

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Навчально-науковий Фізико–технічний інститут

Кафедра прикладної фізики

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

(підпис) Монастирський Г.Є.
(ініціали, прізвище)

«__» _____ 2022 р

Дипломна робота

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо–професійною програмою «Прикладна фізика»

спеціальності 105 «Прикладна фізика та номатеріали»

**на тему: «Особливості біофізичного дослідження гангліозних клітин
сітківки ока»**

Виконала:

Студентка IV курсу, групи ФФ–81

Шолудько Олександра Ігорівна

Керівник:

Старший науковий співробітник, кандидат біологічних наук,

Пурнинь Олена Едуардівна

Рецензент:

Старший науковий співробітник, кандидат біологічних наук,

Войтенко Сергій Валентинович

Засвідчую, що у даній дипломній роботі немає
запозичень з праць інших авторів без відповідних
посилань

Студентка: Шолудько О.І.

_____ (підпис)

Київ – 2022 року

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

Фізико–технічний інститут

Кафедра прикладної фізики

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»

Освітньо–професійна програма «Прикладна фізика»

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о. завідувача кафедри

_____ Монастирський Г.Є.
(підпис) (ініціали, прізвище)

« ____ » _____ 2022 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Шолудько Олександра Ігорівна

1. Тема проєкту «Особливості біофізичного дослідження гангліозних клітин сітківки щурів», керівник проєкту Пурнинь Олена Едуардівна, кандидат біологічних наук, затверджені наказом по університету від « ____ » _____ 20__ р. № _____
2. Термін подання студентом проєкту « _____ » _____ 20__ р.
3. Об'єкт дослідження: гангліозні клітини сітківки.
4. Пояснювальна записка: дипломна робота за обсягом становить 56 сторінок, 24 рисунка (ілюстрації і фотографії), 2 блок-схеми, 7 графіків і 32 джерела використаної літератури.
5. Перелік графічного матеріалу: презентація – 12 слайдів
6. Дата видачі завдання « ____ » _____ 20__ р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту (роботи)	Строк виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1	Досліди в лабораторії	08.2021-02.2022	
2	Ознайомлення з установкою та методами Patch clamp	12.2021-02.2022	
3	Збір літератури за темою	01.2022-02.2022	
4	Написання першої частини дипломної роботи	03.2022-04.2022	
5	Написання другої частини дипломної роботи	04.2022-05.2022	
6	Написання третьої частини дипломної роботи	06.2022	
7	Написання висновків	06.2022	
8	Перевірка дипломної роботи на антиплагіат	10.06.2022	
9	Підготовка доповіді та презентації	06.2022	
10	Передзахист дипломної роботи	16.06.2022	
11	Подання роботи на рецензування	06.2022	
12	Захист дипломної роботи	22.06.2022	

Студентка: О. І. Шолудько

Керівник: О. Е. Пурнинь

АНОТАЦІЯ

Обсяг дипломної роботи складає 56 сторінок. Робота містить 24 рисунка (ілюстрації і фотографії), 2 блок-схеми, 7 графіків і 32 джерела використаної літератури.

Дослідження гангліозних клітин сітківки є актуальним завданням електрофізіологічних досліджень методами біофізики для виявлення способів передачі зорової інформації. Результати досліджень гангліозних клітин можуть допомогти у вирішенні проблем виникнення вад зору в процесі формування зорової інформації в сітківці ока, можливості пошуку способів коригування роботи сітківки на клітинному рівні.

Метою роботи є ознайомлення з електрофізіологічними методами дослідження нейронів ссавців, дослідження особливостей синаптичної передачі гангліозних клітин сітківки щурів при стимулюванні них різними внутрішньоклітинними електрофізіологічними методами та аналіз отриманих даних.

У роботі розглянуто анатомо-морфологічні властивості ока і сітківки ока ссавців, досліджено відповіді від гангліозних клітин при застосуванні до них методу фіксації струму та методу фіксації напруги. Дослідження проводилися на прикладі гангліозних клітин сітківки ока щурів 3-х тижневого віку.

У роботі описано поступовий процес підготовки препарату і проведення досліду. В експерименті застосовувалися методи фіксації потенціалу і фіксації струму в конфігурації “ціла клітина” з використанням петч–піпетки (метод Patch-clamp).

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки ока, нейрон, сітківка, електрофізіологія, потенціал дії, метод фіксації потенціалу, метод фіксації струму.

ABSTRACT

The diploma work consists of 56 pages. The work contains 24 drawings (illustrations and photographs), 2 flowcharts, 7 graphs and 32 references.

Study of retinal ganglion cells is an actual task of electrophysiological studies using biophysics methods to identify ways of transmitting visual information. The results of studies of ganglion cells can help in solving the problems of the occurrence of visual defects in the process of formation of visual information in the retina, the possibility of finding ways to correct the work of the retina at the cellular level.

The aim of the work is to get acquainted with electrophysiological methods of mammalian neurons research, to study peculiarities of synaptic transmission of rat retinal ganglion cells when stimulated by different intracellular electrophysiological methods and to analyze obtained data.

The work considers the anatomical and morphological properties of the mammalian eye and retina, and investigates the responses from ganglion cells when applying the current-clamp method and the voltage-clamp method to them. The studies were carried out on the example of ganglion cells of the retina of 3-week-old rats.

The work describes the gradual process of preparing the preparation and conducting the experiment. The current-clamp method and the voltage-clamp method were used in the experiment in the "whole cell" configuration using apatch-pipette (patch-clamp method).

Key words: retinal ganglion cells, neuron, retina, electrophysiology, action potential, current-clamp method, voltage-clamp method.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ.....	9
1. Анатомія ока.....	9
2. Структура сітківки– її клітини і шари.....	11
3. Кровопостачання сітківки ока. Судинна система сітківки.....	14
4. Зв'язки і структура нейронів сітківки. Передача зорової інформації до мозку від сітківки.....	17
4.1 Роль клітин мюллера в сітківці.....	19
5. Генерація і поширення потенціалу дії.....	20
6. Типи гангліозних клітин сітківки.....	23
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	25
7. Електрофізіологічні методи досліджень.....	25
8. Виготовлення петч–піпеток. Переваги петч–піпеток.....	28
9. Методика препарування і приготування препарату.....	31
10. Опис експериментальної установки.....	35
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	40
11. Проведення експерименту та його результати.....	40
11.1 Стимулювання гангліозної клітини методом фіксації потенціалу.....	42
11.2 Стимулювання гангліозної клітини методом фіксації струму.....	44
11.3 Висновок до розділу.....	48
ВИСНОВКИ.....	49
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	51
ДОДАТКИ.....	55
Додаток 1. Анатомія ока.....	55
Додаток 2. Розташування нейронів у сітківці.....	56

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГКС – гангліозні клітини сітківки

ПД – потенціал дії

МП – мембранний потенціал

МПС – мембранний потенціал спокою

РС – Patch-clamp

VC – Voltage-clamp (метод фіксації потенціалу)

СС – Current-clamp (метод фіксації струму)

АЦП – аналого-цифровий перетворювач

ЦАП – цифро-аналоговий перетворювач

ВСТУП

Око ссавців є головним органом зорової системи ссавців. Сітківка ока відповідає за сприймання та первинний аналіз зорового зображення і перетворює світлову енергію на нейроні імпульси для подальшої передачі отриманої інформації в центральну нервову систему. Гангліозні клітини сітківки відіграють дуже важливу роль у процесі зору, оскільки зорова інформація від ГКС передається до головного мозку через зоровий нерв. ГКС виступають з'єднувальним містком між сітківкою і центрами обробки зорової інформації в мозку.

Дослідження ГКС є актуальним завданням електрофізіологічних досліджень методами біофізики для виявлення способів передачі зорової інформації, проблем виникнення вад зору в процесі формування зорової інформації в сітківці ока, можливості пошуку способів коригування роботи сітківки на клітинному рівні.

У 1939 році дослідники Кертис Х. і Коул К. змогли методом введення в клітину макроелектроду дослідити і зареєструвати МПС гігантського аксона кальмара. У 1949 році Ральф Джерард і Гульберт Лінг розробили мікроелектродну техніку відведення потенціалів, яка дозволяє вивчати МПС, ПД та інші електричні процеси дуже малих клітин, таких як нейрони. Метод Patch-clamp, в якому використовують не мікроелектрод, а спеціальну петч-піпетку був винайдений 1976 року Костюком П.Г. в Інституті фізіології імені О.О. Богомольця. У 1947 році вченими К. С. Коулом і Г. Мармоном був розроблений метод фіксації потенціалу (VC).

Метою даної роботи є реєстрація і аналіз відповідей гангліозних клітин сітківки щурів на стимулювання них різними методами внутрішньоклітинних електрофізіологічних досліджень. В роботі описано поступовий процес підготовки препарату і проведення досліду. В експерименті застосовувалися методи фіксації потенціалу і фіксації струму в конфігурації “ціла клітина” з використанням петч-піпетки (метод Patch-clamp).

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

1. АНАТОМІЯ ОКА

Око є органом зорової системи ссавців, що забезпечує виявлення і подальший аналіз світла. Воно має складну структуру, включаючи три шари спеціалізованих тканин (*див. Додаток 1*), які оточують склоподібне тіло.

Найміцнішою оболонкою зі сполучної тканини в оці є склера, яка разом з рогівкою, входить до складу зовнішньої з трьох оболонок. Ці тканини складаються з колагенових волокон. До цього шару також входить область переходу між склерою і рогівкою, яка називається лімбус. Склера виконує опорну функцію ока, граючи роль каркасу для нього, складається з переплетіння колагенових і еластичних волокон та є стійкою до механічних втручань. Рогівка, через яку всередину ока потрапляє світло, розташовується на передній частині ока. За рогівкою розташований кришталик, який є лінзою ока, тобто головним елементом заломлення світлових променів. Таким чином, зовнішня оболонка відіграє захисну функцію ока від механічних та хімічних уражень, а також може сприймати, пропускати і заломлювати світлові промені [1].

Після зовнішнього шару такі складові ока як райдужка, циліарне (або війчасте) тіло і хороїд об'єднують в середній шар. Райдужна оболонка знаходиться за рогівкою і перед хороїдом. Основна функція райдужки – коректувати кількість світла, яке може пройти крізь зіницю (отвір в центрі райдужної оболонки). Забарвлення райдужки в різні кольори зумовлене наявністю пігменту меланіну. Регулювання кількості світла, яке проходить крізь зіницю, райдужка проводить за рахунок зміни діаметра зіниці її гладенькими м'язами. До райдужки кріпиться циліарне тіло, яке складається з м'язових клітин (війкового м'яза). Циліарне тіло грає важливу роль в роботі

заломлювальної сили кришталіка – акомодації. Кришталіком є двоопукла лінза, яка має змінну фокусну відстань [1].

Зазначимо, що кришталік разом з рогівкою є аналогом об'єктива фотоапарата, в якому вигин великої частини отриманих світлових променів відбувається в місці, де світло потрапляє в око, тобто на межі повітря–рогівка. Для фокусування ока змінюється не відстань між лінзою і сітківкою (аналог зміни відстані між плівкою і об'єктивом для фокусування фотоапарата), а змінюється форма кришталіка завдяки сухожиллям, які або стягують його, або розтягують по краям. Таким чином маємо кришталік ближче до сферичної форми для близьких об'єктів, і відповідно ближче до плоскої форми для далеких [2].

Хороїд ще називається судинною оболонкою ока через велику кількість кровоносних судин, які живлять око. Пігментний епітелій із епітеліальних клітин, які містять в собі пігмент меланін, допомагає усувати розсіяння світла і підтримує високу якість зображення [1].

У внутрішньому шарі ока міститься сітківка, яка відіграє функцію сприймання світла, первинного аналізу, який включає аналіз світлової інформації, темних та світлих плям у зображенні. Після обробки отриманої з навколишнього середовища світлової інформації, сітківка передає її в мозок за допомогою зорового нерва. Нерв знаходиться на задньому полюсі очного яблука. Сітківка здатна перетворити світлову енергію на нервові імпульси, які по зоровому нерву надходять до спеціалізованих структур мозку [1].

2. СТРУКТУРА СІТКІВКИ– ЇЇ КЛІТИНИ І ШАРИ

Сітківка являє собою багат шарову складно побудовану ділянку ока ссавців, що відповідає за отримання квантів світла, їх перетворення в нервові імпульси та передачу зорової інформації до зорової кори головного мозку для подальшої обробки. Розвиток цієї тканини походить від мішечка ембріонального переднього мозку і відокремлюється від нього на ранніх стадіях розвитку. Тому сітківка є частиною мозку, зв'язок з яким зберігається завдяки зоровому нерву – пучку волокон [2].

Структура сітківки складається з нервових клітин, які розташовані в три ряди, між якими знаходяться шари з синаптичними зв'язками (сполучними плексиформними шарами), утворені аксонами та дендритами цих клітин (див. Рис. 2.1) [3].

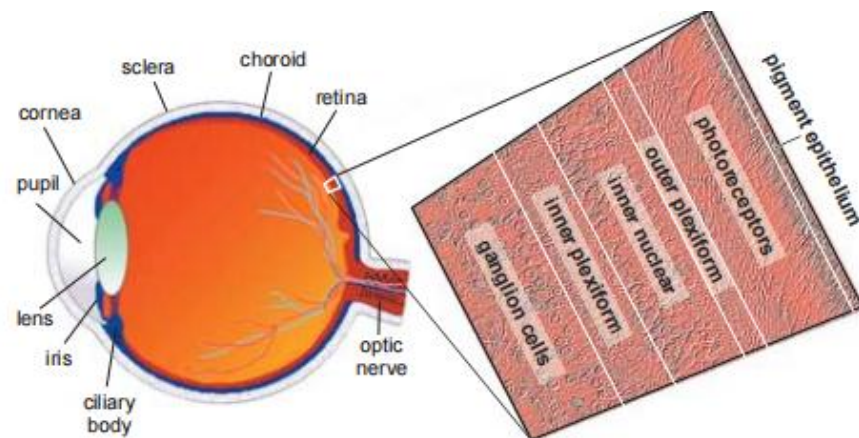


Рис 2.1. Структура ока і збільшена схема шарів структури сітківки. Запозичено з [3].

