

# **MODELAREA DIFUZIEI ACETILCOLINEI ÎN BAIJA DE CELULE, ÎN CONDIȚIILE EXPERIMENTALE DINTR-UN SET-UP DE PATCH CLAMP**

## **REZUMAT**

Lucrarea de față prezintă două modele originale privind difuzia acetilcolinei (substanță activă) în baia de celule (simulând difuzia în fanta sinaptică) într-o instalație patch-clamp. Metoda patch-clamp este una din cele mai răspândite metode de studiu electrofiziologic al canalelor ionice membranare, fie că este vorba despre canale voltaj-dependente sau despre canale activate chimic de către neurotransmițători (ex: receptori membranari ionotropi). Pentru studiul prin patch-clamp al receptorilor membranari ionotropi, substanța activă este aplicată la nivelul membranei celulare cu ajutorul unui sistem de perfuzie, în care fluxul soluțiilor active este controlat cu ajutorul unor valve, iar viteza de curgere depinde de presiunea aerului aplicat.

Cantitatea efectivă de substanță activă care interacționează cu receptorii membranari ai unei celule studiate, în aceste condiții experimentale, depinde de concentrația de substanță în soluția activă (parametru ușor controlabil de către experimentator), însă depinde și de o serie de parametri particulari ai sistemului de patch-clamp. Este vorba despre presiunea de perfuzie, difuzivitatea substanței active în soluția băii de celule, precum și parametrii geometrici: diametrul tubulaturii sistemului de aplicare, distanța la care este situată celula față de vârful sistemului de aplicare, diametrul celulei.

Modelele noastre și-au propus studierea influenței acestor parametri fizici asupra cantității de substanță activă care interacționează efectiv cu receptorii membranari, în condiții experimentale particulare. Scopul unor astfel de modele este determinarea condițiilor experimentale optime de studiu al interacțiunii agonist-receptor și evidențierea unor eventuale corecții de care trebuie ținut cont în analiza datelor experimentale înregistrate prin această metodă. Deși în prezent există modele difuzionale care analizează distribuția in vivo a unui neurotransmițător la nivelul membranei postsinaptice (Whatey et al, 1970; Khanin et al, 1994; Smart & McCammon, 1998; Tai et al, 2003; Popescu & Morega, 2004), nu avem cunoștință până în prezent de modele asemănătoare corespunzătoare situației de studiu experimental.

Modelele au fost efectuate în două ipoteze: prima ipoteză presupune că difuzia este fenomenul exclusiv care guvernează transportul substanței active în soluția de baie, ce-a de-a doua ipoteză luând în considerare și fenomenul de convecție. Problemele au fost rezolvate prin două metode numerice diferite (diferențe finite și element finit), iar concordanța rezultatelor obținute prin cele două metode reprezintă un argument suplimentar pentru validitatea modelelor.

