsistatymo parametrus

1. Literatūros apžvalga

1.1. Skėrys

Būrys Tiesiasparniai (Orthoptera, Gryllida, Saltatoria)

Pagrindiniai bruožai:



pav.1.1. Skėrys keleivis (*Locust migratoria*)

galva hipognatinė (tik kai kuriose grupėse beveik prognatinė ar opistognatinė) gerai išvystytos sudėtinės akys ir 3 arba 2 paprastos akelės, tik pas slaptai gyvenančias formas akelės (pvz., *Myrmecophila*) ar sudėtinės akys (olose gyvenantys *Diestrammena caeca*) redukuotos, sparnai susideda iš kūno šonų plokščiai, apgulančiais ar beveik stogiškai, priekiniai dažniausiai kietesni už užpakalinius, užpakaliniai sparnai paprastai su labai plačia vėduokliška susiskleidžiančia analine sritimi, pusiau permatomi ar įvairiai spalvoti, skrydis daugiau ar mažiau bimotorinis, pas maždaug 30% recentinių tiesiasparnių rūšių sparnai bent dalinai redukuoti, žpakalinės kojos beveik visuomet žymiai ilgesnės už kitas, su storomis šlaunimis, šokamosios, būdingi įvairaus tipo garso aparatai ant sparnų ar dalyvaujant kojoms [15].

1.2. Skėrys keleivis (*Locust migratoria*)



pav.1.2. Skėrys keleivis (*Locust migratoria*)

Skėrys keleivis (**pav.1.2.**) yra viena labiausiai paplitusių skėrių rūšių. Pagrindinės jų gyvenamosios vietos yra Afrika, Azija, Australija ir Naujoji Zelandija.

Skėrio keleivio spalva ir dydis keičiasi nuo jo gyvenimo sąlygų ir priklauso nuo amžiaus (lerva,

subrendęs ar nesubrendęs skėrys).

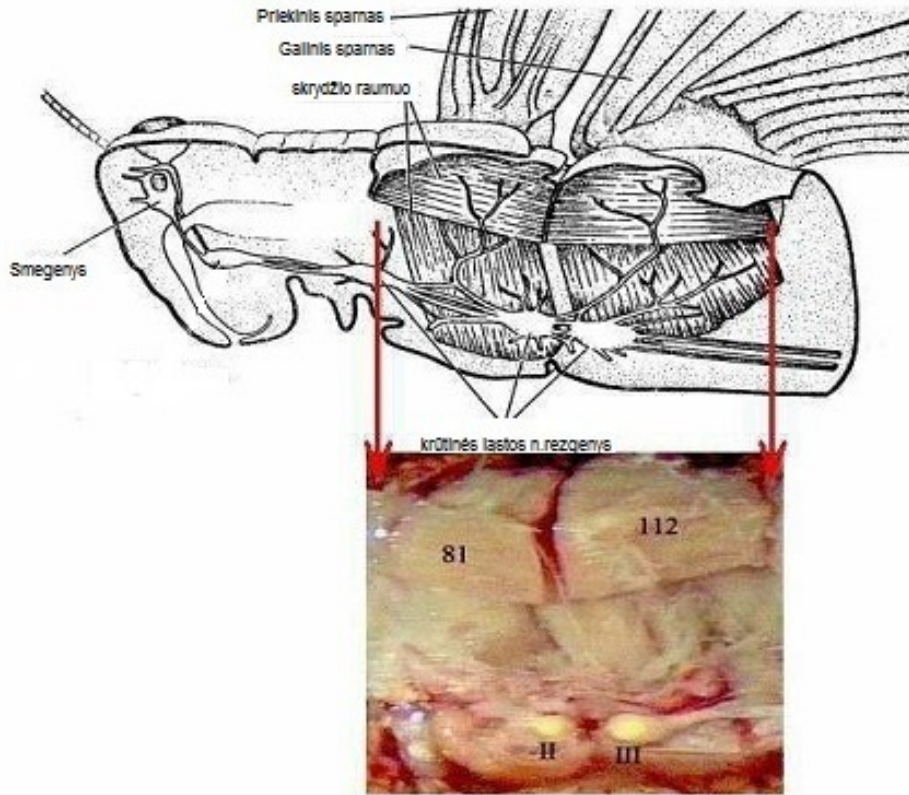
Bendruomenėmis gyvenančių skėrių

dydis priklausomai nuo lyties yra nuo 40 iki 60 milimetrų. Bendruomenėmis gyvenantys skėriai yra šiek tiek mažesni nei pavieniai.

Skėriai yra labai mobilūs, skrisdami pavėjui pasiekia 15-20 km/h greitį. Spiečius gali nusukti nuo 5 iki 130 kilometrų per dieną. Skėrių spiečiaus dydis gali kisti nuo mažiau nei vieno kvadratinio kilometro iki kelių šimtų kvadratinių kilometrų. Kiekviename kvadratiname kilometre yra nuo 40 iki 80 milijonų skėrių [17].

1.3. Skėrio keleivio nervų sistema

Skėrio nervų sistema sudaryta iš nervinių sancaupų – ganglijų, išsidėsčiusių kiekviename kūno segmente. Didesnė ganglijų sancaupa yra galvoje ir laikoma smegenimis. Daug sensorinių organų išsidėsto kūno paviršiuje - vadinamos sensilos. Sensilos yra panašios į plauką ir išijautrina nuo vėjo arba palietus. Didesnės sensorių sancaupos pastebėtos burnos ertmėje, prie antenulių, tarp kūno segmentų ir šalia sėdmens. Visi nervinių ląstelių signalai eina per centrinę neuropilę – tai kūno viduje esantis nervinis vamzdelis. [18]



pav. 1.3. *Locust migratoria* nervų ir raumenų kontrolės skrydžio organų grupė, viršuje Skėrio nervų sistemos atsakingos už skrydį modelis, o žemiau – išpreparuotas skėrio nervų ir raumenų skrydžio kontrolės preparatas

Paveiksle (**pav.1.3**) pavaizduota nervų ir raumenų kontrolės organų grupė. Parasagitalinis pjūvis eina nuo skėrio galvos iki krūtinės ląstos. Pilvo raumens nervo grandinė jungia interneuronas. Motoneuronas kartu su interneuronu atsakingi už signalų perdavimą skrydžio raumenims paveiksle (**pav.1.3**, numeriai **81** ir **112**). Tai nugaros išilginiai raumenys, kurie judina priekinius ir galinius skėrio sparnus. **pav.1.3 II** ir **III** - tai mezo ir metatoraciniai nervai, dalyvaujantys skrydžio mechanizme [19].

Galvos skyrių sudaro stambus viršryklinis mazgas ir mažesnis poryklinis mazgelis, kurie abu sujungti [2, 11]. Galvos smegenų dalys turi neurosekrecinės ląstelės, kurios per hemolimfą veikia kitas ląsteles. Smegenys gaunančios sensorinę informaciją, reguliuoja ganglijų ir įvairių nervų veiklą taip, kad visų raumenų veikla būtų koordinuota. Simpatinė nervų sistema reguliuoja vidaus organų ir raumenų veiklą. Centrinė nervų sistema kartu su receptoriais ir efektoriais yra atsakinga už išorinės ir vidinės

informacijos įsisavinimą, jos perdirbimą bei atitinkamų organizmo atsakų sukėlimą [9, 20, 21].

Skėriuose tempimo receptorius sudarytas iš ląstelės kūno ir vieno išsišakojusio neurono, įsiterpusio jungiamojo audinio viduje. Šis audinys apjungia sparno pagrindą su vidine diafragma.

Vienas iš skėrio mechanoreceptorių vadinasi *Tegula* - polineuroninis jutimo organas, siejamas su kiekvieno sparno tvirtinimo vieta. Organas reaguoja į oro slėgį, oro virpesius ir fiksuoja sparno padėti skrendant. *Tegula* sudaro iš išorės mechanosensorinių plaukelių grupės. Jo poveikis skrydžiui akivaizdus; chirurgiškai pašalinta sensila sumažino sparnų plasnojimo greitį bei amplitudę [10].

