

## Zastosowanie voltametrii w badaniach neurofizjologicznych

Marek Wieczorek<sup>1</sup>, Vitaly S. Palamarchouk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Neurofizjologii Katedry Neurobiologii, Uniwersytet Łódzki,

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Toxicology and Neurosciences, Louisiana State University, Health and Sciences Center, Shreveport, USA

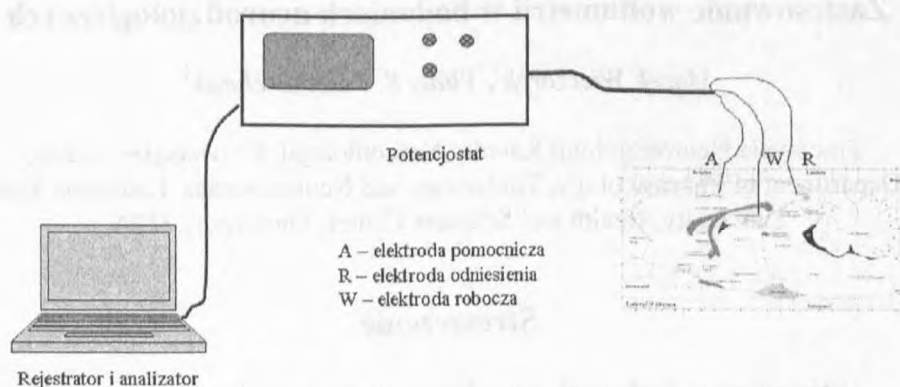
### Streszczenie

Stosowana w badaniach neurofizjologicznych voltametria wywodzi się bezpośrednio z analitycznych metod elektrochemicznych i jest zbliżona do polarografii. Metoda ta, w odróżnieniu od chromatografii czy mikrodiagnostyki nie wymaga pobierania i przygotowywania próbek do późniejszych badań. Cała analiza odbywa się w miejscu, gdzie dany proces zachodzi (w określonej strukturze ośrodkowego układu nerwowego, gdzie ma miejsce uwalnianie neurotransmiterów), a co najważniejsze, pomiar odbywa się w czasie rzeczywistym [20].

Współcześnie stosowane urządzenia pozwalają dokonywać analizy pracy systemów neurotransmisyjnych mózgu w sposób telemetryczny – nie ograniczając tym samym możliwości poruszania się zwierzęcia w kameryze doświadczalnej. Taką procedurę można stosować do, połączonych z behawiorem, obserwacji zmian neurochemicznych i bioelektrycznych mózgu [1].

### Historia rozwoju voltametrii

Stosowane na gruncie badań neurofizjologicznych metody voltametryczne, wywodzą się bezpośrednio z polarografii – jednej z metod analitycznych elektrochemii [21]. Pierwsze informacje o zastosowaniu tej metody w neurofizjologii zostały opublikowane w 1973 roku [10]. Stosowana aparatura wymagała stałego połączenia elektrod zaimplantowanych do mózgu zwierzęcia z potencjostatem polarografu i urządzeniem rejestrującym (Schemat 1). Istotny posęp w rozwoju tej metody dokonał się w roku 1978 [7], kiedy Gonon wprowadził elektrodę roboczą z włókna węglowego (Schemat 2). Elektroda ta, w odróżnieniu od uprzednio stosowanej przez Kissingera elektrody z pasty węglowej [10], dawała zdecydowanie lepszą powtarzalność i tym samym wiarygodność uzyskiwanych rezultatów.



