

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ФІЗИКО-ТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
Кафедра прикладної фізики

«На правах рукопису»

«До захисту допущено»

УДК 612.822.3+616-092.18

Завідувач кафедри

_____ Геннадій МОНАСТИРСЬКИЙ

“ ____ ” _____ 2023 р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

за освітньо-науковою програмою «Прикладна фізика»

зі спеціальності 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»

на тему: Електрофізіологічні властивості нейронів підщелепного ганглія

Виконав здобувач(ка) ступеня магістра II курсу, групи ФФ-11мн

Пархоменко Руслан Львович _____
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Науковий керівник ст. н.с., к.б.н. Пурнинь Олена Едуардівна _____
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Рецензент ст.н.с., к.б.н. Маслов Віталій Юрійович _____
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації
немає запозичень з праць інших авторів без
відповідних посилань.

Здобувач ступеня магістра _____
(підпис)

Київ – 2023 року

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ФІЗИКО-ТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
 Кафедра прикладної фізики

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)
 Спеціальність – 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»
 Освітньо-наукова програма «Прикладна фізика»

ЗАТВЕРДЖУЮ
 Завідувач кафедри
 _____ Геннадій МОНАСТИРСЬ-

КИЙ

(підпис)

«__» _____ 2023 р.

ЗАВДАННЯ
на магістерську дисертацію здобувачу ступеня магістра

Пархоменко Руслан Львович _____
 (прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема дисертації: Електрофізіологічні властивості нейронів підщелепного ганглія _____

науковий керівник дисертації Пурнинь Олена Едуардівна, к.б.н., ст.н.с. _____ ,
 _____ ,
 (прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом по університету від «__» _____ 2023 р. № _____

2. Термін подання здобувачем дисертації _____. _____ 2023 р.

3. Об'єкт дослідження: Нейрони підщелепного ганглія _____

4. Предмет дослідження є Відповіді нейронів підщелепного ганглія на електричну стимуляцію _____

5. Перелік завдань, які потрібно розробити: Здійснити огляд літератури та попередніх досліджень підщелепного ганглія; провести експеримент по визначенню основних властивостей відповідей нейронів підщелепного ганглія за нормальних умов та за штучної гіперглікемії; обробити данні, порівняти результати та зробити висновки _____

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: 58 рисунків та 8 таблиць

7. Орієнтовний перелік публікацій: Всеукраїнська конференція з нейро-наук 25-27 липня 2022 року, XXI Всеукраїнська науково-практична конференція студентів

8. Дата видачі завдання 30 вересня 2021

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Огляд літератури	30 вересня 2021 – 10 жовтня 2021	виконано
2	Підготовка експерименту	14 жовтня 2021 – 12 грудня 2021	виконано
3	Проведення першої частини експерименту	12 грудня 2021 -14 липня 2022	виконано
4	Участь у Всеукраїнській конференції з нейронаук 2022 року	14-27 липня 2022	виконано
5	Проведення другої частини експерименту	27 липня 2022 – 10 квітня 2023	виконано
6	Обробка результатів експерименту	10 квітня 2023 – 1 травня 2023	виконано
7	Участь у XXI Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів	1-12 травня 2023	виконано
8	Оформлення магістерської дисертації	5 жовтня 2021 - 14 травня 2023	виконано

Здобувач ступеня магістра

(підпис)

Руслан Пархоменко

(власне ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

Науковий керівник

(підпис)

Олена Едуардівна

(власне ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: дипломна робота за обсягом становить 82 сторінки, містить 8 таблиць та 58 рисунків. Для дослідження було використано 23 бібліографічних найменувань. Метою роботи є дослідження підщелепного ганглія ссавців та його нейронів, і встановлення змін його електрофізіологічних властивостей при патології — в умовах штучного діабету.

Було розглянуто анатомо-морфологічні та електрофізіологічні властивості підщелепного ганглія ссавців, на прикладі щурів, особливості синаптичної передачі та рецепторів в ньому.

Було проведено експерименти по дослідженню нейронів підщелепного ганглія *in vitro*, з використанням розчинів з підвищеним та нормальним вмістом глюкози.

Ключові слова: *нейрон, ганглій, електрофізіологія, гіперглікемія.*

SUMMARY

The diploma work explanatory message includes 82 pages of the text, 8 tables and 58 illustrations. At the problem modern state analysis, overall 23 references were used.

The purpose of this work is to study submandibular ganglion of mammals and it`s neurons, and to establish changes in its electrophysiological properties in pathology - in artificial diabetes conditions.

Anatomical, morphological and electrophysiological properties of the submandibular ganglion of mammals, on the example of rats, were considered, as well as properties of synaptic connexions and receptors in it.

An experiment on the study of neurons of the submandibular ganglia *in vitro* was conducted, using solutions with high and normal glucose content.

Key words: *neuron, ganglion, electrophysiology, hyperglycemia.*

ЗМІСТ

Вступ.....	4
РОЗДІЛ 1. Огляд структури нервової системи та її складових	5
1.1 Структура нервової системи.....	5
1.2 Анатомія слинних залоз.....	9
1.3 Висновки до першого розділу.....	12
РОЗДІЛ 2.Анатомо-морфологічні відомості про нейрони	
підщелепного ганглія ссавців.....	13
2.1 Основні відомості.....	13
2.2 Морфометричні властивості нейронів підщелепного	
ганглія.....	16
2.3 Будова синаптичних з'єднань.....	19
2.4 Висновки до другого розділу.....	22
РОЗДІЛ 3. Устаткування, що використовується в експериментах	
на нейронах підщелепного ганглія.....	24
3.1. Мікроскопи.....	24
3.2. Електроди для електрофізіологічних експериментів.....	27
3.3. Підсилювачі електричних сигналів.....	28
3.4. Метод фіксації струму.....	29
3.5. Метод фіксації потенціалу.....	30
3.6. Висновки до третього розділу.....	31
РОЗДІЛ 4.Електрофізіологічні властивості підщелепного ганглія	
та його нейронів.....	32
4.1. Синаптичні відповіді нейронів підщелепного ганглія.....	32
4.2. «Мініатюрні» синаптичні струми.....	36
4.3. Культура нейронів підщелепного ганглія та її властивості.....	42
4.4. Реіннервація нейронів підщелепного ганглія.....	44
4.5. Висновки до четвертого розділу.....	48
РОЗДІЛ 5. Синаптична передача в підщелепному ганглії.....	50
5.1. Синаптична передача в нейронах підщелепного ганглія	
дорослих та новонароджених щурів.....	50
5.2. Синаптична передачі після реіннервації	
підщелепного ганглія.....	62
5.3. Внутрішні синаптичні з'єднання.....	66
5.4. Висновки до п'ятого розділу.....	68
РОЗДІЛ 6. Рецептори нейронів підщелепного ганглія.....	69
6.1. Нікотинові рецептори нейронів підщелепного ганглія.....	69
6.2. Внутрішні синаптичні з'єднання.....	71
6.3. Висновки до шостого розділу.....	73
РОЗДІЛ 7. Експериментальна частина.....	74
7.1. Методика.....	74
7.2. Результати.....	76
7.3. Обговорення.....	79
7.4. Висновки до сьомого розділу.....	80
ВИСНОВКИ.....	81
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	82

ВСТУП

Роль підщелепної та під'язикової слинних залоз ссавців полягає у виробленні слини, а підщелепний ганглії, що їх іннервує, регулює їх діяльність. Він належить до парасимпатичного відділу автономної нервової системи. В ньому перемикаються парасимпатичні нервові волокна, пропускаючи симпатичні. Обсяги слиновиділення можуть знижуватися, або збільшуватись, залежно від ситуації. Так, в стресових ситуаціях, виділення слини збільшується, а в релаксаційних – збільшується.

Підщелепний ганглії викликає інтерес при дослідженні цукрового діабету, оскільки при ньому активність слинних залоз відхиляється від нормальної ([1]). При цьому, предметом дослідження є зміна властивостей нейронів підщелепного ганглія при патологічних процесах.

В даному дослідженні нейрони підщелепного ганглія вивчаються як в нормальному стані, так і в патологічних умовах – при гіперглікемії (підвищений вміст глюкози в крові, у порівнянні зі показниками в нормальних умовах).

Досліджуються показники, що є ключовими для функціонування нейронів підщелепного ганглія – показники потенціалів дії, що вони генерують.

Дана робота має на меті встановити відхилення функціонування нейронів підщелепного ганглія при патологічному процесі.

РОЗДІЛ 1

Огляд структури нервової системи та її складових

1.1 Структура нервової системи

Нервова система - це функціональна система, що утворена з клітин, тканин та органів, що регулюють відповіді організму на внутрішні та зовнішні подразники. Нервова система топографічно поділяється на дві основні частини: центральну нервову систему (ЦНС) та периферичну нервову систему (ПНС).

ЦНС відноситься до мозку та спинного мозку. Обидва оточені кістками осового скелета: мозок знаходиться у черепній коробці черепа та спинний мозок у хребетному каналі. ПНС відноситься до решти нервової системи, крім головного мозку та спинного мозку і складається з 12 пар черепних нервів, 31 пари спинномозкових нервів, асоційованих з черепними та хребетними нервами гангліїв, правої і лівої симпатичних ланцюгів та їх гангліїв, а також тазових парасимпатичних нервів.

Периферичні нерви містять нервові волокна, які передають інформацію (подразники), отримані сенсорними рецепторами від внутрішнього і зовнішнього середовища до ЦНС (аферентні нервові волокна) а також волокна, що несуть моторну інформацію від ЦНС до ефektorних структур (еферентні нервові волокна). Периферичні нерви також містять соматичні (аферентні та еферентні волокна, які іннервують опорні структури тіла, такі як шкіра та скелетні м'язи) та вісцеральні (аферентні та еферентні волокна, які регулюють органи тіла) нервові волокна ([2]).

Функціонально, нервова система поділяється на соматичну та вегетативну (автономну) нервові системи. Соматична і вегетативна нервові системи не обмежені топографічними підрозділами, що описані вище і, насправді, вегетативна нервова система охоплює і ЦНС, і ПНС.

Автономна нервова система (АНС) є насамперед вісцеральною і, на відміну від соматичної нервової системи, вона не перебуває під свідомим контролем і може бути функціонально підрозділена на симпатичну, парасимпатичну та кишковий

підсистеми. АНС містить як аферентні, так і еферентні волокна, що виходять із стовбура мозку в межах конкретних черепних нервів (парасимпатичні волокна) або всередині коренів спинних нервів (симпатичні та парасимпатичні волокна). Ці волокна розходяться до груднини, живота, тазу і промежини, до вісцеральної гладенької мускулатури та залозистих елементів та до судинної гладенької мускулатури. У контрасті, ентеральна нервова система включає підслизові та мієнеричні сплетіння, та пов'язані з ними елементи, розташовані в стінці трубчастої частини травної системи. Ентеральна нервова система є автономною у своїй функції, але ця функція може бути регульована парасимпатичною і симпатичною нервовими системами ([2]).

Нейрони

Нейрони - це структурна та функціональна одиниця нервової системи. Вони є високоспеціалізованими клітинами, які функціонують для передачі імпульсів між нервовою системою та всіма частинами тіла, так і між різними регіонами в нервовій системі. Нейрони відповідають за всі спеціальні функції нервової системи, такі, як сенсорне сприйняття, нейронна регуляція, здійснення та контроль рухової активності, когнітивні функції, та багато інших.

Усі нейрони мають клітинне тіло (сому), аксональні відростки, що простягаються від соми, і змінну кількість коротших відростків (дендритів). Однак нейрони є дуже розмаїтими в розмірі та формі. Загалом, дендрити доносять нервові імпульси до тіла клітини, а аксони проводять імпульс від клітинного тіла до сусідніх нейронів або м'язових клітин, або клітин залоз. Усі, без винятку, нейрони, володіють властивістю збудливості та здатністю генерувати та проводити потенціали дії (ПД) вздовж їх аксонів, щоб збуджувати інші нейрони або інші ефекторні клітини. Важливо зазначити, що зрілі нейрони мають дуже обмежену ємність для відновлення і практично відсутню здатність до реплікації та регенерації.

Нейроглія

Нейрогліальні клітини функціонують для підтримки, захисту та вирощення нейронів, і підтримування гомеостазу позаклітинної рідини, в якій перебувають нейрони. Вони, як правило, менші, але майже в 50 разів більш численні, ніж нейрони. На відміну від нейронів, нейрогліальні клітини здатні реплікувати себе. Вони незмінно проліферують шляхом поділу, задля заповнення прогалів, спричинених втраченими нейронами.

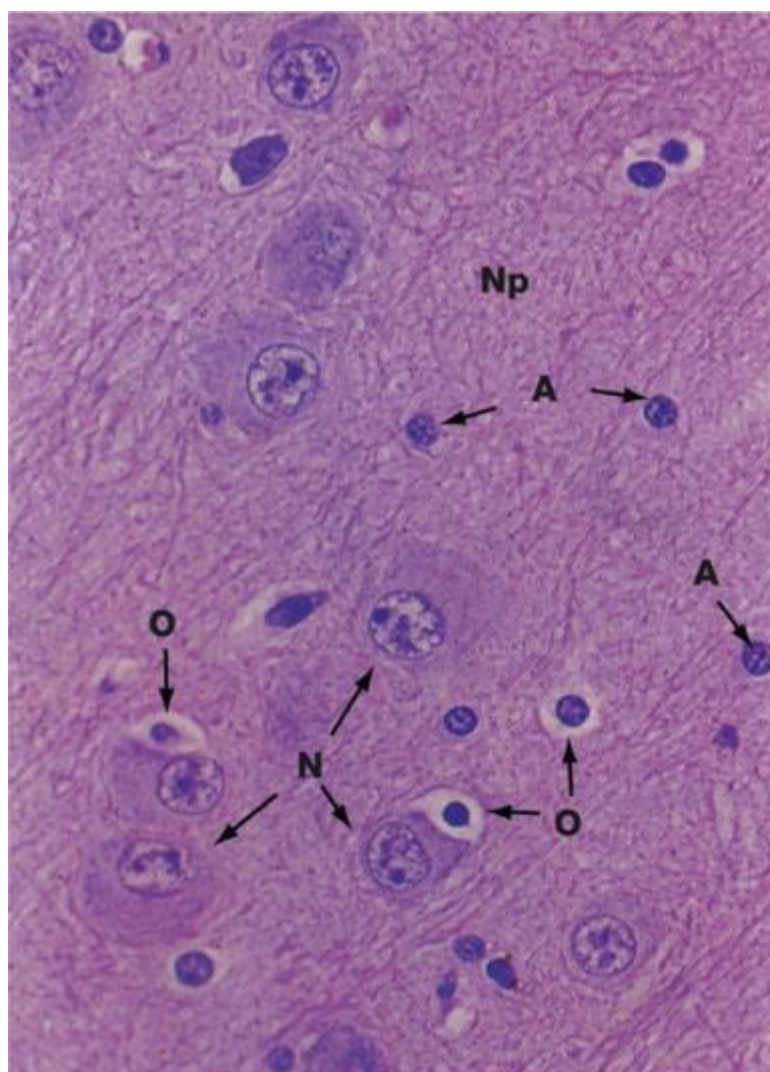


Рис. 1. Світлова мікрофотографія мозкової сірої речовини, що демонструє зв'язок між нейронами та нейрогліями. А, астроцит; N, нейрон; NP, нейрофіл (колекція тонких аксонів та дендритів, що виникають та закінчуються на нейронах); О, олігодендроцит. (Запозичено в [3]).

У нервовій системі є шість типів нейрогліальних клітин. Чотири з них, астроцити, олігодендроцити, мікрогліальні клітини та епендимальні клітини наявні лише в ЦНС, тоді як шваннівські клітини (нейролемоцити) та сателітні клітини обмежені ПНС.

Нейроглія ЦНС

Астроцити - найбільш численні в нейроглії ЦНС і їх легко ідентифікувати за їхніми клітинними тілами у формі зірки, які мають багато вузьких, подовжених відростків. Вони регулюють склад рідини ЦНС, допомагають нейронам розвиватись, відіграють важливу роль у метаболізмі нейротрансмітерів та допомагають підтримувати оптимальний рівень йонного Калію для генерації нервових імпульсів. Важливо, що вони також допомагають утворювати гематоенцифалічний бар'єр (відмежує кров від цереброспінальної рідини та внутрішнього середовища ЦНС)([4]).

Олігодендроцити менші ніж астроцити і мають менше відростків. Їх відростки разом з відростками астроцитів формують опорну мережу для нейронів. Вони мієлінують та ізолюють аксони нейронів ЦНС для швидшого поширення потенціалів дії (сальтаторна провідність).

Мікрогліальні клітини - фагоцитарні клітини, що походять від моноцитів, які рухаються по всій ЦНС. Вони захищають нервову систему шляхом поглинання та руйнуванням чужорідних мікробних організмів, а також видаляє будь-які решки, що виникають внаслідок загибелі нейронних клітин.

Епендимальні клітини утворюють внутрішню оболонку шлуночків мозку і центрального каналу спинного мозку. Вони допомагають у виробництві спинномозкової рідини. Морфологічно вони є сумішшю плоских і циліндричних клітин, деякі з яких можуть бути війчастими і не мати базальної пластинки (фундамент мембрани).

Нейроглія периферичної нервової системи

Шваннівські клітини мієлінізують та електрично ізолюють аксони нейронів у периферичній нервовій системі (ПНС), таким чином, полегшуючи сальтаторну провідність потенціалів дій.

Сателітні клітини підтримують та електрично ізолюють тіла нейронів в гангліях ПНС. Вони також регулюють надходження поживних речовин та виведення відходів від нервоих клітин у гангліях, що утворюються в процесі життєдіяльності.

1.2 Анатомія слинних залоз

Великі та малі слинні залози голови та шиї є важливими структурами, які сприяють багатьом нормальним фізіологічним процесам травного тракту.

Привушна залоза

Привушна залоза - найбільша із трьох основних слинних залоз (рис.2). Вона розташована на поверхні і укладена поверхневим шаром глибокої шийної фасції, де вона утворює влучно названий паротидний(привушний) простір. Паротидний простір розташований постеролатерально до жувального простору, латерально до місця парафарингеального простору, і антеролатерально до каротидного простору. Окрім самої залози, паротидний простір також складається з лицьового нерва (ЧН VII), гілок нижньощелепного поділу трійчастого нерва (ЧН V3), внутрішньопаротидної лімфатичних вузлів, зовнішньої каротидної артерії та ретромандіулярної вени([5]).

Підщелепна залоза

Підщелепна залоза є другою за величиною з трьох великих слинних залоз. Вона розташована глибоко до кута нижньої щелепи і обтягує як підщепний, так і під'язиковий простори. Підщелепний простір огортається поверхневим шаром

глибокої шийної фасції і утримується передньою частиною нижньої щелепи, передньою частиною дигастрального м'язу постермедіально, мілохоїдним м'язом антерсуперіально, та гіоїдною кісткою внутрішньо.

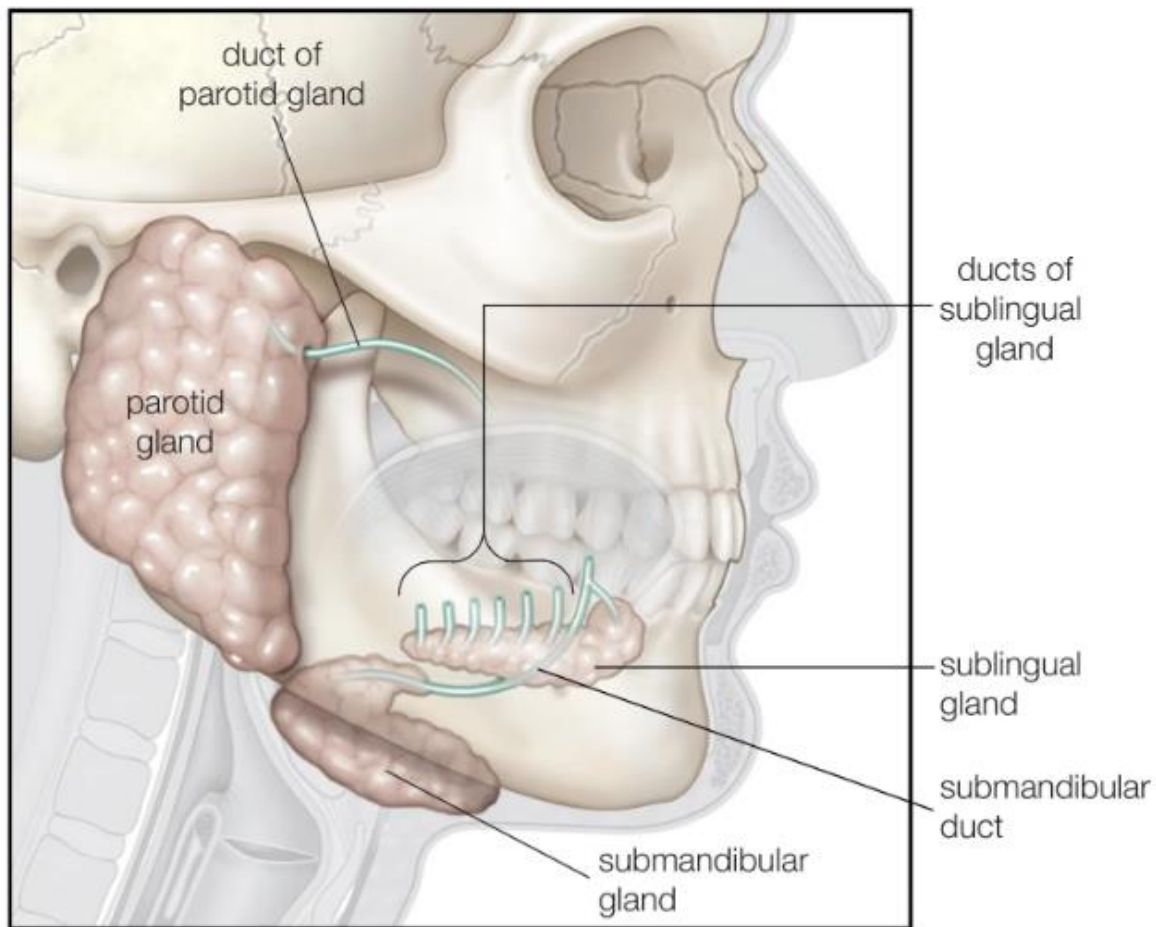


Рис. 2. Слинні залози: parotidgland – привушна залоза, sublingualgland – під'язикова залоза та submandibular – підщелепна залоза і їхні відповідні протоки (ducts) (Запозичено з [6]).

Під'язикова залоза

Під'язикова залоза - найменша з трьох великих слинних залоз. Вона розташована глибоко до тіла нижньої щелепи і розташована в під'язиковому просторі. Під'язиковий простір огорнутий поверхневим шаром глибокої шийної фасції і обмежується передньою частиною нижньої щелепи, геніоглосовими/геніохіоїдними м'язами медіально, мілохіоїдними м'язами постеролатерально та внутрішніми м'язами язика спереду([5]).

Окрім під'язикової залози, під'язиковий простір також складається з глибокої частини підщелепної залози, підщелепної протоки, язикових артерії/вени та язикової гілки нижньощелепного поділу тригемічного нерва (ЧН V3).

Малі слинні залози

Тканина малих слинних залоз складається з 800-1000 невеликих слинних залоз, що розташовуються по всій поверхні синоназальної порожнини, порожнини рота, глотки, гортані, трахеї, легенів та порожнини середнього вуха. Хоча тканину малих слинних залоз можна знайти в будь-якому місці вздовж верхньої частини харчового тракту, вона найбільше сконцентрована в слизових оболонках ротової порожнини, губ, язика, м'якого/твердого піднебіння (див. рис. 3).

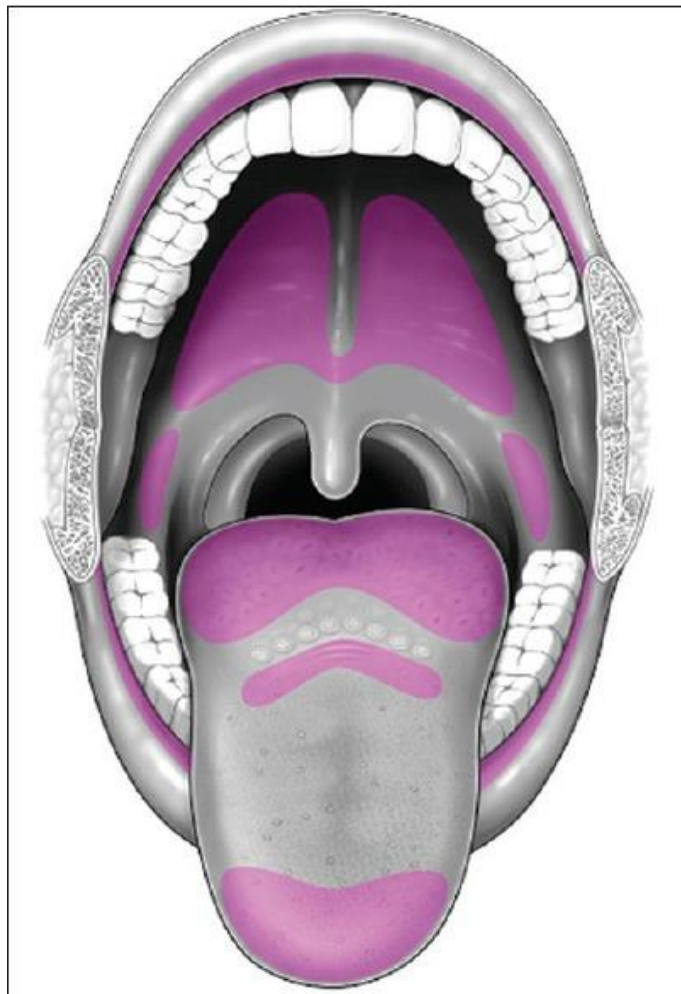


Рис. 3. Розташування малих слинних залоз (позначено фіолетовим) в ротовій порожнині (Запозичено з [4]).

1.3 Висновок до першого розділу

Нервова система людини поділяється топографічно поділяється на дві основні частини: центральну нервову систему (ЦНС) та периферичну нервову систему (ПНС). Функціонально вона поділяється на соматичну та вегетативну (автономну) нервові системи. Головним складовим блоком нервової системи є нейрон. Слинні залози складаються з трьох великих (основних залоз) – слинної, під'язикової та підщелепної.

РОЗДІЛ 2

Анатомо-морфологічні відомості про нейрони підщелепного ганглія ссавців

2.1 Основні відомості

Підщелепний ганглій – це парасимпатичний ганглій, що іннервує підщелепну та під'язикову слинні залози. В ссавців, нейрони цього ганглію розташовані в сполучній тканині між язиковим нервом та всередині та навколо головних слинних проток (див. Рис. 4).

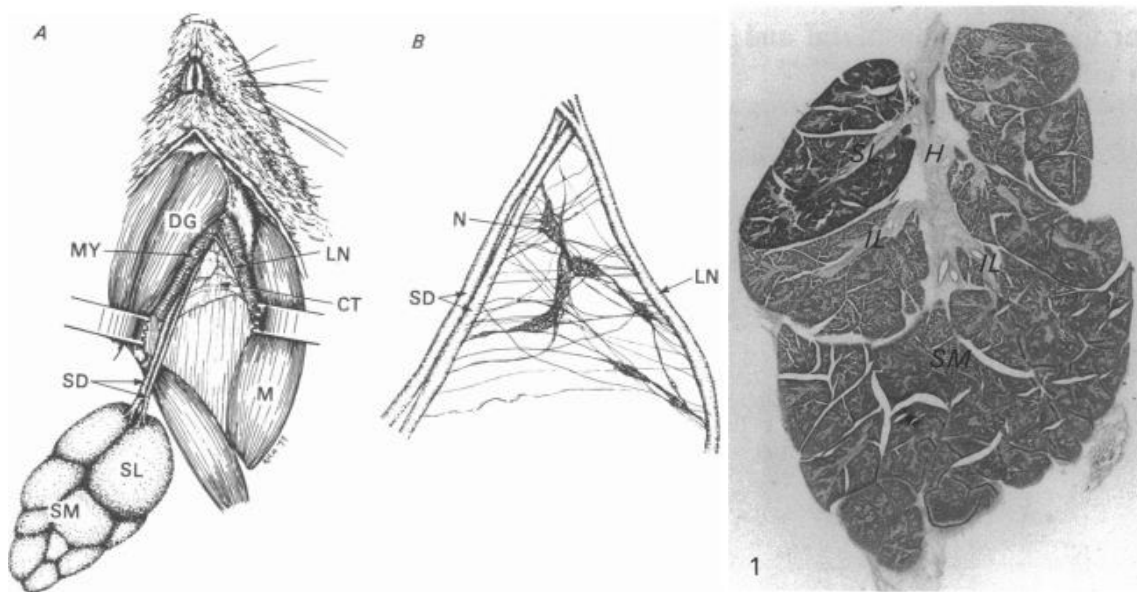


Рис. 4. Розташування підщелепного ганглія щура.