Apie 80 motoneuronų aktyvūs skrydžio metu. **pav. 1.3.** numeriais II ir III, tai yra neuronų sancaupos, kurios ištirtos fiziologiškai ir morfologiškai, II skirtas priekiniai sparnų porai, o kitas - galinei iš dalies redukuotai sparnų porai. Motoneuronai aktyvuojami neuronais, kuris yra krūtinės ganglijoje. Ganglijoje interneuronai nėra išdėstyti homologiškai kaip motoneuronai, interneuronų išsidėstymas apsprendžia specifinį visos sistemos aktyvumą. Krūtinės ląstos nervas pavyzdžiui gali generuoti skrydžio ritmus [5].

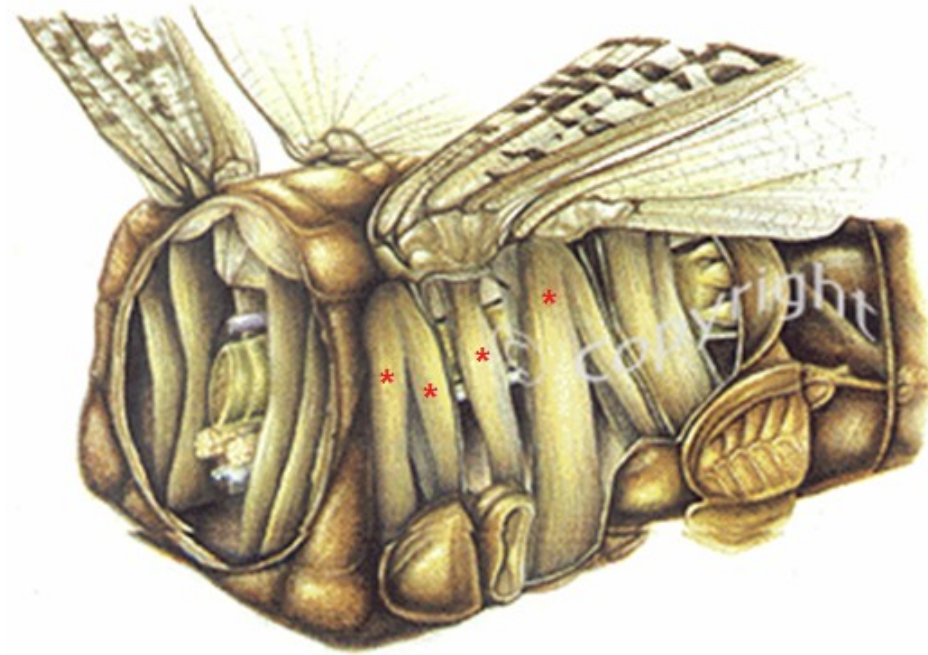
Kiekvienas sparno judesys ar deformacija yra kontroliuojami kelių jutimo organų, esančių sparne arba sparno vyryje. Šių jutimo organų funkcija - kompensuoti sparno judesio trukdžius skridimo metu dėl išorinių veiksnių ar dėl vidinių motorinės sistemos pokyčių. Kontroliuodami skirtingų raumenų grupių aktyvumą bei sparno mosto dažnį jie dalyvauja motorinių elgesio modelių generavime [3;5].

Daug sensorinių sistemų dalyvauja skėrio skrydžio valdyme. Vieni iš jų galvos plaukeliai jautrūs vėjui, daugiakomponentinės akys, antenulės. Visos tos sistemos kontroliuoja ir reguliuoja skėrio skrydį. [4;5;7]

1.4. Skėrio skrydis

Skrydžio metu sparnai plasnoja maždaug 20 Hz dažniu priklausomai nuo skėrio dydžio ir lyties, tačiau nepriklauso nuo lauko temperatūros [21].

Vairavimas ir manevravimas skrydžio metu atliekami keičiant plasnojimo ritmą, amplitudę, bei sparno plasnojimo formą abiejose kūno pusėse.



pav 1.4. Raumenų grupės, esančios skėrio krūtinės ertmėje.

* Dviejų funkcijų raumenys

Raumenys, kontroliuojantys kiekvieną sparną, tiesiogiai jungiasi su sparno pagrindu arba netiesiogiai įtakoja sparno judėjimą, deformuodami krūtinės lašto ertmę. Kai kurie raumenys atlieka ne vieną funkciją, pavyzdžiui jie dar naudojami ir vaikščiojimui **pav.1.4.** pažymėti *.

Krūtininis nervinis rezginytis gali generuoti skrydžio ritmą, net jei centrinė nervų sistema (galvos smegenys) yra izoliuota nuo sensorinio grįžtamojo ryšio ir nuo receptorių sparnuose. Skėrio sparno vyrio tempimo receptoriai, kiti tempimo receptoriai, mechanoreceptoriai yra proprioreceptoriai, kurie valdo kompensacinius refleksus, būtinus tiesiam ir darniam skridimui. Kai kurie iš šių proprioreceptorių reguliuoja sparno plasnojimo dažnį. Virpamieji galvos plaukeliai tikrai atlieka skėrio skrydžio reguliavimą,

tačiau, kaip paaiškėjo, skėrys gali skristi ir be galvos, t.y. be pilnos centrinės sistemos. Netgi turint paruoštą tyrimui skėrio preparatą, aukštas garsas ar vėjelis gali sukelti sparnų plasnįjimą. Pastebėta, kad skėrys keleivis (*locust migratoria*) su nepašalintomis didžiosiomis kojomis, kurios būna suglaustos, nepradedą plasniti sparnais. Sparnai pradeda plasniti tik skėriui pašokus ir ištiesiant kojas.

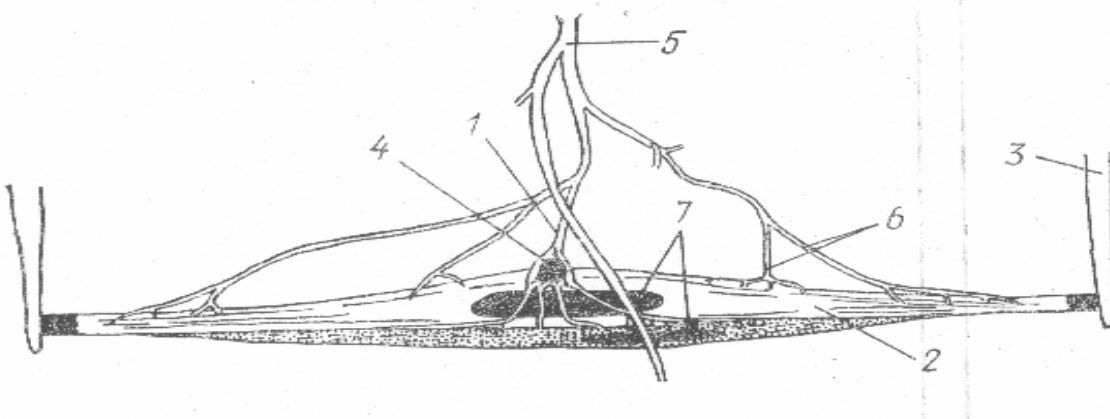
Žinoma, kad skėriui skrendant krūtinės ląstos nerviniai mezginiai kontroliuoja skrydžio ritmą ir tik skrydyje dalyvaujantys raumenys, jų tempimo receptoriai gali įtakoti skrydžio ritmą [20]. Krūtinės ląstos nervinės sankaupos gauna informaciją iš *Tegula* receptoriaus, antenulių, galvos plaukelių ir raumens tempimo sensilos [20, 8, 10].

1.5. Proprio ir pusiausvyros receptoriai

Skėrio (*Locust migratoria*) receptorių grupė, kuriai priklauso mechanoreceptoriai, reaguojantys į raumenų darbą ir kūno segmentų judėjimą. Kai kurie bestuburių receptoriai atlieka dvi funkcijas [10].