В сітківці містяться 5 типів клітин, такі як (див. Рис. 2.2) [1]:

- гангліозні клітини (RGS)
- амакринові клітини
- біполярні клітини
- горизонтальні клітини
- фоторецептори (палички та колбочки)

Гангліозні клітини знаходяться в найбільш внутрішньому шарі. Цей шар також складають переміщені амакринові клітини. Наступний шар складають клітинні тіла амакринових клітин, біполярних і горизонтальних клітин (а також іноді переміщені гангліозні клітини), який має назву внутрішній ядерний шар [1]. Амакринові клітини з'єднують ГКС з біполярними. Вхідний сигнал потрапляє на біполярні клітини, які в свою чергу зв'язуються довгими паралельними шарами сітківки зв'язками з фоторецепторами за допомогою горизонтальних клітин [2].

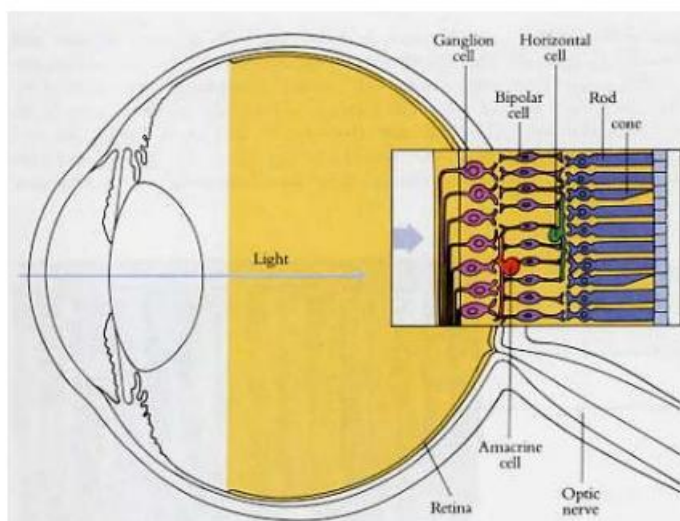


Рис 2.2. Збільшена сітківка праворуч з позначеними типами клітин. Запозичено з [2].

Зовнішній ядерний шар, який йде наступним, містить світлові рецептори – фоторецептори. Фоторецепторами виступають палички і колбочки, причому палички дуже передують за чисельністю і відповідають за бачення при слабкому освітленні (виходять з ладу при яскравому світлі). Колбочки ж дозволяють нам мати яскраво-кольоровий зір, не реагують на тьмяне світло і використовуються при денному світлі [3]. За можливість бачити дрібні деталі також відповідають колбочки. Колбочки центруються всередині жовтої плями сітківки – місця найбільшої гостроти зору, яке досягається за рахунок максимальної кількості колбочок в такому місці. Ця

зона носить назву фовеа (або центральна ямка) – невелика ділянка, яка складається тільки з колбочок і є зоною без паличок [2].

Для гризунів, таких як щури, будуть переважати палички в фоторецепторах, оскільки ці тварини є нічними. При чому їх колбочки становлять лише 3–5% від усіх фоторецепторів і є невеликі за розміром. [3].

Цікавою особливістю сітківки є те, що фоторецептори знаходяться в задній частині сітківки. Це означає, що вхідне світло має подолати всю сітківку до зовнішнього шару, щоб стимулювати фоторецептори. Можливим поясненням того, що сітківка розвивається таким чином, може бути важливість розташування клітин, що містять чорний пігмент меланін. Ця епітеліальна тканина розташована за сітківкою і є дуже темною через велику кількість меланіну в клітинах [3]. Такі клітини за аналогією чорної фарби в фотоапараті не дають вхідному світлу відбиватися або розсіюватися і потрапляти знову на фоторецептори, що може призвести до втрати чіткості (розмитості) зображення [2].

Зазначимо, що група дослідників з Німеччини та Великої Британії в дослідях *in vivo* та *in vitro* методом конфокальної мікроскопії показали, що клітини Мюллера забезпечують проходження світла з низьким розсіюванням від поверхні сітківки (ділянки, що граничить зі скловидним тілом) до фоторецепторів. Використовуючи модифіковану двопроменеву лазерну пастку, вони також змогли показати, що окремі клітини Мюллера діють як оптичні волокна, а їх паралельний масив в сітківці нагадує волоконно-оптичні пластини, що використовуються для передачі зображення з низьким рівнем спотворення [4]. Дослідники зробили висновок, що мюллерівські клітини опосередковують передачу зображення через сітківку хребетних з мінімальним спотворенням та низькими втратами. На думку авторів саме цей висновок прояснює фундаментальну особливість перевернутої сітківки, як оптичної системи, надає гліальним клітинам раніш невідому функцію (поряд з трофічною та скріплюючою всі шари сітківки функціями) [4].

3. КРОВОПОСТАЧАННЯ СІТКІВКИ ОКА. СУДИННА СИСТЕМА СІТКІВКИ

Сітківка ока має найбільші метаболічні потреби у порівнянні з усіма іншими тканинами організму [5], оскільки ефективне постачання поживних речовин, кисню і швидке виведення відходів із сітківки мають особливе і вирішальне значення для функціонування аксонів і нейронів сітківки [6]. Кров до них постачається судинною системою сітківки.

Клітини сітківки отримують поживні речовини з високою швидкістю метаболізму за допомогою двох судинних систем, які відповідають одночасним вимогам достатнього кровопостачання і найменш можливим завадам променям світла на шляху до фоторецепторів [5]. Внутрішню частину сітківки живить центральна артерія, а зовнішню частину сітківки разом з пігментним епітелієм підтримує хоріокапілярна артерія [7]. В око судина сітка входить і виходить через центр зорового нерва.

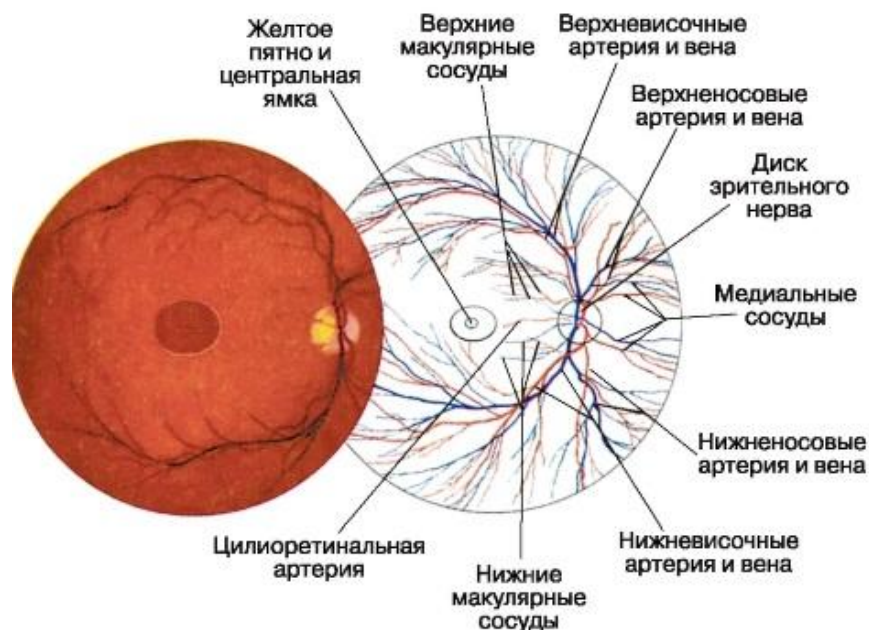


Рис. 3.1. Схема судинної системи сітківки ока. Запозичено з [8].

Тут, в головці зорового нерва, сходяться близько 1,2 мільйона аксонів гангліозних клітин. Ця область має густу капілярну мережу для того, аби задовольнити потребу в швидкому і високому метаболізмі [6].

Далі відбувається розгалуження центральної вени та артерії на чотири пари гілок, які живлять сітківку ока по всій площі (див. Рис. 3.1):

- верхньо– і нижньоскронева артерії та вени;
- верхньо– і нижньоносова артерії та вени

Подальше розгалуження призводить до появи менших артеріол від кожної з чотирьох основних вен та артерій, які охоплюють сітківку в більш периферичному напрямленні. Область, яка залишається без кровоносних судин, тобто є аваскулярною, це – фовеа (центральна ямка) [5].

Розгалужуючись в шарах гангліозних клітин, центральна артерія утворює умовно три капілярні шари судинних сплетень, а саме поверхневий, проміжний і глибокий шари [7]. Завдяки внутрішньому ядерному і внутрішньому плексиформному шарам судини з верхніх шарів (див. Рис. 3.2 (а), шари “*Superficial*” і “*Intermediate*”) мають змогу проникати глибше до клітин сітківки, і утворюють глибокий шар сплетіння судин (див. Рис. 3.2 (а), шар “*Deep*”) [5].

Якщо в зовнішньому шарі сплетіння судини являють собою в основному капіляри, то у внутрішніх шарах крім капілярів і посткапілярних венул кров надходить також по більшим за розмірами артеріолам і венулам. Чим ближче до краю сітківки, тим більше артеріол і венул переходить в капіляри, залишаючи на краю сітківки тонкий аваскулярний обідок [5].

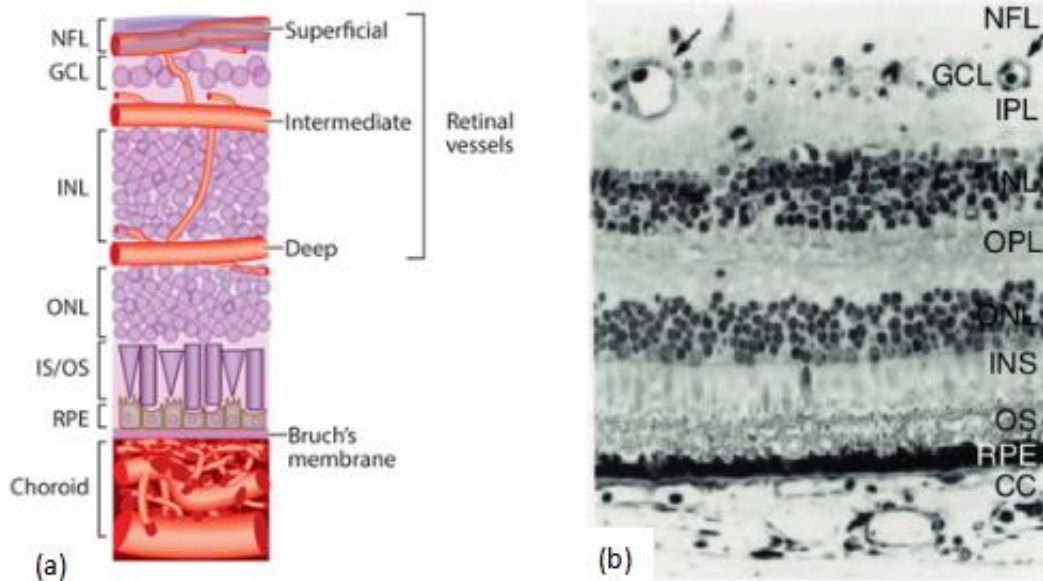


Рис. 3.2 (а) Схематичний вид поперечного перерізу судинної системи сітківки. Запозичено з [7], (b) Мікрофотографія судинної системи сітківки людини. З верхньої частини зображення (з внутрішніх шарів сітківки) до нижньої (до зовнішніх шарів сітківки):

NFL – шар нервових волокон,
 GCL – шар гангліозних клітин,
 IPL – внутрішній плексиформний шар,
 INL – внутрішній ядерний шар,
 OPL – зовнішній плексиформний шар,
 ONL – зовнішній ядерний шар,
 INS – внутрішні сегменти фоторецептора,
 OS – зовнішні сегменти фоторецептора,
 RPE – пігментований епітелій сітківки,
 CC – хороїд (судинна оболонка). Запозичено з [5].

4. ЗВ'ЯЗКИ І СТРУКТУРА НЕЙРОНІВ СІТКІВКИ. ПЕРЕДАЧА ЗОРОВОЇ ІНФОРМАЦІЇ ДО МОЗКУ ВІД СІТКІВКИ

Нейронною клітиною (або просто нейроном) є електрично збудлива клітина, яка передає хімічні або електричні сигнали (інформацію) іншим клітинам за допомогою синапсів – спеціальних з'єднань для передачі інформації. Структурно нейрон складається з соми (тіла клітини) з ядром всередині, аксона, який здатен проводити від клітини на далекі відстані електричні імпульси (потенціал дії), і дендритів, які отримують електрохімічну стимуляцію від інших нейронів і розповсюджують її на сому (див. Рис. 4.1).