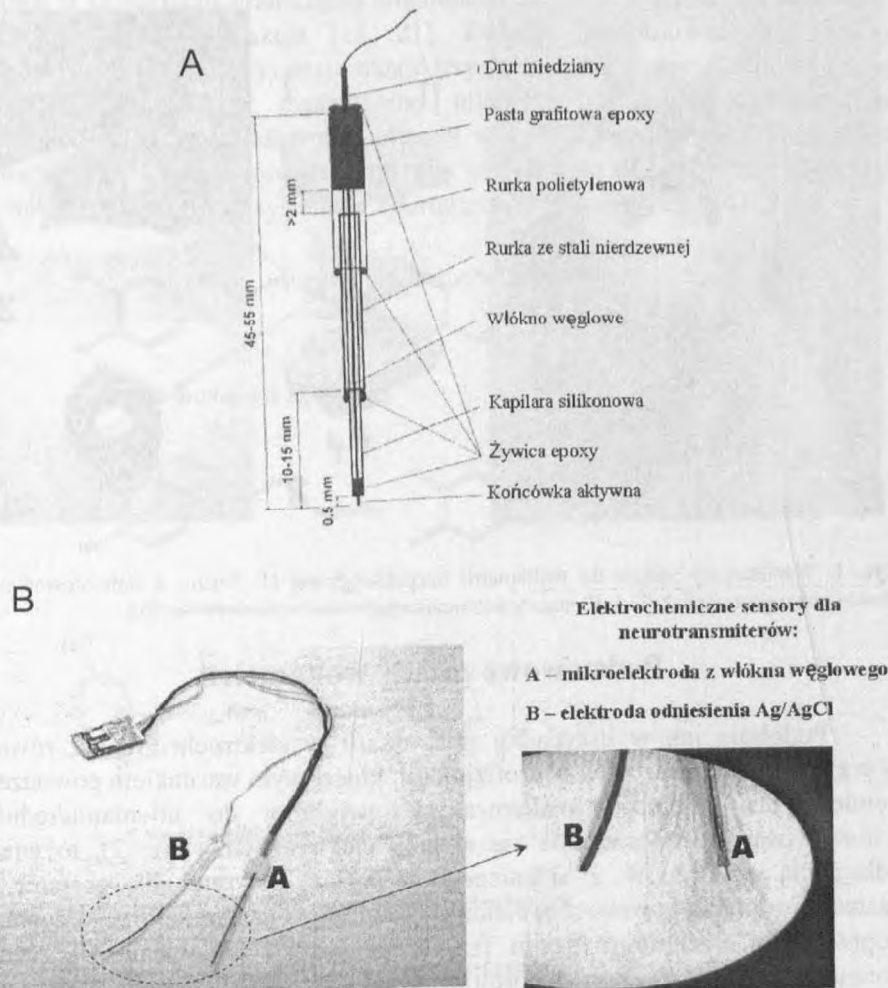
Schemat 1. Zestaw do woltametrii.

Kolejny, milowy krok w rozwoju woltametrii to zastosowanie w 1979 roku przez Armstrong-James'a oraz Millar'a elektrody z włókna węglowego [2], znacznie krótszej niż ta, którą wprowadził Gonona [7]. Roboczy koniec tej elektrody miał długość od 10 do 50  $\mu\text{m}$ . W przypadku elektrody zastosowanej przez Gonona roboczy koniec miał długość 500  $\mu\text{m}$ , a tym samym sygnał woltametryczny był uzyskiwany ze stosunkowo dużej objętości tkanki, a nie z pojedynczych komórek nerwowych.

Późniejsze badania zespołu Armstrong-James'a [2, 3] wykazały, że można rejestrować wydzielane katecholamin oraz serotoniny zarówno w metodach *in vivo* jak i *in vitro*. Następnie, zarejestrowane zostało uwalnianie dopaminy w obrębie prążkowiec w odpowiedzi na stymulację elektryczną dróg dopaminergicznych biegnących w obrębie pęczka przyśrodkowego przodomózgowia [13].