Vienas iš mechanoreceptoriaus pavyzdžių yra plaukelių plokštelė – tai trichoidinių mechanoreceptorinių sensilų sankaupa, dažniausiai randami tarp kūno, kojų, antenulių segmentų, kūno paviršiuje. Skėriuose (*Locust migratoria*) atrasta 17 plaukelių plokštelių porų įvairiausiose kūno segmento vietose. Sensila veikia panašiai kaip taktilinis receptorius - kūno segmentas spaudžia plaukelį ir inervuoja sensorinius neuronus. Plaukelių plokštelės, kaip dviejų funkcijų receptorius, buvo iširtas Vapsvoms. Įrodyta, kad galvos, antenų ar pilvo paspaudimas vietose, kur yra tokio tipo sensilos, leidžia tokio tipo bestuburiams orientuotis sunkio jėgos kryptiai. Skruzdelėms plaukelių plokštelės esančios pilvo segmente, o bitėms galvos ir kūno segmentų jungtyje leidžia laikytis pusiausvyroje. [10,20]

Skėrio sparno judesiai ar deformacija sekami sensoriniais organais, vienas iš jų



pav.1.5. Tempimo receptoriaus schema.

1-aksonas; 2-raumens audinys; 3-tarpsegmentinė membrana; 4-multipoliarinis sensorinis neuronas; 5-nervas; 6-motoneurono nerviniai galiukai; 7-branduoliai [20]

yra sparno vyrio tempimo receptoriai. [28] Tempimo receptoriai labai skiriasi iš kitų receptorių- yra kūno viduje, aptarnaujamas vienu multipoliariniu motoneuronu (**pav. 1.5.**), receptoriaus aksonas tęsiasi į vieną iš krūtinės laštos nervinį mazgą. Tokie receptoriai kontroliuoja tik kūno segmentų judėjimą arba atskirų raumenų susitraukimą.

Kuo stipriau pakeliamas skėrio sparnas, tuo didesnis VP dažnis generuojams tempimo receptoriaus. Receptorius siunčia apibendrintą informaciją apie susitraukimų jėgą bei greitį. Skėriui keliant sparną, VP dažnis raumens tempimo receptoriuje didėja, o nuleidus sparną mažėja. [3, 10, 20]

1.6. Skėrio vyrio tempimo receptoriaus tyrimai

Skėrio (*Locust migratoria*) vyrio tempimo receptoriaus darbas ir charakteristika yra detalčiai ištirta ir aprašyta gyvūno stacionarioje padėtyje. Šio receptoriaus elektrofiziologinis tyrimo metodas buvo aprašytas detalčiau ankstesniuose darbuose pvz. R. Meldrum Robertson straipsnyje „Sensory adaptation: extracellular recording from locust wing hinge stretch receptor“. Yra žinoma, kad receptorius būdamas atpalaiduotoje būsenoje siunčia aksonu VP (veikimo potencialo) impulsus maždaug 10-15 kartu per

sekundę dažniu. Receptorius yra atpalaiduotas, kai skėrio sparn(ai)as yra horizontalioje padėtyje. Keliant skėrio sparną, daugelio tyrimų palaipsniui didėdavo receptoriaus generuojamų atsakų dažnis. Tai galima paaiškinti tuo, kad tempimo receptorius



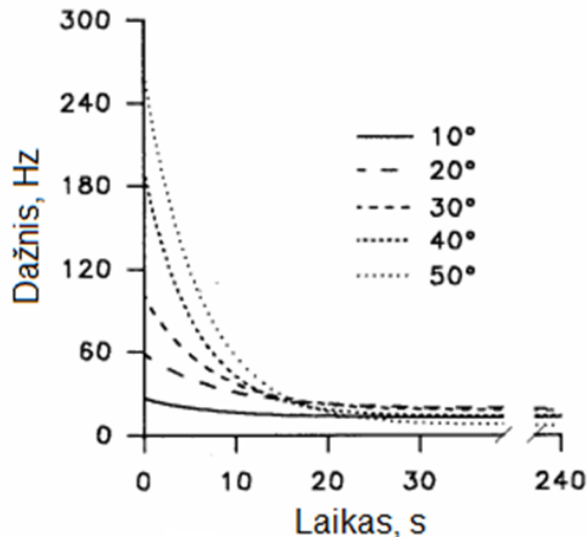
Pav.1.6. Skėrio sparno vyro receptoriaus atsakas po pakelimo nuo 0 iki 40 laipsnių kampu. Kiekvienas pavyzdys tai 100-ms receptoriaus veikimo atkarpa. Skaičius žymi laiką po kurio buvo matuojamas receptoriaus atsakas

palaipsniui įsitempia kai sparnas keliamas. Svarbu tai, kad receptorius pripranta prie apkrovos - adaptuojasi, būdamas pastoviai įsitempęs generuoja aukšto dažnio VP, kuo stipriau įsitempia tuo didesnis VP dažnis, bet laikant sparną pakelta, po kurio laiko VP dažnis krenta (**pav. 1.6**). Manoma, kad taip receptorius informuoja CNS apie savo padėtį bei adaptuojasi krūviui. Pastebėta, kad receptorius skirtingai elgiasi ir skirtingai

generuoja VP po atsistatymo nuo įsitempimo. Kuo ilgiau pakeltas laikomas skėrio sparnas, tuo vėliau po sparno nuleidimo atsiranda tempimo receptoriaus VP ir vis ilgiau receptoriui prireikdavo laiko atsistatyti t.y. pasiekti 10 - 15 Hz impulsų dažnį[14]. Atsistatymo procesas žinomas, tačiau lieka neaiški šio proceso dinamika.

1.7. Veikimo potencialų dažnio adaptacijos ir atsistatymo mechanizmai

Skėrio *Locust mirgatoria* sparno vyrio tempimo receptoriaus savybės yra adaptacija ir atsistatymas būdingos daugelio nervinių ląstelių savybės. Adaptacija

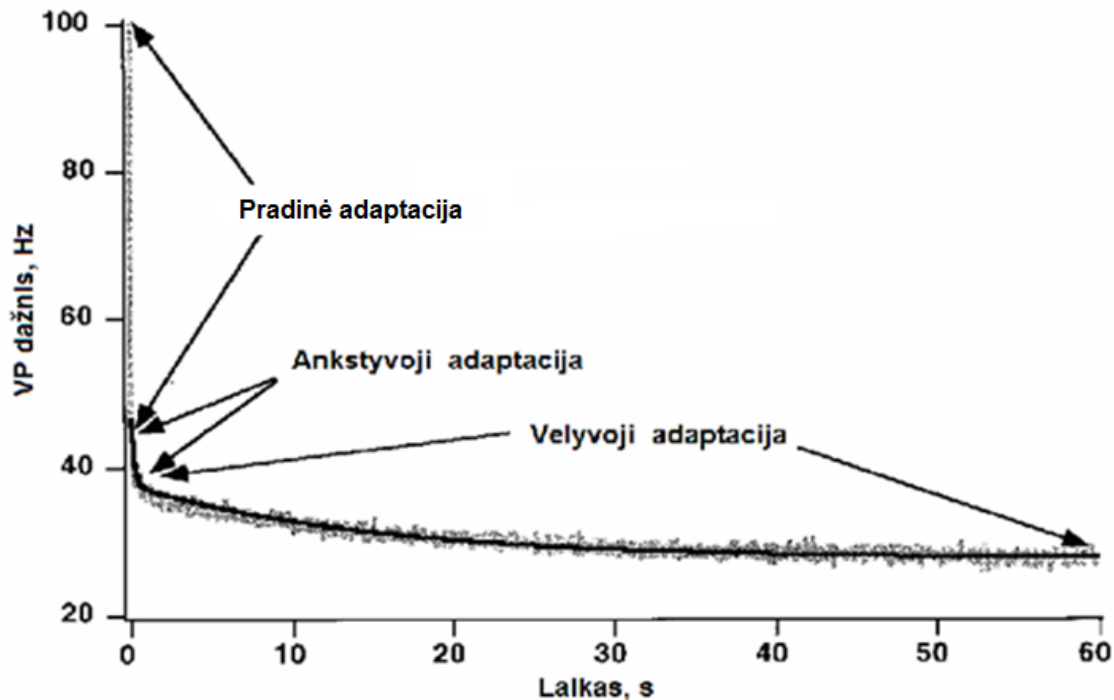


pav. 1.7. Skėrio tempimo receptoriaus dinamikos pavyzdys. VP dažnio priklausomybė nuo sparno pakelimo laispio.

aprašoma viena eksponente [26], tačiau tarakono sensorinio neurono adaptacija buvo detaliau aprašyta dviem eksponentėmis [27]. Detalesni skėrio tempimo receptoriaus tyrimai leido adaptacijos dinamiką aprašyti dviem eksponentėmis, taipogi atrastos eksponenčių laiko pastoviosios. Pirmos eksponentės laiko pastovioji $T_1=5,04 \pm 0,6$ s, antrosios $T_2=24,86 \pm 2,45$ s. [22]. Rezultatai patvirtina dviejų mechanizmų įtakojančių adaptacijos dinamikos buvimą.