Ліворуч. А – клітини ганглія іннервують підщелепну (SM) та під'язикову (SL) слинні залози, знаходяться в тонкій сполучній тканині (CT) під мілогідним м'язом (MY). В - тонкий шар сполучної тканини знаходиться між язиковим нервом (LN) та слинними протоками (SD). (Запозичено з [7])

Праворуч. Фотографія підщелепної (SM) та під'язикової (SL) залоз. Гангліозні клітини розташовані в сполучній тканині в гілумі (H) та в зовнішньо- і внутрішньолобуляній септі (IL). Збільшення 10х. (Запозичено з [8])

Внутрішня структура підщелепного ганглія складається з різноманітних груп гангліїв різних розмірів. Форма окремого ганглія залежить від його

місцезнаходження та кількості вміщених у нього клітин. Група гангліїв, що розташована у регіоні гілума, має великі витягнуті веретеноподібні форми, тоді як група гангліїв, що знаходиться глибше в залозах, має менші розміри. Більші ганглії оточені капсулою зі сполучної тканини, а в сполучній тканині гілума також присутні окремі клітини. [8].

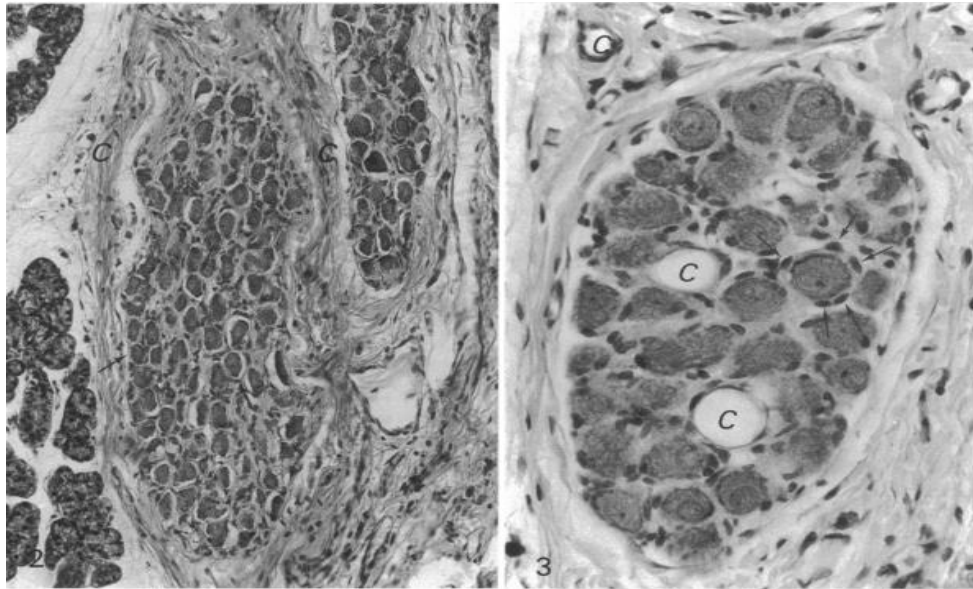


Рис. 5. Підщелепний ганглії щура.

Ліворуч - великий підщелепний ганглії. Щільна капсула зі сполучної тканини (С). Гангліозні клітини позначені стрілками. Збільшення x194 (Запозичено з [8]).

Праворуч - менший підщелепний ганглії дорослого щура. Стрілками позначено сателітні клітини, які оточують соми гангліозних клітин. С – капіляри. Збільшення x350 (Запозичено з [8]).

На гістологічному препараті, зображеному на Рис. 5, можна помітити великий підщелепний ганглії, що розташований всередині щільної капсули зі сполучної тканини. Між гангліозними клітинами видно присутність клітин-сателітів та шванівських клітин. На тому ж рисунку праворуч зображено менший підщелепний ганглії дорослого щура. Слід зазначити, що збільшення мікроскопу на цьому зображенні відрізняється від того, що показано на Рис. 5, ліворуч. У цьому випадку видно ексцентричну позицію ядер гангліозних клітин. Ядра більших нейронів зазвичай розташовуються на периферії (Рис. 5,

праворуч). Нервові волокна та шванівські клітини розподілені між гангліозними клітинами підщелепного ганглію. Також можна помітити багато капілярів у ганглії та в сполучній тканині, яка їх оточує. Розподіл та морфологія окремих клітин, в основному, подібні для постнатальних та дорослих щурів, але в постнатальних клітини загалом менші, а гангліозні капсули менш виражені (Рис. 6). Тіла клітин у ганглії постнатальних щурів вкладені більш щільно, а міжклітинний простір загалом менше. [8].

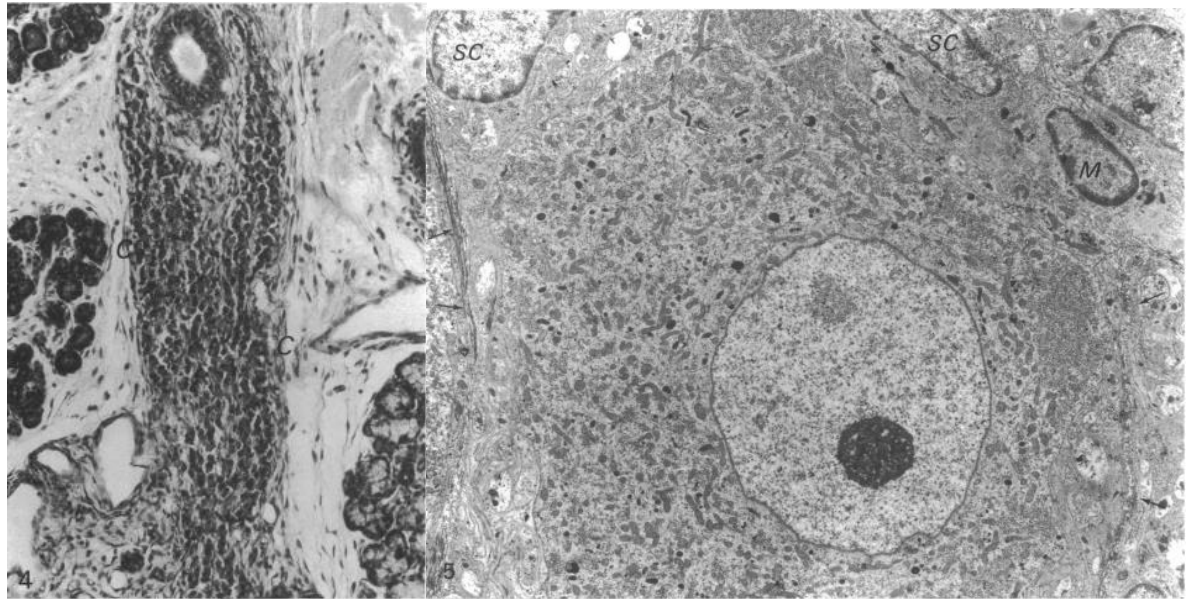


Рис. 6. Підщелепний ганглії щура (Продовження)

Ліворуч - підщелепний ганглії новонародженого щура. Покривна капсула (С) (Запозичено з [8]).

Праворуч - нейрон підщелепного ганглія дорослого щура. Збільшення x5625. (Запозичено з [8]).

Згідно зі зображенням Рис. 6 (ліворуч), у новонародженого щура покривна капсула підщелепного ганглія нечітка, клітини мають менші розміри і щільно вкладені.

При вивченні внутрішньозалозного підщелепного ганглія дорослого щура за допомогою електронного мікроскопа, видно, що він складається з кластерів гангліозних клітин та нервових відростків, разом із підтримуючими елементами,

такими як сателітні клітини, шванівські клітини, фібробласти, колагенові волокна та кровоносні судини (Рис. 6, праворуч) [7].

Нейрон підщелепного ганглія щура характеризується великим ядром, розташованим поза центром клітини. У цитоплазмі присутні безліч мітохондрій, грубий ендоплазматичний ретикулум, комплекси Гольджі та щільні гранули. Також присутні сателітні клітини (SC) та макрофаги, а ядро містить грубі хроматинові маси (М) (Рис. 6, праворуч). Між клітинами ганглію також спостерігаються колагенові фібрили (Рис. 5, праворуч, позначені стрілочками).

Отже, типова клітина підщелепного ганглія має сому, яка має круглу або овальну форму, кілька довгих, розширених дендритів і короткі відростки. Поверхня соми та відростків вкрита оболонкою з сателітних клітин, за винятком деяких точок, де є прямий контакт з іншими сомами, дендритами або терміналями аксонів. Ядро, яке часто знаходиться поза центром соми, містить хроматин. Воно має одне або більше виражених ядерць (рис. 6, праворуч). Численні органели розподілені по всьому тілу клітини, а цитоплазма має високу густину цитозолі. Комплекси Гольджі, грубий ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії мають яскраво виражені контури (рис. 6, праворуч). У більшості клітин грубий ендоплазматичний ретикулум короткий, згрупований і розкиданий по всій цитоплазмі. У деяких клітинах ганглія спостерігалися групи довгого грубого ендоплазматичного ретикулуму, розташовані біля клітинної мембрани. Комплекси Гольджі та мітохондрії розподілені в цитоплазмі випадковим чином (Рис. 6, праворуч). Також присутній гладкий ендоплазматичний ретикулум, який випадково розподілений по всій цитоплазмі та в дендритах є вільні рибосоми. В сомі та відростках є численні мікротрубочки на нейрофіламенти ([7], [8]).

2.2 Морфометричні властивості нейронів підщелепного ганглія

У табл. 1 наведені середні морфометричні значення нейронів підщелепного ганглія. Дослідження, проведені У. К. NG та співавторами, показують, що загалом всі значення зростають зі збільшенням віку щурів [8] .

Найбільше зростання спостерігається в середній площі перетину клітин. Крім того, темп зростання клітинної цитоплазми значно вищий, ніж у ядра (Рис. 7). Колоподібність обчислювалась за формулою: $\text{колоподібність} = \frac{\text{периметр клітини}}{(4 \times \pi \times \text{площа клітини})}$.

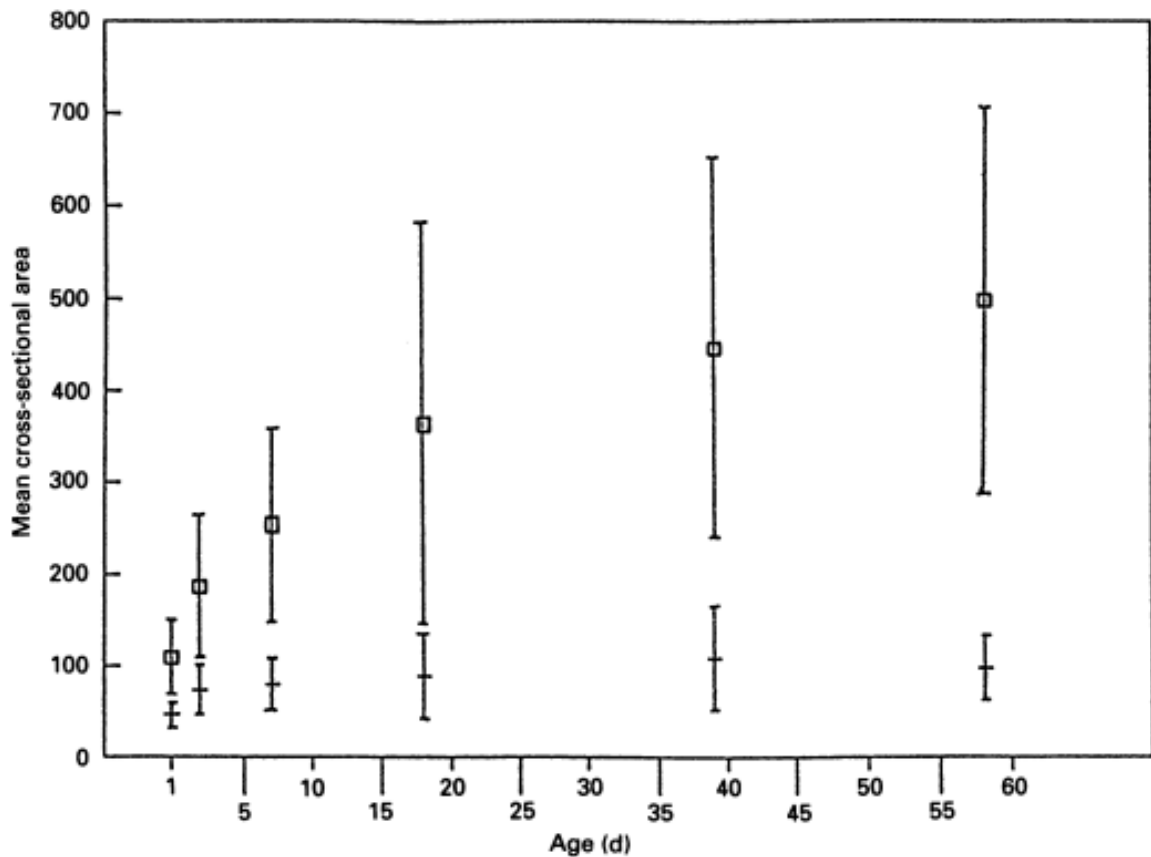


Рис. 7. Усереднена площа поперечного перерізу сом клітин (позначені квадратами) та їх ядер (позначено плюсиками) залежно від віку (Запозичено з [9])

Таблиця 1. Морфометричні характеристики внутрішньозалозних клітин ганглія щурів різних вікових груп (Запозичено з [9])

Age	Mean cross-sectional cell area (μm^2)	Mean cross-sectional nuclear area (μm^2)	Cell/nuclear ratio	Mean cell diameter (μm)	Mean nuclear diameter (μm)	Mean cell perimeter (μm)	Mean cell circularity
Newborn	108.58 ± 39.31	47.18 ± 15.43	2.43 ± 0.96	12.35 ± 2.32	7.98 ± 1.44	40.65 ± 8.29	1.17 ± 0.13
2 d	186.17 ± 81.35	73.36 ± 28.82	2.68 ± 1.11	16.18 ± 3.60	9.87 ± 1.93	53.46 ± 12.38	1.21 ± 0.13
1 wk	254.18 ± 104.09	79.15 ± 27.50	3.40 ± 1.46	18.88 ± 3.99	10.27 ± 1.79	62.78 ± 13.99	1.21 ± 0.12
2-3 wk	362.66 ± 218.18	89.71 ± 41.80	4.20 ± 2.34	22.09 ± 6.50	10.76 ± 2.46	73.55 ± 22.49	1.21 ± 0.15
5-6 wk	446.40 ± 204.23	108.20 ± 58.44	4.51 ± 1.85	25.31 ± 8.47	11.76 ± 2.68	82.59 ± 19.37	1.21 ± 0.15
Adult	497.78 ± 207.12	98.17 ± 36.73	5.38 ± 2.24	26.58 ± 5.64	11.42 ± 2.10	88.79 ± 19.25	1.24 ± 0.13

Як видно з Рис. 8, співвідношення площ (та розмірів) клітина/ядро збільшується в період перших 2-3 тижнів росту, після чого перестає демонструвати зростання.

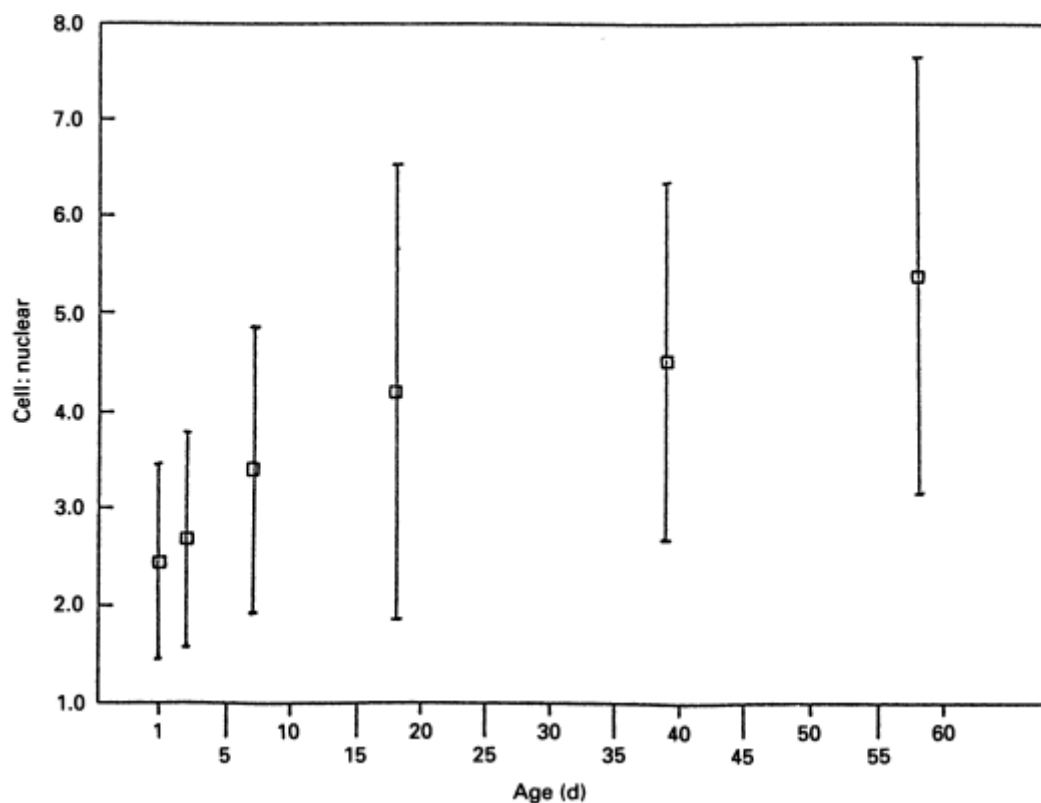


Рис. 8. Співвідношення площ тіла клітин та ядер клітин підщелепного ганглія в щурів, що належать різних вікових груп (Запозичено з [9])

2.3 Будова синаптичних з'єднань

У підщелепному ганглії дорослих щурів часто спостерігаються синаптичні контакти та несинаптичні зв'язки. Більшість синаптичних контактів виникає між аксонами та дендритами (або невеликими відростками) гангліозних клітин (Рис. 9). Дендрити можна впізнати за наявністю рибосом в них.

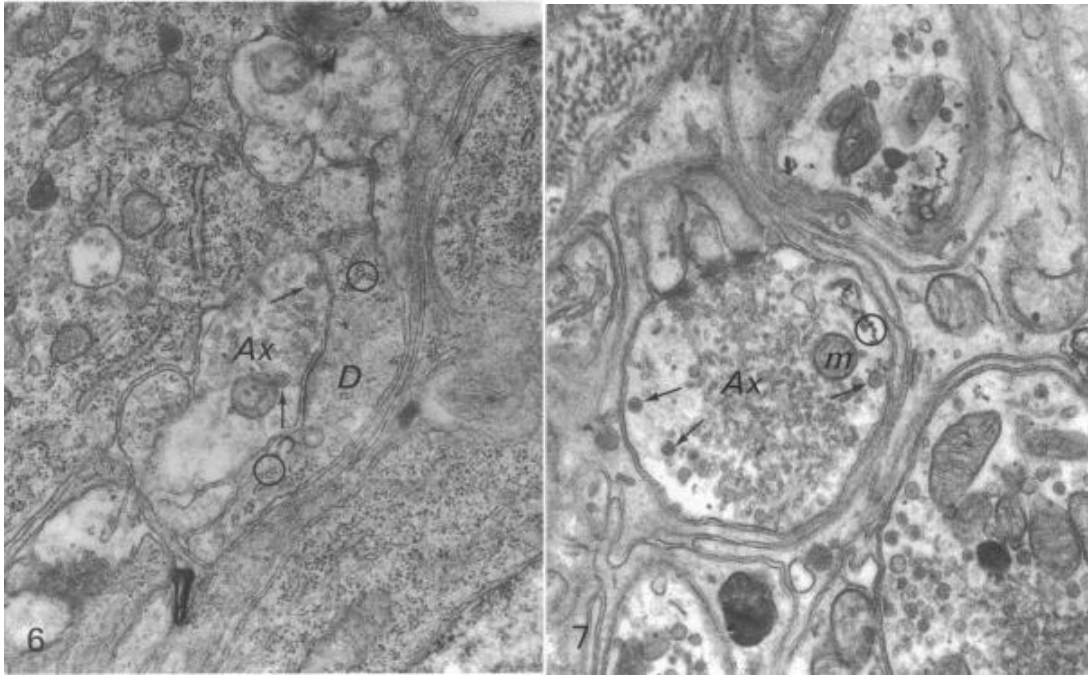


Рис. 9. Синаптичні з'єднання в підщелепному ганглії

Ліворуч - терміналь аксону (Ax) та дендрит (D). Збільшення x29750. (Запозичено з [8]).

Праворуч - терміналь аксону (Ax), з'єднана з 3 малими відростками. m – мітохондрії. Збільшення x29750. (Запозичено з [8]).

Пресинаптичні термінали аксонів містять варіативні агранулярні везикули з декількома великими везикулами, у яких щільні ядра (Рис. 9 (праворуч), позначено стрілочками). У дендритах розсіяні рибосоми (Рис. 9 (ліворуч), обведено). Також присутні глікоген-подібні частинки (Рис. 9 (праворуч), обведено). Рідкісно, термінали аксонів проникають в соми клітин та встановлюють синаптичні зв'язки (Рис. 9). Як показано на Рис. 10 (праворуч), такі аксони мають агранулярні синаптичні везикули (Sv), мікротрубочки (mt) та

мітохондрії (m). Також спостерігаються ущільнення постсинаптичної мембрани (позначено стрілочками).

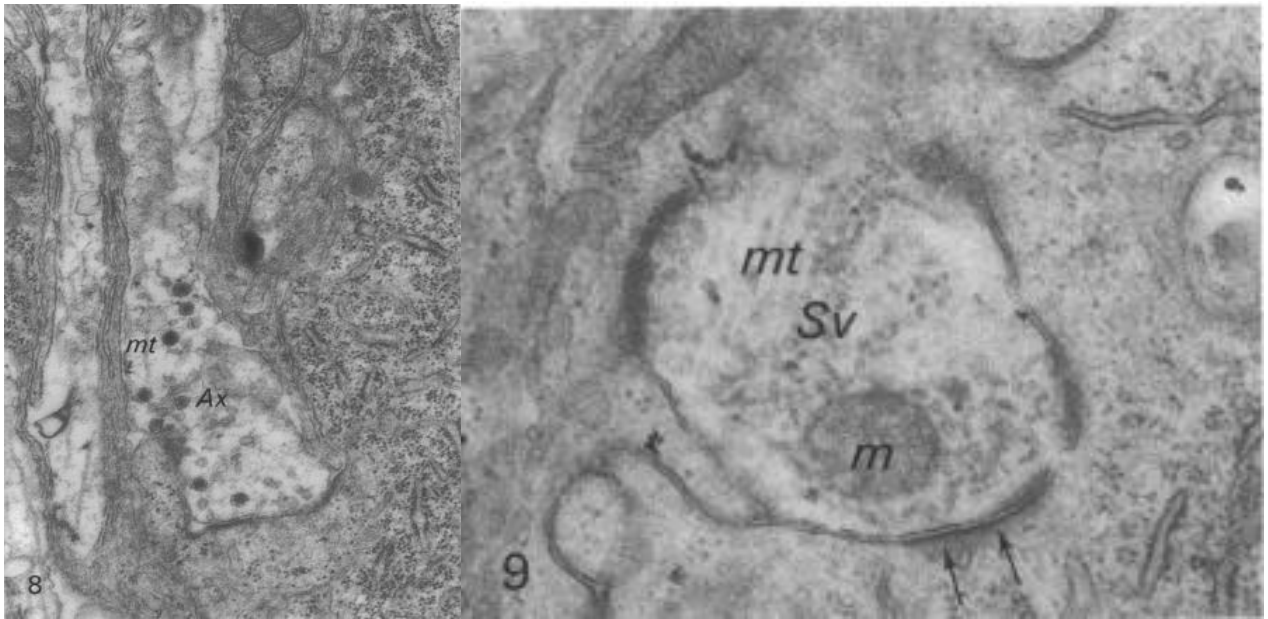


Рис. 10. Синаптичне з'єднання в підщелепному ганглії (Продовження)

Ліворуч- терміналь довгого аксона (Ax), що занурена в цитоплазму клітини ганглія дорослого щура. Наявні мікротрубочки (mt). Збільшення x38500. (Запозичено з [8]).

Праворуч - терміналь аксону, глибоко занурена в сому клітини ганглія дорослого щура, утворює аксо-соматичний контакт. Збільшення x38500. (Запозичено з [8]).

Розмір плеоморфних агранулярних везикул варіюється в діапазоні від 15 до 60 нм. Великі везикули з щільними ядрами мають розмір від 40 до 80 нм (Рис. 9 та 10). В пресинаптичних терміналах аксонів також присутні мітохондрії та мікротрубочки (Рис. 10, ліворуч). Згідно з даними Y. K. NG, іноді можна спостерігати глікоген-подібні частинки (Рис. 9 та 10).

За дослідженнями Y. K. NG, несинаптичні, десмосомоподібні з'єднувальні комплекси досить поширені. Вони зустрічаються між аксонами та дендритами, аксонами та сомами, а також між сомами. Варто відзначити, що такі несинаптичні контакти часто спостерігаються між дендритами та сомами клітин ганглію (Рис. 10, позначено стрілочками). У дендритах також можна виявити

мітохондрії (m), рибосоми, грубі ендоплазматичні ретикулуми (rER) і мікротрубочки (mt).

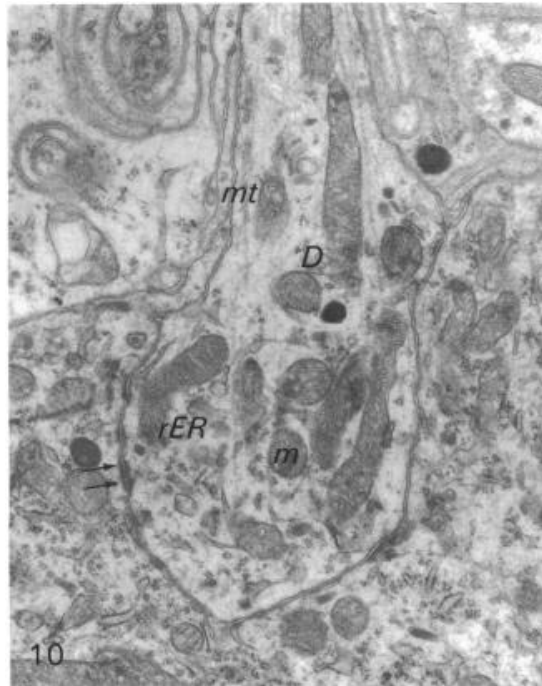


Рис. 11. Дендрит (D), що занурений глибоко в сому дорослої клітини ганглія. Збільшення x22750. (Запозичено з [8]).