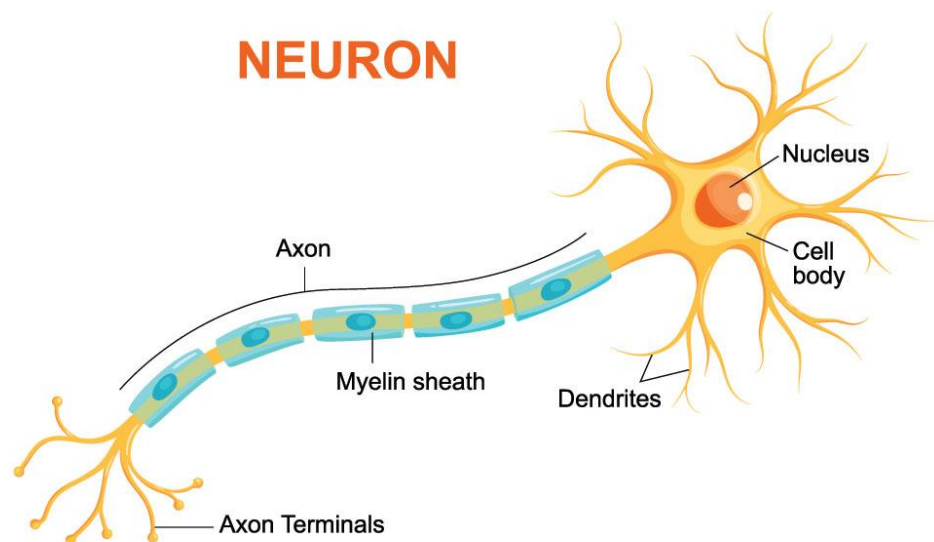


Рис. 4.1. Структура нейрона. Запозичено з [11].

Клітини сітківки, які згадувалися раніше, такі як гангліозні клітини, амакринові клітини, біполярні клітини, горизонтальні клітини і фоторецептори, є основними п'ятьма типами нейронів сітківки. Основна задача нейронів сітківки – передача в мозок зорової інформації. Соми цих клітин знаходяться в зовнішньому ядерному шарі, внутрішньому ядерному

шарі і шарі гангліозних клітин (див. Додаток 2, а також див. Рис. 3.2). При цьому відростки цих нейронів розташовані в зовнішньому і внутрішньому плексиформних шарах[9].

Палочки та колбочки складаються з фотопігменту в зовнішньому шарі і контактують за допомогою синапсів у внутрішньому шарі (який також має клітинне ядро) з біполярними або горизонтальними клітинами. При потраплянні світла на фотопігмент змінюється мембранний потенціал цього рецептора і запускається каскад процесів для передачі інформації далі по аксонам [9]. Інформація передається через основний шлях з трьох нейронів, а саме від фоторецепторів сигнал потрапляє на внутрішню частину сітківки за допомогою біполярної клітини, які контактують з колбочками, а далі до гангліозної клітини [10].

Інші два типи нейронів, а саме горизонтальні і амакринові клітини, відповідають за чутливість до яскравого контрасту світла зорової системи, що має назву латеральної (далекої або бокової) взаємодії всередині сітківки ока. Амакринові клітини уточнюють відповіді від біполярних клітин і утворюють масив підтипів гангліозних клітин для передачі сигналу на них. Горизонтальні і амакринові клітини допомагають передавати сигнал від фоторецепторів до гангліозних клітин [9].

Сигнал від гангліозних клітин сітківки через відповідні аксони, з яких утворюється зоровий нерв, передається до зорової кори головного мозку. Описаний вище шлях і є основою зору [10].

4.1 РОЛЬ КЛІТИН МЮЛЛЕРА В СІТКІВЦІ

Соми нейронів усієї центральної нервової системи оточені гліальними відростками, які забезпечують передачу нервових імпульсів та надають умови їх для генерації. При цьому гліальні клітини частково задовольняють процес метаболізму для самого нейрона. У сітківці роль покриття гліальними клітинами сом нейронів найчастіше виконують відростки клітин Мюллера, тобто клітини Мюллера є гліальними клітинами сітківки ока. Про те, що кожен нейрон в сітківці оточений відростками клітин Мюллера зазначають Stone J. та Valter K [12].

За результатами дослідження американських вчених із Кембриджського університету з використанням електронної мікроскопії, були знайдені відростки клітин Мюллера навіть в місцях, де астроцити щільно прилягають до сом гангліозних клітин. В таких випадках відростки клітин Мюллера перебували між відростком астроцита і сомою нейрона [13].

Клітини Мюллера простягаються вертикально від зовнішнього ядерного шару сітківки до її внутрішнього краю. Такі клітини з'єднують всі шари сітківки між собою, а також живлять інші клітини. Клітини Мюллера забезпечують своєю доглядовою функцією нейрони сітківки. Клітини Мюллера одночасно відповідають ще за підтримку саморегуляції позаклітинного середовища в сітківці [1].

5. ГЕНЕРАЦІЯ І ПОШИРЕННЯ ПОТЕНЦІАЛУ ДІЇ

Потенціал дії (ПД) – це швидке високоамплітудне і короткочасне коливання мембранного потенціалу при збудженні клітин подразником порогової сили. Hodgkin A., Huxley A. Розробили математичну модель, яка описує генерацію та розповсюдження ПД, які виникають через стимуляцію збудливої мембрани, що лежить між зовнішнім середовищем і аксоплазмою (частиною плазми нейрона в аксоні) [27]. ПД є нервовим сигналом, який можна виразити в мілівольтах. До клітини–мішені ПД генерується і передається нейроном по відросткам [14]. ПД генерується в сомі і передається за допомогою аксона нейрона. Незалежно від відстані між нейронами, кожна клітина–мішень отримує однаковий за величиною імпульс [14].

Нейрон генерує і передає ПД за допомогою потенціал–керованих іонних каналів (натрієві (Na^+) і калієві (K^+)), які містить мембрана. Клітинна мембрана має власний мембранний потенціал спокою (МПС), який позначає різницю в електричних потенціалах між зовнішньою та внутрішньою сторонами клітинної мембрани. Значення мембранного потенціалу нейронів знаходяться в діапазоні від від -60 до -70 мВ. Для передачі ПД іонні канали активуються і деактивуються для передачі сигналу по аксону [15].

ПД можуть викликати не всі подразники, а лише ті, які мають достатню (порогову) електричну потужність. ПД генерується в тому випадку, коли значення мембранного потенціалу змінюється подразником до порогових значень (критичний рівень деполяризації), які найчастіше лежать в межах від -50 до -55 мВ. При цьому, подразник, який має достатню енергію чи потенціал, викличе однакову повну відповідь збудливої клітини незалежно від того, наскільки потенціал подразника вище від порогового [15].

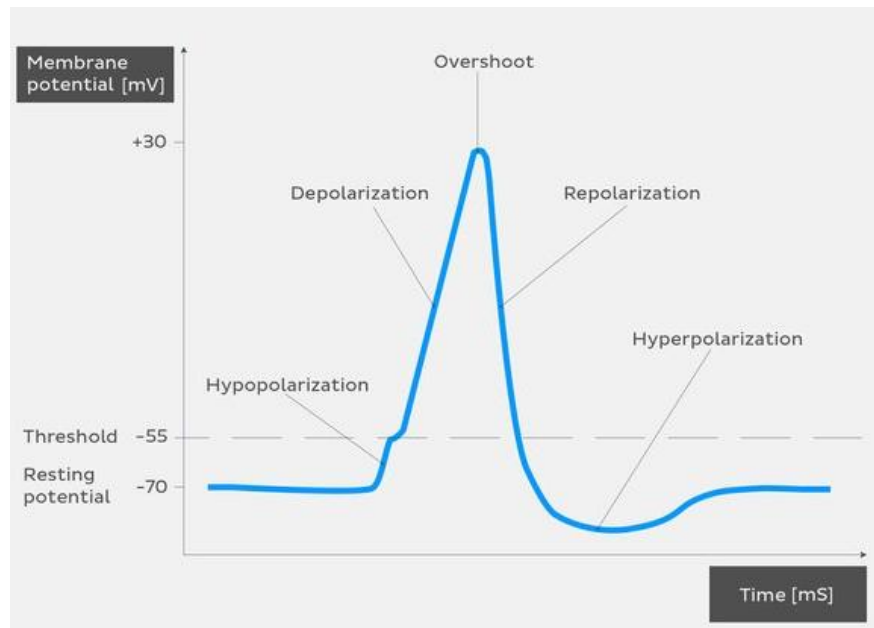


Рис. 5.1 (а). Діаграма фаз і кривої потенціалу дії. Запозичено з [16].

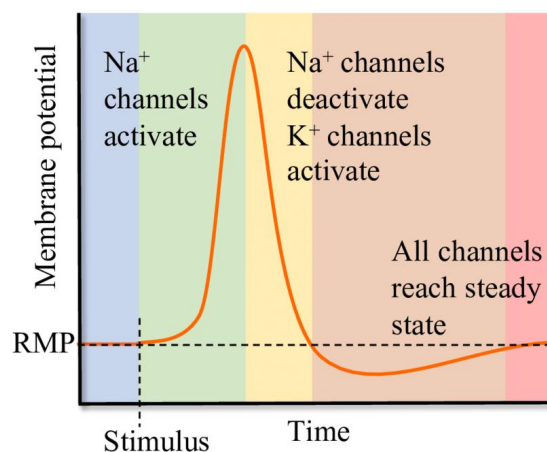


Рис. 5.1 (б). Діаграма потенціалу дії з позначенням активації і деактивації натрієвих і калієвих каналів. Запозичено з [17].

ПД має три основні фази, які називаються деполяризація, викид (Overshoot), реполяризація. При цьому виділяють також фазу гіпополяризації, яка починається перед деполяризацією, а після реполяризації настає фаза гіперполяризації (див. Рис. 5.1 (а)) [16]. Як видно з діаграми, представленої на Рис. 5.1 (а) при досягненні порогу збудження відбувається швидка деполяризація мембрани до досягнення найвищого позитивного значення — овершуту, після чого розпочинається стадія реполяризації мембрани до

досягнення нею МПС. ПД викликаний тимчасовими змінами в мембранній проникності для певних іонів. Цей процес викликає тимчасове відкриття іонних каналів, як показано на Рис. 5.1 (б) [16].

На початковій фазі гіпополяризації починається збільшення потенціалу мембрани до порогового значення потенціалу. У фазі деполяризації збільшений мембранний потенціал відкриває натрієві канали і викликає великий наплив іонів натрію, а внутрішня частина нейрону набуває більше позитивного заряду, який прямує до рівноважного електрохімічного значення для натрію, що рівний +61 мВ. В момент фази викиду (піку потенціалу дії) заряд внутрішньої частини нейрону доходить до електрохімічної рівноваги для іонів натрію [16].

Далі починається фаза реполяризації, в якій натрієві канали починають закриватися і проникність для натрію стрімко падає. Однак відкриваються калієві канали, які реагують на збільшене значення клітинного потенціалу. В цей момент позитивне значення клітини починає падати через великий відтік калія (див. Рис. 5.1 (б)). Мембрана прагне до початкового значення мембранного потенціалу. Але при цьому виникає завжди фаза гіперполяризації, при якій потенціал мембрани набуває більш негативного значення, ніж початкове (приблизно на 10–15 мВ менше МПС). Однак після гіперполяризації значення мембранного потенціалу повністю відновлюється і дорівнює початковому значенню [16].

Після вирівнювання значення мембранного потенціалу до початкового стану натупає рефрактерний період, в який деякий час збудлива клітина тимчасово не здатна виробляти новий ПД [16].

6. ТИПИ ГАНГЛІОЗНИХ КЛІТИН СІТКІВКИ

Сітківка ссавців містить близько 15–20 різновидів гангліозних клітин. Кожен тип відповідає за різноманітні види кодування зорової інформації. Кодування визначається нейромедіаторами, комбінацією синаптичних входів і внутрішніми фізіологічними властивостями (локалізацією іонних каналів, мембранними характеристиками) гангліозної клітини [18].

Різні волокна зорового нерва відповідають за передачу різних атрибутів зображення, наприклад такі як колір, рух, рівень освітленості, просторовий контраст, текстуру, мерехтіння. Цю інформацію кожний тип гангліозних клітин вилучає паралельно і передає в різні частини зорової системи [18].

Зазначимо основні типи гангліозних клітин сітківки за Kim U.S. із співавторами [19]:

– Мініатюрні RGC (P–Cell, mRGC, P–тип), “карлики” — це основний тип гангліозних клітин в сітківці (близько 70–80%). Вони мають маленьке тіло з відносно невеликими полями дендритів (5–10 мкм у центрі сітківки, на периферії досягають до 225 мкм). Знаходяться переважно в центральній частині сітківки. P–Cell мають прямий синапс з малими біполярними клітинами. Клітини відповідають за розрізнення кольору і реагування на його зміни, а також за текстури, при цьому мають повільну швидкість провідності [19].

– RGC Parasol (M–Cell, pRGC, M–тип), “парасольки”.

Гангліозні клітини типу “парасолька” становлять близько 10% всіх гангліозних клітин. Вони відповідають за проекцію на латеральне колінчасте тіло (LGN, великоклітинний шар, який являє собою структуру таламуса). M–Cell мають великі розміри клітинних тіл і дендритних дерев, сприймають інформацію про рух, мерехтіння, є чутливими до контрасту. “Парасольки” мають високу швидкість провідності [19].

– Малі бістратифіковані RGC (K–Cell, sbRGC, K–тип).

Клітини K–типу становлять близько 5–8% гангліозних клітин сітківки. Вони відповідають за проекцію на коніоцелюлярні шари латерального колінчастого тіла. Клітини відносно невеликі за розміром, отримують сигнали від паличок і колбочок. Відповідають за кольоровий зір [19].

– Світлочутливі RGC (ipRGC).

Клітини становлять 1% від загальної суми гангліозних клітин у людей. Клітини мають дендритні поля, які досить великі та розріджені. Вони мають власний фотопігмент меланопсин, через який ipRGC реагують на світло навіть без паличок і колбочок. Вони відповідають за налаштування і підтримку циркадних ритмів, регуляцію світлового рефлексу зіниці. Передають проекцію на супрахіазматичне ядро (SCN). У сітківці мишей було виявлено шість підтипів ipRGCs (M1, M2, M3, M4, M5 та M6), в яких анатомічні і функціональні властивості відрізнялися одна від одної залежно від підтипу [19].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

7. ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для дослідження біоелектричних сигналів існує декілька електрофізіологічних методів.