Atsistatymas po adaptacijos priklauso nuo adaptacijos sustabdymo laiko, jeigu adaptacija sustabdyta prieš lūžio tašką - atsistatymas buvo greitas, sustabdžius adaptaciją po lūžio taško - atsistatymas dramatiškai ilgėjo. [14;22] Skėrio tempimo receptoriaus generuojamas dažnis pradinio adaptacijos momentu priklauso nuo tempimo receptoriaus įtempimo laipsnio. **pav.1.7.** Voro VS-3 organo mechanoreceptoriu adaptacija aprašyta viena eksponente, pradiniu adaptacijos momentu VP dažnis buvo aukštas, laikui bėgant mažėjo. [24]. Žiurkės poliežuvinis motoneuronas turi 3 adaptacijos fazes: pradinę, ankstyvoji, vėlyvoji. Inicijavimo fazė susideda iš staigaus VP dažnio kritimo, kuris gali būti aprašomas tiese. Po jos seka eksponentinis mažėjimas - ankstyvoji fazė. Jos funkcija artima dviejų eksponenčių sumai, kurios laiko pastovioji apie 0,25 s. Paskutinioji - vėlyvoji fazė, tai lėtesnis eksponentinis procesas, kurio laiko pastovioji 10- 20 s. [24;30] **pav.1.7.1.** Manoma, kad inicijavimo stadija reikalinga pirminiam, greitam raumens

susitraukimui, o sekančios fazės tik raumens jėgai palaikyti [29]. Ląstelės mechanizmai, sukiantys adaptaciją nėra visiškai ištirti, nes adaptacija susideda iš daugelio komponentų.



pav.1.7.1. Žiurkės poliežuvinio motoneurono adaptacijos stadijų pavyzdys; inicijavimo, ankstyvoji, vėlyvoji fazės

Joninių kanalų įtaka adaptacijos procese nustatyta, kad K^+ jonų kanalų blokavimas su TEA didino VP generavimo trukmę, mažino inicijavimo adaptacijos fazę, bet ankstyvoji fazė nekito. Ca^{+2} jonų kanalų blokavimas privedė prie inicijavimo stadijos dingimo, tačiau ankstyvoji stadija išryškėjo. Yra manančių, kad Na^+/K^+ -ATPazė VP dažnio adaptaciją gali įtakoti vėlesnėse fazėse. Norint nustatyti ar ši pompa prisideda prie adaptacijos, buvo panaudotas Na^+/K^+ -ATPazės blokatorius ouabainas. Blokuojant K jonų kanalus su Ouabainu, mažėdavo adaptacijos VP amplitudė, tačiau neįtakoja adaptacijos dinamikos. Na^+-K^+ jonų pompos blokavimas nepadarė matomo efekto adaptacijai [30]. Na^+/K^+ -ATPazės blokavimas VP dažnio adaptaciją nei pradinėje, nei tolimesnėse fazėse nepasikeitė [30]. Voro mechanoreceptorius, kurio adaptacija yra palyginus lėta visiškai nepriklauso nuo Ca^{+2} jonų patikimo į ląstelę, o ouabainas veikė voro mechanoreceptoriaus adaptaciją greitindamas lėtąją adaptacijos fazę. Taipogi adaptacija nepriklausė nuo žinomų K^+

srovių [24]. Pelės stuburo motoneuronai: apaminu blokuojami nuo Ca jonų priklausomi K jonų kanalai sukėlė VP dažnio padidėjimą, bet neblokavo adaptacijos. Naudojant iberiotoksiną K⁺ jonų kanalų blokavimui poveikio adaptacijai nebuvo. K⁺ srovių blokavimui buvo naudojamas Kadmio di chloridas, jo poveikis buvo panašus į apamino. Siūloma, kad nei nuo Ca⁺² jonų priklausomi K kanalai, nei nuo įtampos priklausomi Ca⁺² jonų kanalai nereikalingi adaptacijos procesui motoneuronose. Na⁺ jonų kanalai buvo blokuojami Riluzoliu, tai stabdė adaptaciją, gauti duomenys parodė, kad riluzolio-jautrus Na⁺ laidumai įtakoja adaptaciją [30]. Yra įrodyta, kad Na⁺/K⁺-ATPazės aktyvumas prisideda prie lėtosios adaptacijos fazės bestuburių mechanoreceptoriuose [24].

2. Tyrimo metodika

2.1. Preparato paruošimas

Eksperimentai buvo atliekami su skeriais (*Locust migratoria*). Chirurginėmis žirkklėmis dekapituojame skėrio galvą, visas tris poras kojų bei galinius sparnus. Priekiniai sparnai paliekami tyrimui. Naudodami pincetą ištraukiame vabzdžio viduje esančius nereikalingus tyrimui vidurius, su vata atsargiai išvaloma krūtinės ertmė. Preparatas prikljuojamas prie specialaus stovelio ir įdedamas į matavimo aparatūrą [4, 10]. Eksperimentai buvo atliekami kambario temperatūroje (apie 20 ° C).

2.2. Matavimo aparatūra



pav.2.2.1. stiprintuvas DAM80

Signalas iš sparno tempimo receptoriaus, esančio skėrio kamiene, yra registruojamas sidabro vielos monopoliniu elektrodu, kuris prijungtas prie stiprintuvo DAM80 (WPI) (pav.2.2.1). Šis stiprintuvas turi aukšto bei žemo dažnio filtras ir pasirenkamą

stiprinimo koeficientą. Tyrimui buvo nustatyti šie stiprintuvo parametrai: stiprinimas – 10000 kartų, žemo dažnio filtras – 300 Hz, aukšto dažnio filtras – kHz.



pav. 2.2.2. LAB-TRAX-4 sujungtas su kompiuteriu

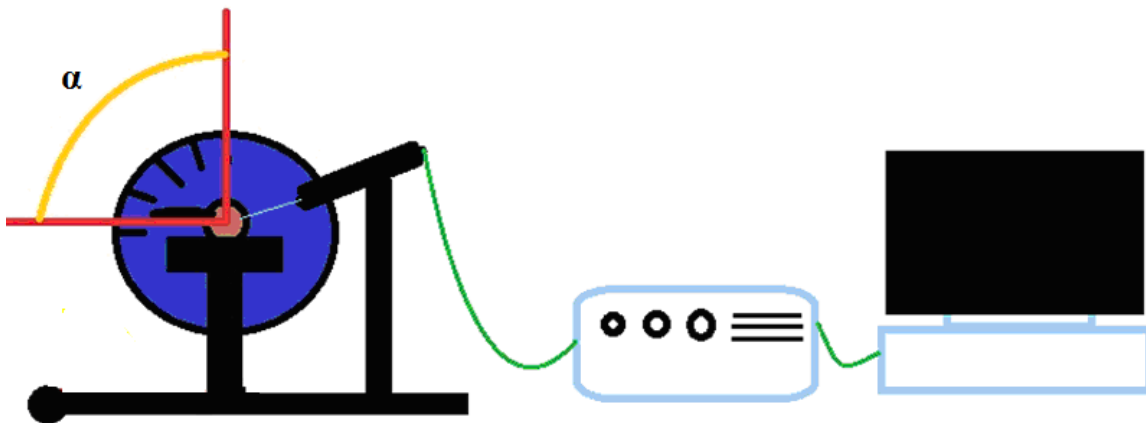
Siekiant užregistruoti signalą su kuo mažiau triukšmų, skėrys išžeminamas, t.y., į skėrio pilvelį įvedamas kitas sidabro elektrodas, kuris sujungiamas su stiprintuvo išžeminimu. Duomenys paverčiami skaitmeniniu formatu LAB-TRAX-4 įvesties įrenginio pagalba. Šis

įrenginys turi 4 jėjimo kanalus. Prie vieno iš 4 kanalų prijungiamas stiprintuvas. [16]

LAB-TRAX-4 sujungtas su kompiuteriu (pav. 2.2.2.) , kuriame įdiegta programinė įranga DataTrax2 duomenų registravimui. Programos Microsoft Office Excel, Origin 6.1 ir pCLAMP 10.2 naudojamos duomenims apdoroti.