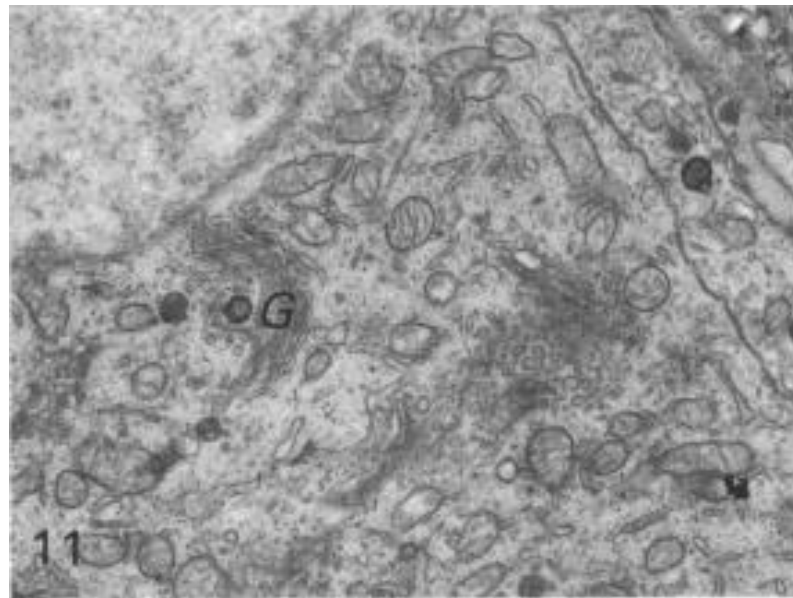


Рис. 12. Ділянка клітини дводенного щура. Збільшення x15000. (Запозичено з [8]).

У таких з'єднаннях деякі дендрити глибоко проникають у клітину (Рис. 11). В окремих випадках вкладений дендрит може досягати діаметру до 2.1 мкм.

Підщелепний ганглій у новонароджених щурів має менший розмір порівняно з дорослими. Клітини в ганглії новонароджених щурів розташовані щільно і мають значну кількість вільних рибосом, а комплекси Гольджі мають розвинені цистерни в області біля ядра (Рис. 12).

Цистерни грубого ендоплазматичного ретикулуму розкидані та погано організовані. В клітинах новонароджених щурів широко поширені мітотичні сателітні клітини (Рис. 13).

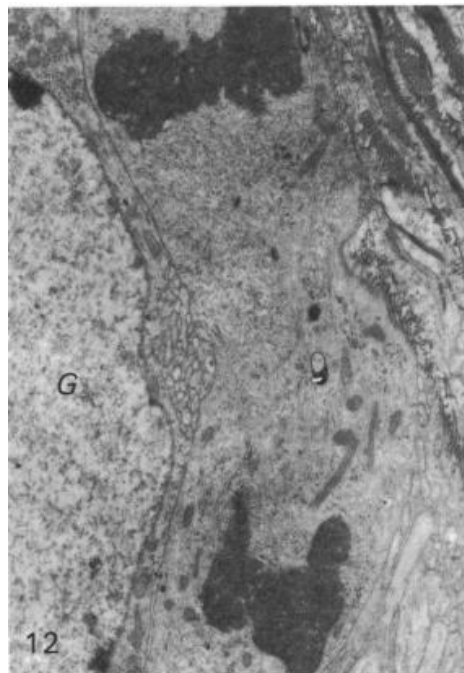


Рис. 13. Сателітна клітина в анафазі, що розташована поруч з клітиною ганглія (G) новонародженого щура. Збільшення x9000. (Запозичено з [8]).

Поширеність синапсів подібна до такої в гангліях дорослих щурів, зі врахуванням зміни їх розподілу та конфігурації.

2.4 Висновки до другого розділу

Отже, відповідно до звіту Y. K. NG, клітини підщелепного ганглія щурів виявляють всі структурні характеристики клітин інших гангліїв парасимпатичної

нервової системи. Згідно з дослідженнями, проведеними командою Y. K. NG, особливістю цих клітин є занурення терміналей аксонів у соми клітин. Це припущення, що така конфігурація запобігає дифузії передавача, забезпечуючи локальний ефект активації клітини. Інше вражаюче спостереження полягає в тому, що дендрити можуть вставляти в сусідні клітини ганглію в областях десмосомальних контактів. Ця особливість забезпечує механічну підтримку та полегшує передачу імпульсів між клітинами ганглію.

РОЗДІЛ 3

Устаткування, що використовується в експериментах на нейронах підщелепного ганглія

3.1 Мікроскопи

Світлова мікроскопія

У біофізичних дослідженнях методи світлової мікроскопії можна розділити на два основних типи: метод світлого поля і флуоресцентну мікроскопію. В методі світлого поля світло проходить через зразок, при цьому зразок поглинає, переламає та відбиває світло. Зазвичай, спостереження клітин таким способом є складним, оскільки більшість клітин прозорі. Для полегшення спостережень оптичний прилад додає фазовий зсув до випромінюваного клітинами світла. Застосовуються два основні підходи: метод фазового контрасту, при якому клітини виглядають темними на світлому фоні, та метод диференційно-інтерференційного контрасту, який дозволяє спостерігати клітини в псевдо-тривимірному зображенні.

Флуоресцентна мікроскопія використовує флуорофори, які є флуоресцентними фарбниками. Молекули цих фарбників поглинають світло однієї довжини хвилі і випромінюють його з іншою довжиною хвилі. У методі флуоресцентної мікроскопії флуорофори "прив'язуються" до певних молекул клітини, які викликають інтерес. Це може бути досягнуто за допомогою генної інженерії або за допомогою антитіл, до яких "прив'язані" молекули флуорофору (імунофлуоресценція) [10].

На рисунку 14 показано схеми різних методів мікроскопії. Наприклад, на рисунку 14 (А) зображена схема інвертованого епіфлуоресцентного мікроскопу. Об'єкт, який підлягає спостереженню, розташований між скляним столиком та покриттям. Об'єктив освітлює зразок та отримує світло від нього. Дихроїчне дзеркало, розташоване під об'єктивом, відбиває збуджувальне світло для флуоресценції та пропускає світло від зразка. Також є фільтри для збуджувального світла (синя лінія) та випромінюваного світла (зелена лінія).

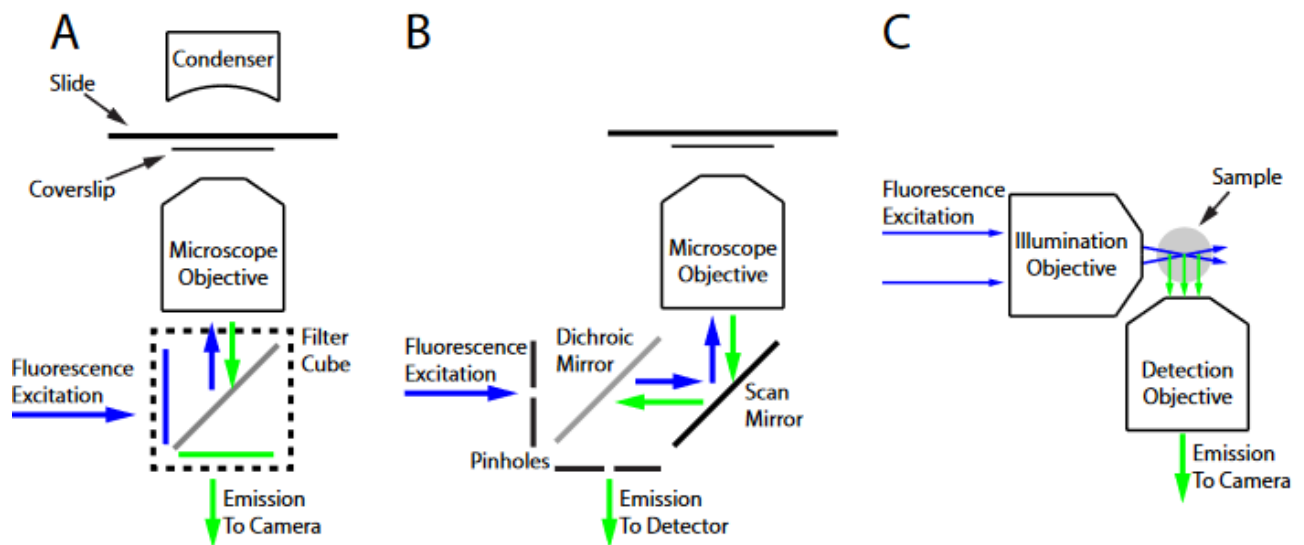


Рис. 14. Основні методи, що використовуються в світловій мікроскопії (Запозичено з [10]).

Прямі мікроскопи мають подібну структуру, але об'єктив та камера розташовані зверху, а конденсер, який підсвічує зразок, знизу. На рисунку 14 (B) показано схему роботи конфокального мікроскопа. У цьому методі сканується лише одна область зразка, положення якої визначається "сканувальним" дзеркалом, оскільки збуджувальне та випромінюване світло проходять у вузьких пучках. На рисунку Рис. 14 (C) збуджувальне світло проходить через ілюмінаційний об'єктив, який створює тонкий шар світла для освітлення зразка [10].

У широкопольовій флуоресцентній мікроскопії, де створюється звичайне зображення об'єкта, зазвичай використовується схема інвертованого мікроскопа (Рис. 14 (A)) і властивості отриманого зображення залежать від обраних лінз у об'єктиві. Максимальна роздільна здатність такого мікроскопа обмежена значенням $0.61\lambda/\text{ЧА}$ в перпендикулярній (X-Y) площині, де ЧА - числова апертура приладу. Перевагою цієї схеми є можливість культивування досліджуваних клітин безпосередньо на покривному склі. Недоліком і основним обмеженням цього методу є те, що детекторна камера не може розрізнити світло, яке виникає внаслідок багатьох молекул флуорофору, що випромінюють світло в широкому тілесному куті. Таким чином, кожна ділянка зображення, яку спостерігають, буде "затуманена" світлом, що випромінюється з інших ділянок.

Тому цей метод складно застосовувати в разі глибокого (в площині Z) або щільно "зафарбованого" зразка. Максимальна товщина зразка для такого типу мікроскопа становить 20 мкм.

Ці недоліки відсутні в методі конфокальної мікроскопії, який надає можливість отримати тривимірне зображення. Зразок опромінюється дуже фокусованим променем світла (див. Рис. 14 (B)), а детектор отримує випромінене світло лише з певної фокальної площини. Таким чином, "скануюче" дзеркало рухається, направляючи промені по всьому зразку, і зображення формується точково.

В таких мікроскопах точковий детектор менш чутливий, ніж камера, але були розроблені системи, які можуть одночасно сканувати кілька точок у зразку і передавати дані на камеру. Одним з таких методів є використання диску з отворами, який обертається і дозволяє швидко отримати зображення. Максимальна товщина зразка для звичайного конфокального мікроскопа становить 100-200 мкм, а для конфокального мікроскопа з диском - 30-50 мкм [10].

Іншим потужним методом є світлова флуоресцентна мікроскопія (Рис. 14 (C)). У цих мікроскопах зразок опромінюється з площини, перпендикулярної площині зразка, і світло випромінюється лише в фокальній площині. Цей метод також зменшує пошкодження зразка, оскільки зменшує кількість світла, яким його опромінюють. Крім того, застосовуючи однакові об'єктиви, можна змінювати їх ролі, отримуючи якісне тривимірне зображення зразка. Ще однією перевагою цього методу є висока роздільна здатність зображення у глибину, порівняно з іншими методами мікроскопії. Цей метод можна застосовувати для зразків товщиною понад 1 мм.

Крім того, розробляються методи флуоресцентної мікроскопії надвисокої роздільної здатності, що дозволяють досягнути роздільної здатності 20 нм у площині XY та 50 нм у глибину.

3.2 Електроди для електрофізіологічних експериментів

Дослідження електрофізіологічних характеристик клітин зазвичай здійснюється за допомогою мікроелектродів та підсилювачів, що дозволяють вимірювати струми навіть від окремих каналів та реєструвати найменші зміни в мембранному потенціалі.

Мікроелектроди, які використовуються в біофізичних дослідженнях, представляють собою скляні трубочки, заповнені електролітом. Мікроелектрод утворює електричний контакт з досліджуваною клітиною. Цей контакт може бути прямим, коли електрод проникає через клітину або відриває частину мембрани, яка прилипає до отвору електрода. Крім того, контакт може бути непрямим, як у випадку з позаклітинним записом, коли електрод утворює електричний контакт з клітиною через розчин електроліту, в якому знаходяться електрод і клітина.

Розмір кінчика електрода має бути дуже малим. Наприклад, "гострі" електроди для проникнення через клітинну мембрану мають діаметр кінчика менше 0.5 мкм, а "петч" -електроди, які відривають частину клітинної мембрани, мають розмір приблизно 1-3 мкм.

Зазвичай, тонкий провід з AgCl знаходиться в електроліті всередині електрода і з'єднує електрод з вимірювальним підсилювачем. Це дозволяє перетворювати йонний струм на електричний за конкретною формулою:



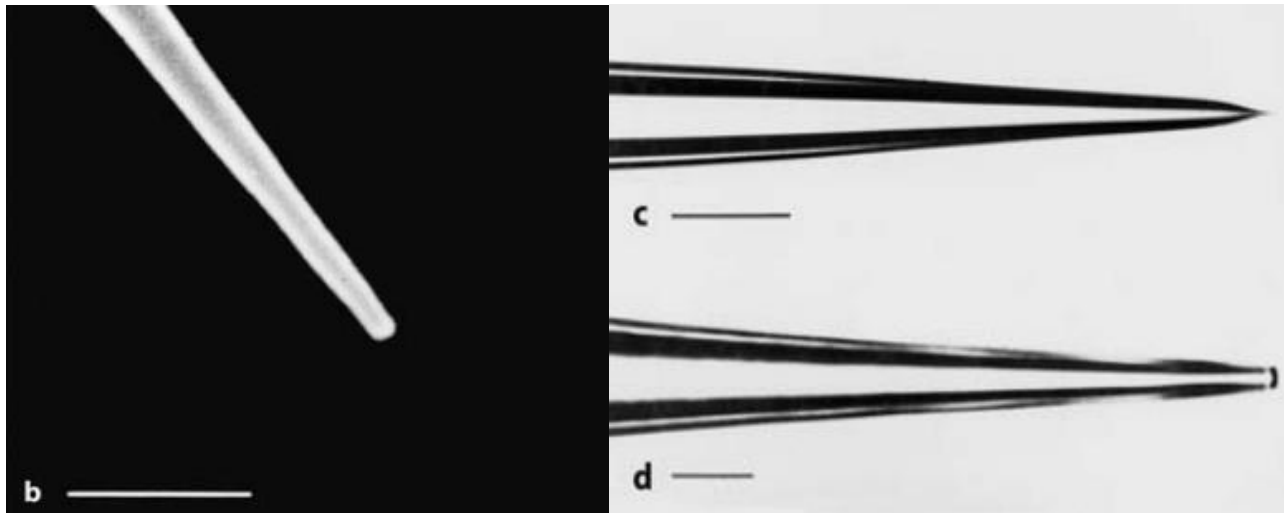


Рис. 15. Мікроелектроди. Ліворуч – «гострий» електрод для внутрішньоклітинного відведення, шкала – 1 мкм. Праворуч – «петч»-електрод, шкала зверху відповідає 500 мкм, знизу – 10 мкм (Запозичено з [11]).

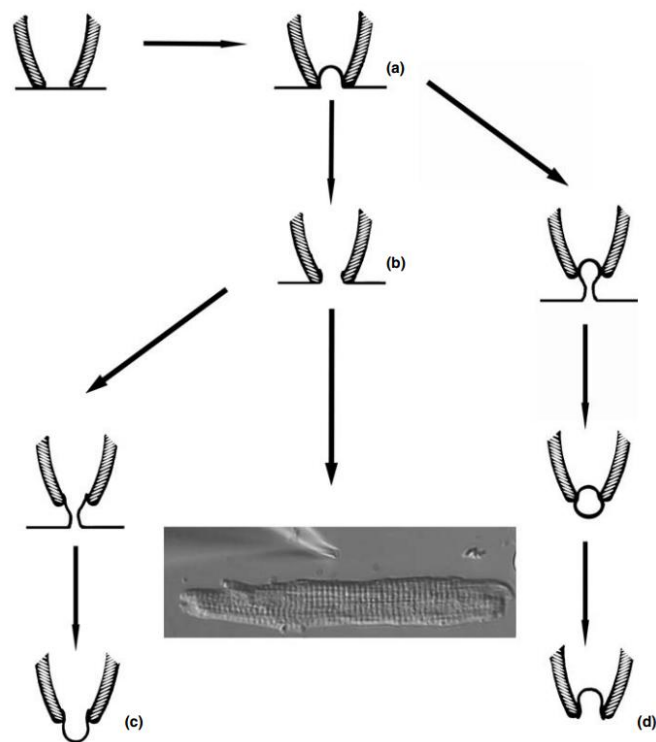


Рис. 16. Види конфігурацій «патч клемп». Електрод наближається до мембрани клітини та утворює дуже щільне (гігаомне) з'єднання кінчика електроду та мембрани (Запозичено з [11]).

3.3 Підсилювачі електричних сигналів

Для вимірювання електричних сигналів, що отримуються від клітини за допомогою електроду, потрібний спеціальний підсилювач, оскільки струми та потенціали, пов'язані з живими клітинами, мають дуже малі значення. Цей підсилювач має високий вхідний опір, низький рівень шуму, високий коефіцієнт

підсилення та широку смугу пропускання. Крім того, він повинен передбачати та компенсувати похибки, які можуть бути спричинені самим електродом, шумами та іншими факторами.

3.4 Метод фіксації струму

Метод полягає в пропусканні певного струму через електрод та відстеженні змін мембранного потенціалу. Для успішної реалізації цього методу необхідно забезпечити пропускання струму з високою точністю, оскільки необхідні струми коливаються в діапазоні від мікроамперів до пікоамперів.

В цьому методі присутня проблема, пов'язана з появою певної напруги під час пропускання струму через мікроелектрод. Цю проблему можна вирішити за допомогою двох електродів: один для пропускання струму та інший для вимірювання потенціалу. Також можна використовувати метод "перемикання" підсилювачів, щоб зупиняти подачу струму під час виміру потенціалу. Крім того, можна впровадити електричну компенсацію похибки, яку вносить електрод.

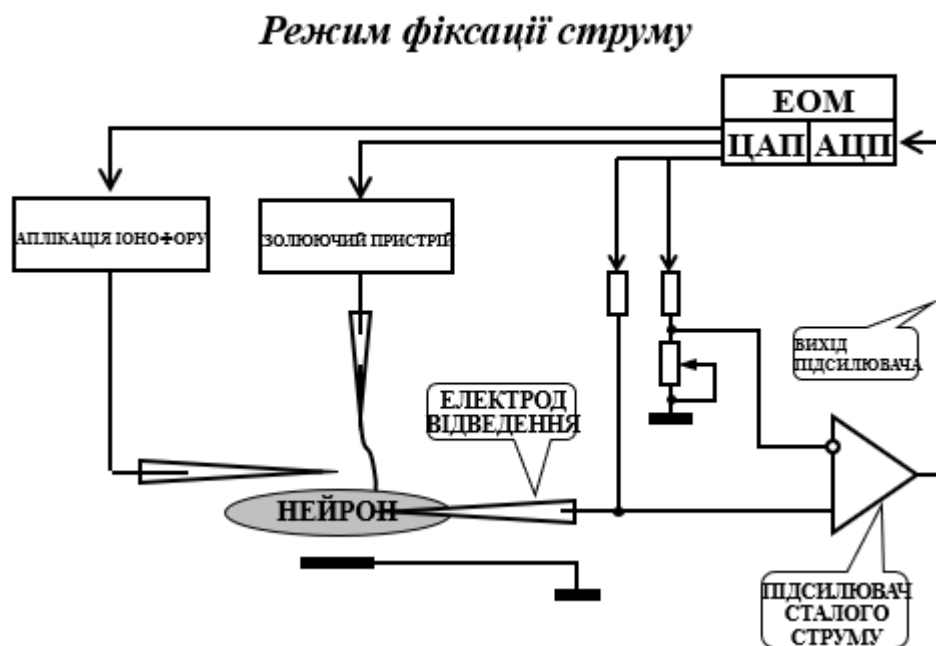


Рис. 17. Блок-схема установки для методу фіксації струму.

На рисунку 17 наведена блок-схема установки для вимірювання струму в режимі фіксації. ЕОМ (електронно-обчислювальна машина, тобто комп'ютер) пов'язана з аналогово-цифровим та цифрово-аналоговим перетворювачами. Для забезпечення струму через клітину використовується схема з підсилювачем сталого струму зі зворотним зв'язком. Також застосовується іонофор - речовина, яка зв'язує йони та може змінювати їх концентрації поза мембраною, що підсилює роль ключових йонів в клітині.

3.5 Метод фіксації потенціалу

У даному методі мембранний потенціал клітини встановлюється на певному рівні (за допомогою підсилювача), і вимірюється йонний струм, що виникає при цьому потенціалі. Потенціал підтримується сталим за допомогою компенсації - при зміні мембранного потенціалу від заданого значення, регулюється струм, що пропускається через електрод. В результаті, цей струм повинен бути рівним йонному струму через клітинну мембрану.

Даний метод характеризується обмеженою точністю через неідеальну форму клітини, що призводить до нерівномірності мембранного потенціалу на поверхні клітини. Також похибки вносять мікроелектроди та вміст клітини між вершинками електродів та мембраною.

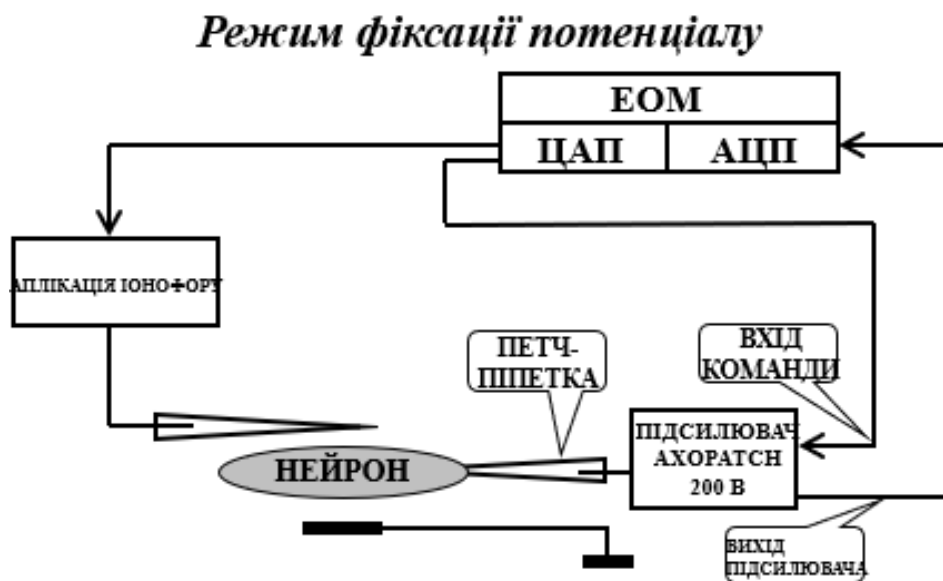


Рис. 18. Блок-схема установки для методу фіксації потенціалу.

На Рис. 18 показано блок-схему установки для проведення вимірів в режимі фіксації потенціалу. Так, застосовується петч-клемп підсилювач, наприклад, Ахорatch 200В, який є широкорозповсюдженим підсилювачем для досліджень електрофізіологічних властивостей нейронів та окремих йонних каналів.

3.6 Висновки до третього розділу

Таким чином, було розглянуто основні методи дослідження клітин підщелепного ганглія, які включають світлову мікроскопію з використанням флуорофорів та без них. Були розглянуті переваги та недоліки основних методів світлової мікроскопії. Крім того, були висвітлені основні методи дослідження електрофізіологічних властивостей клітин, а також основні методи вимірювання електричних сигналів нейронів. Були розглянуті також блок-схеми пристроїв, що використовуються для реалізації цих методів.

РОЗДІЛ 4

Електрофізіологічні властивості підщелепного ганглія та його нейронів

4.1. Синаптичні відповіді нейронів підщелепного ганглія

Під час стимуляції нерва *chorda tympani* (барабанна струна), який надає іннервацію підщелепним та під'язиковим слинним залозам, в клітинах підщелепного ганглія спостерігаються синаптичні струми, як це показано на рисунку 19, ліворуч.

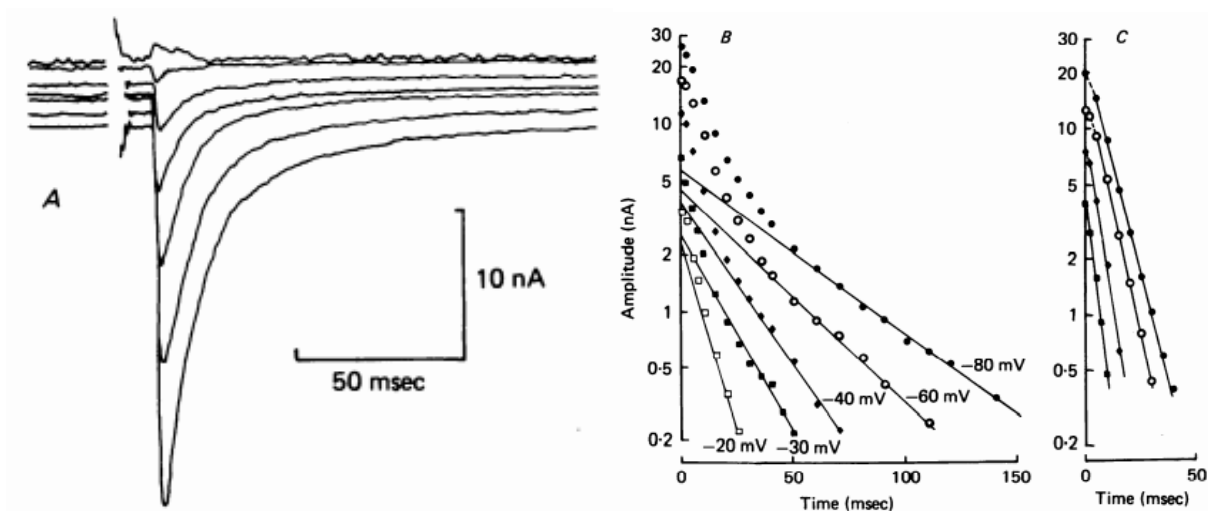


Рис. 19. Синаптичні струми при різних мембранних потенціалах.

Ліворуч - струми при мембранних потенціалах(зверху вниз): -4, -10, -20, -30, -40, -60, -80 мВ (Запозичено з [12]).

Праворуч - напівлогарифмічні графіки струмів, показаних ліворуч. Зліва – графік для повільної (експоненційної) компоненти, праворуч – для швидкої (Запозичено з [12]).

Як зазначено Н. Р. RANG, викликані синаптичні струми спадають відповідно до кривої - суми двох еспонент:

$$a(t) = a_f e^{-t/\tau_f} + a_s e^{-t/\tau_s} \quad (2)$$

де a - амплітуда струму, a_f та a_s , τ_f та τ_s – амплітуди та часові константи швидкої та повільної компонент відповідно, а t – час, що минув після піку викликаного синаптичного струму.

Амплітуда синаптичних струмів зростає лінійно до гіперполяризації мембрани (див. Рис. 20, праворуч).