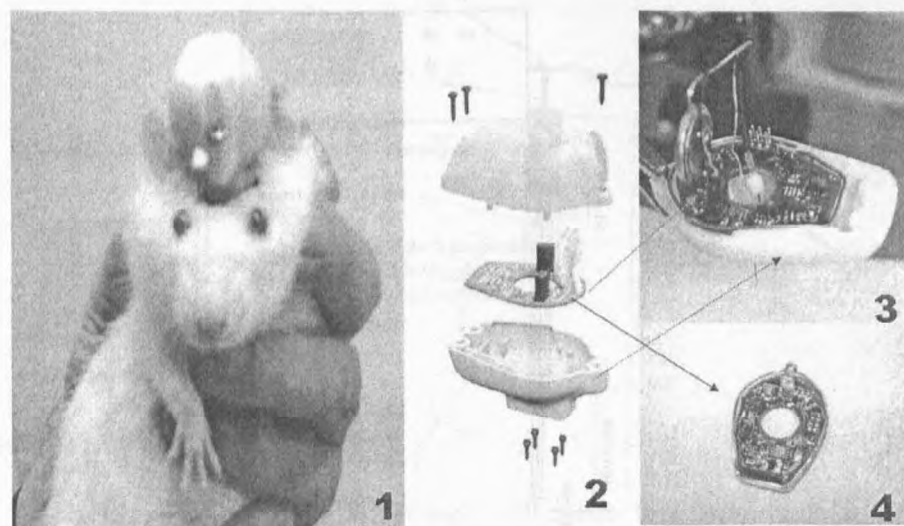
Pierwsze systemy stosowane w badaniach woltametrycznych pozwalały na jednoczesny pomiar aktywności jedynie pojedynczych systemów neurotransmisyjnych, zwykle w obrębie jednej struktury mózgu [14]. Rozwój elektroniki i tym samym ciągle udoskonalanie poszczególnych elementów aparatury do woltametrii (potencjostaty, czy urządzenia odbierające i filtrujące sygnał z zaimplantowanych elektrod), dały możliwość pomiaru, w tym samym czasie, aktywności dwóch systemów neurotransmisyjnych, choćby dopaminergicznego i serotonergicznego [5].

Obecny kierunek rozwoju tej metody badawczej to miniaturyzacja potencjostatów i tym samym możliwość wprowadzenia metod woltametrii bezprzewodowej (Ryc. 1), które pracują bądź to w oparciu o sygnał radiowy [15], bądź to wykorzystujące transmisję sygnałów w podczerwieni [4]. Tym



**Schemat 2.** Schemat konstrukcji elektrody roboczej z włókna węglowego (A) oraz fotografia elektrody z włókna węglowego (B).

samym, możliwe się stało obserwowanie aktywności określonego systemu neurotransmisyjnego mózgu u nieuspionych i niczym nie skrępowanych, swobodnie poruszających się zwierząt. Daje to możliwość korelowania zmian neurochemicznych mózgu, zachodzących w czasie rzeczywistym, ze zmianami zachowania się zwierzęcia w trakcie eksperymentu lub pomieszczeniu hodowlanym, jeśli tego wymagają założenia doświadczenia.

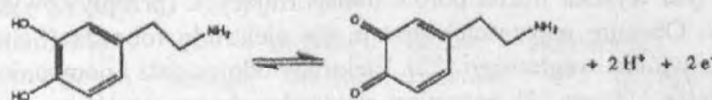


Ryc. 1. Współczesny zestaw do woltametrii bezprzewodowej (1. Szczur z zamontowanym na głowie potencjostatem; 2, 3, 4. Elementy potencjostatu).