2.3. Atsistatymo dinamikos tyrimo eiga

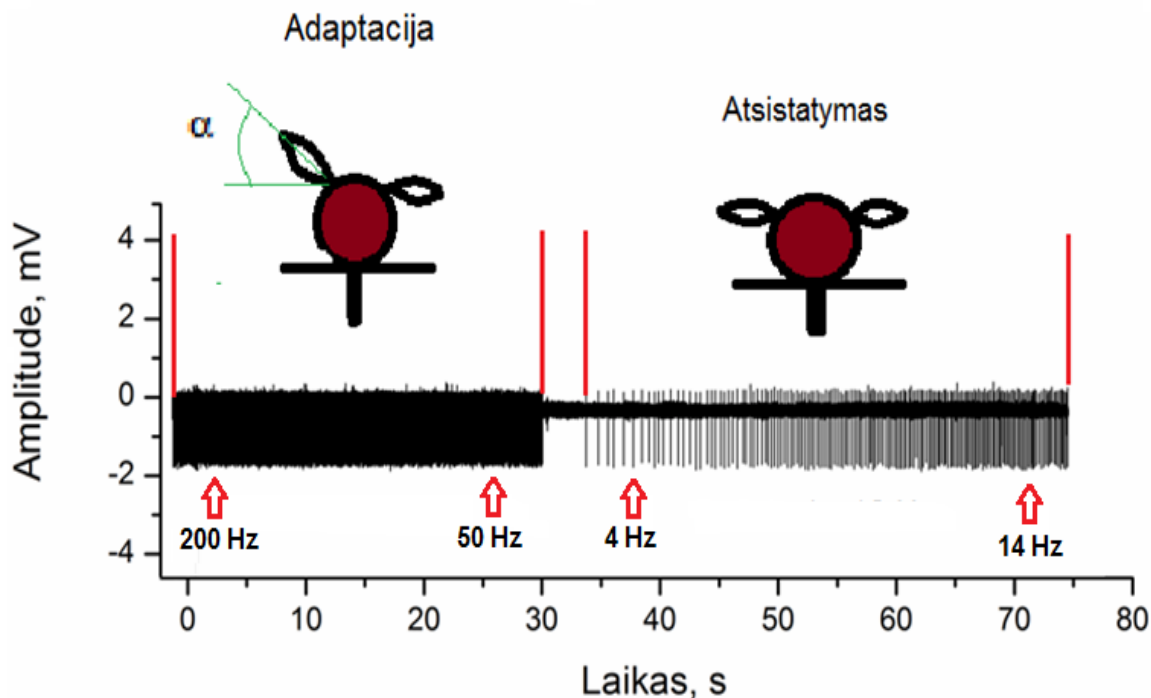
Skėrys paruošiamas pagal anksčiau aprašytą preparavimo metodiką [4,10]. Registravimo mikroelektrodas priglaudžiamas prie tos pusės skėrio sparno nuleidžiamųjų raumenų, kurios pusės sparnas yra užfiksuotas. Elektroda priglaudžiamas ir vos liečiant audinio paviršių ieškoma tempimo receptoriaus atsako, kurį stebime kompiuterio ekrane. Tipinis signalas yra VP potencialai pasikartojantys 10-15 Hz dažnių. Sparnui esant horizontalioje padėtyje, veikimo potencialų dažnis yra 10-15 Hz. Pakėlus sparną, impulsų dažnis padidėja,. Tokiu būdu įsitikiname, kad stebime tyrimui reikalingą receptorių.



Pav. 2.3.1.1. Eksperimentinė shcema. Manipulatorius, stiprintuvas kompiuteris

Atsistatymo tyrimui parinkome tokią metodiką, kuri buvo prieš kurį laiką aprašyta adaptacijos dinamikos tyrime VU Gamtos mokslų fakultete. Žinodami, kad adaptacijos dinamika aprašoma dviem eksponentėmis, kurių eksponenčių laiko konstantų vertės $5,04 \pm 0,6$ s ir $24,86 \pm 2,45$ s [22].

Atsistatymo dinamikos tyrimui naudojome skirtingus varginimo laikus, t.y. skirtingus sparno užlaikymo alfa kampų laikus ($\alpha = 40^\circ$) **Pav. 2.3.1.2.** Bevarginant



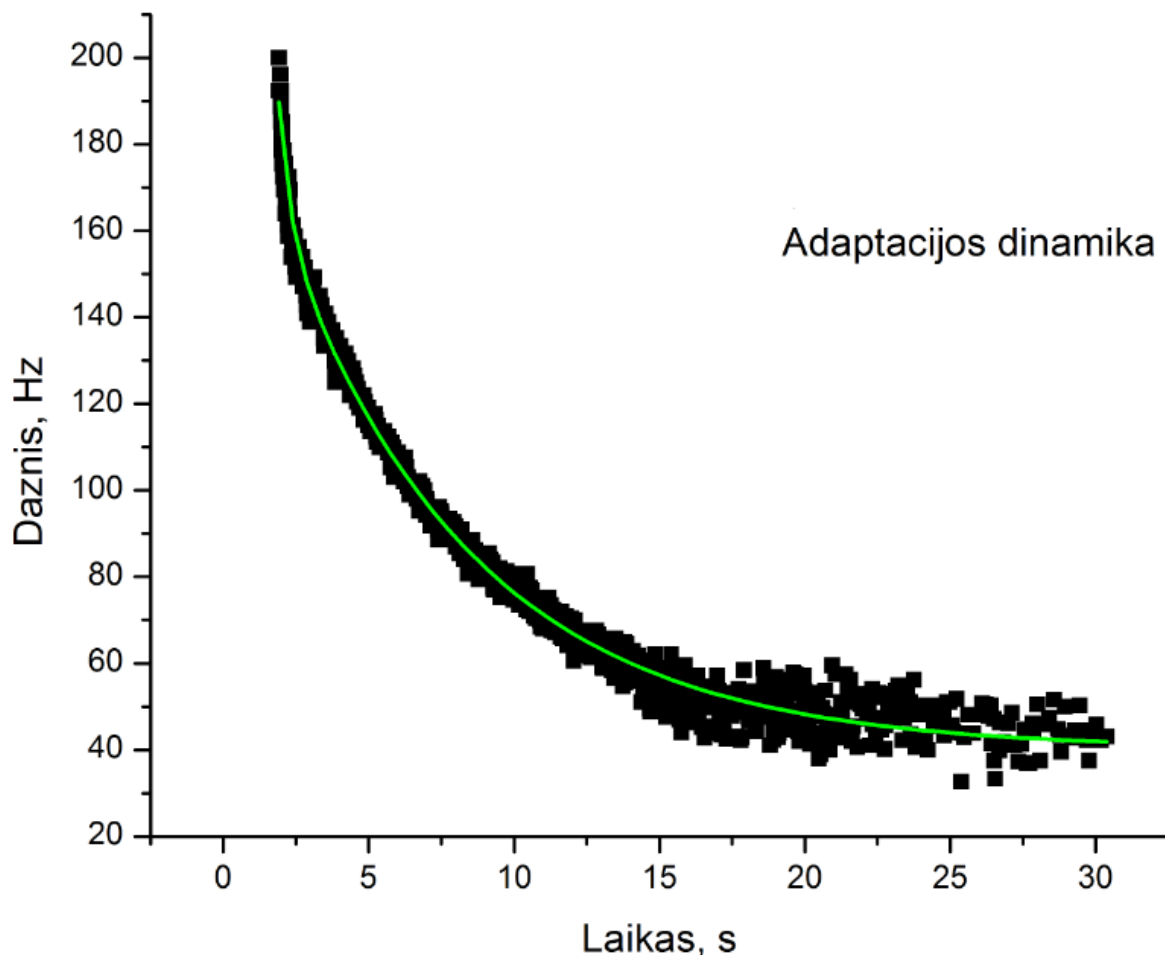
pav.2.3.1.2. Skėrio tempimo receptoriaus adaptacijos ir atsistatymo tirimo schema.