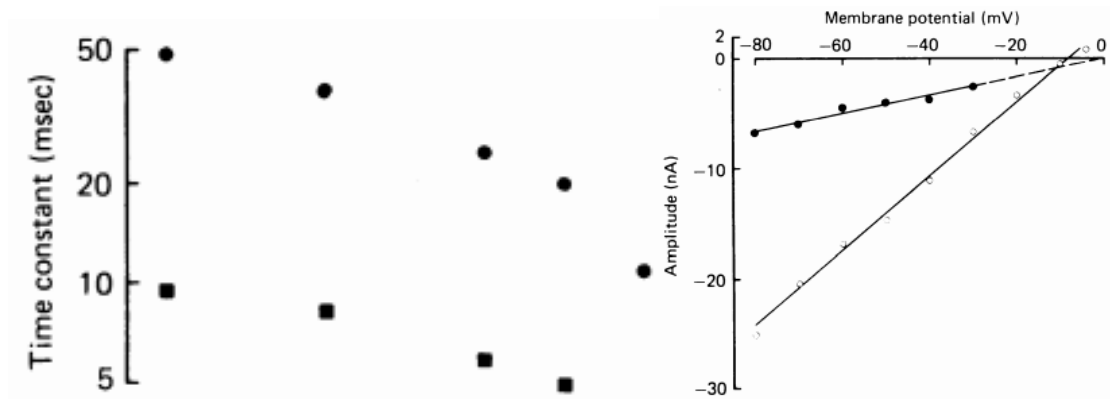


Рис. 20. Амплітуди та часові константи експоненційних компонент синаптичних струмів.

Ліворуч -повільна компонента позначена кружечками, швидка – квадратиками (Запозичено з [12]).

Праворуч -повільна компонента позначена чорними кружечками, білими позначена пікова амплітуда (Запозичено з [12]).

Крім того, при збільшенні концентрації кальцію в розчині, пікові амплітуди струмів також зростають, як дослідив Н. Р. RANG. Наприклад, в розчині Кребса з нормальною концентрацією кальцію (2.5 mM), пікові амплітуди при значеннях -40 та -80 мВ становили відповідно 8.3 ± 1.4 nA та 18.3 ± 4.0 nA, тоді як при концентрації кальцію 7.5 mM відповідні амплітуди склали 11.9 ± 2.1 nA та 28.6 ± 5.3 nA. Загалом, при однакових значеннях мембранного потенціалу при концентрації кальцію 7.5 mM, пікові амплітуди були більшими в 1.41 ± 0.07 разів, як зазначено у таблиці 2. [12].

Як видно з Таблиці 2, співвідношення амплітуди повільної компоненти струму до пікової залишалося приблизно незмінним при різних мембранних потенціалах, що свідчить про однаковий зворотний потенціал для обох компонент. Крім того, незначна зміна середнього значення відношення пікової та повільної амплітуд підтверджує, що амплітуди швидкої та повільної компоненти синаптичного струму однаково реагують на зміну концентрації кальцію.

Таблиця 2. Залежність основних характеристик синаптичних струмів від значень мембранного потенціалу та концентрації кальцію (Запозичено з [12]).

Calcium concn. (mM)	Membrane potential (mV)	Peak amplitude a_p (nA)	Relative amplitude of slow component a_s/a_p	τ_f (msec)	τ_s (msec)
2.5	-30	5.33 ± 0.77 (10)	0.49 ± 0.05 (10)	5.4 ± 1.3 (7)	22.1 ± 3.8 (10)
	-40	8.27 ± 1.38 (12)	0.51 ± 0.05 (12)	6.3 ± 1.0 (9)	27.2 ± 3.9 (13)
	-50	10.14 ± 1.70 (10)	0.46 ± 0.05 (10)	8.0 ± 1.5 (7)	33.4 ± 7.5 (9)
	-60	14.60 ± 2.61 (10)	0.47 ± 0.05 (10)	8.3 ± 1.3 (8)	36.8 ± 6.3 (10)
	-70	15.59 ± 3.45 (7)	0.49 ± 0.08 (7)	8.3 ± 1.8 (5)	30.4 ± 5.3 (8)
	-80	18.33 ± 3.96 (8)	0.43 ± 0.05 (8)	8.6 ± 1.2 (6)	45.4 ± 9.0 (8)
	-100	25.90 ± 5.4 (3)	0.40 ± 0.07 (3)	8.2 ± 3.9 (3)	—
7.5	-30	7.6 ± 1.4 (5)	0.51 ± 0.03 (5)	8.2 ± 1.3 (5)	34.1 ± 2.8 (5)
	-40	11.9 ± 2.1 (13)	0.43 ± 0.03 (13)	7.6 ± 0.74 (12)	39.7 ± 2.1 (12)
	-50	13.1 ± 2.2 (7)	0.48 ± 0.03 (7)	9.5 ± 1.3 (7)	46.1 ± 4.3 (7)
	-60	16.7 ± 2.7 (13)	0.42 ± 0.03 (13)	9.9 ± 0.86 (12)	53.6 ± 3.3 (12)
	-70	20.1 ± 3.2 (5)	0.43 ± 0.05 (5)	10.5 ± 1.6 (5)	56.2 ± 7.3 (5)
	-80	28.7 ± 5.3 (13)	0.38 ± 0.04 (13)	11.7 ± 1.0 (12)	60.2 ± 6.6 (12)
	-100	39.9 ± 8.5 (9)	0.40 ± 0.04 (9)	12.2 ± 1.1 (9)	75.8 ± 5.1 (9)

Як зазначено Н. Р. RANG, амплітуда викликаних синаптичних струмів майже не змінюється з часом у окремих клітинах, хоча різні клітини можуть мати різні значення. Наприклад, пікова амплітуда при концентрації кальцію 2.5 mM та мембранному потенціалі -80 mV варіюється від 4 до майже 40 nA у різних клітинах, а «повільна» часова стала становить від 18 до 68 мс. «Швидка» часова стала коливалась від 5.2 до 13.6 мс [12].

При зміні частоти стимулюючого сигналу від 0.1 до 0.33 або 1 Гц, пікова амплітуда синаптичного струму значно зменшилась: при 1 Гц амплітуда становила менше половини свого значення при 0.1 Гц, як показано на рис. 14. При цьому часові константи сигналу не змінилися, а також збереглося співвідношення амплітуд.

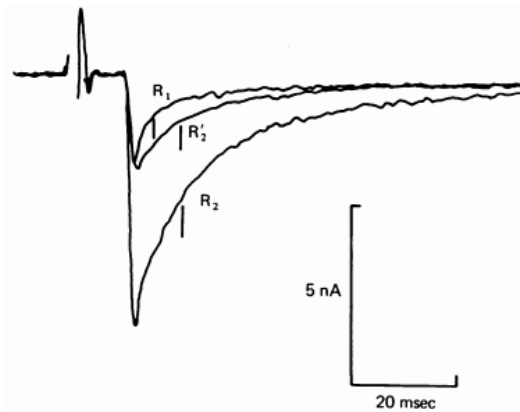


Рис. 21. Синаптичні струми при різних значеннях частоти стимулюючого сигналу. R_1 -синаптична відповідь на слабкий стимул з частотою 0.1 Гц, R_2 -сильніший стимул з частотою 0.1 Гц, R_2' -стимул такої ж сили, що і R_2 , але з частотою 0.33 Гц (Запозичено з [12]).

Слід також зазначити, що деякі клітини отримують іннервацію від кількох нервових волокон, і залежно від сили стимулу може бути активовано одне або кілька волокон. На рис. 21 зображено синаптичні струми від однієї клітини, проте в R_1 сила стимулу достатня лише для активації одного пресинаптичного волокна, у R_2 - обох.

Згідно з даними Н. Р. RANG, характеристики синаптичних струмів змінюються зі зміною температури. Так, при зміні температури від 20 до 37 °C, пікова амплітуда синаптичного струму збільшилась приблизно в 2.5 рази, тоді як зворотний потенціал залишався незмінним. Часові сталі зменшились приблизно вдвічі, а відносні амплітуди обох компонент не змінилися [12].

При додаванні неостигміну спостерігається суттєве подовження сигналу, хоча розпад сигналу на дві компоненти залишається (див. Рис. 22).

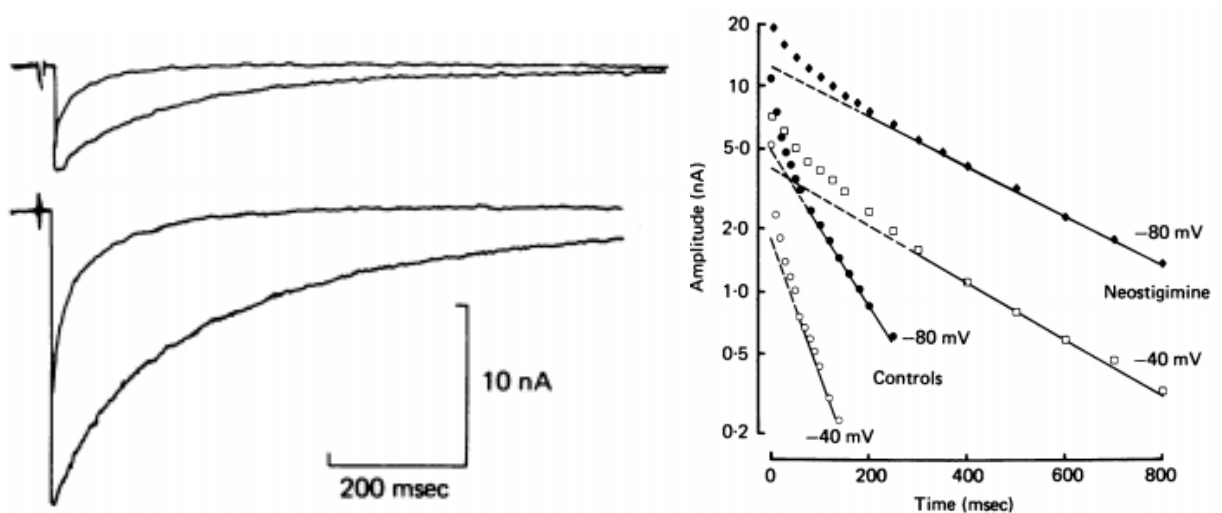


Рис. 22. Візуалізація ефекту додавання неостигміну на викликані синаптичні струми.

Ліворуч: Зверху – викликані синаптичні струми при -40 мВ та -80 мВ. Знизу – струми при тих же значеннях мембранного потенціалу, з додаванням 10 мкМ неостигміну (Запозичено з [12]).

Праворуч -напівлогарифмічні графіки струмів, показаних на ліворуч (Запозичено з [12]).

Таблиця 3. Ефект аплікації 10 мМ неостигміну на синаптичні струми(Запозичено з [12]).

A. E.s.c.s			
E_m (mV)	$\frac{a_p(\text{neo})}{a_p(\text{control})}$	$\frac{\tau_t(\text{neo})}{\tau_t(\text{control})}$	$\frac{\tau_s(\text{neo})}{\tau_s(\text{control})}$
-40	1.1 ± 0.2	—	2.6 ± 0.8
-60	1.1 ± 0.2	3.4 ± 0.6	2.4 ± 0.5
-80	1.0 ± 0.2	3.5 ± 0.7	2.5 ± 0.4
-100	1.0 ± 0.2	3.6 ± 0.6	2.3 ± 0.3

Додавання неостигміну призвело до збільшення пікової амплітуди струмів, які варіювалися від клітини до клітини в діапазоні від 30% до 50%. Співвідношення повільної компоненти до пікової амплітуди залишалося незмінним. Подовження синаптичної відповіді також варіювалося від клітини до клітини, причому "повільна" стала часу збільшилась в середньому в 3.5 рази, а "швидка" - в 2.5 рази. Подовження "швидкої" сталої часу також не залежало від мембранного потенціалу. У той же час, збільшення "повільної" сталої часу явно (хоч і не значно) залежало від мембранного потенціалу.

Отже, малоймовірно, що дві компоненти в синаптичних струмах виникають через наявність синаптичних районів з різною активністю холінестерази.

4.2 «Мініатюрні» синаптичні струми

Щодо "мініатюрних" синаптичних струмів, як повідомляє Н. Р. RANG, наряду з викликаними синаптичними струмами спостерігаються також "мініатюрні" синаптичні струми, які є спонтанними і виникають досить рідко у більшості клітин. Вони починають з'являтися частіше при високих частотах, що може бути

наслідком пошкоджень пресинаптичних терміналів електродами. Вони можуть бути зареєстровані в більшості клітин при частотах 0.2-2 Гц та за умови підвищеної концентрації калію до 15-20 мМ. Спонтанні синаптичні струми та ті, що викликані зростанням концентрації калію, майже не відрізняються, тому не розглядаються окремо [12].

З Рис. 23 видно, що амплітуди «мініатюрних» синаптичних струмів залежать від зміни мембранного потенціалу схожим чином, що і викликані синаптичні струми.

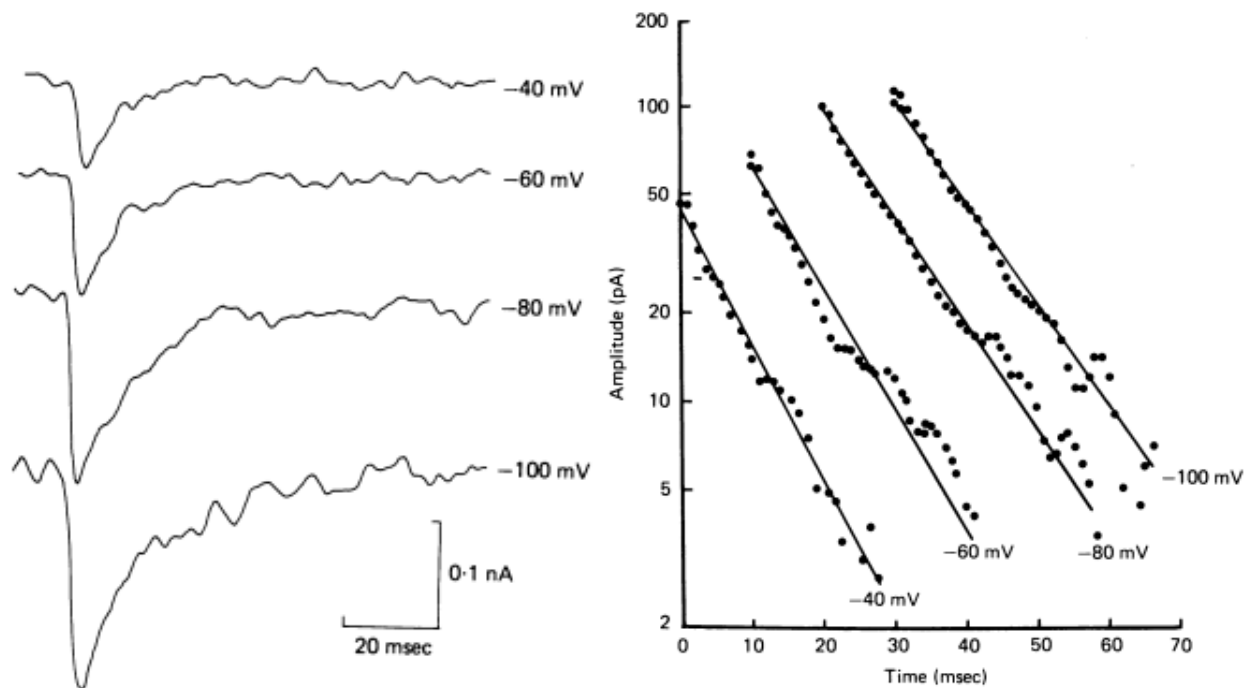


Рис. 23. «Мініатюрні» синаптичні струми.

Ліворуч - «Мініатюрні» синаптичні струми, що були зареєстровані при різних значеннях мембранних потенціалів (Запозичено з [12]).

Праворуч - Напівлогарифмічні графіки струмів (Запозичено з [12]).

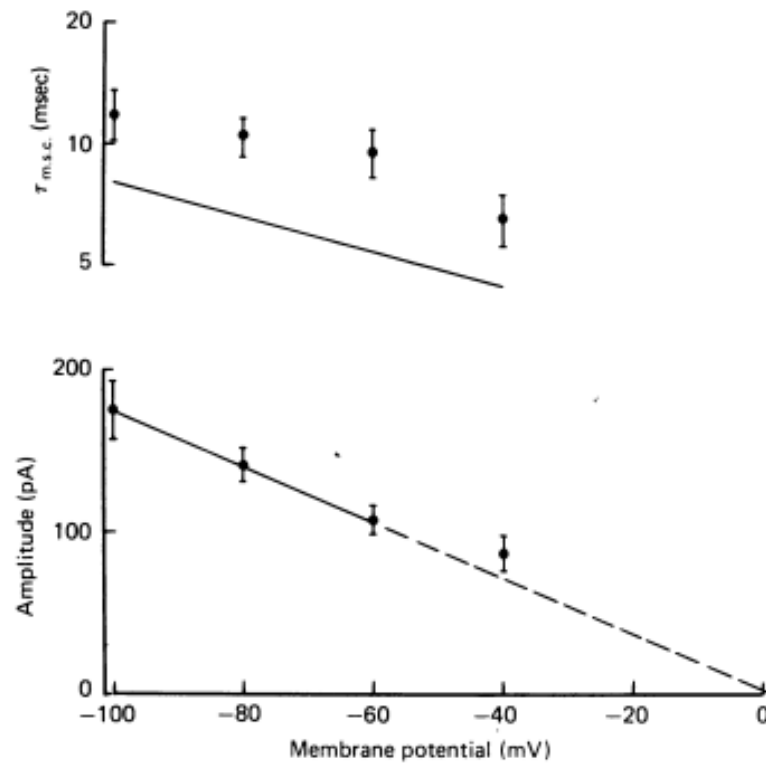


Рис. 24. «Мініатюрні» синаптичні струми (продовження). Залежність часової константи (зверху) та амплітуди (знизу) від мембранного потенціалу (Запозичено з [12]).

«Мініатюрні» синаптичні струми відрізняються від викликаних струмів тим, що перші спадають згідно з експоненційним законом. З рисунку 24 видно, що значення часової сталої для «мініатюрних» синаптичних струмів відповідає значенням «швидкої» часової сталої викликаних струмів. Крім того, ці часові сталі змінюються з мембранним потенціалом в схожий спосіб. Наприклад, середнє значення часової сталої для «мініатюрних» струмів становить 10.4 ± 1.1 мс (-80 мВ, 7.5 мМ кальцію), а для «швидкої» часової сталої - 11.7 ± 1.0 мс. Середнє відношення значення часової сталої при -80 та -40 мВ складало 1.37 ± 0.5 для «мініатюрних» струмів і 1.58 ± 0.07 для «швидкої» часової сталої викликаних синаптичних струмів (див. Таблицю 4).

Табл. 4. Порівняння часових констант для струмів, релаксаційних струмів та шумів (Запозичено з [12]).

	Calcium concn. (μM)	Membrane potential (mV)					
		-40	-50	-60	-70	-80	-100
E.s.c (fast component)	2.5	6.3 $\pm$ 1.0	8.0 $\pm$ 1.5	8.3 $\pm$ 1.3	8.3 $\pm$ 1.8	18.6 $\pm$ 1.2	8.2 $\pm$ 3.9
	7.5	7.6 $\pm$ 0.8	9.5 $\pm$ 1.3	9.9 $\pm$ 0.9	10.5 $\pm$ 1.6	11.7 $\pm$ 1.0	12.2 $\pm$ 1.1
E.s.c (slow component)	2.5	27.2 $\pm$ 3.9	33.4 $\pm$ 3.9	36.8 $\pm$ 6.3	30.4 $\pm$ 5.3	45.4 $\pm$ 9.0	
	7.5	39.7 $\pm$ 3.1	46.1 $\pm$ 4.3	53.6 $\pm$ 3.3	56.2 $\pm$ 7.3	60.2 $\pm$ 6.6	75.8 $\pm$ 5.1
M.s.c.	2.5	5.7 $\pm$ 0.8		6.7 $\pm$ 1.0		8.5 $\pm$ 1.5	11.3 $\pm$ 1.2
	7.5	6.4 $\pm$ 1.0		9.4 $\pm$ 1.4		10.4 $\pm$ 1.1	11.9 $\pm$ 1.8
V-jump (fast-component)	7.5			~ 4	4-8	5-9	
V-jump (slow component)	7.5			29.3 $\pm$ 4.4	34.7 $\pm$ 1.5	50.4 $\pm$ 7.8	
Noise (fast component)	2.5 } 7.5 }	7 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1			8 $\pm$ 2	
Noise (slow component)	2.5 } 7.5 }	43 $\pm$ 2	61 $\pm$ 8			51 $\pm$ 8	

Відповідно до даних, представлених Н. Р. RANG, можна стверджувати, що «мініатюрні» синаптичні струми відповідають «швидкій» компоненті викликаних синаптичних струмів. Збільшення концентрації кальцію з 2.5 до 7.5 мМ не має впливу на амплітуду «мініатюрних» синаптичних струмів, але збільшує їх часову сталу в середньому в 1.43 рази. Крім того, залежність «мініатюрної» часової сталої від мембранного потенціалу залишається незмінною при збільшенні концентрації кальцію. Аплікація неостигміну майже не впливає на амплітуду «мініатюрних» синаптичних струмів, але збільшує їх часову сталу в 1.3-2 рази в різних клітинах [12].

При зменшенні кількості квантів струму викликаних синаптичних струмів, здійснене шляхом зміни розчину на розчин Кребса (1 мМ кальцію та 10 мМ магнію) замість нормального розчину Кребса, їх амплітуда зменшилась на понад 90%, залишаючи часові складові без змін. Як часова константа, так і відносна амплітуда «повільної» складової викликаних синаптичних струмів залишаються абсолютно незмінними при довільному зменшенні їх амплітуд (див. Рис. 17).

На рисунку 25 зображено напівлогарифмічні графіки, де лініями показані повільні експоненційні компоненти. а - викликані синаптичні струми в нормальному розчині Кребса (2.5 мМ кальцію, 1.2 мМ магнію). b-e – струми, що були отримані після зміни нормального розчину Кребса на розчин з вмістом 1

мМ кальцію та 10 мМ магнію, при однакових інтервалах часу між записами струмів [12].

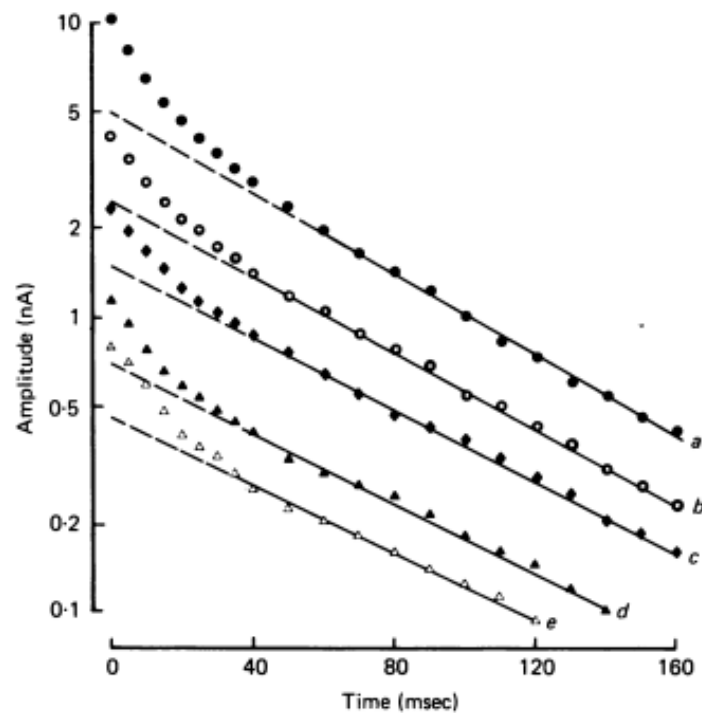


Рис. 25. Графік впливу зменшеного виділення ацетилхоліну на протікання викликаних синаптичних струмів (Запозичено з [12]).

При значній кількості «квантів» ацетилхоліну, окремі «кванти» перекриваються в зонах впливу, що призводить до непропорційного зростання постсинаптичної відповіді. З недостатньою кількістю «квантів» ацетилхоліну, яка не спричиняє такого перекривання, постсинаптичні відповіді мають значно скорочений час тривалості.

Проте, як відзначає Н. Р. RANG, викликані синаптичні струми в клітинах підщелепного ганглію мають «повільну» компоненту, навіть коли антихолінестераза відсутня, що свідчить про те, що описаний вище механізм мало ймовірно є відповідальним за наявність «повільної» компоненти струмів [12].

Проте, цей механізм пояснює, чому часова стала «мініатюрних» синаптичних струмів менш чутлива до аплікації неостигміну, ніж «швидка» часова стала викликаних синаптичних струмів, хоча інші характеристики «мініатюрних»

синаптичних струмів схожі на характеристики «швидкої» компоненти викликаних синаптичних струмів.

Таким чином, наявність «повільної» компоненти викликаних синаптичних струмів не обумовлена поступовим зменшенням трансмітера в синаптичній щілині, але зумовлена певними кінетичними властивостями іонних каналів, що впливаються ацетилхоліном [12].

Для аналізу характеристик іонних каналів, що відкриваються під дією ацетилхоліну, застосовується аналіз шуму, що був записаний при аплікації 5-15 мкМ ацетилхоліну та при наявності антихолінестерази [12].

Типовий спектр шуму зображено на Рис. 26.

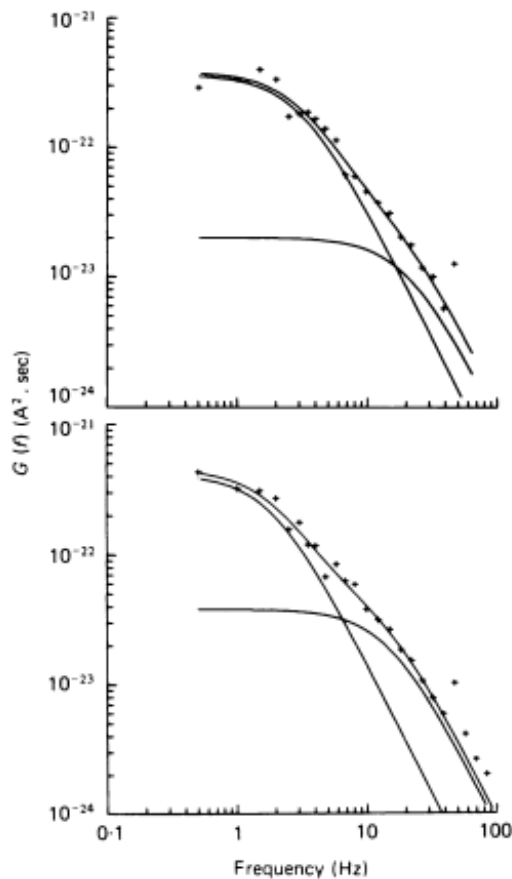


Рис. 26. Спектр шуму, який виникає при аплікуванні 5 мкМ ацетилхоліну. Мембранний потенціал на зображенні згори -50 мВ, знизу -60 мВ (Запозичено з [12]).

В більшості випадків спектр шуму, викликаного аплікацією ацетилхоліну, може бути добре описаний за допомогою моделі одного компонента лоренціану (3).

$$G(f) = \frac{G(0)}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2} \quad (3)$$

Функція $G(f)$ визначає спектральну щільність, де f є частотою, а f_c – частотою половини потужності. Часова стала шуму визначається як:

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_c} \quad (4)$$

Однак, згідно з Н. Р. RANG, спектр шуму, який був отриманий з клітин підщелепного ганглія, не може бути адекватно апроксимований одним компонентом лоренціану. Замість цього, два окремі компоненти лоренціану краще відповідають спостереженим даним [12].

Тому застосовується модель, яка включає дві компоненти-лоренціани в наступній формі:

$$G(f) = \frac{G_1(0)}{1 + \left(\frac{f}{f_{1c}}\right)^2} + \frac{G_2(0)}{1 + \left(\frac{f}{f_{2c}}\right)^2} \quad (5)$$

Дві часові сталі $\tau_1 = \frac{1}{2\pi f_{1c}}$ та $\tau_2 = \frac{1}{2\pi f_{2c}}$. На рис. 18. зображено дві компоненти-лоренціани (дві нижні криві на кожному графіку).

Отже, з даними Н. Р. RANG можна зробити висновок, що в нейронах підщелепного ганглія існують два типи постсинаптичних рецепторів, які мають різні кінетичні властивості.