## **EFACTUL GALANTAMINEI ASUPRA RECEPTORULUI NICOTINIC. MĂSURĂTORI PRELIMINARE PRIN METODA PATCH-CLAMP**

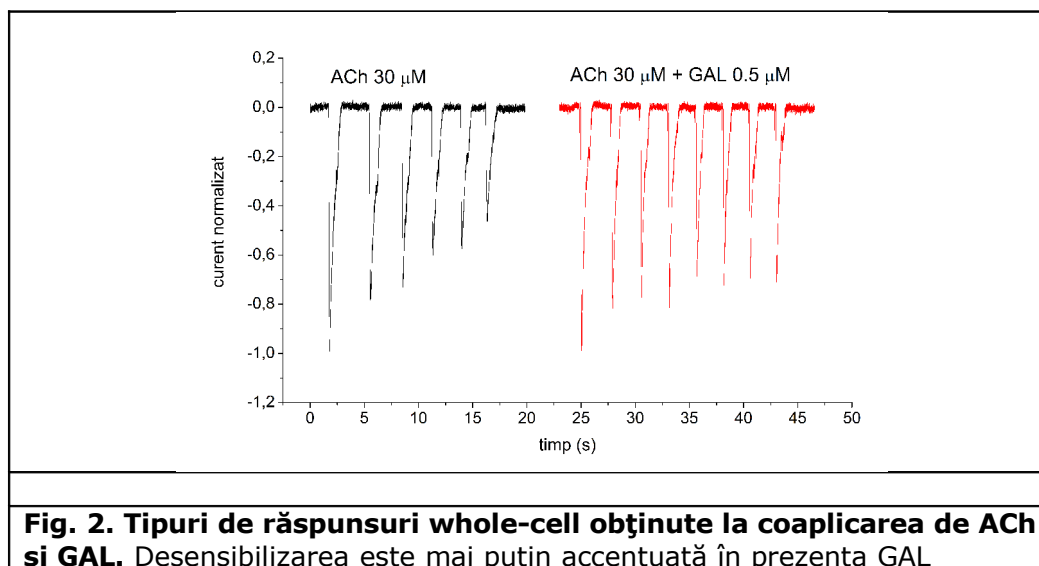
### **Rezumat**

Studiile care fac obiectul prezentului proiect sunt adresate acțiunii unei substanțe farmacologice –galantamina – asupra fenomenelor de activare și desensibilizare ale receptorilor nicotiniici de tip periferic, în ipoteza că ansamblul membrană-receptor realizează un sistem funcțional interdependent, și că modularea neurotransmisiei se poate realiza nu doar prin afectarea directă a unei proteine-receptor ci și prin interferența cu mediul lipidic al bistratului membranal în care receptorul este inserat. În acest sens, se vor utiliza metode electrofiziologice specifice pentru fiecare etaj interesat (membrane lipidice

artificiale pe suport solid, bistraturi lipidice artificiale tip *black lipid membranes, patch-clamp*), combinate cu modelarea teoretică a ipotezelor funcționale sugerate de rezultatele experimentale.

Receptorul nicotinic de ACh este un canal ionic ligand-dependent, cu o structură pentamerică, fiind format din mai multe tipuri de subunități (denumite  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Receptorul nicotinic de ACh prezintă două situsuri de legare a acetilcolinei, situate pe subunitățile  $\alpha$ . Mecanismul de deschidere a canalului ionic al nAChR nu este complet cunoscut. Pe lângă ACh și nicotină, o serie de substanțe se pot lega de receptorul nicotinic de ACh prin mecanisme competitive sau necompetitive, stimulându-l, cu apariția consecutivă a fenomenelor colinergice. Un mecanism deosebit de acțiune asupra receptorului nicotinic pare să aibă **galantamina**. Ea potențează aloteric transmisia nicotinică, având efect facilitator la nivelul SNC, prin aceasta având capacitatea de a ameliora deficite de învățare în studii efectuate pe animale de laborator.

În această fază a proiectului ne-am propus efectuarea unor experimente preliminare, folosind tehnica patch-clamp, asupra mecanismului de desensibilizare a receptorului nicotinic de ACh în prezența galantaminei. S-au pus la punct condițiile de măsurare a semnalelor electrice prin metoda patch-clamp și protocoalele de stimulare. Rezultatele preliminare ale experimentelor au evidențiat faptul că doi parametri ai protocolului de stimulare influențează în mod decisiv răspunsul celular *whole-cell* măsurabil. Este vorba despre durata de aplicație a ACh și despre intervalul dintre aplicații. O durată mai mare de aplicație a ACh este corelată cu o desensibilizare mai rapidă, observabilă prin scăderea răspunsului la o aplicație ulterioară. Acest aspect este consistent cu date din literatură, atestând o desensibilizare accentuată a receptorilor nicotinici la expunerea prelungită la concentrații de agoniști (Corringer *et al*, 1998). Un interval mai scurt între aplicații succesive este de asemenea corelat cu o desensibilizare mai rapidă, pe când intervale prea lungi permit revenirea completă a receptorilor la o stare nedesensibilizată.



Datele preliminare obținute în această primă fază indică existența cu certitudine a unui efect al GAL asupra desensibilizării receptorului nicotinic. Se vor continua experimentele cu măsurători pentru diferite concentrații de acetilcolină și galantamină