tempimo receptorių buvo gaunami receptoriaus atsakai, sustabdžius varginimą po kurio laiko buvo fiksuojami atsistatymo atsakai, tyrimo schema ir rezultatų pavyzdį atspindi **pav.2.3.1.2.** Varginimo laiko intervalams tirti buvo panaudoti Origin 6.1, Office 2003 bei pCLAMP 10.2 programiniai paketai. To paties tempimo receptoriaus adaptacija ir atsistatymas buvo matuojami vieno eksperimento metu, nenutraukiant eksperimento. Adaptacijos ir atsistatymo atsakai įvertinti naudojama "pick peaks" Origin paketo funkcija. Dažnis gautas kaip atvirkštinis dydis intervalo tarp veikimo potencialų. Skaičiavimai atlikti Excell ir Origin programose. Gauti dažnio priklausomybės pavyzdžiai atvaizduoti Origin programos pagalba. Rezultatai aprašyti pagal $x \pm sd$ s. forma.

3. Tyrimo rezultatai ir aptarimas

3.1. Adaptacijos ir atsistatymo dinamika

Pakėlus ir laikant sparną į 40 laipsnių poziciją, veikimo potencialų dažnis mažėja, o nuleidus į pradinę padėtį kurį laiką jų nėra, o vėliau pradeda didėti kol grįžta iki

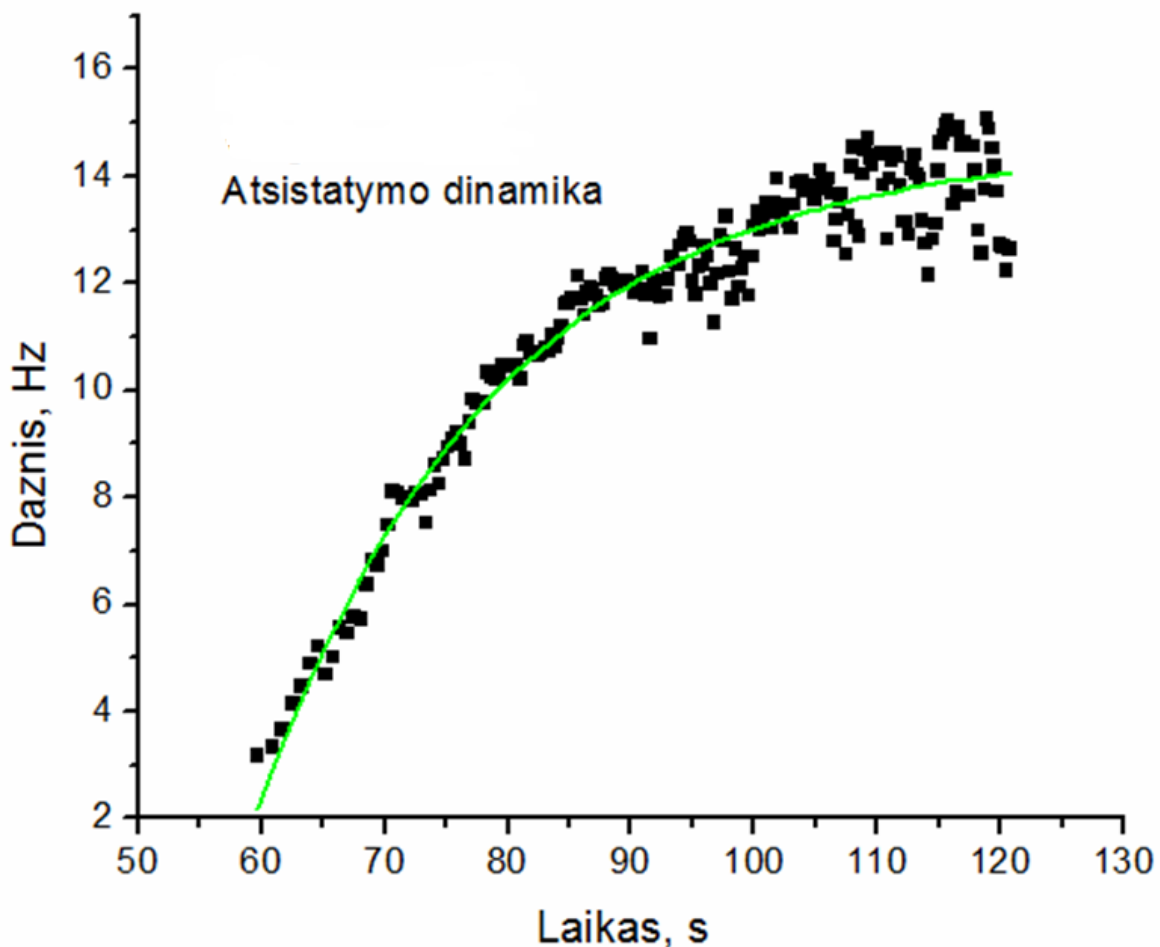


pav.3.1.1. Skėrio sparno tempimo receptoriaus adaptacijos dinamikos pavyzdys, 30 s. varginimas.

pradinio lygio. Tyrėme receptoriaus savybes sparną laikydami pakeltoje pozicijoje 30 s. Kaip aprašyta literatūroje [14,24], gavome veikimo potencialų dažnio mažėjimą, kuri galima gerai aprašyti dviem eksponentėmis [23], **pav. 3.1.1**, su lėtąja ir greitesne laiko konstanta: $T_1 = 5,45 \pm 0,75$ s, $n=19$, ir $T_2 = 26,63 \pm 6,11$ s, $n=19$. Manoma, kad

skirtingos laiko konstantos atspindi mažiausiai du skirtingos kinetikos procesus, atsakingus už adaptaciją [23].

Kai sparnas nuleidžiamas į pradinę padėtį, veikimo potencialų dažnis iš pradžių didėja greitai, vėliau atsistatymas lėtėja (**pav. 3.1.2.**). Veikimo potencialų dažnio atsistatymą gerai aprašo viena eksponentė (**pav. 3.1.2.**) su laiko konstanta $32,99 \pm 9,67$ s. $n=16$, ka sparnas buvo laikytas pakeltoje pozicijoje 30 s (30 s adaptacija). Tyrėme 60 s. adaptaciją palyginti kaip adaptacijos ir atsistatymo dinamiką įtakoja dvigubai didesnis varginimo laikas, atsistatymo eksponentės laiko konstanta yra $42,63 \pm 30,02$ s. $n=16$ (**pav. 3.1.4.**). Pagal T-testą laikant sparną pakeltoje pozicijoje pasirinktais laiko intervalais eksponenčių



pav.3.1.2. Skėrio sparno tempimo receptoriaus atsistatymo dinamikos pavyzdys.