Позаклітинний запис є найпростішим методом, який дозволяє робити електрофізіологічні записи поза клітинами. Отримані сигнали посилюються для подальшого запису результату на комп'ютер. Цей метод має дуже низький рівень шуму приладів, що являється його перевагою. Таки метод можна застосовувати як для запису з однієї клітини, так і для багатоклітинного запису для вивчення злагодженої роботи декількох нейронів між собою[23].

У 1939 році дослідники Кертис Х. і Коул К. змогли методом введення в клітину макроелектрода дослідити і зареєструвати мембранний потенціал спокою (МПС) гігантського аксона кальмара. У 1949 році Ральф Джерард і Гульберт Лінг розробили мікроелектродну техніку відведення потенціалів, яка дозволяє вивчати МПС, потенціал дії (ПД) і інші електричні процеси дуже малих клітин, таких як нейрони. Для цього використовують мікроелектрод з тугоплавкого скла, який від'єднують в одне плече містка Уінстона для збалансування містка. Після проколу електродом клітини місток розбалансовують і зчитують різницю потенціалів, яка утворюється на містку[23, 25].

З допомогою метода фіксації струму "Current Clamp" (CC) стає можливим реєстрація внутрішніх показників клітини, а саме потенціалу клітини. Для реалізації цього методу мікроелектрод підключається до буферного підсилювача з одиничним коефіцієнтом підсилення з набагато більшим вхідним опором ніж у електрода і клітини, але має напругу рівну напрузі на

кінці електрода. Струм при такому методі підтримується постійним, зазвичай в нульовому значенні [23].

Для дослідження цілих клітин і активності окремих іонних каналів вибраної ділянки мембрани застосовують внутрішньоклітинний метод “Patch-clamp” (PC). Метод був винайдений 1976 року Костюком П.Г. в Інституті фізіології імені О.О. Богомольця. Для проведення експериментів цим методом використовують не мікроелектрод, а спеціальну петч-піпетку. Дослідник може контролювати різницю потенціалів, які виникають між сторонами клітинної мембрани, і хімічно або електрично впливати на клітину. Метод PC дає можливість реєстрації не тільки потенціалів, а й струмів іонних каналів, які проходять через клітинну мембрану. Така методика означає, що фрагмент мембрани клітини ізолюється петч-піпеткою [25].

Існують декілька варіантів цього метода. PC в конфігурації “Cell-attached” дає можливість ізолювати від зовнішнього середовища і дослідити фрагмент мембрани клітини з іонними каналами, які в ньому містяться. Конфігурацією “Inside-out” можна відірвати фрагмент мембрани, де зовнішня частина мембрани буде в піпетці, а внутрішня частина мембрани буде омиватися розчином. Конфігурація “Whole-cell” (ціла клітина) за допомогою негативного тиску і розриву фрагмента мембрани дає можливість змінювати склад позаклітинного середовища, а також реєструвати струми і потенціали мембрани цілої клітини. “Nucleated patch” означає фіксацію не з мембранною, а з клітинним ядром [24].

Для дослідження електричних характеристик клітини, таких як струм і напруга, існують два різновиди підходів – внутрішньоклітинні методи “Current Clamp” і “Voltage Clamp”.

Внутрішньоклітинний метод підтримування постійним значення мембранного потенціалу має назву “Voltage Clamp” (VC). Такий метод дозволяє реєструвати струм на сегментах мембрани. Метод VC був

розроблений вченими К. С. Коулом і Г. Мармоном у 1947 році. Струм, який протікає через мембрану, підсилюється і реєструється комп'ютером. Щоб уникнути похибок вимірювання через нестабільні падіння напруги, використовують або два мікроелектрода або один мікроелектрод, до якого застосовують метод уривчастої фіксації напруги. Також можна проводити дослід з використанням петч-піпетки. Метод фіксації напруги можна використовувати у конфігурації “ціла клітина”, коли мембрану проколюють одним або двома мікроелектродами або підходять петч-піпеткою і руйнують невелику ділянку мембрани, яка щільно присмоктується до петч-піпетки [23].

Для дослідження гангліозних клітин сітківки нами був обраний метод РС у конфігурації „ціла клітина” з використанням петч-піпетки. При цьому метод дозволяє проводити дослід методом фіксації струму і фіксації напруги через одну й ту саму петч-піпетку.

8. ВИГОТОВЛЕННЯ ПЕТЧ–ПІПЕТОК. ПЕРЕВАГИ ПЕТЧ–ПІПЕТОК

Петч–піпетки для дослідження виготовлялися самостійно в лабораторних умовах завдяки пристрою для витягування петч–піпеток та мікроелектродів SutterInstrument “P97” (див. Рис. 8.1). Піпетки виготовляли із заготовок боросилікатного скла з короткими кінчиками і відносно великим діаметром ($>0,7$ мкм) за допомогою використання підібраної програми для розігрівання скла за один – два етапи.



Рис. 8.1. Пристрій для витягування петч–піпеток та мікроелектродів Sutter Instrument “P97”. Запозичено з [26].

Витягувач P97 складається з системи для формування кінчиків мікропіпетки і налаштування параметрів витягування і камери з нагрівним елементом, який нагріває скло до необхідної температури. Пристрій здатен витягувати мікропіпетки, петч–піпетки і мікроголки для ін’єкцій [26].

Використання петч–піпетки порівняно з класичним методом застосування мікроелектродів має ряд переваг, такі як можливість працювати як в режимі фіксації струму, так і в режимі фіксації потенціалу за допомогою лише одної піпетки, а також дослідження малих клітин, оскільки при роботі з мікроелектродом велика вірогідність пошкодження мембрани, що буде легше уникнути із застосуванням мікропіпетки.

Також до переваг відносять малий опір при застосуванні петч–піпетки (від 2 до 10 МОм) у порівнянні з мікроелектродом (більше 100 МОм), що значно покращує якість експериментальних результатів. При цьому на контакті між мікроелектродом і мембраною опір витоку сягає до 500 МОм, в той час як у петч–піпетки це значення більше 10 ГОм [23]. При використанні методу РС із застосуванням петч–піпетки утворюється щільний гігаомний контакт, який ізолює клітинну мембрану і утворює умови, при яких практично відсутній витік струму через контакт, а отже і весь струм, який проходить через мембрану до електрода, реєструється [23].

Дослідження проводилися з використанням петч–піпеток з опором від 4 до 6 МОм, виготовлених в лабораторії на пристрої Sutter Instrument P97 (див. Рис. 8.2).

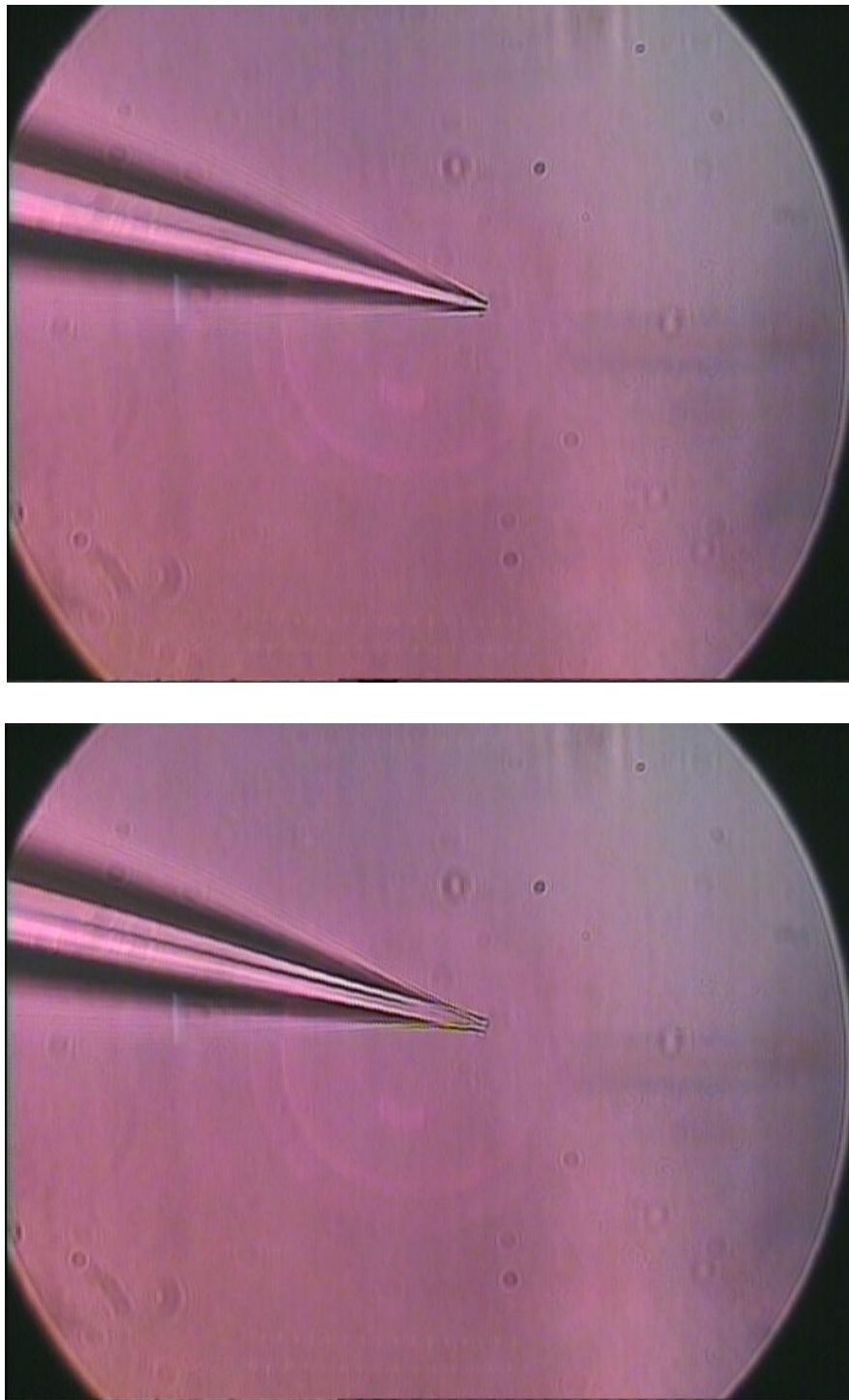


Рис. 8.2. Вигляд петч-піпетки під мікроскопом з фокусуванням на різних ділянках кінчика.

9. МЕТОДИКА ПРЕПАРУВАННЯ І ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТУ

В досліді використовували щурів лінії Вістар 3-х тижневого віку обох статей. Щурів знеживлювали за допомогою повітряної суміші карбоген ($95\% \text{CO}_2$, $5\% \text{O}_2$) відповідно етичним нормам поводження з лабораторними тваринами.

Око щура сягало близько 5,5 мм в діаметрі. Майже дві третини порожнини очного яблука займає сферична лінза (див. Рис. 9.1). Око виділяли попередньо зробивши розрізи по бокам очних м'язів за допомогою вигнутих ножиць і переміщали його в чашку Петрі зі спеціальним покриттям із гуми Silgard (США) у фізіологічний розчин Кребса для очищення від сполучних тканин і видалення передніх сегментів ока.

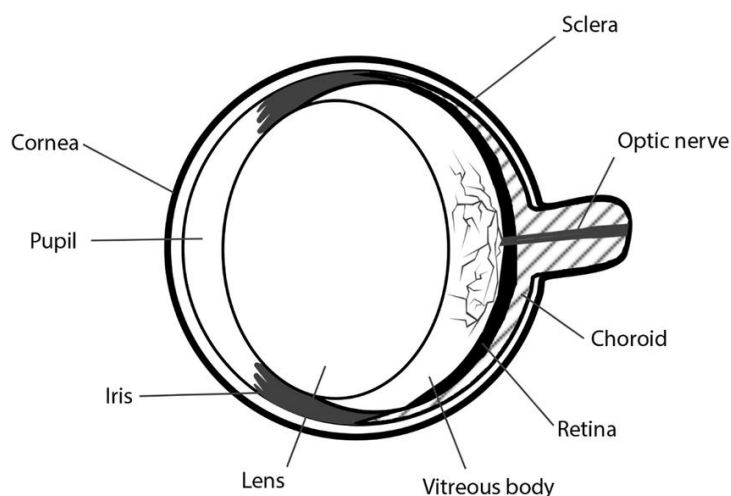


Рис. 9.1. Схематичний рисунок ока щура. Запозичено з [28].

Розчин Кребса робили з використанням деіонізованої води наступного складу (в мМ): NaCl 140, KCl 3, MgCl_2 2, CaCl_2 2, HEPES 10, Глюкоза 12 (усі реактиви виробництва Sigma). Кислотність підтримували в межах 7,3–7,4 pH. Значення кислотності (pH) доводили за допомогою pH-метра pH526 (Німеччина) з додаванням концентрованого лужного середовища NaOH та концентрованої кислоти HCl .