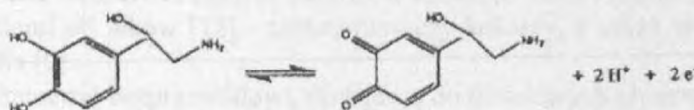
### Podstawowe zasady woltametrii

Podobnie jak w przypadku polarografii w elektrochemii, tak również w przypadku woltametrii w neurofizjologii, kluczowym warunkiem powodzenia pomiaru jest zdolność analizowanych związków do utleniania/redukcji i możliwości przemieszczania się w polu elektrycznym (Rys. 2), to znaczy odłączania elektronów z utlenianego związku, po tym jak zostanie on zaabsorbowany na powierzchni elektrody roboczej, a następnie przenoszenia ich poprzez powierzchnię rozdziału faz. W przypadku pojawienia się różnicy potencjałów cząsteczki neurotransmiterów nabywają zdolność do przemieszczania się w kierunku elektrody roboczej, a podczas dalszego zwiększania różnicy potencjałów cząsteczki, które znajdują się w warstwie granicznej elektrody, mogą być również utleniane/redukowane [11]. Wykorzystując te właściwości i stosując odpowiedni układ elektrod pomiarowych (elektroda robocza – utleniająca, elektroda odniesienia i elektroda pomocnicza - wykorzystuje się ją jedynie w przypadku szybkiego skanowania dla „odprowadzenia” silnego prądu, który nie jest związany z utlenianiem) dokonuje się w układzie *in vivo* lub *in vitro* utleniania analizowanego związku i równocześnie rejestruje liczbę uwolnionych z cząsteczek elektronów (generowanych zmian prądu) w czasie tego procesu. Prąd oksydacyjny, generowany w czasie utleniania związku jest proporcjonalny do stężenia

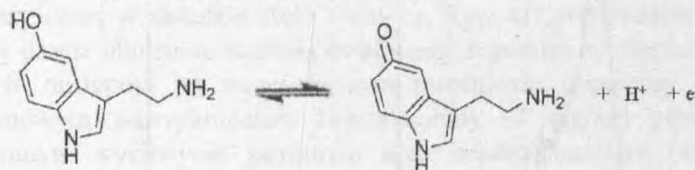
związku w przestrzeni graniczącej znajdującej się przy powierzchni elektrody, na której przebiega reakcja [11, 21]. Związki neurotransmisyjne (aminy biogenne czy aminokwasy) mają charakterystyczne dla siebie potencjały, przy których następuje ich maksymalne utlenianie w polu elektrycznym. Wykorzystując tę ich właściwość, metody woltametryczne pozwalają na takie dostosowanie urządzeń pomiarowych, aby można było obserwować aktywność określonego/określonych systemów neurotransmisyjnych mózgu [4].



Reakcja utleniania dopaminy



Reakcja utleniania noradrenaliny



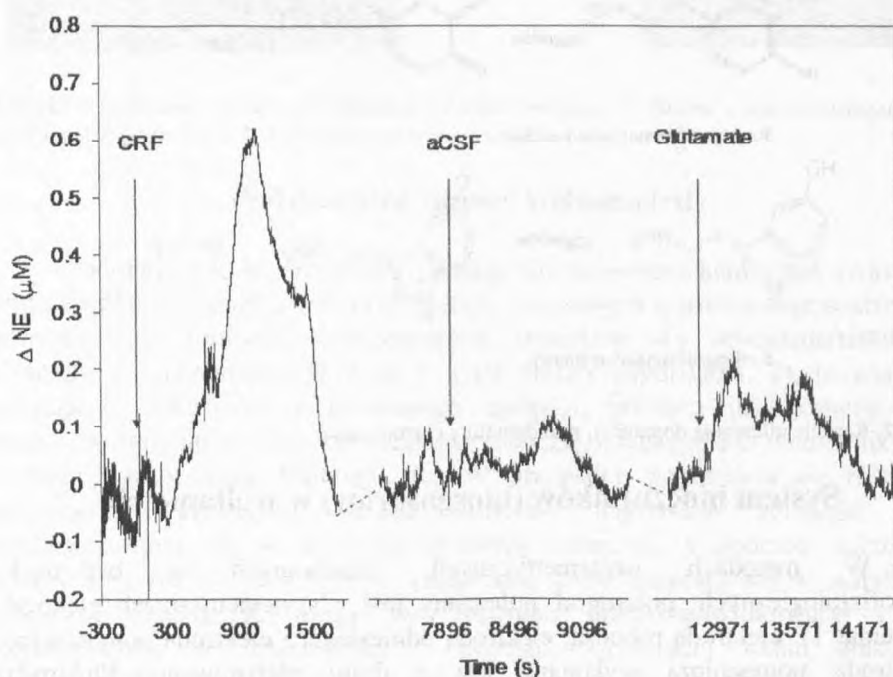
Reakcja utleniania serotoniny

Ryc. 2. Reakcje utleniania dopaminy, noradrenaliny i serotoniny.