4.3 Культура нейронів підщелепного ганглія та її властивості

Для дослідження нікотинових ацетилхолінових рецепторів в клітинах підщелепного ганглія, зручно використовувати культуру нейронів підщелепного ганглія, яку можна отримати за методом, що був описаний дослідниками Р. Т. А. Gray та С. J. Magnus.

Культивовані нейрони мають потенціал спокою наближено до -55 мВ (у діапазоні від -40 до -60 мВ). Вхідний опір клітин, що визначався залежно від струму, необхідного для поляризації клітини від -60 до -80 мВ, варіювався від

500 МОм до 3 ГОм. Для клітин підщелепного ганглія дорослих щурів, вхідний опір становить від 40 до 200 МОм [13].

Культивовані нейрони проявляють чутливість до ацетилхоліну: локальна аплікація ацетилхоліну спричиняє внутрішньоклітинний струм. При аплікації 10 мкМ ацетилхоліну, величина струму становить приблизно 74 ± 18 пА, що значно менше, ніж величина струму, що виникає в нейроні підщелепного ганглія дорослого щура при аплікації 5 мкМ ацетилхоліну - 1-2 нА [14].

Спектральний аналіз шуму, спричиненого аплікацією ацетилхоліну, показаний на рисунку 27.

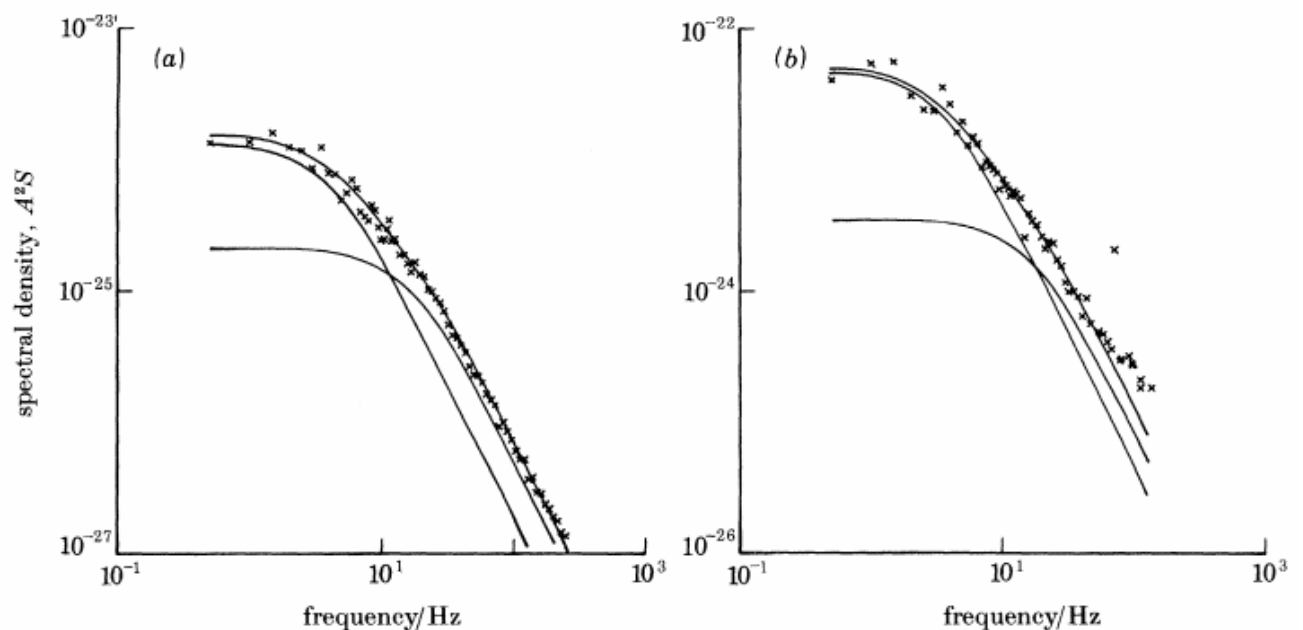


Рис. 27. Зображення спектрів шумів, що викликані аплікацією ацетилхоліну до культивованих нейронів(ліворуч) та нейронів підщелепного ганглія дорослих щурів (праворуч) (Запозичено з [15]).

Спектр шумів, що виникають внаслідок аплікації ацетилхоліну, можна ефективно описати як суму двох компонентів-лоренціан. Спектр культивованих нейронів схожий на спектр нейронів підщелепного ганглія дорослого щура, але останній має значно більшу амплітуду (див. Рис. 27, зверніть увагу на різницю масштабів вісей ординат).

Часові константи для культивованих нейронів становлять приблизно 5.9 ± 1.8 мс ("швидка" константа) та 41.0 ± 12.7 мс ("повільна" константа).

Отже, згідно з Р. Т. А. Gray та С. J. Magnus, характеристики струмів, що викликаються аплікацією ацетилхоліну, подібні в нейронах культури та нейронах підщелепного ганглія дорослого щура. Тим не менш, вхідний опір культивованих нейронів значно більший, що може бути зумовлено змінами властивостей мембрани або наявністю меншої кількості відростків [15].

4.4 Реіннервація нейронів підщелепного ганглія

Автономна іннервація підщелепної та слинних залоз може змінюватися при змінах розмірів паренхіми залоз. Наприклад, при лігації-делігації (перев'язуванні) протоки підщелепної залози вона швидко атрофується, а потім з часом повертається до нормального стану. Цей процес супроводжується реіннервацією залоз і представляє інтерес для дослідження механізмів іннервації [16].

Після лігації протоки підщелепної залози спостерігається зменшення як об'єму клітин ацинусів, так і довжини аксонів, що призводить до втрати зв'язку нервів з клітинами слинних залоз [17]. Протягом 4 тижнів лігації підщелепної протоки спостерігається майже чотирикратне зменшення розміру залози (див. табл. 5).

Табл. 5. Вага залоз та активність холін ацетилтрансферази (CAT) (Запозичено з [16]).

	Unoperated control	Ligated (4 weeks)	Ligated (4 weeks) and deligated (8 weeks)
Gland weight (g)	0.31 ± 0.02	0.08 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.01*
CAT (nm g ⁻¹)	778 ± 28	2332 ± 401	1448 ± 98*
Total CAT (nm)	243 ± 14	176 ± 39	201 ± 8

Також, в структурі залози відбуваються суттєві зміни. Наприклад, змінюється кількість та розподіл секреторних ацинусів (див. Рис. 28).

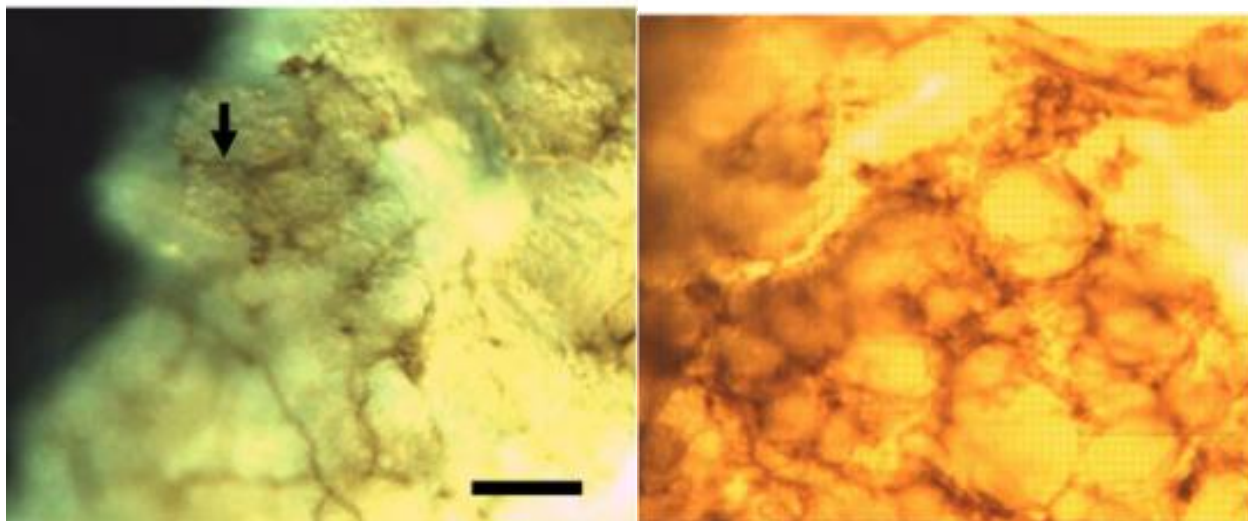


Рис. 28. Здорова і лігована підщелепні залози. Шкала відповідає 30 мкм.

Ліворуч - фарбування холінестераз-специфічним субстратом здорової підщелепної залози. Парасимпатичні нерви зображено стрілочкою (Запозичено з [16]).

Праворуч - залоза після 4-тижневої лігації (Запозичено з [16]).

Як видно із Рис. 29 (праворуч), після лігації практично усі клітини втрачають видільні гранули.

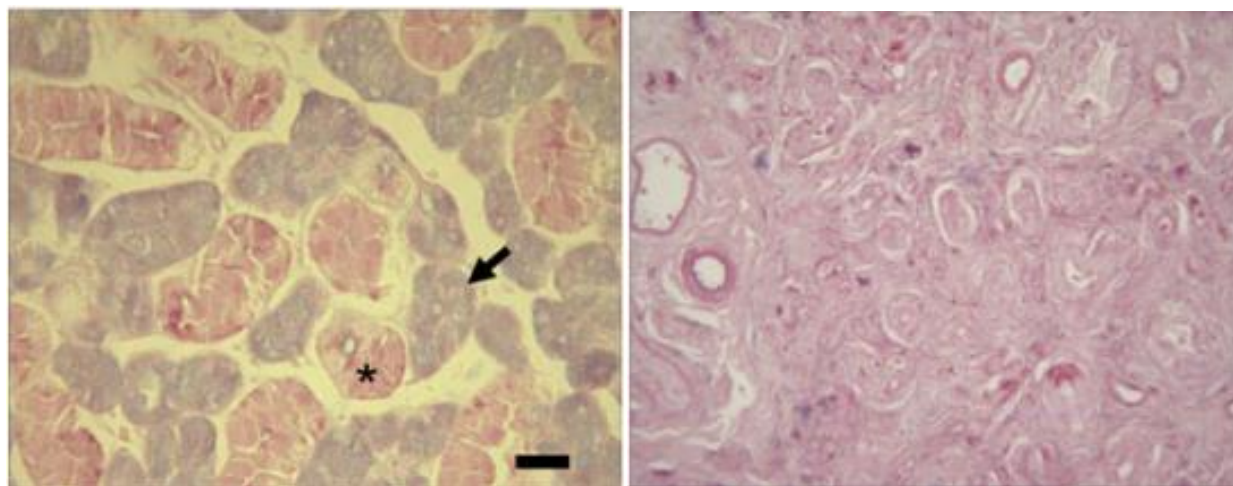


Рис. 29. Здорова та лігована підщелепні залози (продовження). Шкала відповідає 30 мкм.

Ліворуч - клітини в здоровій підщелепній залозі (позначено стрілочкою, сині) та гранулярні протоки (позначено зірочкою, рожеві) (Запозичено з [16]).

Праворуч - клітини та видільні гранули в залозах, що були ліговані протягом 4 тижнів (Запозичено з [16]).

Протягом 4 тижнів після делігації залоза майже повністю відновлюється, що видно на рис. 30. Втім, гранулярні протоки у залозі, що відновилися, є не такими численними, як у здоровій (рис. 30).

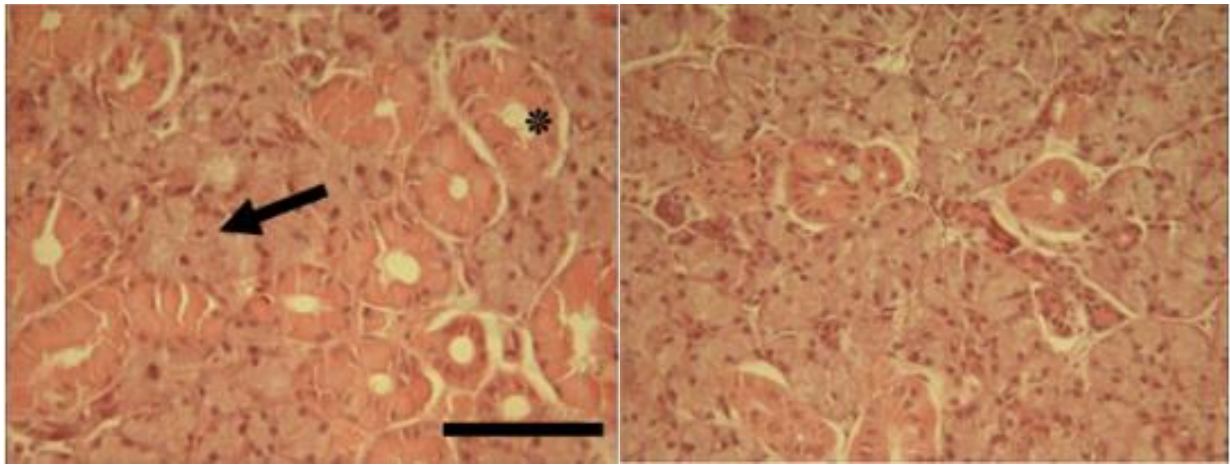


Рис. 30. Здорова та відновлена підщелепні залози. Шкала відповідає 100 мкм.

Ліворуч - гематоксин-еозинове фарбування здорової підщелепної залози. Ацинуси позначено стрілочкою, гранулярні протоки позначено зірочкою (Запозичено з [16]).

Праворуч - відновлена підщелепна залоза (Запозичено з [16]).

У відновленій підщелепній залозі парасимпатичні нерви розташовуються більш щільно, та краще зафарбовані (Рис. 31).

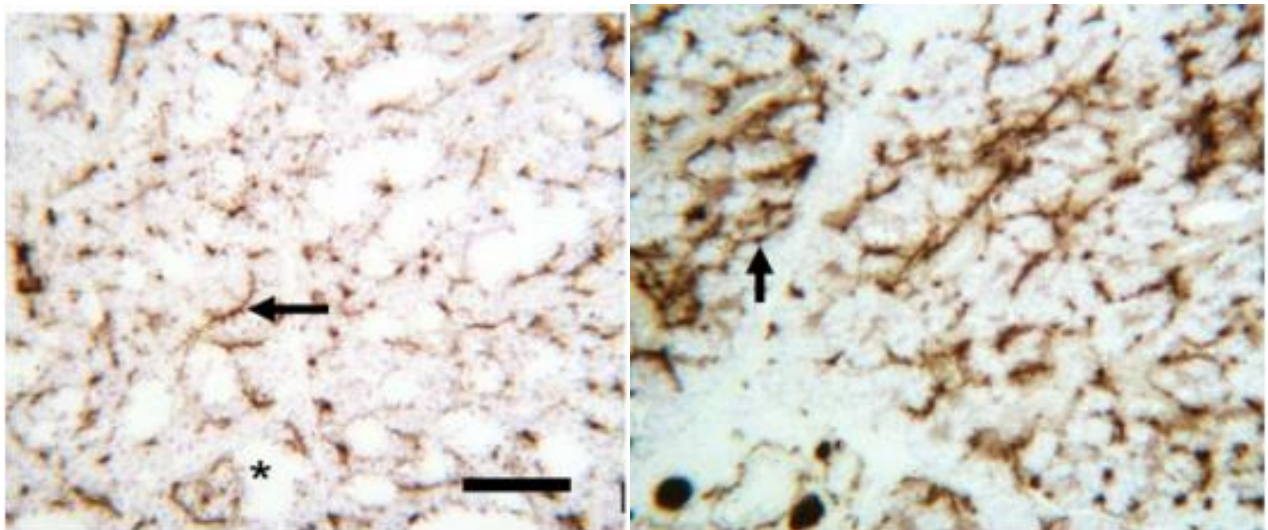


Рис. 31. Порівняння здорової та відновленої підщелепних залоз(продовження). Шкала відповідає 100 мкм.

Ліворуч - холінестеразне фарбування здорової підщелепної залози. Парасимпатичні нерви позначено стрілочкою, світлі зони відповідають гранулярні протоки (позначено зірочкою) (Запозичено з [16]).

Праворуч - холінестеразне фарбування відновленої підщелепної залози(позначення ті самі) (Запозичено з [16]).

Протягом 4-тижневого процесу регенерації підщелепних залоз спостерігається збільшення їх розміру на приблизно 75% в порівнянні з залозами, які були піддані лігації протягом 4 тижнів. Внаслідок цього відновлюється структура протоків та ацинусів. В здорових залозах спостерігається значна кількість парасимпатичних нервів, зокрема навколо ацинусів. Гранулярні протоки трапляються рідко і не мають щільної іннервації. У лігованих залозах іннервація є достатньо щільною (див. Рис. 29, праворуч). У відновлених залозах щільність іннервації залишається такою самою, але ацинуси та секреторні протоки стають більш виразними.

Зміни в щільності іннервації також виявляються під час вимірювань активності холінацетилтрансфери (див. табл. 5). Ліговані залози мають утричі більшу щільність, ніж здорові залози, а відновлені залози - вдвічі більшу. Ймовірно, це відображає різницю в їх розмірах, оскільки загальна кількість холін ацетилтрансфери подібна в усіх станах підщелепної залози [16].

При електричній стимуляції клітин підщелепної залози відсоток клітин, що реагують на стимуляцію, різко зменшується протягом першого тижня лігації, а на другий тиждень різниця стає менш помітною. Це свідчить про з'єднання нервів до ацинусів, що ізолювані від лігової залози.

Табл. 6. Зміна відсотку ацинарних клітин, що приєднані до нервів (Запозичено з [16]).

	Unoperated control	1 week ligated	2 weeks ligated	4 weeks ligated
Percentage of acinar cells connected to nerves ^a	75.4 ± 7.3	43.1 ± 10.3*	64.6 ± 11.3	50.1 ± 6.9
Number of cells ^b	92 (4)	107 (3)	122 (3)	23 (1)

Електрична стимуляція парасимпатичних нервів у здорових та відновлених підщелепних залоз призводить, у середньому, до збільшення слиновиділення на 50% (відносно ваги залози) у відновленій залозі порівняно зі здоровою (див.

Рис. 32.). Ця різниця спостерігається при трьох різних частотах електричної стимуляції.

З іншого боку, метахолінова стимуляція всієї залози призводить до приблизно однакового слиновиділення у здорових та відновлених залозах.

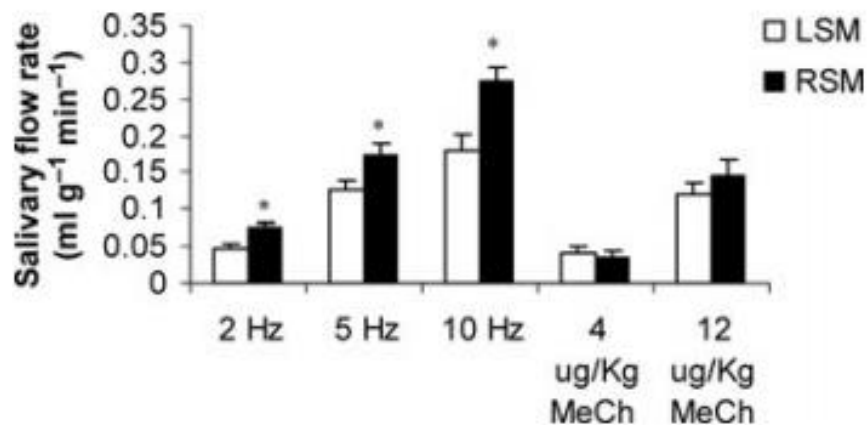


Рис. 32. Вплив електричної стимуляції здорової (LSM) та відновленої (RSM) слинних залоз (Запозичено з [16]).

Отже, згідно з висловлюванням Р. Т. А. Gray та С. J. Magnus, при лігації підщелепної залози з метою підтримки нормального слиновиділення, вегетативні нерви знову іннервують клітини лігованих залоз. Це призводить до можливого збільшення розміру залози після делігації. Крім того, відновлені залози характеризуються збільшеною кількістю парасимпатичних нервів, що приєднані до кожного секреторного ацинуса, що зумовлює зменшення кількості ацинусів [16].

4.5 Висновки до четвертого розділу

Таким чином, було проведено докладний аналіз характеристик нейронів підщелепного ганглія. Виявлено, що амплітуда синаптичних струмів прямо пропорційна гіперполяризації мембрани. Крім того, пікові значення цих струмів зростають зі збільшенням концентрації кальцію в розчині. Синаптичні струми, що викликаються, зменшуються згідно суми двох експонент. Крім звичайних синаптичних сигналів, спостерігаються "мініатюрні" синаптичні струми, які виникають спонтанно, рідко та підлягають експоненційному зменшенню.

Виявлено наявність двох типів постсинаптичних рецепторів у нейронах підщелепного ганглія, які відрізняються за кінетичними властивостями. Також розглянуто особливості культивування нейронів підщелепного ганглія, що мають значну схожість з нейронами підщелепного ганглія дорослих щурів, за винятком вищого входного опору культивованих нейронів.

Також розглянуто процес реіннервації слинних і підщелепних залоз, що відбувається після лігації (перев'язування) протоки підщелепної залози. Було виявлено, що існує механізм реіннервації залоз, який дозволяє їм повністю відновити нормальний розмір та функцію слиновиділення після видалення перев'язки.

РОЗДІЛ 5

Синаптична передача в підщелепному ганглії

5.3 Синаптичні передачі в нейронах підщелепного ганглія дорослих та новонароджених щурів

Особливості іннервації підщелепної та під'язикової залоз у щурів визначаються як характеристиками окремих нейронів підщелепного ганглія, так і особливостями реорганізації їх синаптичних зв'язків. Під час нормального розвитку ссавців в підщелепному ганглії відбувається перебудова синаптичних передач, що призводить до зміни структури синаптичних зв'язків.

На рисунку 33 наведено зображення нейронів підщелепного ганглія щурів різного віку, отриманих за допомогою камери-люциди.

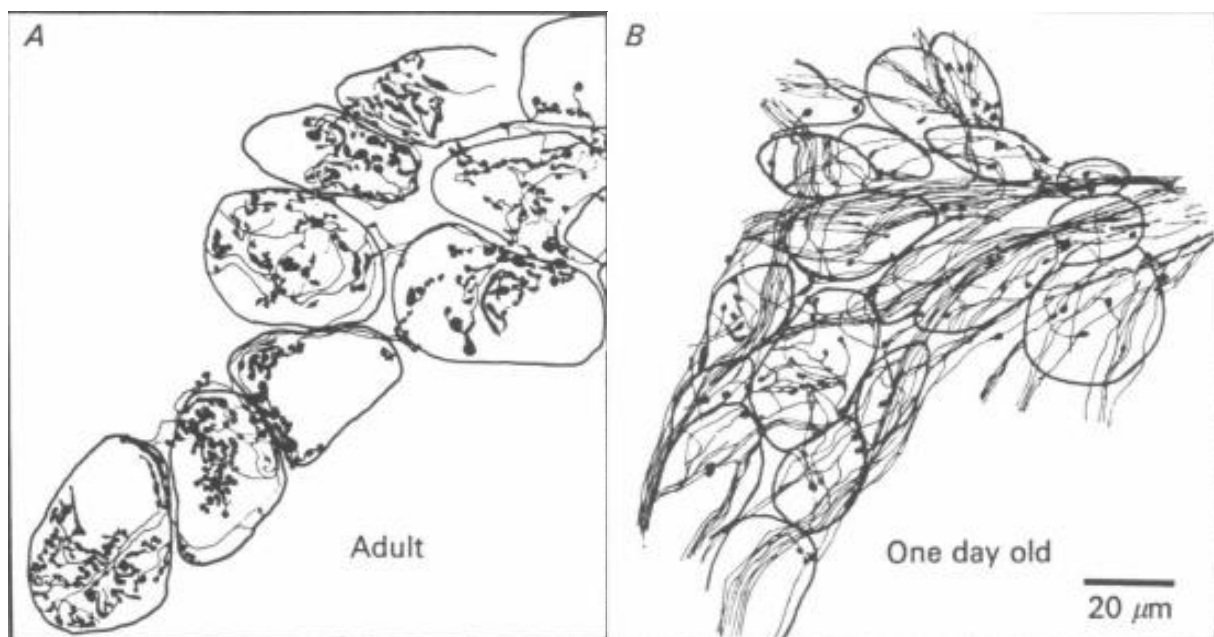


Рис. 33. Зображення нейронів підщелепного ганглія та їх синаптичних терміналей. А – нейрони підщелепного ганглія дорослого щура. В – нейрони підщелепного ганглія новонародженого щура (Запозичено з [7]).

Як видно з рисунку 33, у новонароджених щурів нейронах підщелепного ганглія спостерігається значна кількість нервових волокон, в той час як терміналії аксонів є досить обмеженими (див. Рис. 30). У дорослих щурів нейронах підщелепного ганглія спостерігається значно менше нервових волокон, але

терміналії аксонів присутні у великих кількостях на поверхні більшості нейронів ганглія (див. Рис 34).

Крім того, волокна, що з'єднують терміналії аксонів у нейронах підщелепного ганглія щурів, мають помірну товщину, що ускладнює оцінку кількості волокон, які приєднані до кожного окремого нейрона.

Як вказує JEFF W. LICHTMAN, середня кількість терміналій аксонів на один нейрон коливається від 25 до 80, з середньою величиною 44 (усереднено за 110 нейронами) [7].

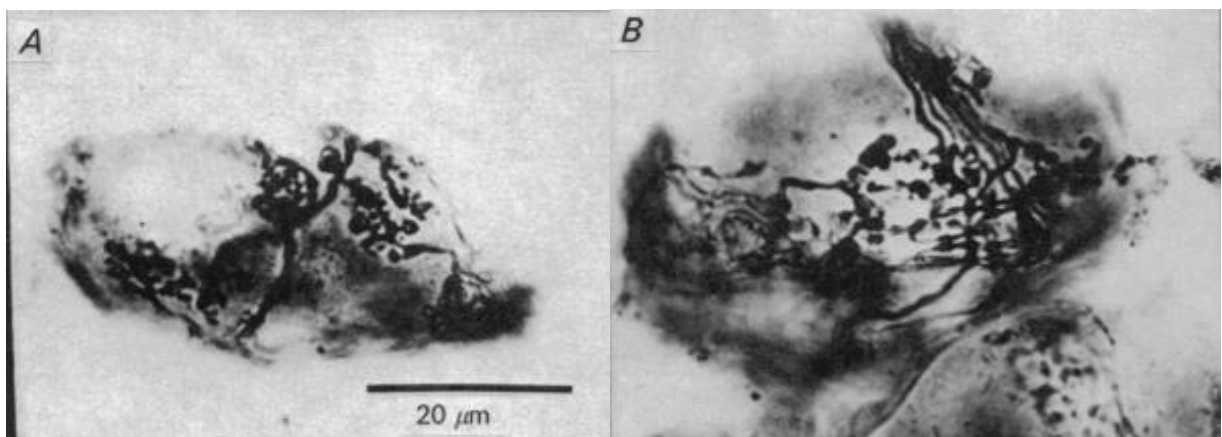


Рис. 34. Зображення синаптичних терміналей аксонів нейронів підщелепного ганглія дорослих щурів (фарбування йодидом цинку) (Запозичено з [7]).