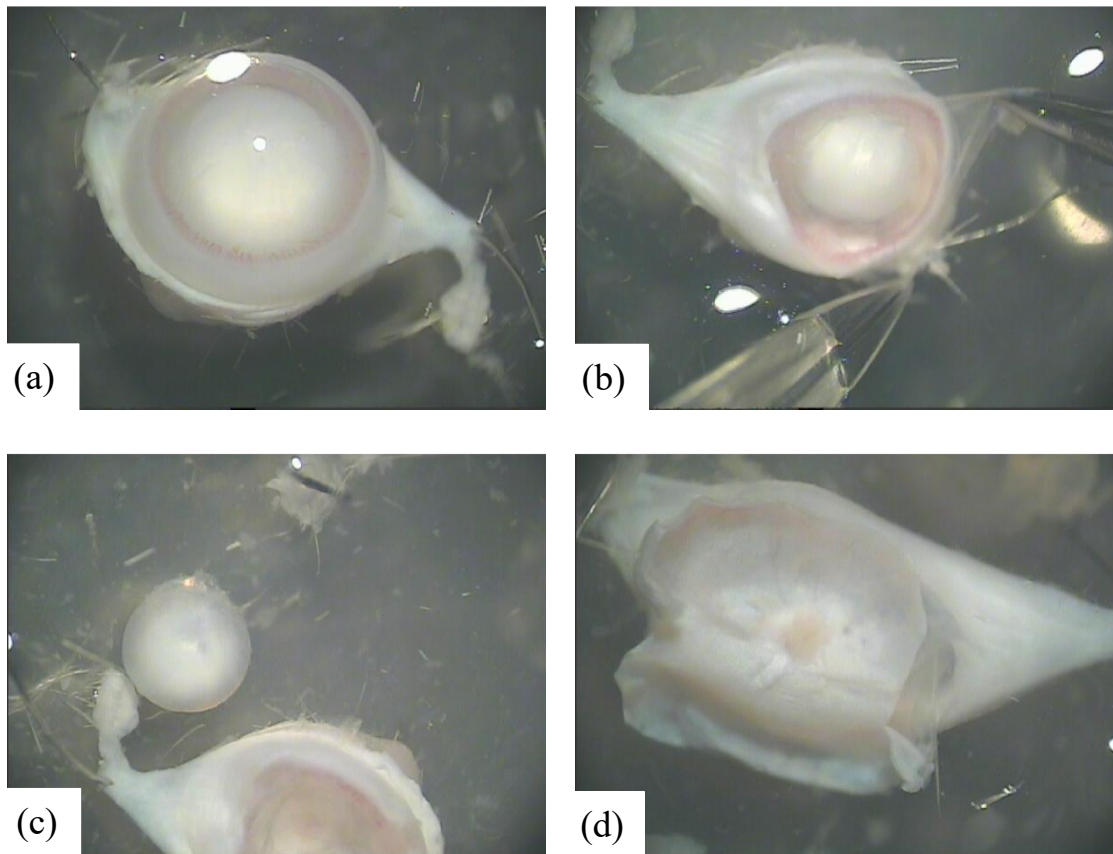


Рис. 9.2 (а). Препарування ока для вилучення сітківки.

- (а) Відокремлене око приколоне до чашки Петрі за допомогою тонких голок.
- (б) Око очищується від сполучних тканин, робить розріз в роговиці ока.
- (с) Виділили передню камеру ока разом з кришталиком.
- (д) Поступове відділення сітківки від склери.

Тонкими ентомологічними голками приколювали око до дна чашки Петрі в трьох місцях. Робили надріз в рогівці ока по границі зубчастого краю і видаляли передню камеру ока разом з кришталиком. Далі, поміщаючи ножиці між склерою і сітківкою, поступово відділяли сітківку від склери. Після відшарування сітківки розрізали зоровий нерв ока між склерою і сітківкою в області оптичного диска. Поверхню сітківки очищали за допомогою пінцета від сполучних тканин над шаром гангліозних клітин. Сітківку надрізали на чотири фрагменти для її розкриття і горизонтального положення (Рис. 9.2 (а) і (б)).

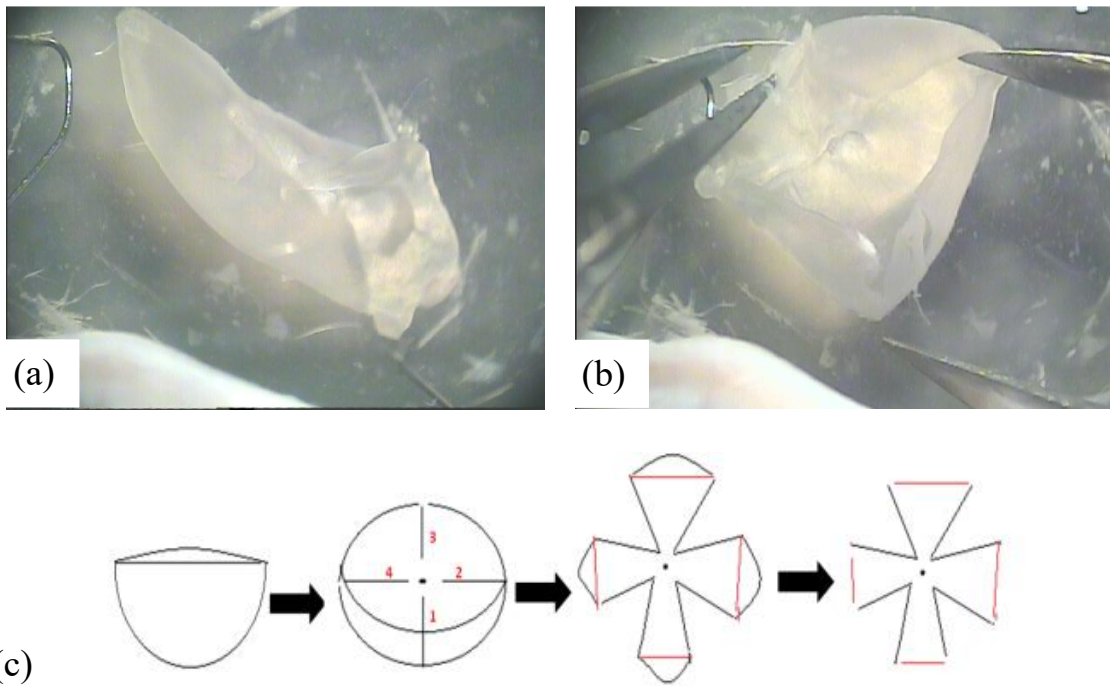


Рис. 9.2 (b). Препарування ока для вилучення сітківки.

(a) Завернута сітківка, відділена від ока. (b) Розгорнута сітківка ока.

(c) Схема надрізання сітківки на чотири фрагменти. Запозичено з [20].

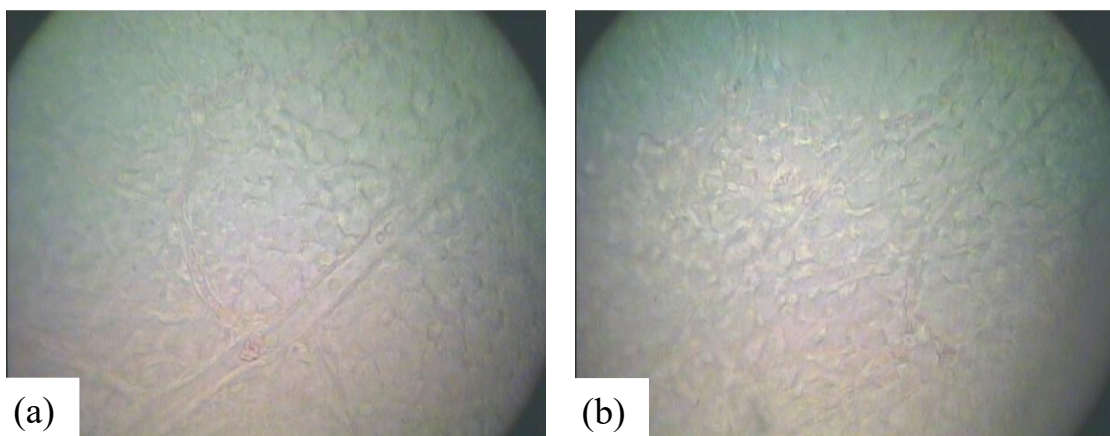


Рис. 9.3. Знімки шару гангліозних клітин з видимими судинами сітківки

Відокремлену сітківку переміщали на експериментальну камеру зі спеціальним покриттям із гуми Silgard (США) під поляризаційно-інтерференційний мікроскоп Biolar (Польща). Сітківку приколювали тонкими вольфрамовими голками діаметром 30 мкм внутрішнім шаром з гангліозними клітинами догори (див. Рис. 9.3).

Досліди проводилися при кімнатній температурі. Через камеру пропускався постійний потік фізіологічного розчину Кребса на сітківку зі швидкістю: 1 крапля на 3–4 секунди. Петч–піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином.

Внутрішньоклітинний розчин робили з використанням деіонізованої води наступного складу (в мМ): KCl 50, EGTA 10, MgCl₂ 5, HEPES 20, Глюконат кальцію 100 (усі реактиви виробництва Sigma). Значення кислотності і її доведення до необхідного значення робили аналогічно розчину Кребса.

10. ОПИС ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ УСТАНОВКИ

10.1 ПОЛЯРИЗАЦІЙНО–ІНТЕРФЕРЕНЦІЙНИЙ МІКРОСКОП BIOLAR

Для препарування ока з метою виділення сітківки відокремлене очне яблуко переміщали під поляризаційно–інтерференційний мікроскоп Biolar, основною частиною якого є поляризаційно–інтерференційна система, яка складається з двозаломлюючих призм типу Волластона, аналізатора, поляризатора, щілинної діафрагми і кварцевого компенсатора. Призма може переміщатися як в горизонтальному, так і в вертикальному напрямку по відношенню до осі тубуса мікроскопа. Задачею призми є роздвоєння пучка світла, що на неї падає, і створення фазового зсуву між ними. Аналізатор і поляризатор являються поляроїдами (поляризаційними фільтрами), задачею яких є поляризація світла. В сукупності система створює інтерференційні смуги (див. Рис. 10.1.1) [21].

Досліди проводилися з використанням об'єктива для водної імерсії зі збільшенням $\times 40$. Загальне посилення мікроскопа $\times 500$. Об'єктив є ізольованим від корпусу мікроскопу за допомогою діелектричного перехідника.

Для настройки освітлення використовуємо метод освітлення по Келлеру, який надає можливість досягання рівномірного освітлення і задовольняє найкращій необхідний контраст для дослідження об'єкту. Перед налаштуванням необхідно відключити аналізатор і поляризатор, а діафрагму максимально розширити і встановити конденсор у верхньому положенні. Далі при включеному освітленні необхідно досягнути різкого зображення, максимально зменшити діафрагму і при центральному положення зображення повертати ручку конденсора до потрапляння в поле зору кромek діафрагми. Окуляр мікроскопа переміщуємо до появи різкого зображення і переміщуємо освітлювач до необхідного положення [21].

При проведенні оцінки якості препарування сітківки ока використовувався поляризаційно–інтерференційний контраст (DIC), який зазвичай використовують для бачення мінімальних нерівностей на поверхні об'єкта. Оскільки ми використовували двозаломлюючу призму (DIC–призму), при потраплянні двох розділених призмою пусків світла на нерівність (горбик) об'єкту один з розділених променів проходить шлях більший на $2\Delta h$ і отримуємо різницю ходу променів, яке перетворюється в значення сірих відтінків і таким чином виділяється рельєф досліджуваного препарату [22].

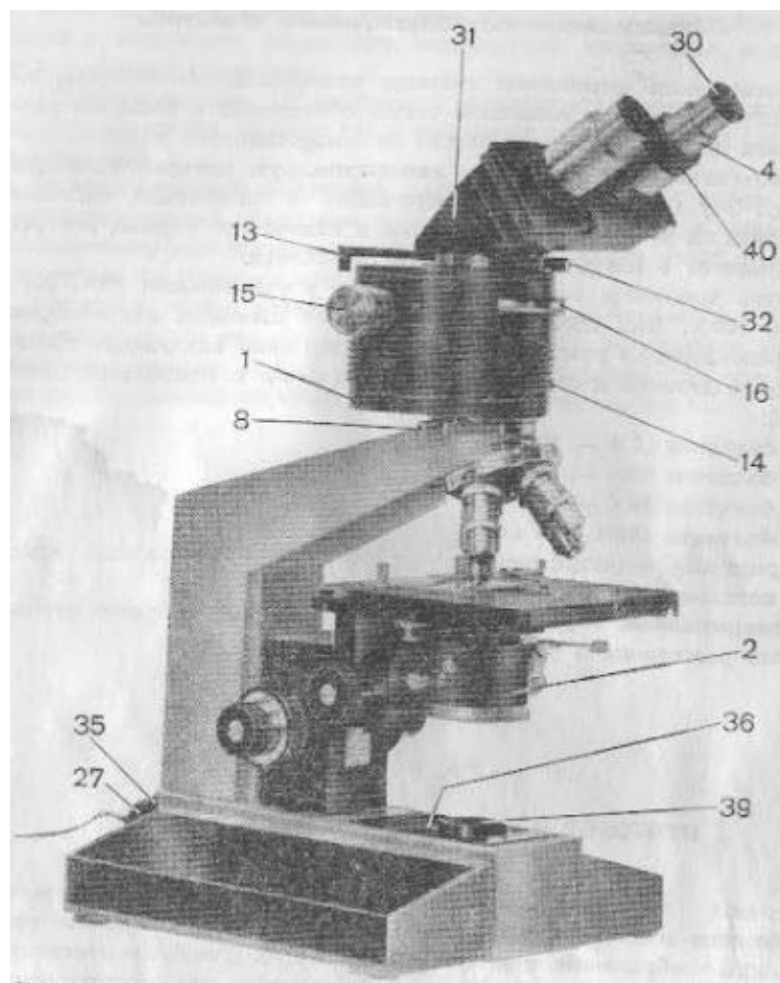


Рис. 10.1.1. Поляризаційно–інтерференційний мікроскоп Biolar. Основні елементи мікроскопа: 1 – інтерференційна головка, 2 – конденсатор з щілиною, 9 – поляризатор, 13 – важіль переключення призми, 16 – аналізатор, 35 – освітлювач. Запозичено з [21].

10.2 СХЕМА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ УСТАНОВКИ ДЛЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ РЕЄСТРАЦІЙ

Дослідження ГКС щура методом фіксації потенціалу і струму проводились за допомогою електрофізіологічної установки, що була зібрана на базі мікроскопа BIOLAR (Польща) з використанням об'єктиву для водної імєрсії зі збільшенням $\times 40$ (сумарне збільшення $\times 500$).