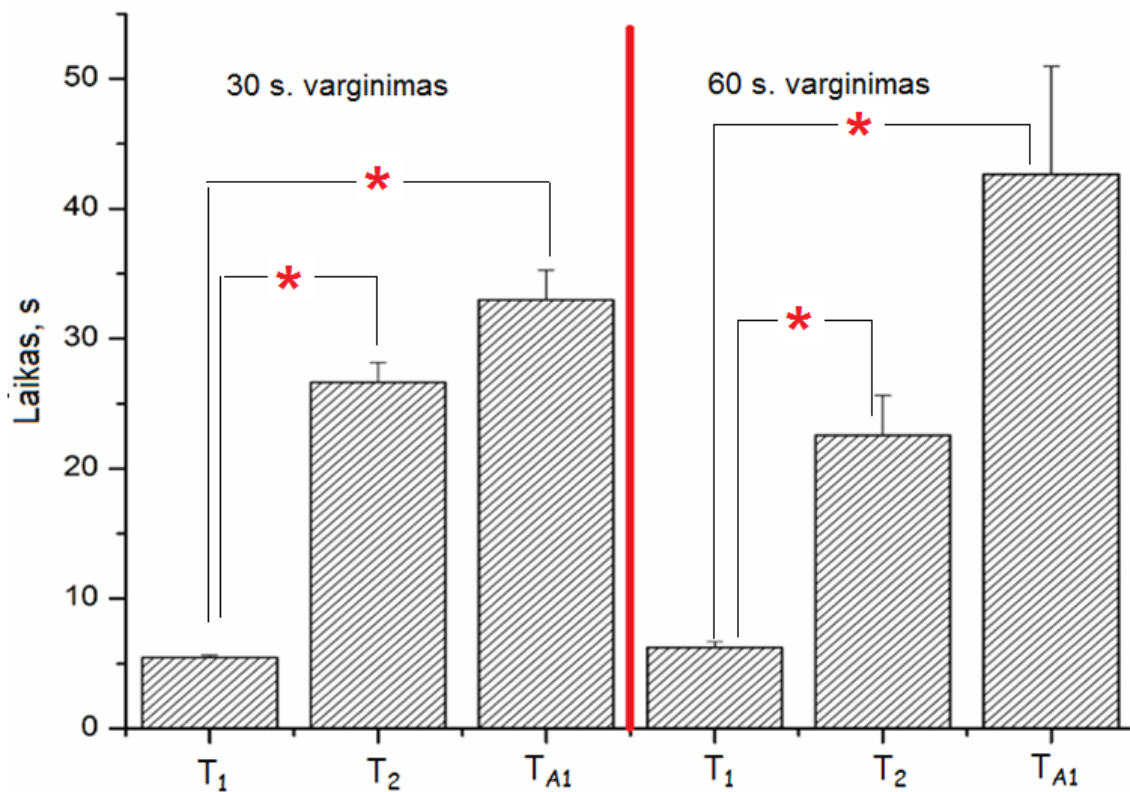
laiko pastoviųjų vidurkiai gauti skirtingi, tačiau tarp imčių skirtumo nėra.

Norėjome palyginti adaptacijos ir atsistatymo procesu eksponenčių laiko pastoviųjų vidurkius. Gavome adaptacijos ir atsistatymo laikinę charakteristiką varginant, receptorių 30 ir 60 s., **pav.3.1.3.** kur:

T_1 - adaptacijos pirmos eksponentės laiko konstantų vidurkis

T_2 - adaptacijos antros eksponentės laiko konstantų vidurkis

T_{A1} - atsistatymo eksponentės laiko konstantų vidurkis



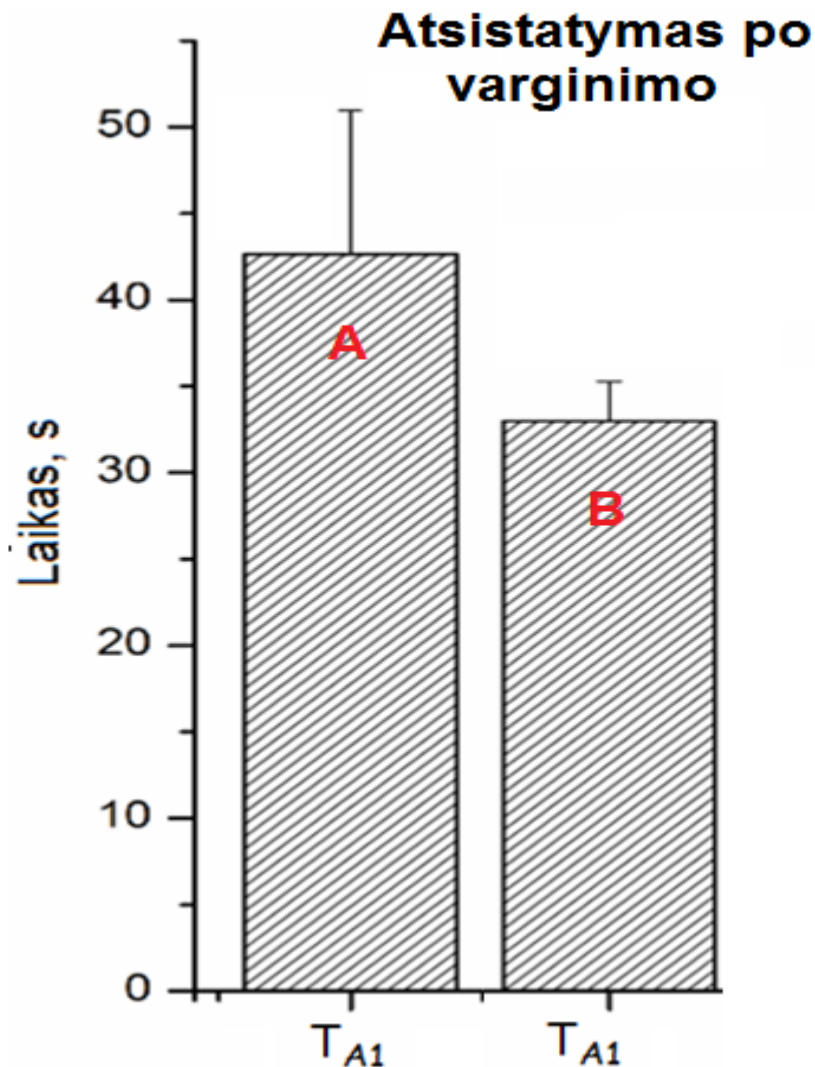
pav.3.1.3. Skėrio tempimo receptoriaus adaptacijos ir atsistatymo laiko

charakteristikos. * - patikimas skirtumas.

Pirmoji adaptacijos eksponentė nepriklauso nuo varginimo laiko. 30 ir 60 s adaptacijos eksponenčių pirmosios laiko konstantos nesiskiria. Taipogi nesiskiria ir antros adaptacijos eksponentės laiko konstantos abiem varginimo laikams. Atsistatymo laiko

konstantos (T_{A1}) irgi nesiskiria **pav.3.1.4.**, galime daryti išvada, kad varginimo laikas neįtakoja sparno vairo tempimo receptoriaus atsistatymo dinamikai.

Manome, kad pagal adaptacijos dinamiką turi koreliuoti su atsistatymo dinamiką, lyginome adaptacijos (varginimo) ir atsistatymo eksponenčių laiko konstantas, radome, kad adaptacijos dinamikos greitoji laiko konstanta nekoreliuoja su atsistatymo eksponentes laiko konstanta. Lyginome adaptacijos antros eksponentes laiko konstanta su atsistatymo laiko konstanta. Atsistatymo laiko pastovioji buvo didesnė už lėtąją adaptacijos laiko pastoviąją 60 s. varginimo atveju. Varginant receptorių 30 s. lėtoji adaptacijos laiko pastovioji buvo didesnė negu 60 s. varginimo atveju, o atsistatymo laiko pastovioji buvo mažesnė už ilgesnio varginimo atsistatymo laiko pastoviąją. Darome išvada, kad atsistatymo dinamika nepriklauso nuo adaptacijos laiko.



pav.3.1.4. Skėrio sparno tempimo receptoriaus atsistatymo po varginimo laikinė charakteristika. **A** - atsistatymas po 60 s. varginimo, **B** - atsistatymas po 30 s. varginimo.