### System bioczuJNIKÓW (biosensorÓw) w woltametrii

W metodach woltametrycznych, stosowanych w badaniach neurofizjologicznych, polarograf połączony jest z systemem trzech elektrod (Schemat 1): elektrodą roboczą, elektrodą odniesienia i elektrodą pomocniczą. Elektroda pomocnicza wykonana jest z drutu platynowego. Elektroda odniesienia z drutu srebrnego, pokryta została chlorkiem srebra [21]. Natomiast elektroda robocza, utleniająca, w początkowym okresie stosowania woltametrii w neurofizjologii, była budowana z metalu szlachetnego: złota lub platyny [21]. Elektrody robocze wykonane z metalu nie dawały możliwości pomiaru stężeń neurotransmiterów zbliżonych do ich wartości fizjologicznych w mózgu.

Następną generacją były elektrody wykonane z pasty węglowej. Powierzchnia adsorpcyjna tych elektrod jest znacznie większa niż metalowych i tym samym, znacznie wzrasta liczba cząsteczek, które w jednostce czasu mogą się utleniać. Duża powierzchnia tych elektrod znacznie zwiększyła ich czułość w kierunku niezbędnej dla możliwości pomiarów fizjologicznych stężeń neurotransmiterów w mózgu. Nowoczesne elektrody robocze wykonywane są z włókna węglowego, którego cechą jest wysoka powierzchnia właściwa, a łącznie z tym wysoka liczba porów transportujących (przepływowych) oraz mikroporów. Obecnie najczęściej stosuje się elektrodę roboczą (Schemat 2) zbudowaną z włókna węglowego [22]. Elektrody odniesienia i pomocnicza mają zwykle średnicę 150  $\mu\text{m}$  [4], natomiast elektroda robocza z włókna węglowego ma średnicę 30  $\mu\text{m}$ , a jej końcówka aktywna, długość od 200 do 500  $\mu\text{m}$  [22], (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Przykład chronoamperometrycznego zapisu, w czasie rzeczywistym, uwalniania noradrenaliny. Rejestracja od jednego szczura za pomocą elektrody z włókna węglowego znajdującej się w obrębie formacji hipokampalnej. Mikroiniekcje CRF i glutamianu wykonano do miejsca sinawego (100 nL, 1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$ ).

## Zastosowanie woltametrii we współczesnych badaniach neurofizjologicznych

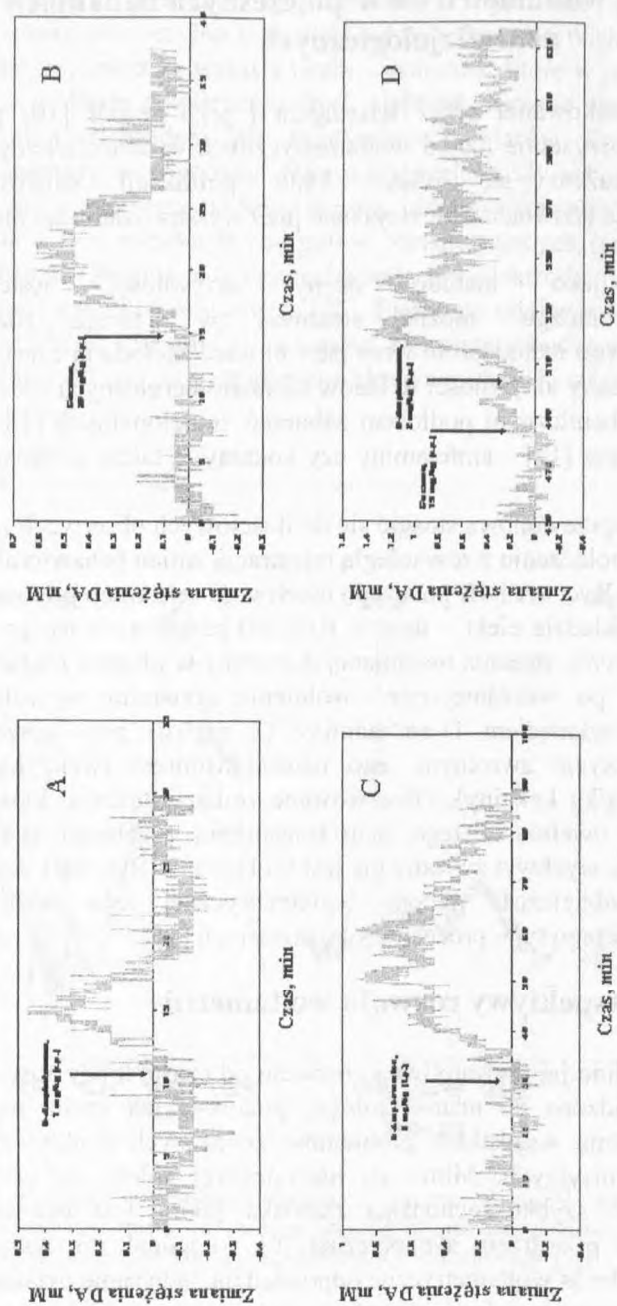
Od czasu opublikowania przez Kissingera i jego zespół [10] pracy przedstawiającej wykorzystanie metod woltametrycznych w neurofizjologii do chwili obecnej ukazało się blisko 1800 publikacji naukowych, przedstawiających dane doświadczalne uzyskane przy wykorzystaniu tej metody (wg. Science Direct).