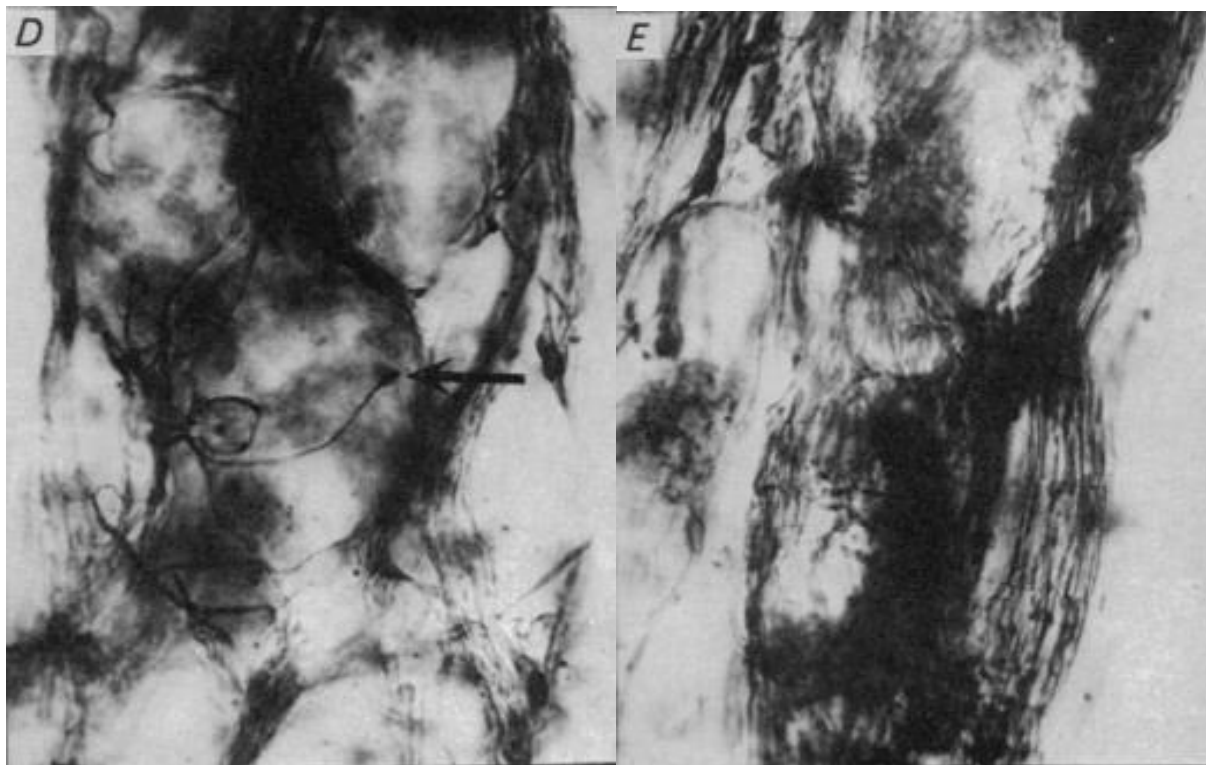


Рис. 35. Зображення синаптичних терміналей аксонів нейронів підщелепного ганглія новонароджених щурів(фарбування йодидом цинку), масштаб той самий, що і на попередньому рисунку (Запозичено з [7]).

На рисунках 34 і 35 наведені електронні фотографії синаптичних профілів нейронів підщелепного ганглія дорослих та новонароджених щурів відповідно. Основною відмінністю між ними є те, що в нейронах дорослих щурів спостерігається більша кількість мітохондрій і везикул.

Зазвичай нейрони підщелепного ганглія характеризуються невеликою кількістю великих дендритів, проте вони мають значну кількість менших відростків, як видно на рисунку 34. У нейронів дорослих щурів спостерігається велика кількість коротких відростків, які розгалужуються від тіла клітини та від основи аксона. Важливо зазначити, що середня довжина аксона становить сотні мікронів і він не має галузей. Зовнішній вигляд нейронів новонароджених щурів якісно не відрізняється, за винятком їх розмірів [7].

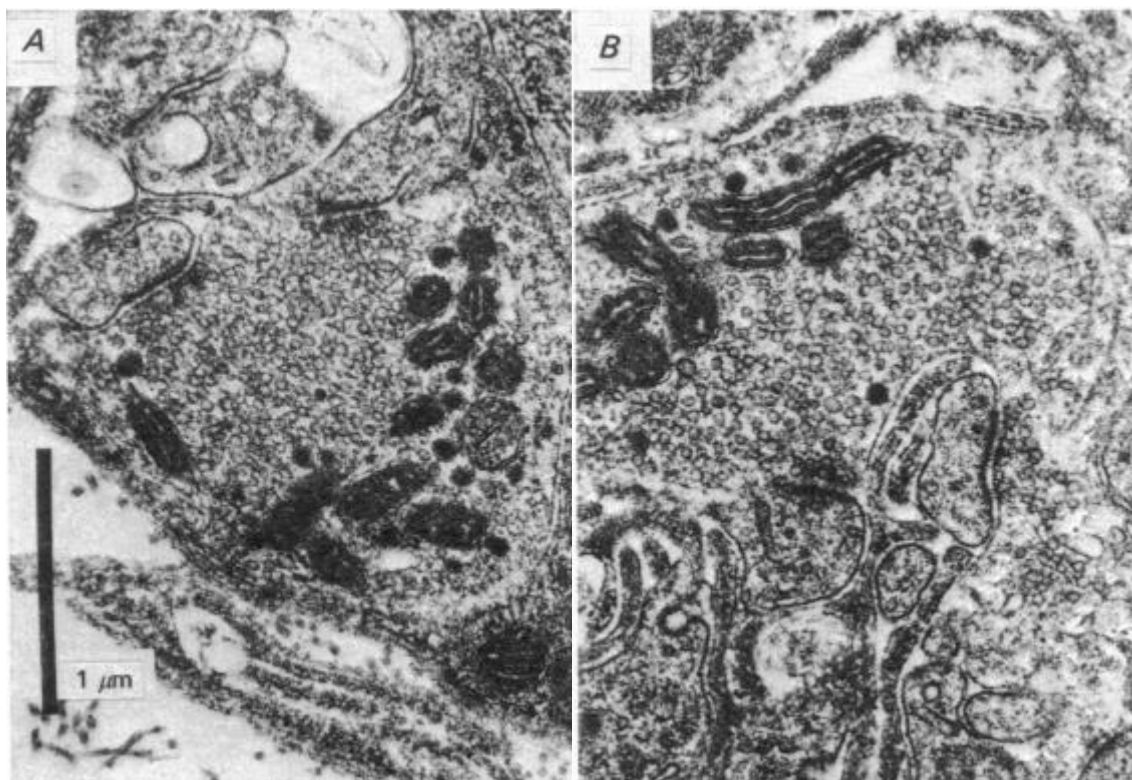


Рис. 36. Зображення синаптичних профілів нейронів підщелепного ганглія дорослих щурів (Запозичено з [7]).

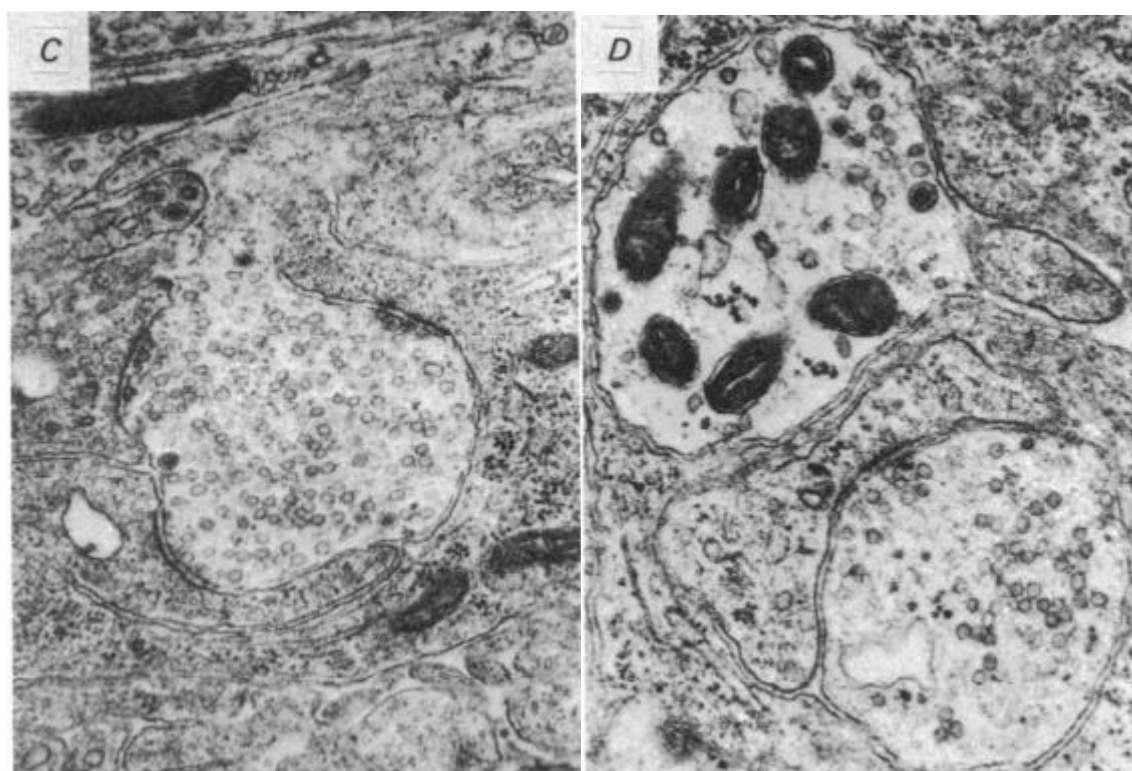


Рис. 37. Зображення синаптичних профілів нейронів підщелепного ганглія новонароджених щурів (Запозичено з [7]).



Рис. 38. Нейрони та їх відростки підщелепного ганглія дорослого (А) та новонародженого (В) щура (Запозичено з [7]).

Більшість електрофізіологічних характеристик нейронів підщелепного ганглія дорослих та новонароджених щурів мало відрізняються, за винятком більшої схильності перших до збудження [7]. Однак, відповідь нейронів підщелепного ганглія новонароджених щурів на прегангліонну стимуляцію значно відрізняється від тієї, що спостерігається у нейронів дорослих щурів (див. Рис. 38).

У нейронів 7-денних щурів відбувається складна викликана пост-синаптична відповідь при поступовому збільшенні сили стимулу. З цим зростанням сили стимулу змінюються форма, амплітуда і тривалість викликаних відповідей. Крім того, кілька послідовних кроків у синаптичній відповіді часто спричиняють потенціал дії (див. рис. 39).

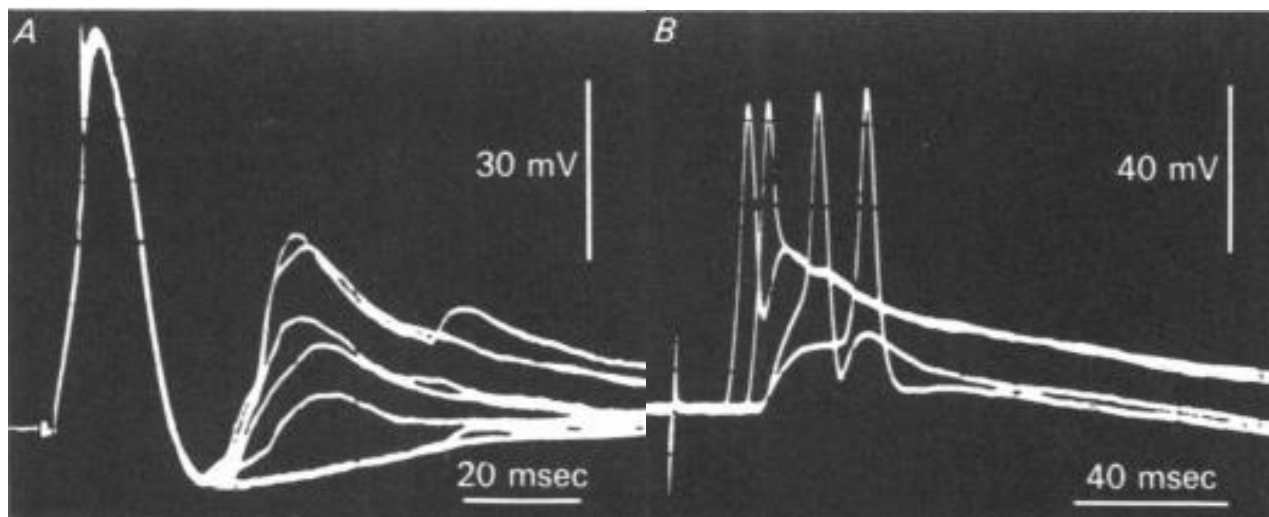


Рис. 39. Записи викликаних пост-синаптичних відповідей нейронів неонатальних щурів.

Ліворуч (А) - викликані пост-синаптичні відповіді, при стимуляції 1-тижневого щура (Запозичено з [7]).

Праворуч (В) - викликані пост-синаптичні відповіді, при стимуляції 2-тижневого щура (Запозичено з [7]).

На рисунку 39 зображено викликану пост-синаптичну відповідь при стимуляції нейрона 1-тижневого щура. Візуально спостерігається поява «сходинок» відповідно до зростання сили стимуляції, при чому на рисунку видно щонайменше 6 таких «сходинок». На рисунку 39, що представляє стимульований нейрон з 2-тижневого щура, спостерігаються 4 пост-синаптичні відповіді на поступово зростаючу стимуляцію.

На рисунку 40 зображено нейрон 3-тижневого щура, в якому спостерігається простіший пост-синаптичний потенціал з наявністю 3 окремих «сходинок», що проявляються по-різному. У тому ж нейроні, дві «сходинки» призводять до появи потенціалів дії.

Згідно з JEFF W. LICHTMAN, середня кількість «сходинок» викликаних пост-синаптичних потенціалів найбільша у нейронів підщелепних гангліїв щурів першого тижня життя ($4,7 \pm 1,1$, варіюється від 3 до 7), і зменшується зі збільшенням віку щурів. Наприклад, протягом 5 тижня життя кількість «сходинок» у викликаних відповідях становить всього $1,3 \pm 0,5$ (варіюється в межах від 1 до 3) [7].

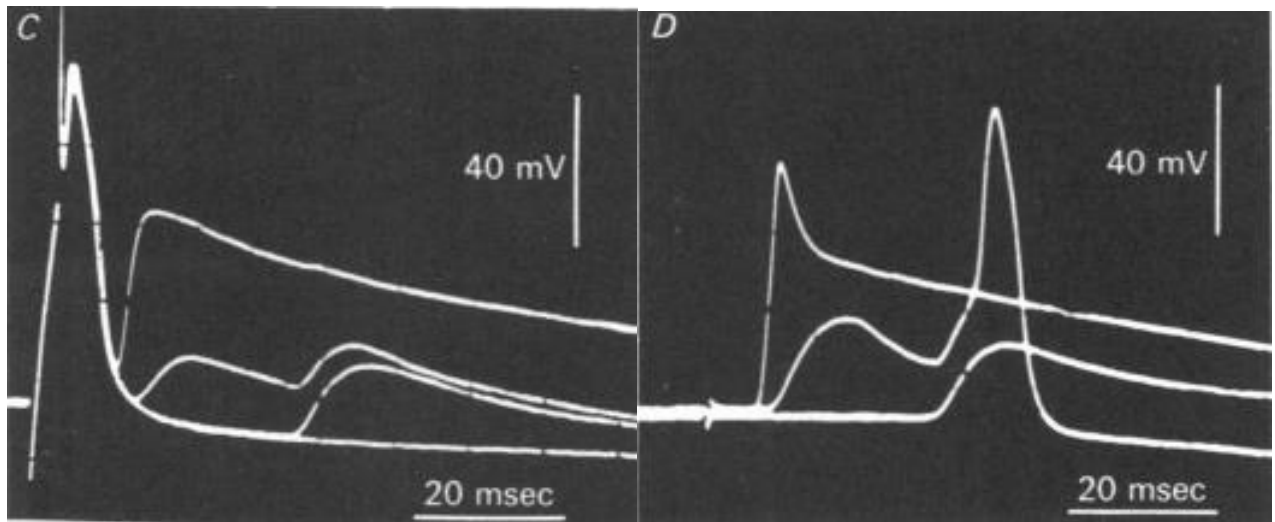


Рис. 40. Викликані пост-синаптичні відповіді нейронів неонатальних щурів (продовження).

Ліворуч (С) - викликані пост-синаптичні відповіді, отримані при стимуляції 3-тижневого щура (Запозичено з [7]).

Праворуч (D) - викликані пост-синаптичні відповіді, отримані при стимуляції 3-тижневого щура (Запозичено з [7]).

Крім того, переважна більшість нейронів підщелепного ганглія дорослих щурів, які проявляють кілька «сходинок» у викликаному пост-синаптичному потенціалі, можуть бути стимульовані лише одним із аксонів, що їх іннервують (див. Рис. 40). Наприклад, у більшості нейронів, поступове зростання стимуляції язикового нерва призводить лише до появи однієї пост-синаптичної відповіді. У деяких нейронів, які іннервуються кількома аксонами, також можуть виникати менші по амплітуді, «другорядні» потенціали. Як показано на Рис. 39 (В). при досить слабкій стимуляції може виникнути «другорядний» потенціал, характеризуючийся низькою амплітудою. Нейрони, які іннервуються більш, ніж одним аксоном, мають схожий розподіл амплітуд викликаних пост-синаптичних потенціалів.

На рисунку 39 (А) представлений розподіл амплітуд пост-синаптичних потенціалів для нейронів, що іннервуються одним аксоном. Майже 95% цих нейронів мають амплітуду, яка перевищує порогове значення. У той же час, лише 7% з «другорядних» потенціалів (див. Рис. 39 (В)) мають амплітуду, що перевищує порогове значення.

Таким чином, як зазначає JEFF W. LICHTMAN, переважна більшість клітин підщелепного ганглія дорослих щурів іннервуються лише одним прегангліонним аксоном, тоді як ті, які іннервуються більш, ніж одним аксоном, проявляють сильну пост-синаптичну відповідь лише на стимуляцію одного іннервуючого аксона, тобто, поведуть себе максимально подібно до одинарно іннервованих [18].

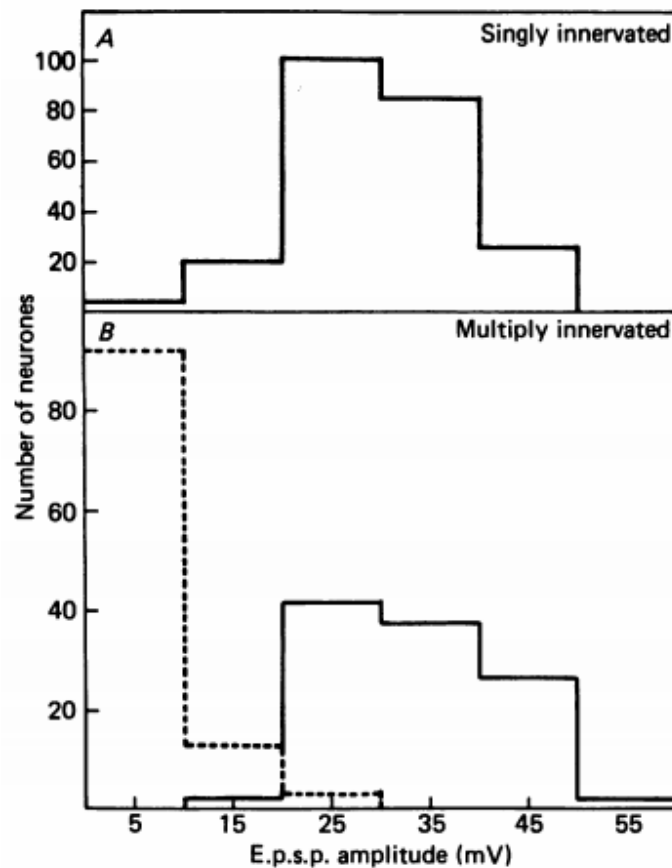


Рис. 41. Гістограми амплітуд викликаних пост-синаптичних потенціалів дії, що виникають у нейронах підщелепного ганглія дорослих щурів (Запозичено з [18]).

На рисунку 41 наведено викликані пост-синаптичні відповіді нейронів дорослих щурів. Зображено пост-синаптичний сигнал на зображенні 30, який був зафіксований під час стимуляції нейрона деполяризуючим струмом, що викликав потенціал дії.

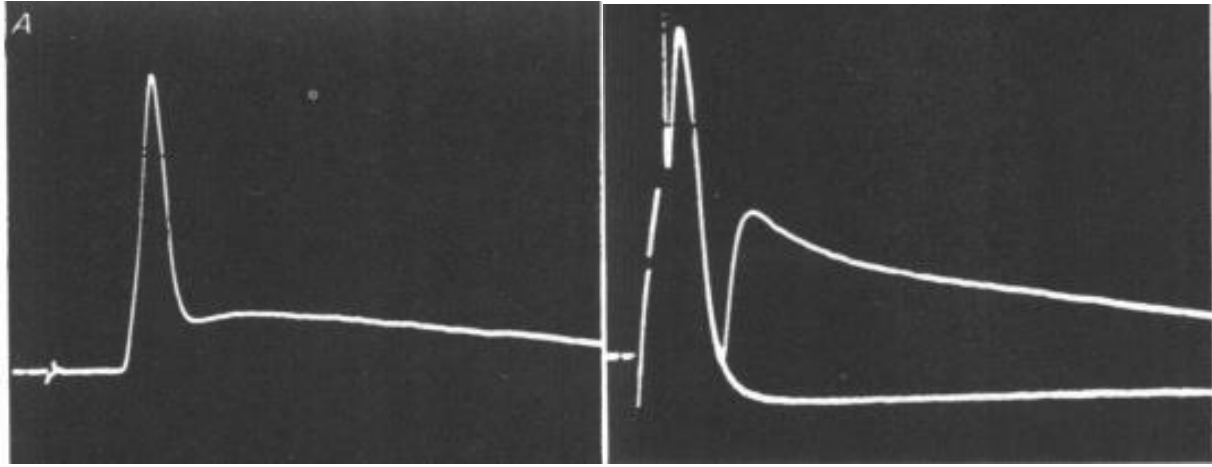


Рис. 42. Зображення викликаних пост-синаптичних відповідей нейронів дорослих щурів.

Ліворуч (А) - викликана пост-синаптична відповідь, отримана при стимуляції язикового нерва дорослого щура (Запозичено з [7]).

Праворуч (В) - викликаний пост-синаптичний сигнал без регенеративної відповіді, отриманий при стимуляції язикового нерва дорослого щура (Запозичено з [7]).

Кілька «сходинок» в синаптичному відклику виникають через наявність кількох аксонів, що іннервують клітини [7].

Гістограму кількості іннервуючих аксонів наведено на рис. 43.

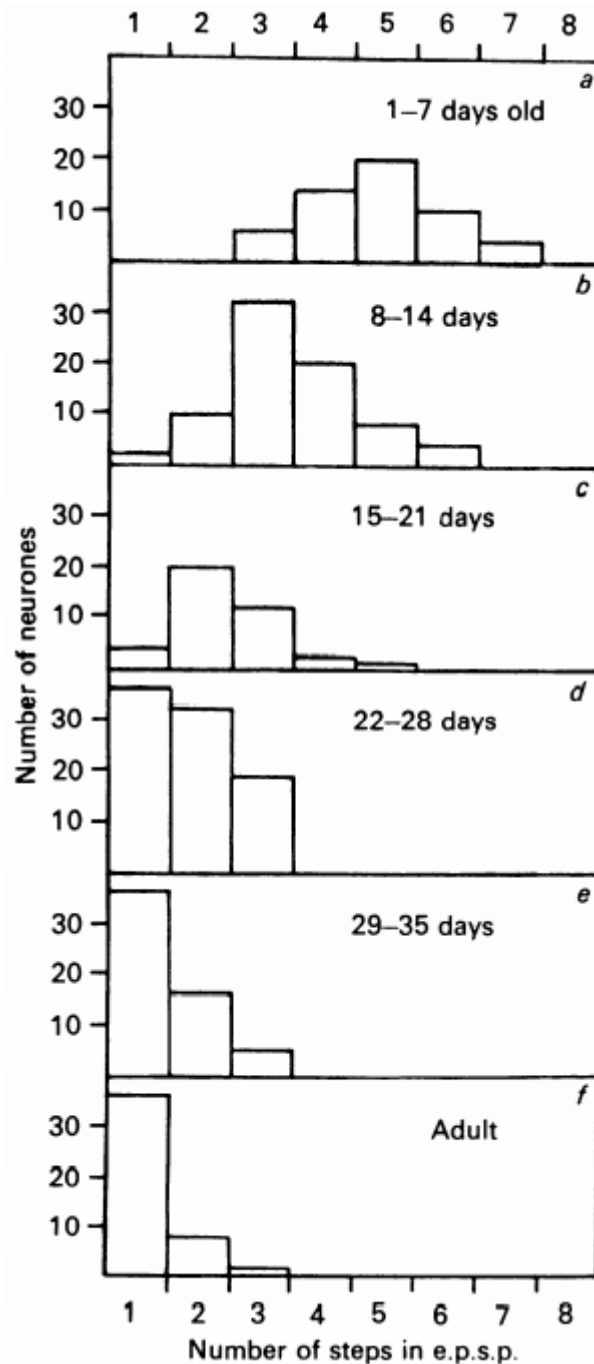


Рис. 43. Кількості іннервуючих аксонів, розраховані з кількості «сходинок» в пост-синаптичній відповіді нейронів (Запозичено з [7]).

Як видно з рисунку 43, кількість аксонів іннервуючих нейронів поступово зменшується зі збільшенням віку щурів. На рисунку 44 показано гістограму кількості синапсів на одиницю площі клітин. Видно, що кількість синапсів значно зростає від перших днів життя щура до 2-3 тижнів, а потім мало змінюється. Крім того, різниця в кількості синапсів стає ще більшою, якщо врахувати різницю в площах клітин підщелепного ганглія щурів різного віку, як вказано в таблиці 1.

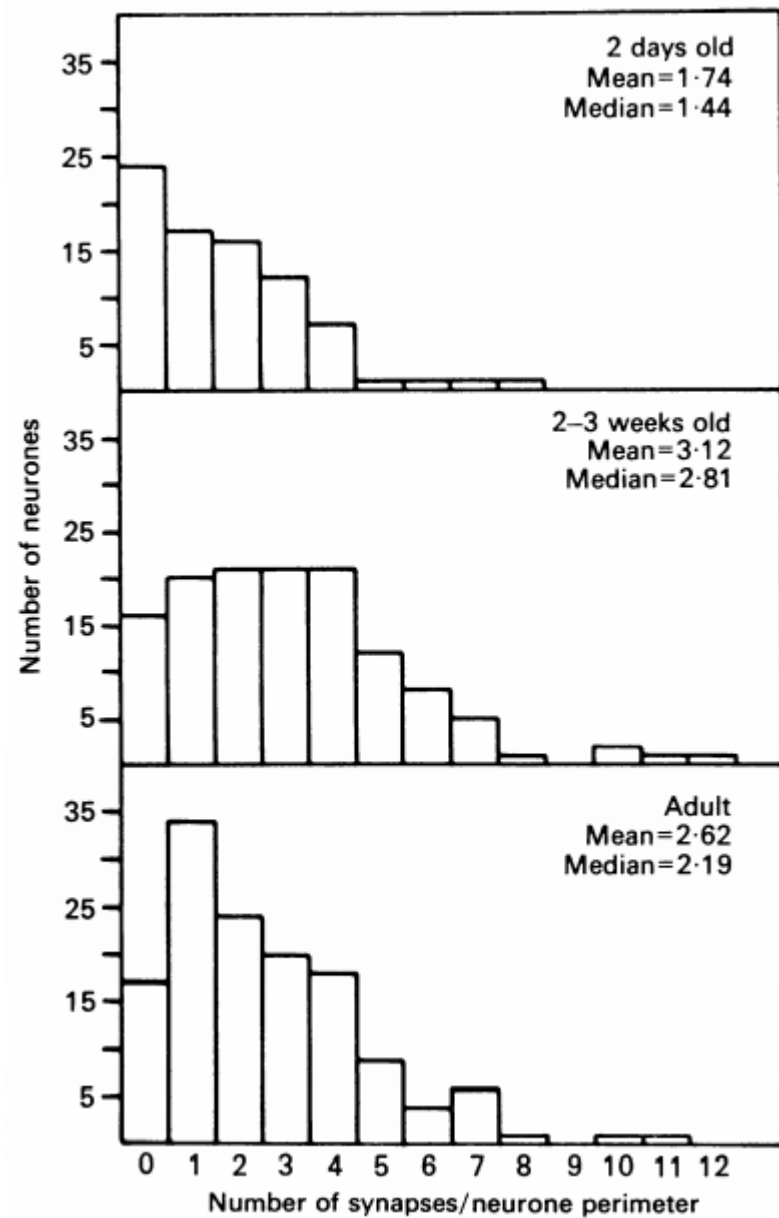


Рис. 44. Гістограми кількості синапсів на одиницю площі нейронів (Запозичено з [7]).