Підсилювач електричних сигналів Axopatch-1B (Axon Instruments, США) дає можливість вимірювати струми в режимі фіксації потенціалу, а також визначати природний потенціал спокою нейрона в режимі фіксації струму (див. Рис. 10.2.1). Завдяки перемикачу “Mode” можемо переключати режими роботи VC або CC, використовуючи одну й ту саму петч-піпетку.

Для зв'язку електрофізіологічної установки з комп'ютером використовується багатофункціональний пристрій вводу-виводу PCI-6221 DAQ BOARD (плата збору даних) (National Instruments, США), що являє собою багатоканальні аналого-цифровий перетворювач (АЦП), цифро-аналоговий перетворювач (ЦАП), а також цифрові вводи/виводи та ін.



Рис. 10.2.1. Підсилювач електричних сигналів Axopatch-1B (Axon Instruments, США)

Керування експериментом, а саме формування амплітуди та форми підтримуваного на мембрані потенціалу V_{command} та оцифровка даних (величина та форма струму, який протікає через мембрану), проводилося за допомогою спеціальної програми WinWCP – цифро–аналоговим перетворювачем (ЦАП).

Блок–схема для внутрішньоклітинної реєстрації відповідей від гангліозних клітин сітківки методом РС у конфігурації “ціла клітина” представлена на Рис. 10.2.2 (а) та 10.2.2 (б). Блок–схема (а) відповідає режиму роботи методом фіксації потенціалу (VC), блок–схема (б) відповідно методу фіксації струму (CC).

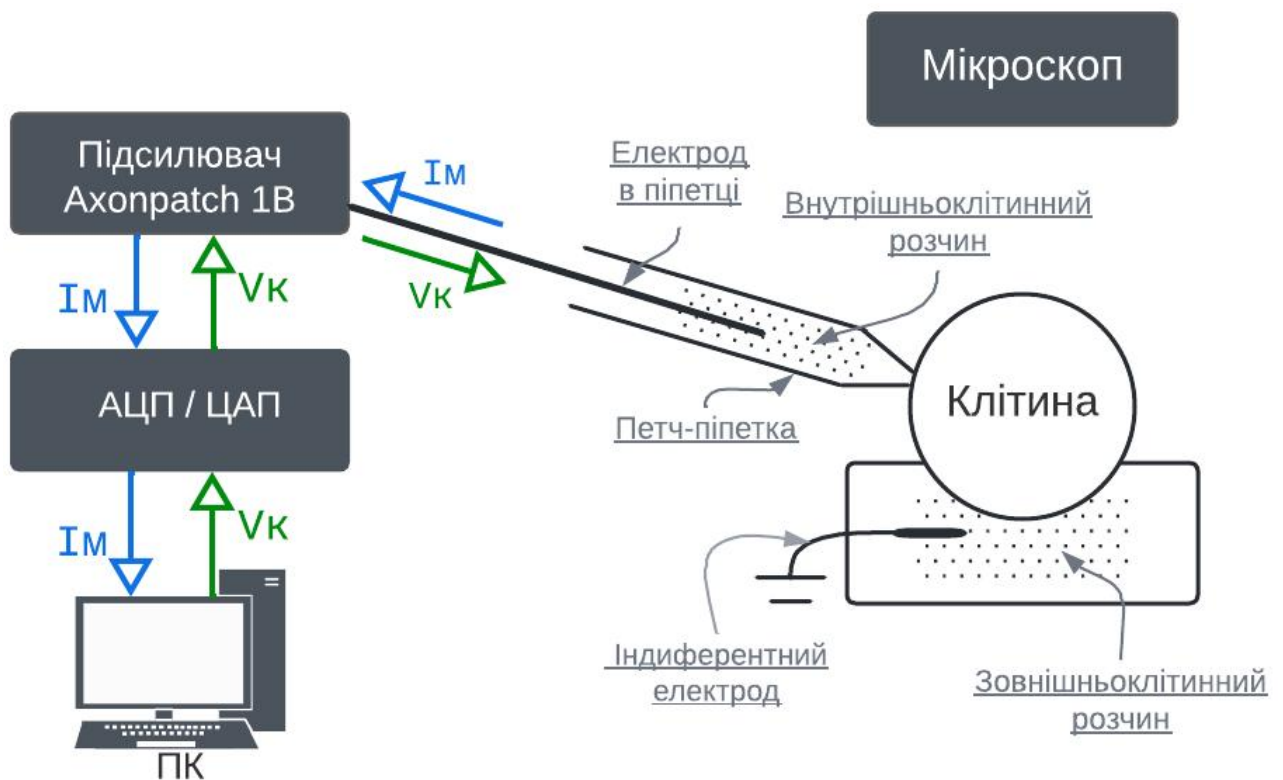


Рис. 10.2.2 (а). Блок–схема для внутрішньоклітинної реєстрації відповідей від гангліозних клітин сітківки методом фіксації потенціалу у конфігурації “ціла клітина”

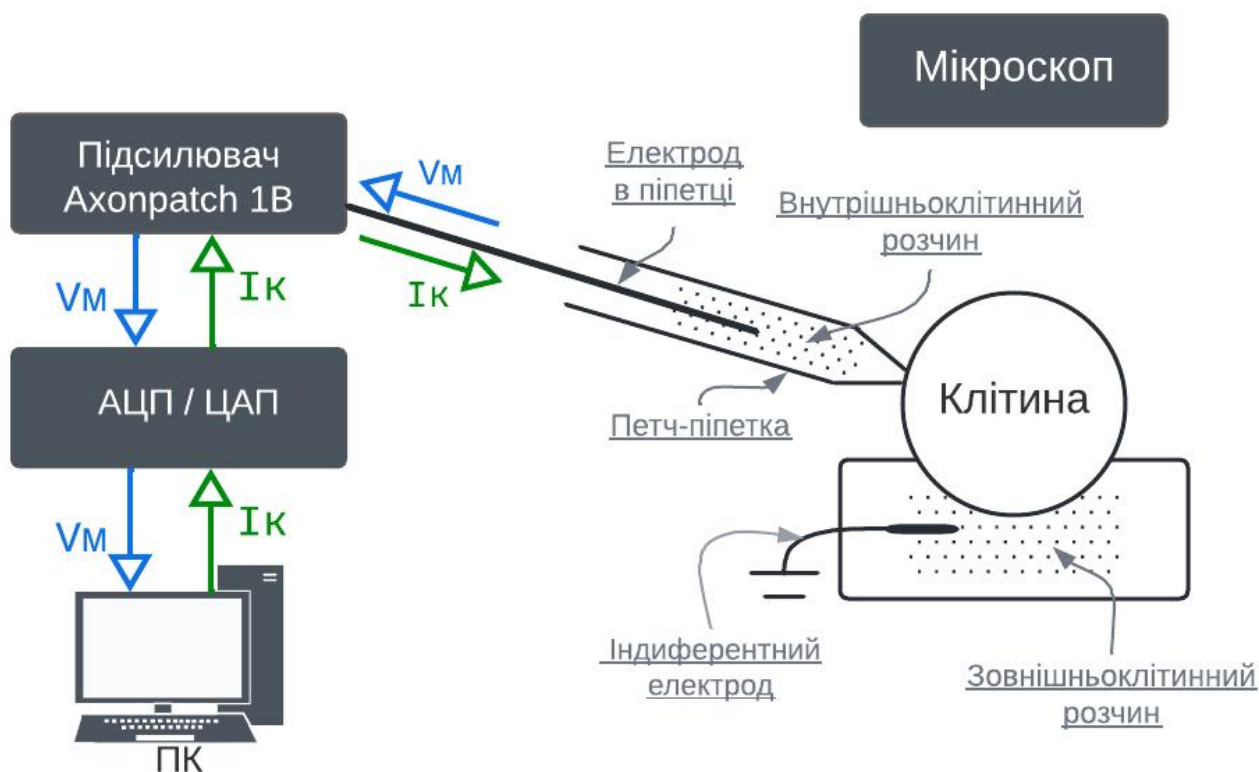


Рис. 10.2.2 (b). Блок-схема для внутрішньоклітинної реєстрації відповідей від гангліозних клітин сітківки методом фіксації струму у конфігурації “ціла клітина”

Як видно з блок-схем, петч-піпетка містить внутрішньоклітинний розчин і електрод, а зовнішньоклітинний розчин омиває клітину. У камері з зовнішньоклітинним розчином знаходиться індиферентний хлор-срібний електрод. У випадку застосування методу фіксації потенціалу від ПК до електроду подаємо командну напругу (V_K), отримуємо значення мембранного струму (I_M) досліджуваної клітини. Відповідно для методу фіксації струму при заданні командного струму (I_K) отримуємо значення напруги мембрани (V_M). Мембранний потенціал задається змінним резистором «Holding potential» на передній панелі підсилювача. Форма та амплітуда поштовху потенціалу задається в програмі WinWCP, виводиться через ЦАП та подається на відповідний вхід підсилювача.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

11. ПРОВЕДЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЙОГО РЕЗУЛЬТАТИ

Для експерименту, як рекомендовано американськими вченими G.-Y. Wang, G.-M. Ratto, а також B. J. O'Brien, T. Isayama та іншими, обирали середні гангліозні клітини розміром більше 10 нм (таким чином виключали з експерименту амакринові клітини, які у щурів мають розміри менше 10 нм), які мали аксон, гладку поверхню і МПС, рівним від -70 до -50 мВ. Клітини з нестабільним МПС або з ПД, який не перевищував 0 мВ, виключали з дослідження [29, 30].

Використовуючи петч-піпетку, заповнену внутрішньоклітинним розчином, прикладали до неї додатній тиск і підходили піпеткою до обраної клітини (див. Рис. 11.1). Під тиском, який можна надати видихом повітря у спеціальний отвір, внутрішньоклітинний розчин виливався струменем з кінчика піпетки. Перед контактом петч-піпетки з клітиною змивали цим струменем залишки сполучної тканини на клітині для кращого контакту. При дуже малій відстані між мембраною клітини і піпеткою під тиском струменя внутрішньоклітинного розчину в клітині утворювалася вм'ятина. В цей момент прибирали додатній тиск, струмінь зупинявся, а отвір петч-піпетки утворював щільний контакт з мембраною клітини. Такий щільний контакт має назву **Giga-seal**. Графік утворення Giga-seal наведений на Рис. 11.2.

Отримавши Giga-seal, для розривання фрагменту мембрани, яка опинилася в отворі петч-піпетки, прикладали сильний швидкий поштовх від'ємного опору, який можна надати вдихом із спеціального отвору. Після успішного прориву мембрани внутрішньоклітинний розчин в петч-піпетці і середовище всередині клітини швидко перемішувалися завдяки дифузії і ставали ідентичними. Після цього ставало можливим фіксувати різницю потенціалів на мембрані.

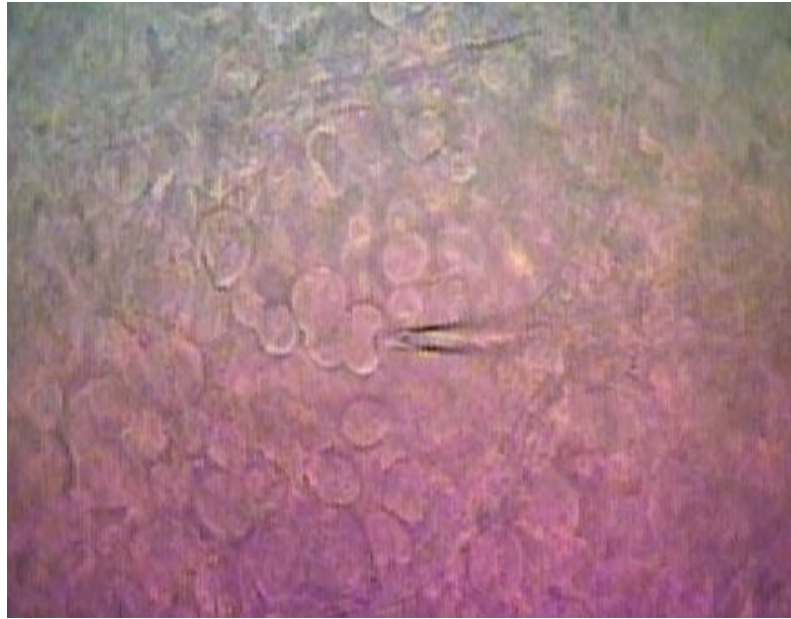


Рис. 11.1. Препарат цілої сітківки щура з петч-піпеткою, що з'єднана з нейроном.

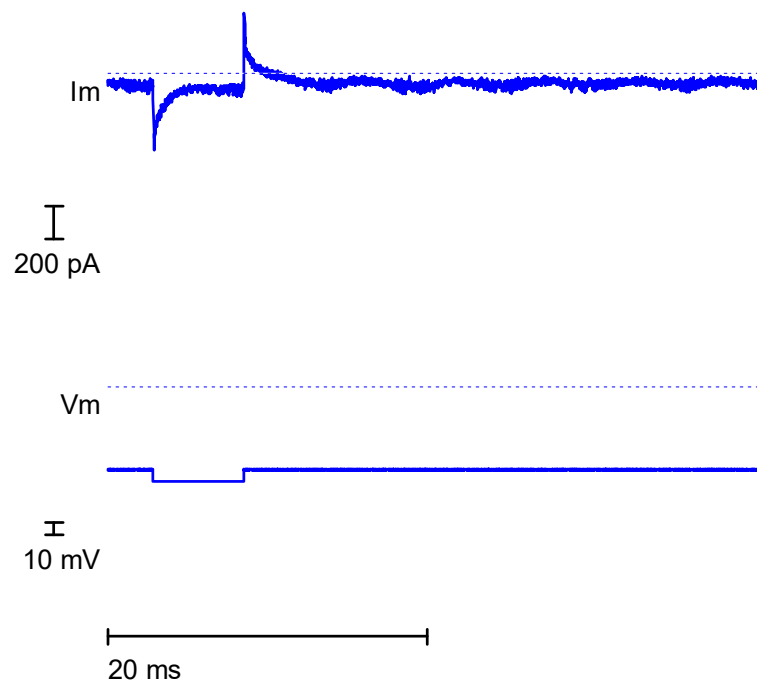


Рис. 11.2. Графік утворення Giga-seal в конфігурації “ціла клітина”.