Woltametrię, jako metodę oceny aktywności systemów neurotransmisyjnych mózgu, można stosować w szeregu różnych eksperymentach, zarówno metodach *in vitro* jak i *in vivo*. Metoda ta często jest wykorzystywana do oceny aktywności układów monoaminergicznych mózgu w badaniach nad neurochemicznym podłożem zaburzeń emocjonalnych [18, 19], uzależnieniami od leków [12] - amfetaminy czy kokainy, a także w badaniach nad depresją [9].

Woltametrię bezprzewodową stosuje się do ilościowych obserwacji zmian neurochemicznych w połączeniu z równoległą rejestracją zmian behawioralnych u szczura (Ryc. 4). Na Ryc. 4A i 4B pokazano możliwość rejestracji odpowiedzi dopaminergicznej w układzie efekt – dawka. Ryc. 4D przedstawia następujące dopaminy czasie obniżenie stężenia uwalnianej dopaminy w obrębie prądkowia. Zmiany te następują po wcześniejszym uwolnieniu dopaminy wywołanym dootrzewnowym wstrzyknięciem D-amfetaminy (2 mg/kg) przy uprzednio zablokowanym wychwycie zwrotnym tego neurotransmitera (wstrzyknięcie dootrzewnowe 15 mg/kg kokainy). Obserwowane zmiany stężenia dopaminy pokazują, że proces uwalniania tego neurotransmitera przebiega znacznie wolniej, niż wtedy, gdy wychwyt zwrotny nie jest blokowany (Ryc. 4B). Jedynie wysoka czasowa rozdzielczość metody woltametrycznej dała możliwość obserwowania kinetyki tego typu procesów synaptycznych [15].

### Perspektywy rozwoju woltametrii

Woltametria, mimo jej niewątpliwego rozwoju od czasu, kiedy została po raz pierwszy wprowadzona do neurofizjologii, podobnie jak każda metoda analityczna nie wyjaśnia wszystkich problemów związanych z aktywnością systemów neurotransmisyjnych. Mimo jej niewątpliwiej zalety, że pozwala obserwować niezwykle szybko zachodzące zjawiska, jakimi jest wydzielanie neurotransmiterów do przestrzeni synaptycznej [6], to jednak nie wszystkie stosowane obecnie techniki woltametryczne odpowiadają na te same pytania. Na przykład chronoamperometria daje możliwości najlepszego rozdziału czasowego