Клітини ганглія природньо розділені на кластери, причому різні нейрони в одному кластері можуть іннервуватися різними прегангліонними аксонами, як показано на рис. 45.

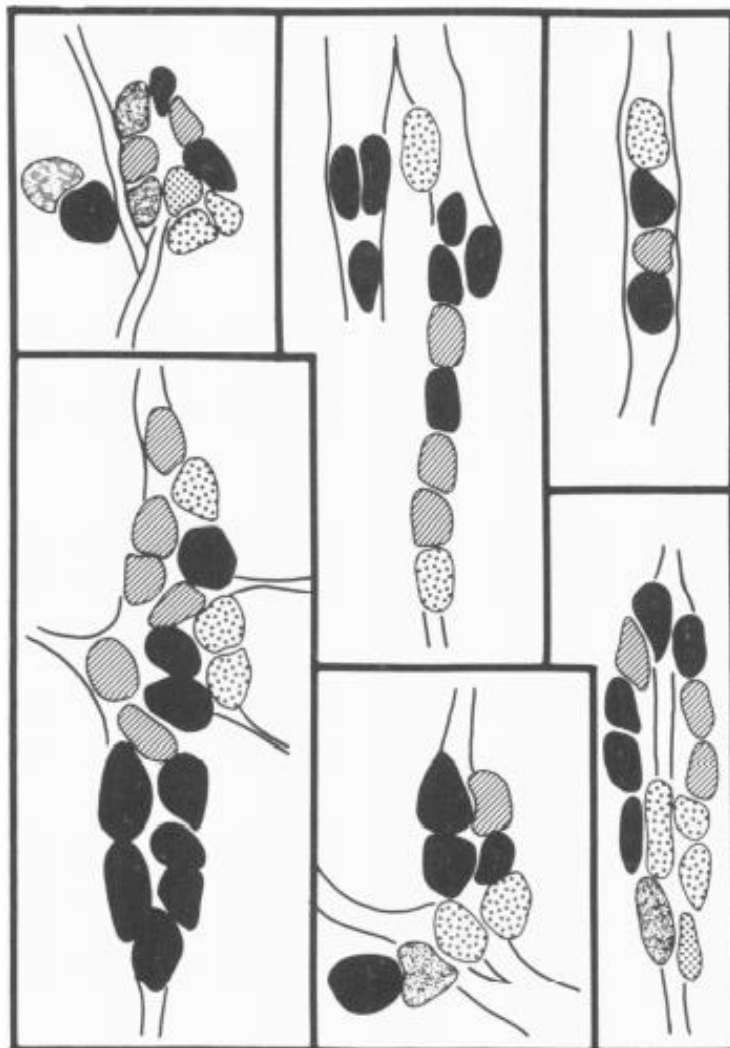


Рис. 45. Схеми іннервації кластерів нейронів підщелепного ганглія. Нейрони, що іннервовані одним прегангліонними аксоном, ретушовані однаково. Зображення отримане за допомогою камери-люциди (Запозичено з [18]).

Кластери нейронів підщелепного ганглія в середньому складаються з 10 нейронів (від 2 до 18), які іннервуються 4-5 різними прегангліонними аксонами (від 4 до 5). Кожен прегангліонний аксон іннервує 2-3 нейрони ганглію (від 1 до 10). У розміщенні клітин кластерів підщелепного ганглія не спостерігається жодної просторової закономірності, і близько 20% нейронів не мають контакту з жодною іншою клітиною, що іннервується тим самим прегангліонним аксоном [18].

5.2 Синаптична передача після реіннервації підщелепного ганглія

Механізм «одинарної» іннервації нейронів підщелепного ганглія залишається працездатним у дорослому віці. Згідно з JEFF W. LICHTMAN, при ушкодженні нерва *chorda tympani*, який іннервує підщелепну та під'язикову залози, відбувається процес реіннервації, причому зберігається та ж "одинарна" схема. Послідовність реіннерваційного процесу показана на рисунку 36. Клітини з повноцінною іннервацією (амплітуда пост-синаптичних потенціалів вища за порогову) позначені пунктиром.

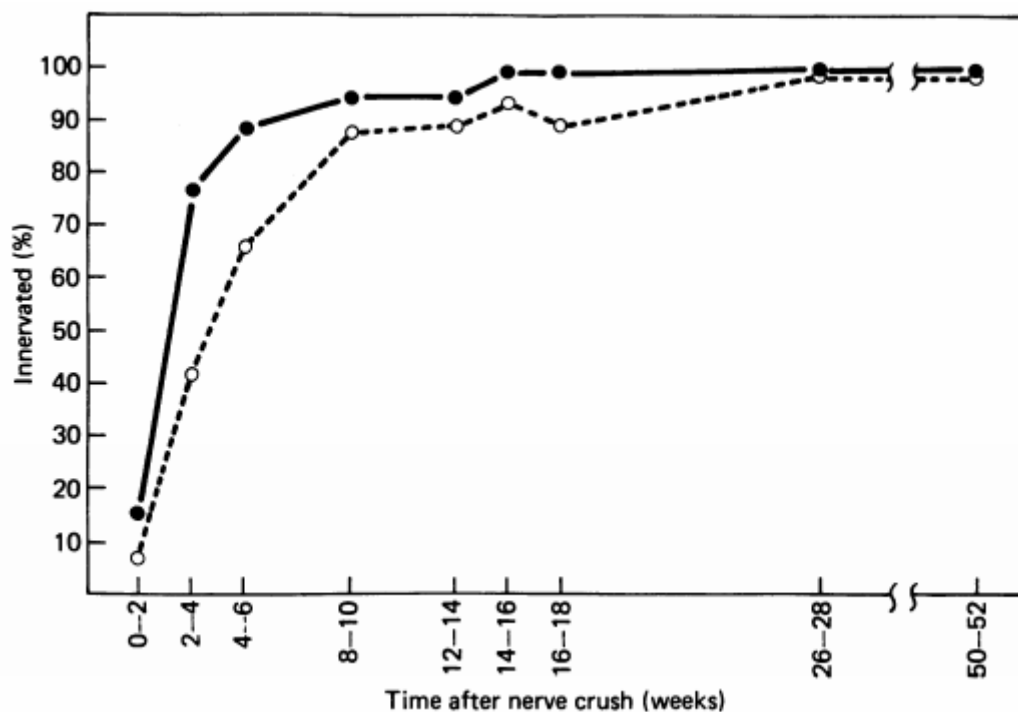


Рис. 46. Візуалізація процесу реіннервації підщелепного ганглія дорослого щура (Запозичено з [18]).

У процесі реіннервації спостерігається одночасне відновлення іннервації та "елімінація синапсів". Як ілюструється на рисунку 46, на ранніх етапах реіннервації значна кількість нейронів має багатократну іннервацію, вказану числом "сходинок" у їх викликаних пост-синаптичних потенціалах. Проте, на 16-18 тижнів відновлення понад 80% нейронів підщелепного ганглія мають одинарну іннервацію. Більше того, зі зростанням процесу реіннервації

співвідношення між нейронами з одинарною та багатократною іннервацією поступово збільшується.

Зважаючи на загальне зростання кількості повноцінно іннервованих нейронів, можна припустити, що під час процесу реіннервації нейронів підщелепного ганглія утворюється більше синаптичних з'єднань, ніж знищується під час "елімінації" [18].

Згідно з дослідниками D. Purves та J. W. Lichtman, після реіннервації синаптичні з'єднання розташовуються інакше, ніж до деіннервації. Синаптичні з'єднання до та після реіннервації показані на рисунку 47.

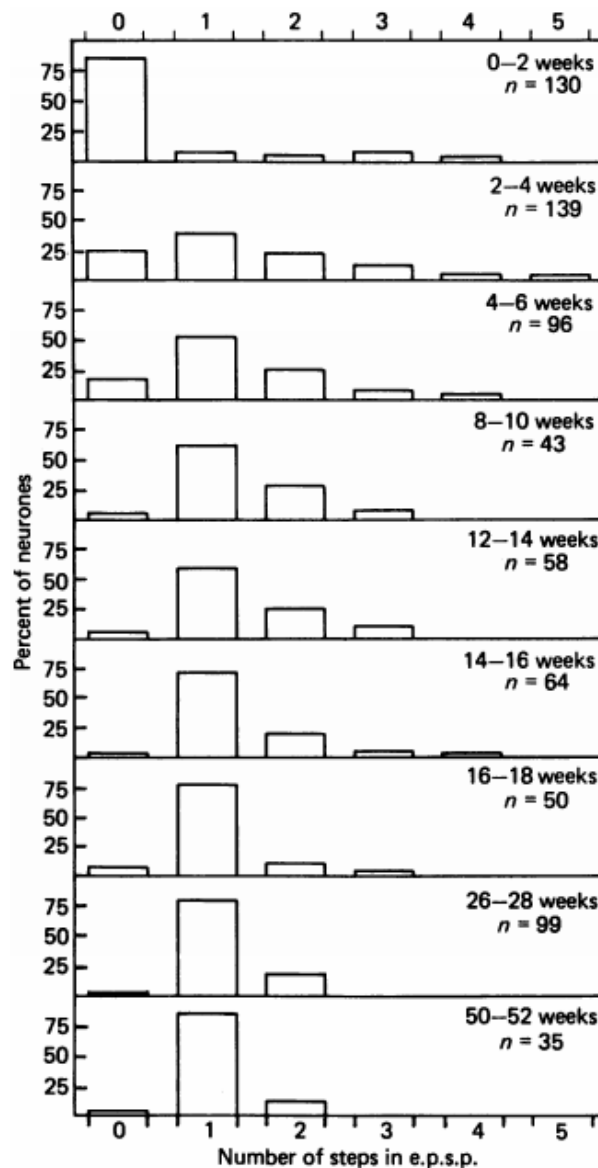


Рис. 47. Гістограми кількостей прегангліонних аксонів, що іннервують нейрони в процесі реіннервації підщелепного ганглія дорослого щура (Запозичено з [18]).

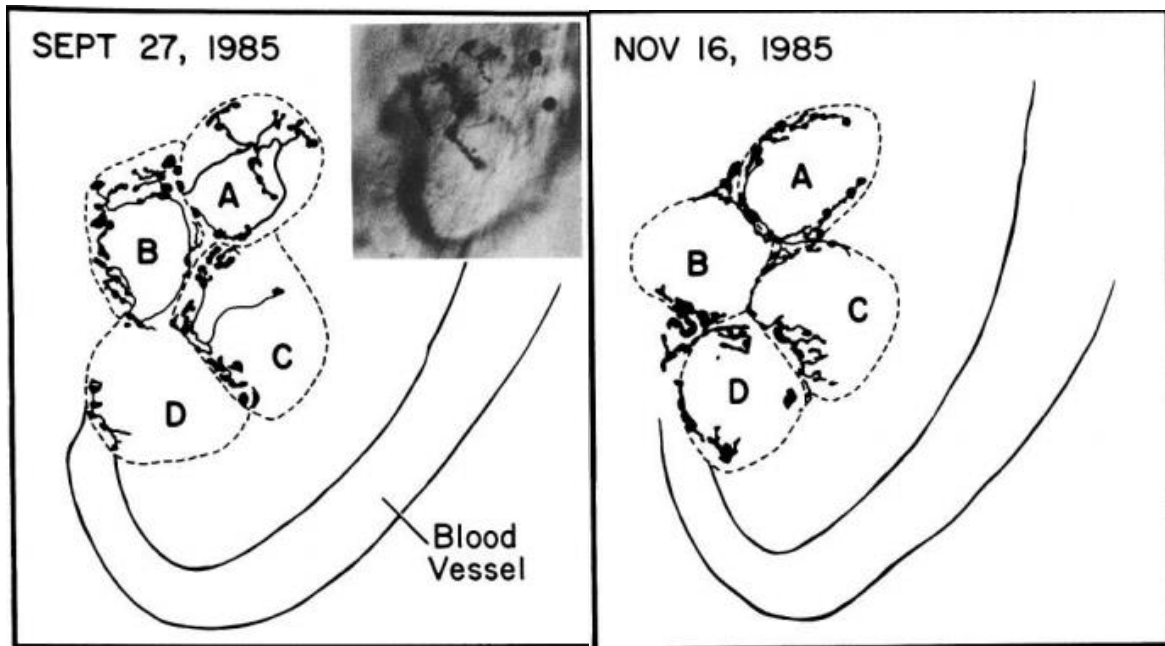


Рис. 48. Зміна розташування синаптичних з'єднань до (зліва) та після (справа) реіннервації, зображення отримано за допомогою камери-люциди.

Ліворуч - зображення розташування синаптичних з'єднань в кластері нейронів підщелепного ганглія після пошкодження chordatympani, вентральна сторона (Запозичено з [19]).

Праворуч - зображення розташування синаптичних з'єднань в кластері нейронів підщелепного ганглія після реіннервації, вентральна сторона (Запозичено з [19]).

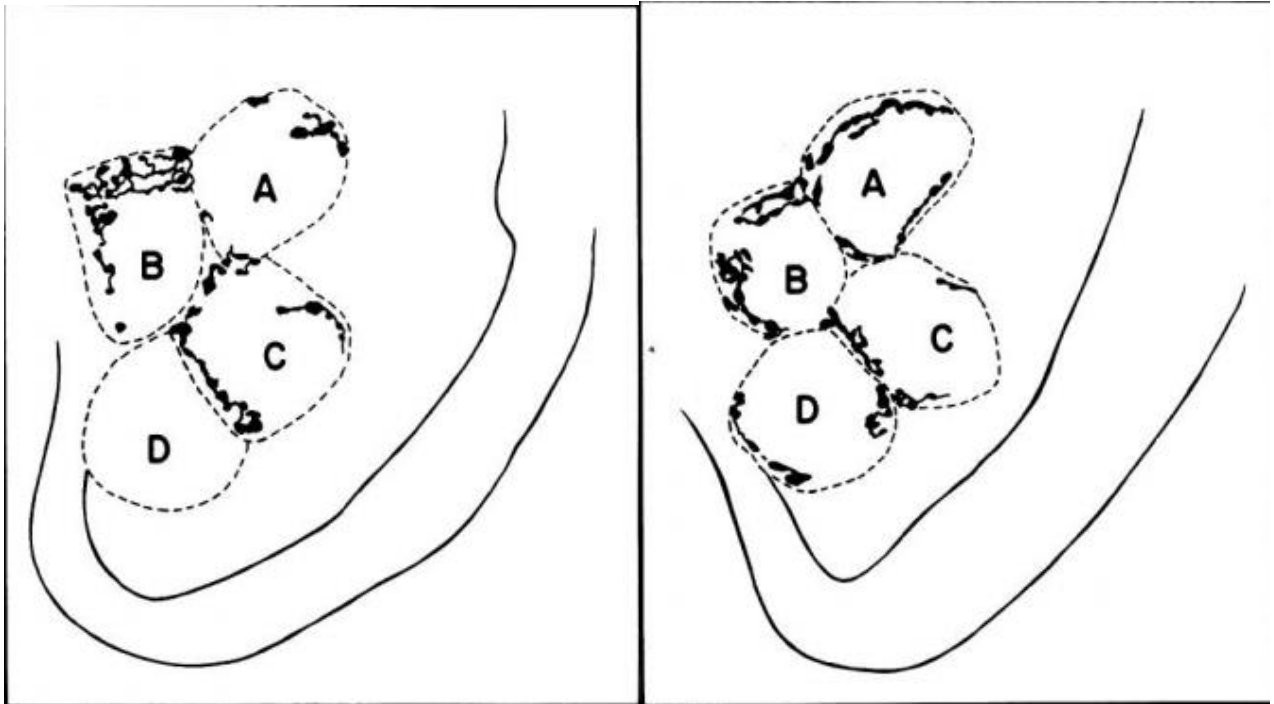


Рис. 49. Розташування синаптичних з'єднань до та після реіннервації, зображення отримано за допомогою камери-люциди (продовження).

Ліворуч - розташування синаптичних з'єднань в кластері нейронів підщелепного ганглія після пошкодження *chordatympani*, дорзальна сторона (Запозичено з [19]).

Праворуч - розташування синаптичних з'єднань в кластері нейронів підщелепного ганглія після реіннервації, дорзальна сторона (Запозичено з [19]).

Розподіл синаптичних з'єднань між нейронами виявляє чітку відмінність до та після реіннервації, що можна спостерігати на рисунку 40. Незважаючи на те, що після реіннервації синаптичні з'єднання часто знаходяться в тих самих областях клітини, де вони були до пошкодження нерва, їх конфігурація суттєво відрізняється. Таким чином, синаптичні з'єднання на нейронах підщелепного ганглія не є стійкими, а утворюються заново під час реіннервації [19].

Нейрони підщелепного ганглія здійснюють іннервацію двох взаємопов'язаних залоз - під'язикової та підщелепної, і розподілені у ганглії відповідно до залози, яку вони іннервують, як показано на рисунку 50.

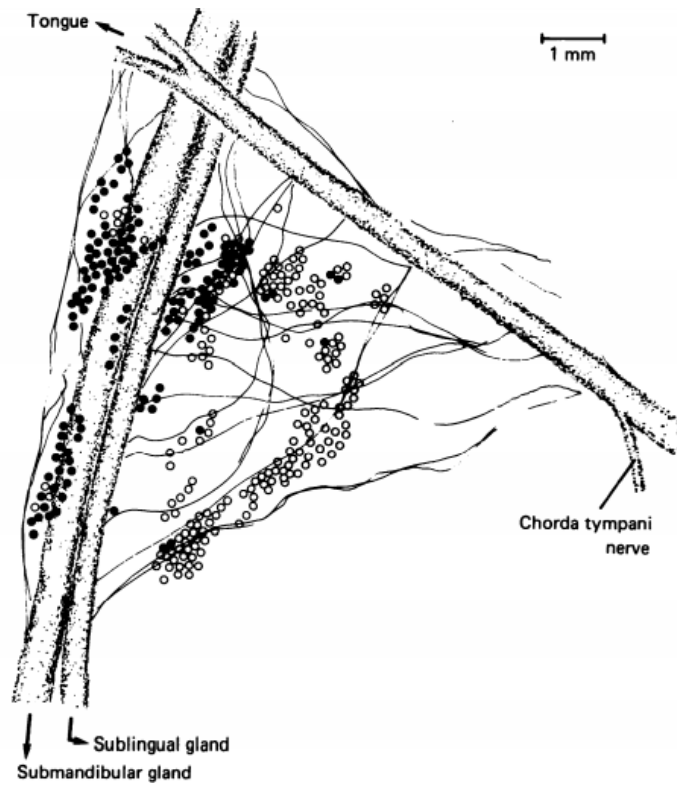


Рис. 50. Схематичний розподіл клітин підщелепного ганглія, що іннервують різні залози. Нейрони, що іннервують підщелепну залозу, позначені чорними кружечками, а ті, що іннервують під'язикову – порожніми (Запозичено з [20]).

Тому, нейрони, які іннервують підщелепну залозу, переважно розташовані вздовж слинних протоків, тоді як ті, що іннервують під'язикову залозу, знаходяться в тонкому шарі сполучної тканини між протоками та нервом chorda tympani [20].

5.3 Внутрішні синаптичні з'єднання

У підщелепному ганглії зазвичай не спостерігаються "проміжні" нейрони, які з'єднують кілька нейронів ганглія. Проте, внутрішні синаптичні з'єднання між нейронами існують в підщелепному ганглії. Навіть після пошкодження нерва chorda tympani, стимуляція постгангліонної зони може призводити до

викликаних пост-синаптичних потенціалів у багатьох нейронах підщелепного ганглія, як показано на рисунку 51.

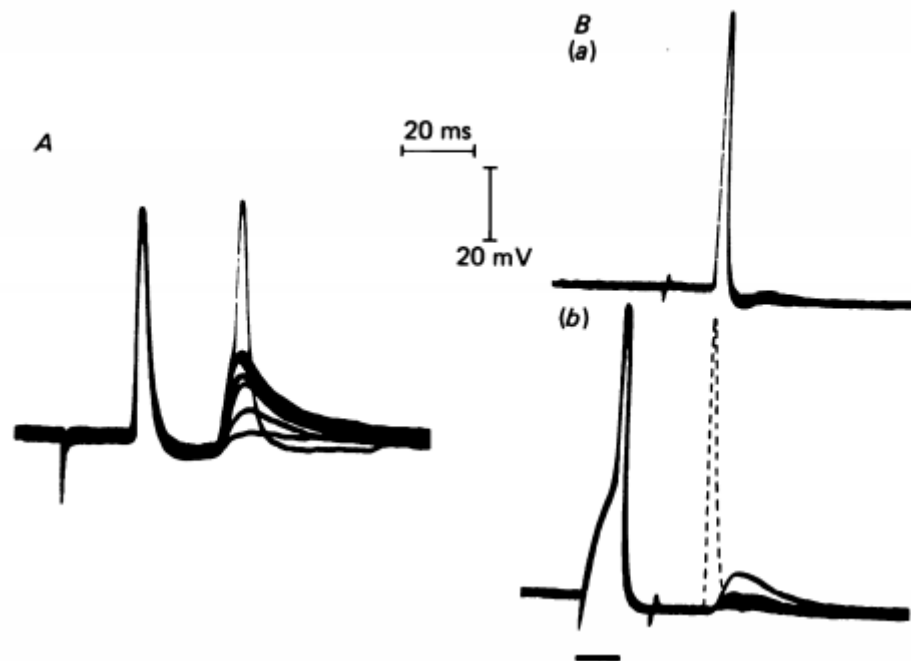


Рис. 51. Записи синаптичних відповідей на пост-гангліонну стимуляцію нейронів підщелепного ганглія (після пошкодження chordatympani) (Запозичено з [20]).

На рисунку 51 (A) представлена постсинаптична відповідь на антидромічну стимуляцію, що означає стимулювання постгангліонного аксона. Видно, що ця відповідь має значну амплітуду (перший пік - стимул), причому її амплітуда не залежить від сили стимулу і час від часу досягає амплітуди самого стимулу. На рисунку 51 (B) показані викликані постсинаптичні потенціали, що виникають після гіперполяризації стимулюючого сигналу (зверху), а також пригнічення викликаного постсинаптичного потенціалу при проходженні зворотно спрямованих струмів (перший пік) через записуючий електрод (знизу, пунктиром позначено типове положення антидромічних потенціалів).

Дослідники KAZUYOSHI KAWA та STEPHEN ROPER вказують, що амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів, що виникають у відповідь на антидромічну стимуляцію, зменшуються при стимуляції частотою понад 10 Гц ([2]). Тому можна зробити висновок, що внутрішні синаптичні передачі мають хімічну природу.

5.4 Висновки до п'ятого розділу

Отже, структура нейронів підщелепного ганглія передбачає їх розділення на дві групи: перша група іннервує підщелепну залозу, а друга група іннервує під'язикову залозу. Ці два типи нейронів фізично розташовані окремо в ганглії. Нейрони, що іннервують підщелепну залозу, розташовані вздовж слинних проток, тоді як нейрони, що іннервують під'язикову залозу, розташовані в тонкому шарі сполучної тканини між слинними протоками та *chorda tympani*. Крім того, у дорослих щурів кожен нейрон підщелепного ганглія, як правило, іннервується одним прегангліонним аксоном, а ті, які іннервуються кількома аксонами, проявляють сильну відповідь тільки на один аксон. В новонароджених щурів кожен нейрон підщелепного ганглія іннервується кількома прегангліонними аксонами, існує механізм "елімінації" синапсів. Цей механізм може бути активований у дорослому віці, наприклад, після пошкодження нерва *chorda tympani*, коли відбувається реіннервація нейронів підщелепного ганглія, в результаті чого відновлюється схема "одинарної" іннервації. Крім того, в підщелепному ганглії присутні внутрішні синаптичні з'єднання між нейронами ганглія, які мають хімічну природу.

РОЗДІЛ 6

Рецептори нейронів підщелепного ганглія

6.1 Нікотинові рецептори нейронів підщелепного ганглія

Нікотинові ацетилхолінові рецептори, які активуються як ацетилхолін, так і ніотином, широко поширені в нервовій системі ссавців, зокрема в підщелепному ганглії. Особливості нікотинових рецепторів підщелепного ганглія виявляються в двох чітко виражених компонентах синаптичних відповідей на аплікацію агоністів. Спектр струмового "шуму", спостережуваний при аплікації агоністів, може бути добре описаний двома лоренціанськими компонентами (див. формулу 5). Вплив різних нікотинових агоністів на ці два компоненти можна оцінити за допомогою співвідношення дисперсії струму одного з компонентів до загальної дисперсії.

$$f_{var} = \frac{\sigma(I_1)^2}{\sigma(I_1)^2 + \sigma(I_2)^2} \quad (6)$$

У формулі (6) $\sigma(I)^2$ є дисперсією однієї з компонент. За низьких концентрацій молекул агоністів, дисперсія струму є прямо пропорційною середньому струму [9].

Тоді, формула (6) набуває виду:

$$f_{var} = \frac{I_1}{I_1 + (i_2/i_1)I_2} \quad (7)$$

Де i це струм, що протікає через один канал.

Спектри синаптичних шумів після аплікації різних агоністів зображені на рис.52.

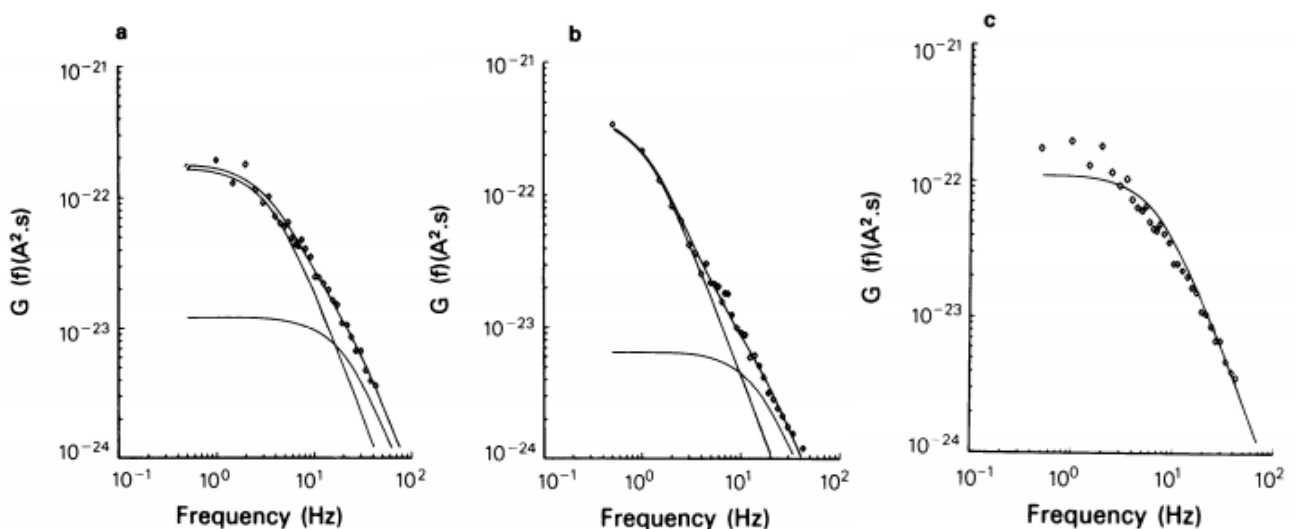


Рис. 52. Спектри шумів при аплікації різних нікотинових агоністів (Запозичено з [14]).