11.1 СТИМУЛЮВАННЯ ГАНГЛІОЗНОЇ КЛІТИНИ МЕТОДОМ ФІКСАЦІЇ ПОТЕНЦІАЛУ

Для отримання відповіді від клітини при методі фіксації потенціалу подавали імпульс фіксованої напруги у вигляді “сходинки”, після чого реєстрували мембранний струм від усієї клітини. В досліді з методом фіксації потенціалу підтримували потенціал рівний -70 мВ.

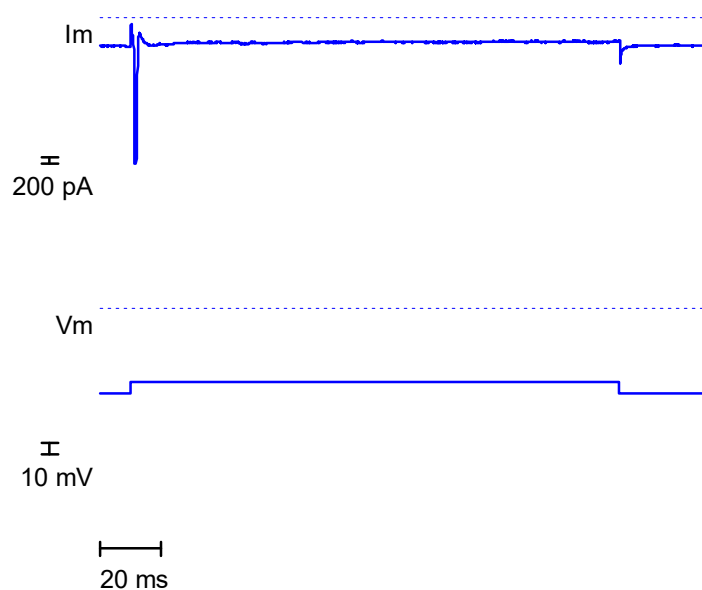


Рис. 11.1.1. Струм, який зареєстровано від гангліозної клітини у відповідь на подання імпульсу фіксованої напруги методом РС у конфігурації “ціла клітина” зі значеннями показників: МПС = $-72,6$ мВ, величина “сходинки” фіксованої напруги $V_{\text{dep}} = 10$ мВ, $I_m = -4041,7$ пА.

Клітини стимулювали *деполяризуючим* (V_{dep}) потенціалом. Це означає, що клітина деполяризується, а отже буде всередині заряджена позитивно, а ззовні – негативно. Така клітина буде генерувати ПД.

На Рис. 11.1.1 наведено графік отриманого мембранного струму I_m при стимулюванні клітини “сходинкою” постійного потенціалу, рівною

10 мВ. Такий потенціал є деполяризуючим (V_{dep}). МПС гангліозної клітини рівний близько $-72,6$ мВ, що відповідає початковому рівню потенціалу клітини на графіку. Поштовх постійного потенціалу, який зображено на нижньому графіку у вигляді “сходинки”, означає тимчасовий зсув фіксованої напруги і показано в одиницях виміру мВ. Верхній графік зображає мембранний струм як відповідь клітини на стимулювання потенціалом в одиницях виміру пА. В момент подачі імпульсу напруги і при завершенні бачимо активні зміни струму, що означає перезарядку ємності мембрани клітини. Значення отриманої відповіді від клітини при поданні “сходинки” постійної напруги дорівнює $I_M = -4041,7$ пА.

На другому графіку отриманої відповіді від клітини з МПС $= -71,7$ мВ на стимулювання деполяризуючою напругою (Рис. 11.1.2) отримане значення мембранного струму $I_M = -2265,5$ пА. “Сходинка” складає 10 мВ.

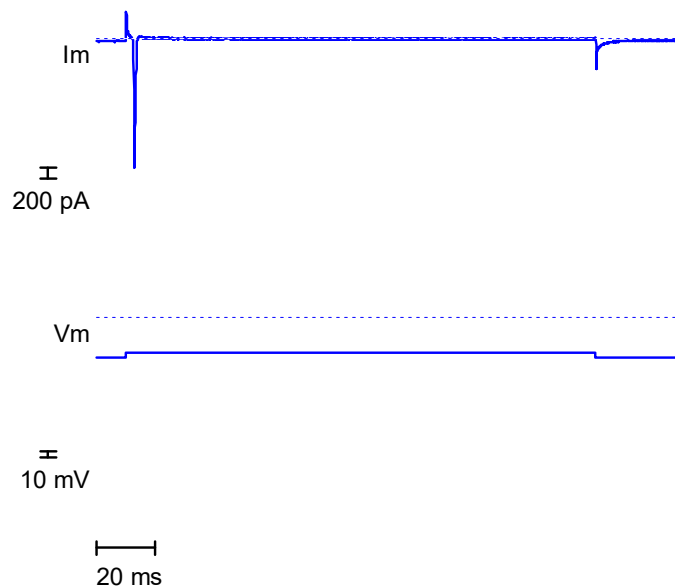


Рис. 11.1.2. Струм, який зареєстровано від гангліозної клітини у відповідь на подання імпульсу фіксованої напруги методом РС у конфігурації “ціла клітина” зі значеннями показників: МПС $= -71,7$ мВ, величина “сходинки” фіксованої напруги $V_{dep} = 10$ мВ, $I_M = -2265,5$ пА.

11.2 СТИМУЛЮВАННЯ ГАНГЛІОЗНОЇ КЛІТИНИ МЕТОДОМ ФІКСАЦІЇ СТРУМУ

При застосуванні методу фіксації струму подавали імпульс фіксованого струму на клітину і реєстрували відповідь від неї у вигляді зміни потенціалу мембрани.

На Рис. 11.2.1 подано графік відповіді клітини з МПС = $-58,0$ мВ на метод СС, на якому верхня лінія відповідає за поштовх фіксованим струмом рівним 600 пА, а нижня лінія демонструє зареєстрований мембранний потенціал як відповідь на імпульс струму. Струм, яким стимулювали клітину, є деполяризуючим (I_{dep}). Бачимо на графіку напруги, що мембранний потенціал клітини перетнув вісь “нуль” і перейшов в додатне значення, отже було подолано порогове значення мембранного потенціалу (зазвичай в межах від -50 до -55 мВ) і був викликаний ПД.

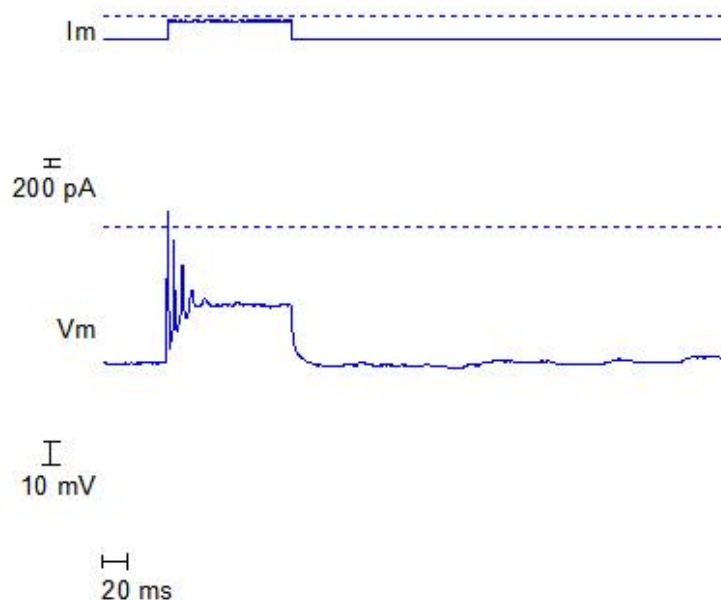


Рис. 11.2.1. Напруга, яка зареєстрована від гангліозної клітини у відповідь на подання імпульсу фіксованого струму методом РС у конфігурації “ціла клітина” зі значеннями показників: МПС = $-58,0$ мВ, величина “сходінки” фіксованого струму $I_{dep} = 600$ пА.

Інша відповідь від клітини наведена на Рис. 11.2.2, яка демонструє викликаний подразником ПД клітини. Гангліозна клітина мала МПС = -59,0 мВ, значення “сходинки” фіксованого деполяризуючого струму I_{dep} дорівнює 300 пА.

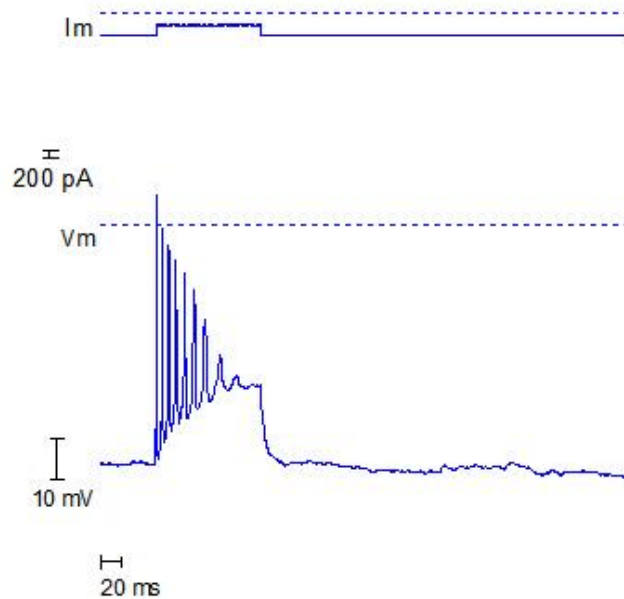


Рис. 11.2.2. Напруга, яка зареєстрована від гангліозної клітини у відповідь на подання імпульсу фіксованого струму методом РС у конфігурації “ціла клітина” зі значеннями показників: МПС = -59,0 мВ, величина “сходинки” фіксованого струму $I_{\text{dep}} = 300$ пА.

Графік, який наведено на Рис. 11.2.3, демонструє, що крім зафіксованої відповіді від клітини методом фіксації струму було зареєстровано ще ПД клітини, який не був викликаний експериментом. Це наведено на нижньому графіку напруги, де бачимо явний ПД, при цьому відповідна частина графіку для струму відповідає початковим значенням струму (“сходинки ще немає”). Це означає, що клітина отримала інформацію від іншої клітини, що зафіксували на графіку.

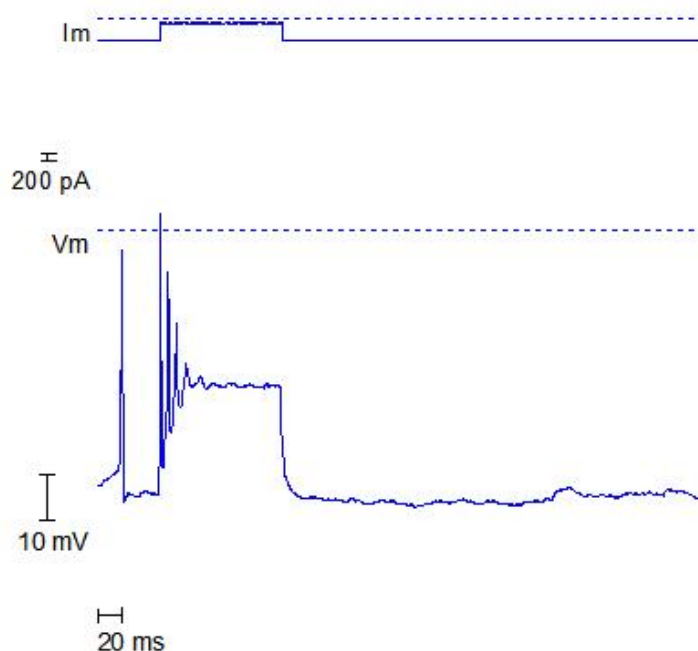


Рис. 11.2.3. Напруга, яка зареєстрована від гангліозної клітини у відповідь на подання імпульсу фіксованого струму методом РС у конфігурації “ціла клітина” зі значеннями показників: МПС = $-58,0$ мВ, величина “сходінки” фіксованого струму $I_{\text{dep}} = 600$ пА.

Деполяризація клітини виникає, коли внутрішньоклітинний електрод виступає анодом, а електрод ззовні клітини є катодом. Якщо впливати на клітину за умови зміни полярності електродів (внутрішньоклітинний електрод є катодом), мембрана клітини *гіперполяризується*, що означатиме зниження збудливості. В такому випадку потенціал тільки віддаляється від критичного рівня деполяризації, генерація ПД неможлива. Однак, виникають зміни мембранного потенціалу і критичне порогове значення зменшується. Тому після розмикання електричного кола МП вертається до початкового значення, проходить нове зменшене критичне значення деполяризації (яке вже лежить близько до рівня МПС), що викликає ПД. Такий ПД є не справжнім, а так званим анодрозмикальним потенціалом [25].

На Рис. 11.2.4 наведено відповідь клітини на *гіперполяризуючий* поштовх. Значення гіперполяризуючого поштовху струму I_{hyp} рівне -100 пА. Бачимо,

що після подання “сходінки” струму значення мембранного потенціалу зменшилося, тобто стало більш негативним. Після завершення впливу на клітину бачимо ПД, який є анодрозмикальним потенціалом.