Ryc. 4. Televoltametryczne zapisy zmian stężenia dopaminy w obrębie prążkowie. Zmiany w stężeniu dopaminy po podaniu 1 mg/kg D-aminofetaminy (A), 2 mg/kg D-aminofetaminy (B), 20 mg/kg D-aminofetaminy (B), 15 mg/kg kokainy (C), 15 mg/kg kokainy, a następnie 2 mg/kg D-aminofetaminy (D).



zachodzących zjawisk synaptycznych, jednak niestety słabą stroną tej techniki jest jej średnia możliwość rozróżnienia poszczególnych związków neurotransmisyjnych. Z drugiej strony, voltametria cykliczna oferuje zarówno dobry rozdział czasowy jak i chemiczny badanych zjawisk synaptycznych. Natomiast szybka chronoamperometria daje dobry rozdział czasowy i średniej jakości rozdział chemiczny obserwowanych zjawisk [6].

Obecnie pojawiają się szerokie perspektywy zastosowania (i tym samym połączenia) voltametria z innymi metodami eksperymentalnymi, na przykład metodami rejestracji czynności bioelektrycznej mózgu. Przykładem może być zastosowanie voltametria do obserwacji zmian uwalniania noradrenaliny w obszarze pól projekcyjnych z miejsca sinawego (LC), w odpowiedzi na pojedyncze wstrzyknięcia (dokomorowe czy dożylnie) morfiny u szczurów. Badania elektrofizjologiczne wykazały, że pojedyncze dawki morfiny powodują nie tylko proste obniżenie aktywności bioelektrycznej neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego, ale również indukują synchroniczne wyładowania oscylacyjne w obrębie LC. Wykorzystując chronoamperometrię, stwierdzono zwiększenie uwalniania noradrenaliny w obrębie zakrętu zębatego formacji hipokampalnej zsynchronizowane z aktywnością neuronów LC [8].

Innym z kolei zastosowaniem tej metody jest jej wykorzystanie do pomiaru aktywności układu glutaminergicznego w mózgu. Pomimo tego, że ten pobudzeniowy system neurotransmisyjny jest w mózgu szeroko rozpowszechniony, to obserwacja jego aktywności w czasie rzeczywistym jest niezwykle trudna. Rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie voltametria w połączeniu ze specjalnie skonstruowaną elektrodą enzymatyczną [16, 17].

Wymienione wyżej zastosowania i perspektywy rozwoju voltametria są jedynie wybranymi przez autorów niniejszego opracowania przykładami wykorzystywania tej metody we współczesnych badaniach neurofizjologicznych. Pełna analiza wszystkich zastosowań tej metody eksperymentalnej w znacznym stopniu przekracza cel niniejszego opracowania.

### Piśmiennictwo:

1. Aillon, D., Johnson, D.A., Johnson, D., Palamarchouk, V.S., Smagin, G.N. (2005) *In vitro* study of a new carbon fiber microelectrode for real time measurement of dopamine with digital wireless transmission: application to studies in behaving animals. *Society for Neuroscience Meeting, Washington, DC.*