Išvados

- Skerio sparno vyrio tempimo receptoriaus VP dažnio atsistatymas apršomas pirmos eilės eksponente.
- Skerio sparno vyrio tempimo receptoriaus VP dažnio atsistatymo dinamika nepriklauso nuo adaptacijos-varginimo laiko.
- Adaptacijos lėtesnė laiko pastovioji ir atsistatymo laiko pastovioji gali būti nulemtos tuo pačiu viduląsteliniu mechanizmu.

Vilniaus Universitetas
Gamtos mokslų fakultetas
Biochemijos ir biofizikos katedra

Pavel Korabliov

Magistrinis darbas

**SKĖRIO SPARNO VYRIO TEMPIMO RECEPTORIAUS
DINAMIKOS TYRIMAS**

Santrauka

Mechanoreceptorių aktyvumas koduojamas VP sekomis. Receptoriaus adaptacija aprašoma dviejų eksponenčių pagalba, tačiau nežinoma kaip aprašomas atsistatymo procesas. Tyrimai atlikti su skėrio (*Locust migratoria*) sparno tempimo receptoriumi. Nustatėme, kad atsistatymą galima gerai aprašyti eksponente. Atsistatymo dinamika nepriklauso nuo adaptacijos laiko.

Vilnius University
Faculty for Natural Sciences
Department of Biochemistry and Biophysics

Pavel Korabliov

STUDY OF LOCUST WING HINGE STRETCH RECEPTOR DYNAMICS

Summary

Mechanoreceptor activity is encoded with AP. Receptor adaptation describes the exponential decay, but description of recovery process is unknown. Investigations were carried out with locust (*Locust migratoria*) wing hinge stretch receptors. We found that recovery is well described exponent law. Dynamics of recovery does not depend on the adaptation time.

Literatūra

1. O. Rukšėnas ir R. Grikšienė, *Sensorinių sistemų biofizika*, p. 230, 2007.
2. <http://lt.wikipedia.org/wiki/Vabzd%C5%BEiai> 2011-05-12
3. A. Alaburda, O. Kaminskas, O. Rukšėnas, *Replacement of vertebrates by locust in student laboratory exercises*, p. 8.
4. R. Meldrum Robertson, *Sensory adaptation: extracellular recording from locust wing hinge stretch receptor*, p. 263, 1992, S7-S11.
5. Baker PS, Gewecke M, Cooter RJ (1981) *The natural flight of the migratory locust, Locusta migratoria L. III. Wing-beat frequency, flight speed and amplitude*. J Comp Physiol 141: 233-237
6. 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
7. Burrows M. *Monosynaptic connexions between wing stretch receptor and flight motoneurons of the locust*. J. exp. Biol. (1975), 62, 189-219.
8. Möhl, B.(1985). *The role of proprioception in locust flight control.II. Information signalled by forewing stretch receptor during flight*. J. Comp. Physiol. A 156, 103-116.
9. Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. *Multiple potassium conductances and their role in action potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons*. J Neurophysiol. 1993 Jun; 69(6):2150-63.

10. Wolf H. *The locust tegula: significance for flight rhythm generation, wing movement control and aerodynamic force production*. J. exp. Biol. 182, 229–253 (1993).
11. R. Meldrum Robertson and David N. Reye. *A Local Circuit Interaction in the Flight System of the Locust*. October 1988, 8(10): 3929-3936.
12. http://en.wikipedia.org/wiki/Migratory_locust 2011-04-18
13. R. Meldrum Robertson *Methods in INSECT SENSORY NEUROSCIENCE, Locust flight*
14. R. Meldrum Robertson. Department of biology, Queen's University, Kingston, Ontario K7L 3N6, Canada. *Sensory adaptation: extracellular recording from locust wing hinge receptor*.
15. Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas Zoologijos katedra Nariuotakojų lyginamosios anatomijos pagrindai Paskaitų santrauka E. Budrys 2004
16. <http://www.wpiinc.com/index.php/vmchk/LAB-TRAX-4.html> 2011-05-02
17. Walker, Annette, *The Reed Handbook of Common New Zealand Insects*, Reed Books, 2000 ISBN 0-7900-0718-5
18. Christopher O'Toole, ISBN 1-55297-612-2, 2002 *Firefly Encyclopedia of Insects and Spiders*.
19. Wilson DM (1968): *Flight Control system of the Locust*. Newjork: Scientific American, Inc. Jeff W. Dawson.

20. Тыщенко В.П. Физиология насекомых. — М.: Высшая школа, 1986. 162-203psl
21. Ronald M. Wilson, 1961 Jan 6, *The central nervous control of the flight in a locust*
22. A.Alaburda, R.Buišas ir kt., *Biologija* 2010 Vol.56.No1-4.P.24-28. *Locust wing stretch receptor adaptation and recovery from adaptation.*
23. U.Hoger, A.S. French *J Comp Physiol A* (2005) 191:403-411, *Slow adaptation in spider mechanoreceptor neurons.*
24. Randall K. Powers, A.Sawczuk, *J.Physiol* 1999 101-114. *Multiple mechanisms of spike-frequency adaptation in motoneurones*
25. G.B.Miles, Y.Dai, *J Physiol* 566,2 (2005) pp 519-532. *Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurones.*
26. Robertson RM. *Am J Physiol* 1992; 263 - s7-11.
27. French AS. *J neurophysiol* 1989; 62: 768-77 *Two components of rapid sensory adaptation in a cockroach mechanoreceptor neuron*
28. Reye, D.N. and K.G. Pearson *Entertainment of the locust central flight system*
29. Sawczuk A, Powers RK, Binder MD (1995) *Adv Exp Med Biol* 384:123-134 *Intrinsic properties of motoneurons. Implications for muscle fatigue.*

30. Sawczuk A, Powers RK, Binder MD (1997) J Neurophysiol 78:2246-2253
Contribution of outward currents to spike-frequency adaptation in hypoglossal motoneurons of the rat.

PRIEDAS

Duomenų ląstelės su "-" ženklų - tai duomenys kuriuos negalėjome apdoroti dėl triukšmų. Lentelėje T_1, s - tai pirmos adaptacijos eksponentes laiko konstantos vertė sekundėmis, T_2, s - antros. T_{A1}, s - tai atsistatymo eksponentes laiko konstantos vertė sekundėmis.

Receptorius numeris	Adaptacijos eksponentes laiko konstantos, varginimas 30s		Atsistatymo laiko konstantos po 30s varginimo	Receptorius numeris	Adaptacijos eksponentes laiko konstantos, varginimas 60s		Atsistatymo laiko konstantos po 60s varginimo
	T_1, s	T_2, s	T_{A1}, s		T_1, s	T_2, s	T_{A1}, s
1	3,65	28,02	16,25	03.19	5,88	24,6	21,00
2	6,03	25,14	25,73	03.20(2)	8,69	9,81	19,39
3	5,45	36,82	24,85	03.20(3)	8,44	10,03	19,54
4	5,75	25,39	28,92	03.21	4,65	18,35	18,41
5	-	-	24,22	03.21(2)	5,84	6,68	54,69
6	6,59	-	-	03.25(1)	7,2	24,39	10,95
7	6,69	-	42,58	03.26(1)	8,97	35,32	-
8	4,83	19,49	32,92	03.27	8,35	20,81	-
9	5,56	19,06	52,33	03.30	9,37	12,92	-
10	5,62	30,09	34,98	03.30(2)	4,08	10,78	-
11	6,02	26,47	31,12	03.31 (2)	3,09	23,38	35,89
12	5,78	21,86	41,01	03.31(1)	5,76	3,83	-
13	5,36	18,16	46,3	3.226	3,86	17,87	48,14
14	5,04	24,89	30,35	04.02	5,07	43,16	55,94
15	5,25	36,5	46,01	04.02(2)	5,67	21,57	47,56
16	5,81	36,93	33,26	04.03	7,00	53,85	21,11
17	4,39	27,46	27,9	04.03(2)	4,11	43,58	97,21
18	4,57	21,43	35,43	10.20	6,61	21,56	-
19	5,76	28,41	19,69	10.24	5,55	26,57	104,45