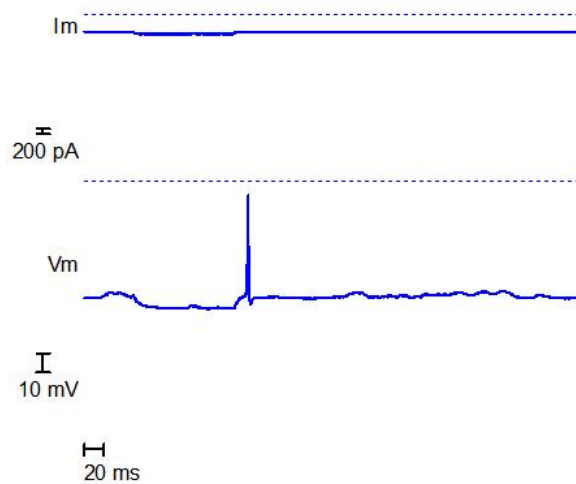


Рис. 11.2.4. Напряга, яка зареєстрована від гангліозної клітини у відповідь на гіперполяризуєчий поштовх струму методом РС у конфігурації “ціла клітина” зі значеннями показників: МПС = $-60,8 \text{ мВ}$, величина “сходінки” фіксованого струму $I_{\text{гип}} = -100 \text{ пА}$.

11.3 ВИСНОВОК ДО РОЗДІЛУ

За результатами проведених експериментів було отримано графіки відповідей гангліозних клітин сітківки щурів методами фіксації потенціалу і фіксації струму.

Отримані графіки збігаються з очікуваними. Як було продемонстровано дослідниками A. L. Hodgkin, A. F. Hux-Ley and B. Katz у 1951 році у роботі “Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo” [31], а також підтверджено вченими J. Malmivuo і R. Plonsey у роботі “Bioelectromagnetism. 4. Active Behavior of the Cell Membrane” [32], графіки відповідей від нейронів мають характерні вигляди, в залежності від яких, можемо робити висновки про вид методу фіксації та характер проведення експерименту.

Було проведено дослідження як деполяризуючими (VC і CC), так і гіперполяризуючими значеннями (CC) фіксованої характеристики. На графіках бачимо зареєстровані ПД від генерування “сходінки”, а також було зафіксовано ПД від клітини до клітини ще до стимулювання нейрона. При використанні методу фіксації струму впливали на клітину також гіперполяризуючим значенням поштовху постійного струму, що призвело до гіперполяризації клітини і подальшого анодрозмикального потенціалу, який був зафіксований на графіку і описаний у розділі.

ВИСНОВКИ

При поданні імпульсу стимулюючого струму або потенціалу до гангліозної клітинної мембрани виникає відповідь від клітини у вигляді її деполяризації або гіперполяризації. У роботі було описано і продемонстровано експериментами методи фіксації струму і потенціалу на двох ГКС щурів в конфігурації “ціла клітина” з використанням петч-піпеток (метод РС).

Отримані в роботі результати підтверджують те, що якщо при використанні методу фіксації струму подавати стимулюючий струм достатній для подолання клітинним потенціалом порогового значення деполяризації, клітина деполяризується, після чого бачимо генерацію ПД, який являє собою швидке високоамплітудне і короткочасне коливання мембранного потенціалу при збудженні клітини подразником порогової сили.

Зареєстровано зміни мембранного потенціалу від клітин у відповідь на стимулювання поштовхом постійного струму для $I_{\text{dep}} = 300$ пА (для значення МПС = -59,0 мВ) і $I_{\text{dep}} = 600$ пА (МПС = -58,0 мВ). При повторному поштовху постійного струму $I_{\text{dep}} = 600$ пА (МПС = -58,0 мВ) зафіксовано ПД від стимулювання клітини, а також ПД від клітини до клітини ще до стимулювання нейрона. Отримані ПД характеризуються швидким зростаючим потенціалом, який після досягання свого додатного піку вертається до значення МПС в більш повільному темпі.

При поданні імпульсу стимулюючого гіперполяризуючого струму $I_{\text{hyp}} = -100$ пА (МПС = -60,8 мВ) зафіксовано відповідь клітини у вигляді її гіперполяризації (гальмуванні), що означає подальше виникнення анодрозмикального потенціалу в момент завершення стимулу на клітину струмом.

При використанні методу фіксації потенціалу отримано графіки, які вказують на швидку відповідь клітини у вигляді зміни постійного

мембранного струму, а також продемонстровано перезарядку ємності мембрани клітини в момент подачі імпульсу напруги і при її завершенні.

Було зареєстровано наступні значення мембранного струму від клітин у відповідь на стимулювання поштовхом постійної напруги $V_{\text{dep}} = 10 \text{ мВ}$: $I_m = -4041,7 \text{ пА}$ (для значення МПС = $-72,6 \text{ мВ}$), а також $I_m = -2265,5 \text{ пА}$ (МПС = $-71,7 \text{ мВ}$).

Отримані в дослідженнях графіки збігаються з очікуваними, які було одержано і описано в роботах дослідників, що працювали з методами фіксації струму і потенціалу на ГКС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. F. Germain, C. Pérez–Rico, J. Vicente, P. de la Villa Functional histology of the retina. *Microscopy: science, technology, applications and education*. Méndez–Vilas and J. Díaz (Eds.). Spain, 2010. № 4. vol. 3. C. 914–925.
2. Hubel D. H. Eye, Brain, and Vision: монографія. New York : Scientific American Library : Distributed by W.H. Freeman, 1987. 111 с.
3. Kolb H. How the retina works. *American Scientist*, the magazine of Sigma Xi. 2003. vol. 91. C. 28–35.
4. Franze K., Grosche J., Skatchkov S. N. et al. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. Ed. by Luke Lee, University of California. Berkeley, CA, 2007. vol. 104. no. 20. C. 8287–8292.
5. Chan–Ling T. Development of the Retinal Vasculature. *Elsevier Ltd*, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia, 2010. C. 22–33.
6. Yu P. K., McAllister I. L., Morgan W. H. et al. Inter–Relationship of Arterial Supply to Human Retina, Choroid, and Optic Nerve Head Using Micro Perfusion and Labeling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS)*, 2017. vol. 58. no. 9. C. 3565–3574.
7. Sun Y., Smith L. E. H. Retinal Vasculature in Development and Diseases. *Annual Review of Vision Science*, 2018. vol. 4. C. 101–122.
8. Очне дно. Портал, 2020. URL:
<https://tmu.org.ua/146725/%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%B5-%D0%B4%D0%BD%D0%BE-%D1%8F%D0%BA-%D0%BF%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B2%D1%96%D1%80%D1%8F%D1%8E%D1%82%D1%8C-%D1%89%D0%BE-%D0%BF%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%B7%D1%83%D1%94-%D0%BD%D0%BE/>

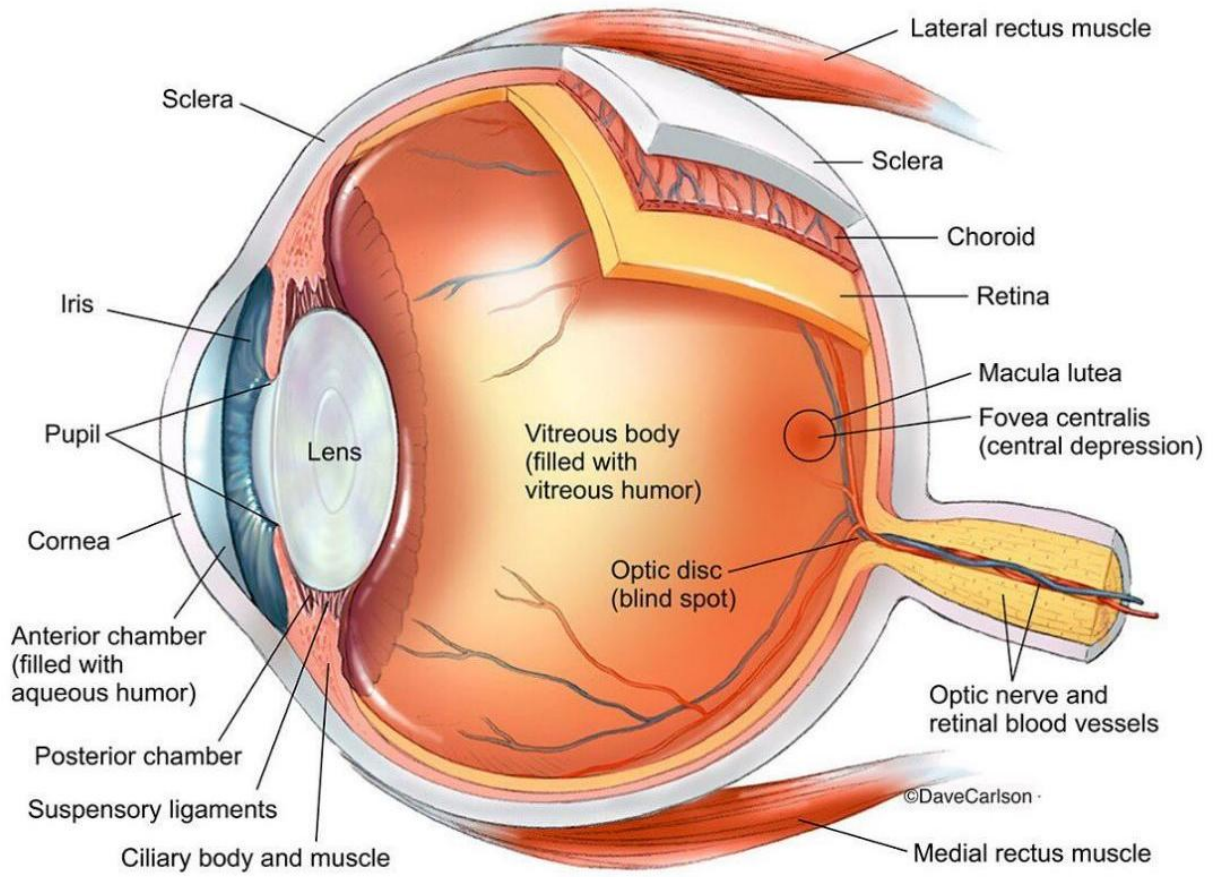
9. Circuits within the basal ganglia system. In *Neuroscience*. 2nd edition / Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D. et al. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2001. 681 c.
10. Masland R. H. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron*. 2012. vol. 76(2). C. 266–280.
11. Rahul Tandon. *Neuron*. Teachmint. URL:
<https://www.teachmint.com/tfile/studymaterial/class-9th/science/neuronexplainerdiagramjpg/4e0407a6-3acd-450d-a7f3-36314b5bd974>
12. Stone J., Valter K. Roles of retinal macroglia in maintaining the stability of the retina. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 2003. vol. 31. C. 295–313.
13. Hollander H., Makarov F., Dreher Z. et al. Structure of the macroglia of the retina: Sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells. *Journal of Comparative Neurology*. 1991. vol. 313. C. 587–603.
14. Hodgkin A., Huxley A. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature*. 1939. № 144. C. 710–711.
15. Hall J. E., Hall M. E. Guyton and Hall textbook of medical physiology: навч. посіб. Philadelphia: Saunders Elsevier 107, 2011. 1146 c.
16. Jana Vasković. Kenhub, 2022. URL:
<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/action-potential>
17. Verma P., Kienle A. et al. Using bifurcation theory for exploring pain. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2019. № 59(6). C. 2524–2535.
18. Wong R. C. S., Cloherty S. L. et al. Intrinsic physiological properties of rat retinal ganglion cells with a comparative analysis. *Journal of Neurophysiology*. 2012. № 108(7). C. 2008–2023
19. Kim U. S., Mahroo O. A. et al. Retinal Ganglion Cells–Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. *Frontiers in Neurology*. 2021. № 12. C. 1664–2295.

20. Lectin stain for retinal vasculature (flat-mounted retinas of rats or posterior eye cups of mice): University College Dublin. 5 с.
21. Поляризаційно–інтерференційний мікроскоп Biolar (Технічний опис і інструкція по експлуатації). Warszawa : Wydawnictwo Katalogow I Cennikow, 1976. 97 с.
22. Капитца Х. Г. Первые шаги в микроскопии. *Zeiss*. 1997. 46 с.
23. The Axon CNS Guide to Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques. *Axon CNS. Molecular Devices*. U.S.A., 2006. 298 с.
24. Introduction To Electrophysiology. Teledyne Photometrics, 2022. URL: <https://www.photometrics.com/learn/electrophysiology/introduction-to-electrophysiology#:~:text=In%20general%2C%20electrophysiology%20can%20be,intracellular%20electrophysiology%2C%20and%20extracellular%20electrophysiology>
25. Пасічніченко О.М., Макарчук М.Ю. Фізіологія нервів і м'язів : навч. посіб. Київ : Навчально–науковий центр «Інститут біології та медицини», 2020. 157 с.
26. P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller Operation Manual. Sutter Instrument Company. Novato, CA, 2020. 66 с.
27. Hodgkin, A., and Huxley, A. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117:500–544.
28. Point S., Beroud M. Blue light hazard: does rat retina make relevant model for discussing exposure limit values applicable to humans? *Radioprotection*. 2019. № 54(2). С. 141–147.
29. G.-Y. Wang, G.-M. Ratto et al. Functional Development of Intrinsic Properties in Ganglion Cells of the Mammalian Retina. *Journal of neurophysiology*. 1997 № 78(6). С. 2895–2903.

30. B. J.O'Brien, T.Isayama et al. Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells. *The Journal of physiology*. 2002. № 538(3). C. 787-802.
31. A. L. Hodgkin, A. F. Hux-Ley, B. Katz. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo. *The Journal of Physiology*. 1952. №116. C. 424–448
32. J. Malmivuo i R. Plonsey. Bioelectromagnetism - Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetis. 4. Active Behavior of the Cell Membrane. Oxford University Press. USA, 1995. № 4. C. 66-105

ДОДАТКИ

Додаток 1. Анатомія ока



Додаток 2. Розташування нейронів у сітківці