2. Armstrong-James, M., and Millar, J. (1979) Carbon Fibre Microelectrodes. *J. Neurosci Meth.* 1: 279-287.
3. Armstrong-James, M., Millar, J., and Kruk, Z.L. (1980) Quantification of noradrenaline iontophoresis. *Nature.* 288: 181-183.
4. Crespi, F., Dalessandro, D., Annovazzi-Lodi, V., Heidbreder, C., Norgia, M. (2004) In vivo voltammetry: from wire to wireless measurements. *J. Neurosci. Meth.* 140: 153-161.
5. Crespi, F., England, T.G., Trist, D.G. (1995) Simultaneous, selective detection of catecholaminergic and indolaminergic signals using cyclic voltammetry with treated micro-sensor. *J. Neurosci. Meth.* 61: 201-212.
6. Darren, M.J., Wightman, R.M. (1999) Electrochemical monitoring of biogenic amine neurotransmission in real time. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19: 33-46.
7. Gonon, F., Cespuglio, R., Ponchon, J-L, Buda, M., Jouvet, M., Adams, R.N., Pujol, J-F. (1978) Mesure électrochimique continue de la libération de dopamine réalisée dans le néostriatum du rat. *Compte Rendus* 286: 1203-1206.
8. Zhu, H., Palamarchouk, V.S., Zhou, W. (2005) Effects of morphine on norepinephrine release in rat hippocampus: an in vivo voltammetry study. *Society for Neuroscience Meeting, Washington, DC.*
9. Huerta-Cerdán, A., de la Rosa, J.M., González, C.A., Genesca, J. (2003) Cyclic voltammetry and dielectric studies on PbS-potassium ethyl xanthate-dextrine system under flotation and depression conditions. *J. Materials Process. Technol.* 143-144: 23-27.
10. Kissinger, P.T., Hart, J.B., and Adams, R.N. (1973) Voltammetry in Brain Tissue- a new neurophysiological measurement. *Brain Res.* 55: 209-213.
11. Kissinger, P.T., Heineman, W.R. (1984) Laboratory techniques in electroanalytical chemistry. *Marcel Dekker, INC. New York and Basel*, s. 51-127.
12. Kiyatkin, E.A., Stein, E.A. (1995) Fluctuations in nucleus accumbens dopamine during cocaine self-administration behavior: an in vivo electrochemical study. *Neuroscience.* 64: 599-617.
13. Millar, J., Stamford, J.A., Kruk, Z.L., Wightman, R.M. (1985) Electrochemical, pharmacological, and electrophysiological evidence of rapid dopamine release and removal in the rat caudate nucleus following electrical stimulation of the median forebrain bundle. *European J. Pharm.* 109: 341-348.
14. Nakazato, T., Akiyama, A. (1999) High-speed voltammetry: dual measurement of dopamine and serotonin. *J. Neurosci. Meth.* 89: 105-110.
15. Palamarchouk, V.S., Goeders, N., Song, D., Aillon, D., Johnson, D.A., Johnson, D., Smagin, G.N. (2005) In vivo real time measurement of dopamine with digital wireless data transmission: application to studies in behaving animals. *Society for Neuroscience Meeting, Washington, DC.*
16. Palamarchouk, V.S., Song, D., A. Medd, Aillon, D., Johnson, D.A., Mrzljak, L., Smagin, G.N.. (2004) In vivo real time measurement of glutamate in basolateral amygdala (BLA) of behaving animals subjected to conditioned fear stress paradigm. *Society for Neuroscience Meeting. San Diego, CA*
17. Palamarchouk, V.S., Song, D., Medd, A., Aillon, D., Johnson, D.A., Mrzljak, L., Smagin, G.N., (2003) In vivo real time measurement of glutamate using enzyme electrodes. *Society for Neuroscience Meeting. San Diego, CA*
18. Pezze, M.A., Feldon, J. (2004) Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog. Neurobiol.* 74: 301-320.

19. Salamone, J.D. (1996) The behavioral neurochemistry of motivation: methodological and conceptual issues in studies of the dynamic activity of nucleus accumbens dopamine. *J. Neurosci. Meth.* 64: 137-149
20. Stamford, J.A. (1990) Fast Cyclic Voltammetry - Measuring Transmitter Release in Real-Time. *J. Neurosci. Meth.* 34: 67-72
21. Stamford, J., Crespi, F., Marsden, C.A. (1992) In vivo voltammetric methods for monitoring mono-amine release and metabolism. W: *Practical approach series monitoring neuronal activity.* Oxford, UK: Irl Press at Oxford University Press, s. 113-145
22. Swiergiel, A.H., Palamarchouk, V.S., Dunn, A.J. (1997) A new design of carbon fiber microelectrode for in vivo voltammetry using fused silica. *J. Neurosci. Meth.* 73: 29-33

Adres do korespondencji:

**Marek Wieczorek**

Pracownia Neurofizjologii Katedry Neurobiologii

Uniwersytet Łódzki

ul. Rewolucji 1905 r nr 66

90-222 Łódź

tel. (48 42) 66 55 668

e-mail: marek@biol.uni.lodz.pl