На рисунку 52 представлені спектри шумів після застосування 50 мкМ карбахоліну (А та С) і 5 мкМ суберилдихоліну. На графіках А та С спостерігається однаковий спектр, який можна апроксимувати двома та однією компонентою-лоренціаном відповідно.

У таблиці Т1 представлені числові значення характеристик спектрів шумів. CCh відноситься до карбахоліну, DMPP - до диметил-4-фенолпіперазиніуму, SubCh - до суберилдихоліну, ACh - до ацетилхоліну, а Nic - до нікотину. Виявляються різниці у часових компонентах шумів і відносній дисперсії. Параметр γ - електропровідність, обчислюється за допомогою наступної формули:

$$\gamma = \frac{\pi(G_1(0)f_{1c} + G_2(0)f_{2c})}{2I(V - V_{eq})} \quad (8)$$

У рівнянні (5), позначення ідентичні, а V_{eq} позначає рівноважний потенціал. Зазначене рівняння припускає, що обидва типи каналів мають однакову провідність.

Ця величина змінюється, але не спостерігається чіткої залежності від агоністів, як це відображено у таблиці 7. З цих результатів можна зробити висновок, що провідність "швидких" та "повільних" каналів схожа між собою.

Табл. 7. Зміна характеристик спектрів шумів при аплікації різних агоністів (Запозичено з [14]).

Agonist	f_{var}	$\tau_2(ms)$	$\tau_1(ms)$	$\gamma(pS)$	n
CCh	0.34* (± 0.02)	42.4 (± 2.9)	6.2 (± 0.5)	18.6 (± 1.1)	37
DMPP	0.24 (± 0.02)	51.0 (± 3.6)	6.9 (± 0.6)	19.7 (± 1.2)	21
SubCh	0.20 (± 0.02)	85.6 (± 5.1)	7.6 (± 0.5)	17.3 (± 1.2)	12
ACh	0.21 (± 0.03)	79.2 (± 9.4)	6.5 (± 1.3)	19.7 (± 2.2)	11
Nic	0.23 (± 0.03)	56.0 (± 6.7)	6.2 (± 0.6)	21.4 (± 2.4)	12

При цьому, часові компоненти не залежать від концентрації агоніста [14].

Згідно з дослідженням, проведеним у попередньому розділі, часові компоненти залежать від мембранного потенціалу, але ця залежність не змінюється при зміні агоніста.

Дослідники P.T.A. Gray та H.P. Rang вказують, що залежність відносної дисперсії струму від речовини-агоніста дозволяє зробити висновок про різну ймовірність відкриття двох типів каналів, залежно від наявності різних речовин-агоністів (при однакових концентраціях). Ця залежність відбивається у значеннях часових констант (див. Табл. 7). Крім того, нікотинові агоністи проявляють селективність щодо впливу на "швидкі" та "повільні" канали, хоча цей вплив вважається незначним.

6.2 Внутрішні синаптичні з'єднання

У підщелепному ганглії, крім звичайних прегангліонних синаптичних з'єднань, спостерігаються також "внутрішні" синаптичні з'єднання, які формуються прямо між сомами клітин. Ці синапси можуть бути класифіковані на два типи: хімічні та електричні. Синаптичні відповіді, що виникають з цих двох типів синапсів, показані на рисунку 53.

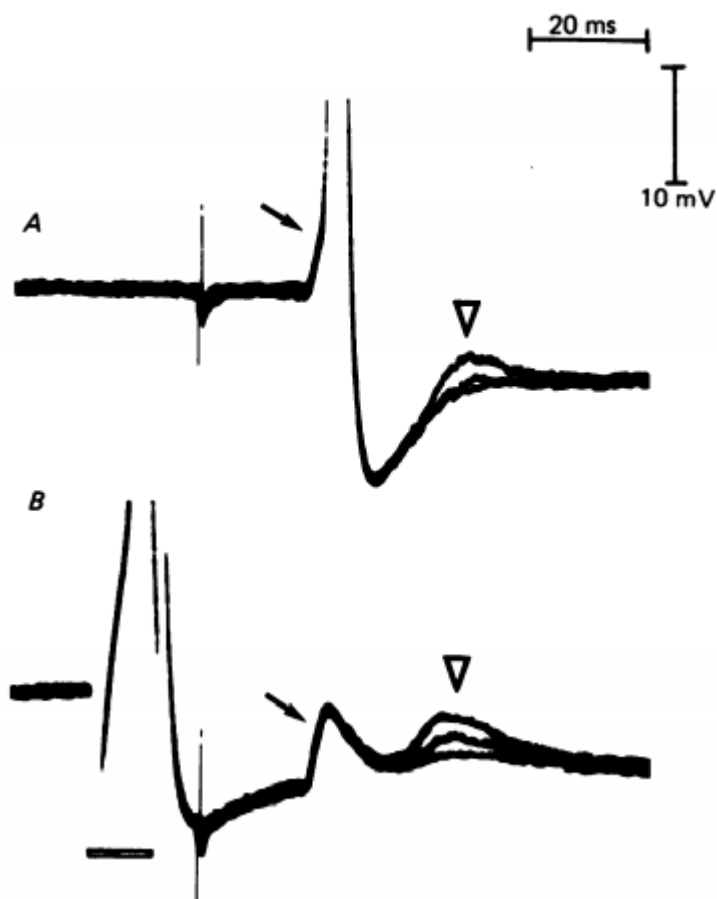


Рис. 53. Синаптичні відповіді від двох типів внутрішніх синаптичних з'єднань в підщелепному ганглії (Запозичено з [20]).

На рисунку 53 (А) зображено синаптичну відповідь на антидромну стимуляцію, де спостерігаються деполяризуючі потенціали (позначені стрілочкою), за якими слідує потенціал дії, а потім викликані постсинаптичні потенціали (позначені трикутником). На рисунку 53 (В) представлені сигнали з того ж нейрона, але відхилені антидромні імпульси, що пригнічуються протилежно спрямованим струмом (інжекттованим через записуючий електрод, позначений лінією знизу). Чітко видно два види викликаних постсинаптичних сигналів (позначені стрілочкою та трикутником). З'ясовано, що хімічні синапси мають нікотинові рецептори [20].

Другий тип синапсів (позначений трикутниками на рисунку 47) є електричним, і відповіді на них не пригнічуються після стимуляції високою частотою (понад 10 Гц).

6.3 Висновки до розділу 6

Отже, можна зробити висновок, що в підщелепному ганглії присутні нікотинові ацетилхолінові рецептори, подібно до багатьох інших частин нервової системи. Основною їх відмінністю є наявність двох типів каналів - "швидких" та "повільних", які реагують по-різному на різні речовини-агоністи. Крім того, в підщелепному ганглії спостерігаються внутрішні синаптичні зв'язки, що утворюються безпосередньо між клітинами ганглія, де деякі з них також мають нікотинові рецептори.

РОЗДІЛ 7

Експериментальна частина та обговорення

7.1 Методика

Препарат

Досліджувані підщелепні ганглії виділялися з 3-тижневих щурів лінії Wistar. Матеріал зібрано з дотриманням норм біоетики та вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.). Було використано обидва цілі нефарбовані ганглії, які було екстрактовано з тварин разом зі сполучною тканиною, між ідрізком нерва chorda tympani та відрізком слинних проток (Рис. 4, ліворуч). При процедурі екстракції ганглій постійно перебував в зовнішньоклітинному розчині, і кріпився до камери, дно якої заповнене агаром, за допомогою вольфрамових ниток, сполучна тканина з поверхні препарату видалялась так, щоб не порушити його структурну цілісність, але полегшити доступ мікроелектроду до нейронів.

Мікроскопія

Було використано метод інтерференційно-дифракційної світлової мікроскопії, при якому об'єктив був занурений в зовнішньоклітинний розчин. Приклад типового спостереження наведений на Рис. 54.

Електрофізіологічні вимірювання

Для дослідження електрофізіологічних властивостей був використаний метод одноелектродного внутрішньоклітинного відведення за допомогою підсилювача Axoclamp 2B Current and Voltage Clamp («Axon Instruments», США) в режимі міст. Сигнали оцифровувались аналогово-цифровим перетворювачем Digidata 1200A під керуванням комп'ютерної програми Clampfit 9.0 («Axon Instruments», США).

Для стимуляції клітини використовувався протокол, при якому стимулюючий струм починається з 0.1 нА, триває 100 мс, та збільшується на 0.1 нА на кожному проході, з перервами 100 мс.

Розчин

В роботі було використано розчини для зовнішньоклітинного середовища, та для заповнення мікроелектроду. Зовнішньоклітинний розчин підбирався таким чином, щоб симулювати нормальне середовище, в якому перебувають нейрони даного ганглія, і забезпечити їх нормальне функціонування протягом всього експерименту.

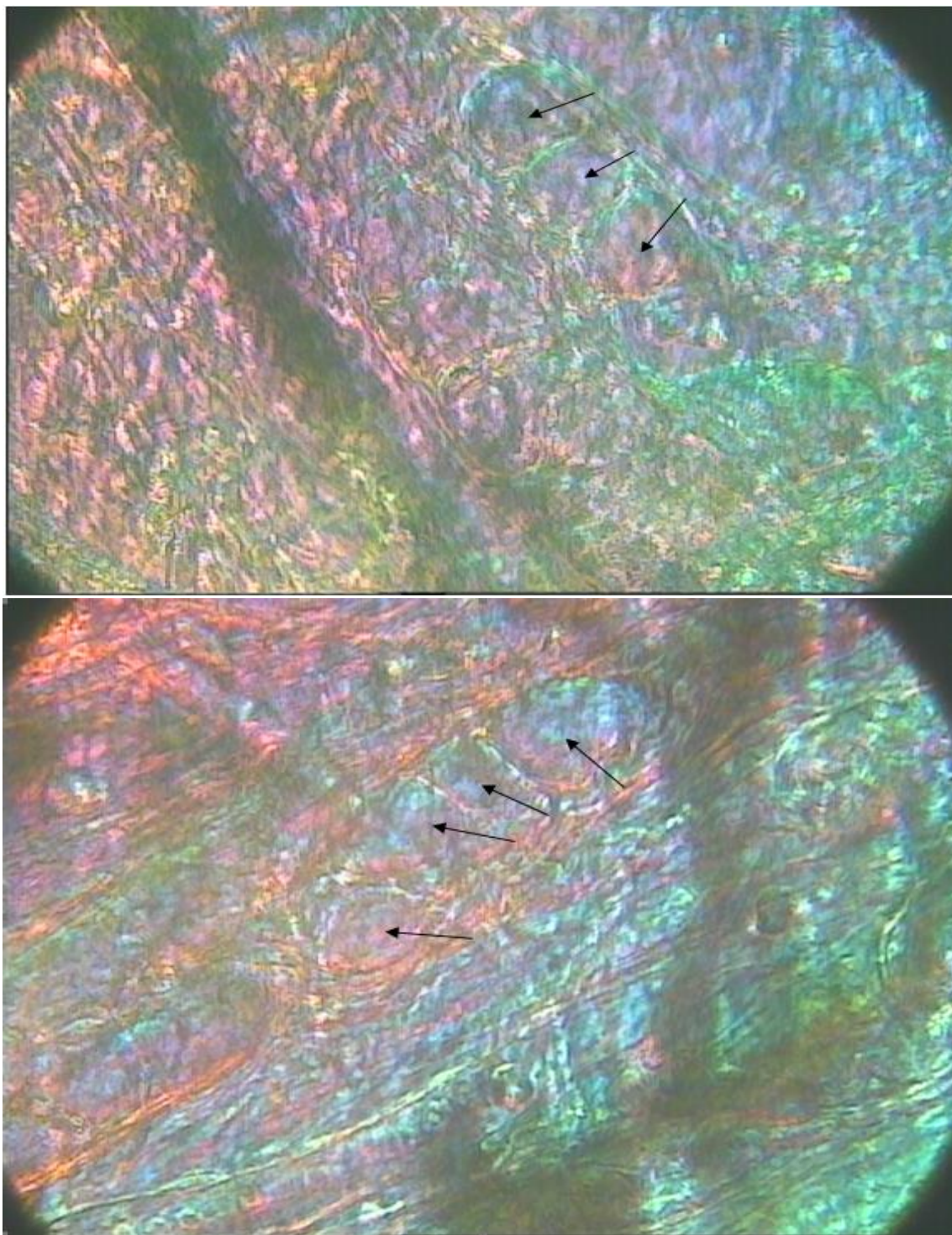


Рис. 54. Типові зображення нейронів в дослідженні, стрілочками показано соми нейронів.

У контрольному зовнішньоклітинному розчині містилося мМ): NaCl – 140, KCl– 2.2, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, C₆H₁₂O₆– 12. Для гіперглікемічного розчину концентрація C₆H₁₂O₆ збільшувалася до 30. Розчин доводився до pH = 7.4. Для заповнення мікроелектродів використовувався розчин KCl, 0.5 М.

7.2. Результати

Результат наведено в таблиці 8. В таблиці, Um - середній мембранний потенціал нейрона протягом вимірювання, Amp - амплітуда потенціалів дії, TP - мембранний потенціал, за якого виникає ПД, Rheobase - мінімальна величина амплітуди стимулюючого струму, за якої виникає ПД, і Half-width - ширина піку ПД на напіввисоті. За результатами побудовано порівняльні графіки порогу збудливості (Рис. 55), ширини на напіввисоті (Рис.57), та реобазис (Рис. 56). Окрім того, було порівняно миттєву частоту ПД - частоту виникнення другого ПД (Рис. 58). N в дужках – кількість нейронів, що були проаналізовані.

Табл. 8. Експериментальні результати. (*-p<0.05 порівняно з контролем).

	Um, mV	Amp, mV	TP, mV	Rheobase, nA	Half-width, ms
Контроль ПГ(n=8)	-52±4	60±7	-24±7	0.08±0.003	5±1
Діабет ПГ(n=8)	-43±5*	53±10	-15±4*	0.07±0.003	5±1

Нейрони ПГ продемонстрували статистично достовірне зменшення мембранного потенціалу та порогу збудливості при аплікації гіперглікемічного розчину. При цьому, такі показники, як напівширина на напіввисоті та реобаза не майже змінилися, амплітуда - не змінилася в межах статистичної похибки.

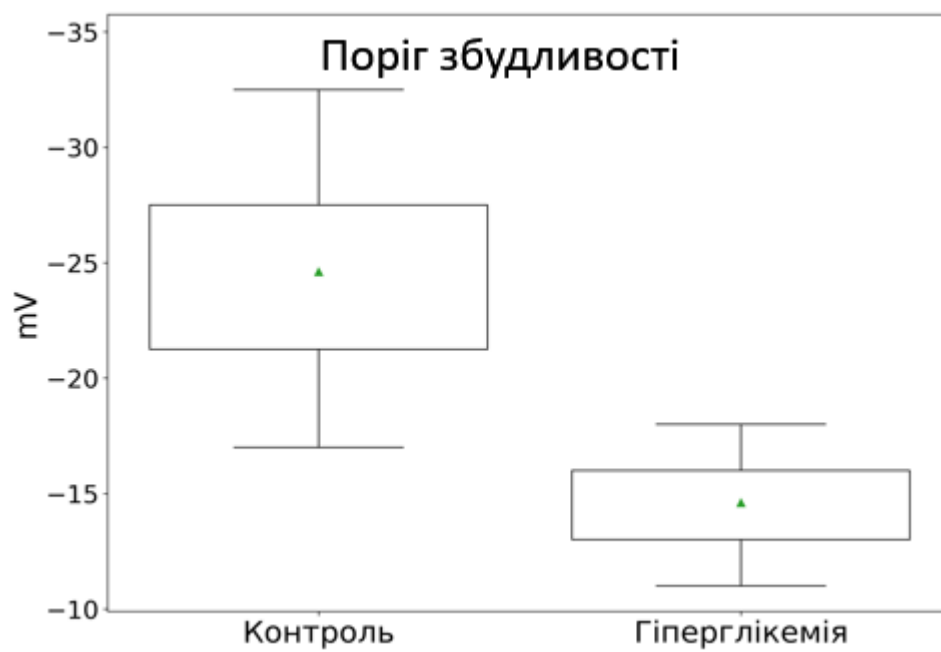


Рис. 55 Поріг збудливості

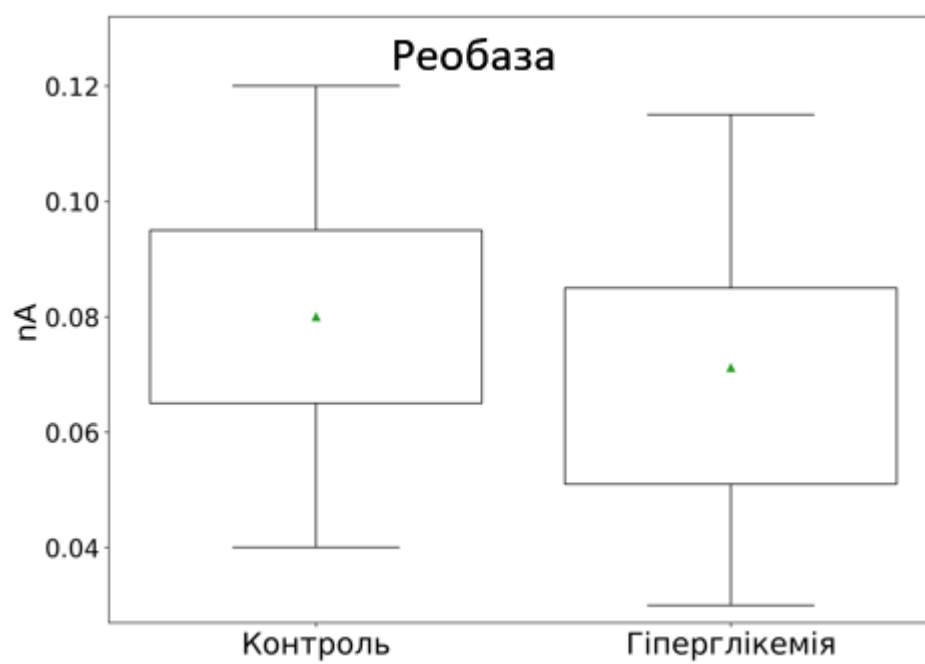


Рис. 56. Реобазис

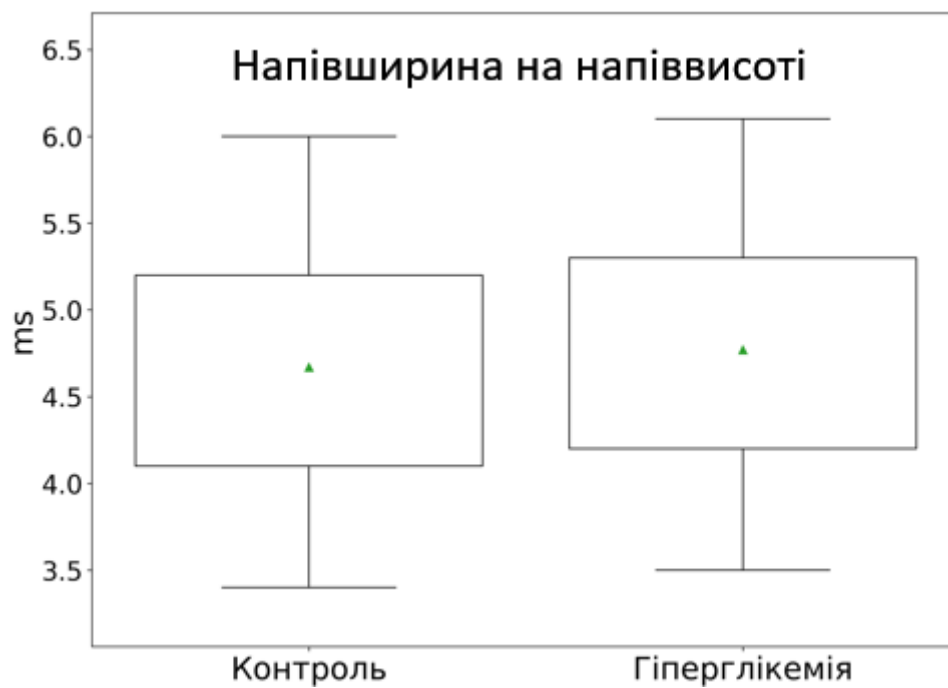


Рис. 57. Напівширина на напіввисоті

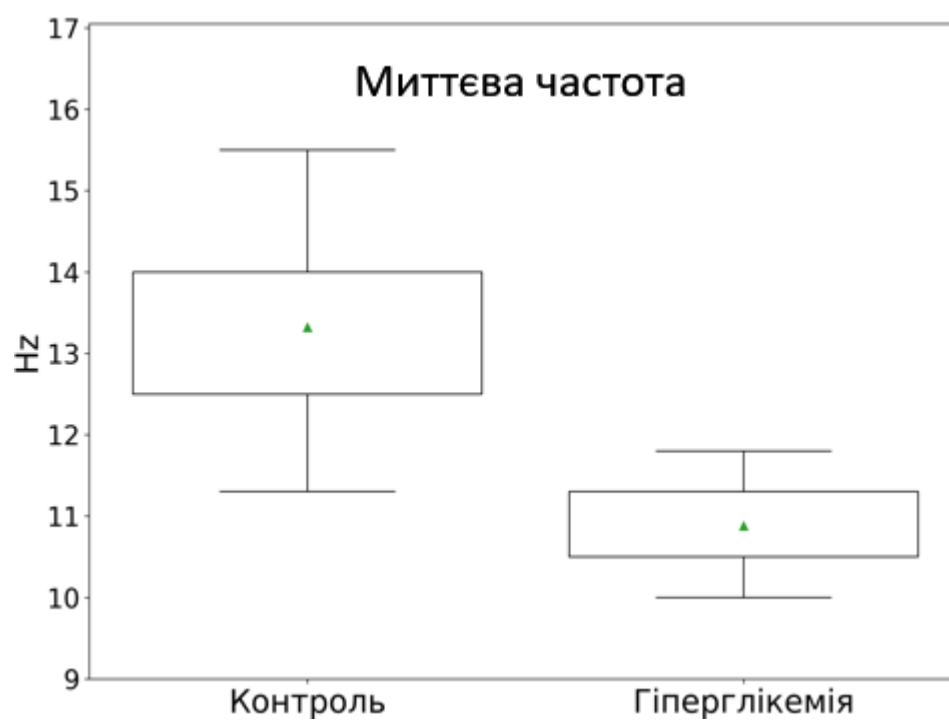


Рис. 58. Миттєва частота

При більш тривалій стимуляції, або за більшої сили стимуляції, нейрони демонструють здатність генерувати послідовні потенціали дії – при цьому, частота генерації даних потенціалів дії є функцією від сили струму ([21]).

7.3. Обговорення

Результати даного дослідження демонструють явну зміну чутливості нейронів підщелепного ганглія до стимуляції, навіть при відсутності довготривалих змін, викликаних діабетом (оскільки нейрони перебували в гіперглікемічному розчині найбільше кілька годин).

Зміна таких показників викликаних стимуляцією потенціалів дії, як поріг збудливості, мембранний потенціал, і реобазис, вказують на можливість суттєвих змін в мембрані нейронів, та зміну функціонування мембранних комплексів.

Зменшення такого показника, як миттєва частота, який характеризує здатність нейронів генерувати послідовні потенціали дії, може прямо впливати на кількість виробленої слинними залозами слини, що може бути однією з причин виникнення подальших проблем у функціонуванні всієї травної системи. Даний симптом при діабеті підтверджується і результатами інших досліджень (див. [22]).

Отримані результати також було порівняно з іншим симпатичним ганглієм, що іннервує слинні залози – Верхнім Шийним Ганглієм: нейрони підщелепного (парасимпатичного) ганглія демонструють більшу чутливість до стимуляції, окрім того, нейрони Верхнього Шийного Ганглія не демонструють змін під дією гіперглікемії ([23]), що викликає інтерес у подальшому визначенні порівняльних характеристик нейронів гангліїв симпатичного/парасимпатичного відділів, як в контролі, так і при діабеті.

7.4 Висновки до розділу 7

Отже, було проведено експериментальне визначення електрофізіологічних властивостей нейронів підщелепного ганглія, а саме – властивостей потенціалів дії, що генерованих ними. Серед цих властивостей – рівноважний мембранний потенціал, амплітуда потенціалів дії, поріг – порогове значення мембранного потенціалу, при якому виникають потенціали дії, напівширина на напіввисоті – значення, що характеризує форму потенціалу дії, реобаз – порогове значення струму стимуляції, за якого виникають потенціали дії(за даного протоколу), та миттєву частоту – значення, що характеризує здатність нейронів генерувати послідовні потенціали дії. Ці значення були порівняні з такими для нейронів у гіперглікемічному розчині, що симулює діабет – більшість показників не демонструють суттєвих змін, але рівноважний мембранний потенціал, поріг збудливості і миттєва частота показують суттєве зменшення – тобто, погіршення чутливості нейрона до стимуляції.

ВИСНОВКИ

Досліджено властивості підщелепного ганглія та його нейронів, і зміни в їх функціонуванні при патологічних умовах – в даному випадку, при штучній гіперглікемії.

В даній роботі:

- Проведено всесторонній літературний огляд анатомо-морфологічних, електрофізіологічних властивостей нейронів підщелепного ганглія, досліджено синаптичну передачу та рецептори в ньому.
- На основі проведених експериментів встановлено основні електрофізіологічні властивості нейронів підщелепного ганглія *in vitro*, за нормальних умов та в гіперглікемічному розчині.
- Виявлено зменшення мембранного потенціалу нейронів при викликаній гіперглікемії, зменшення порогу збудливості та реобазис, а також миттєвої частоти виникнення другого потенціалу дії. Такі зміни вказують на можливість змін в мембрані нейронів, та змін у функціонуванні мембранних комплексів.

Дане дослідження надає підґрунтя для подальшого вивчення діяльності нейронів підщелепного ганглія в моделі довготривалої патології – діабету 1 типу (з використанням стрептозоцину), задля вивчення механізмів корекції довготривалих патологічних змін.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

- [1] S. A. Amineh Hoseini Ali Mirzapour A. B., «Salivary flow rate and xerostomia in patients with,» *Electron Physician*, т. 9, № 9, pp. 5244-5249, 2017.
- [2] P. J. Bazira, «An overview of the nervous system,» *Surgery (Oxford)*, pp. 451-462, 8 August 2021.
- [3] G. O. P. W. Barbara Young, *Wheater's Functional Histology*, Elsevier, 2013.
- [4] K. H. Elaine Nicpon Marieb, *Human Anatomy & Physiology*, Pearson Education, Incorporated, 2019.
- [5] A. A. B. Alexander T Kessler, «Review of the Major and Minor Salivary Glands, Part 1: Anatomy, Infectious, and Inflammatory Processes,» *Journal of clinical imaging science*, т. 8, № 47, 2018.
- [6] «<https://www.britannica.com/>,» [Онлайновий]. Available: <https://www.britannica.com/science/human-digestive-system/Absorption>. [Дата звернення: 05 2023].
- [7] J. W. Lichtman, «The reorganization of synaptic connexions in the rat submandibular ganglion during post-natal development.,» *Journal of anatomy*, p. 155–177, 1977.
- [8] W. C. W. E. A. L. Y. K. Ng, «The intraglandular submandibular ganglion of postnatal and adult rats. I. A light and electron microscope study,» *Journal of anatomy*, p. 305–314, 1992.
- [9] W. C. W. E. A. L. Y. K. Ng, «The intraglandular submandibular ganglion of postnatal and adult rats. II. A morphometric and quantitative study,» *Journal of anatomy*, pp. 249-258, 1992.
- [10] K. Thorn, «A quick guide to light microscopy in cell biology,» *Molecular biology of the cell*, p. 219–222, 2016.
- [11] P. W. L. M. Hans Reiner, «Voltage-Clamp and Patch-Clamp Techniques,» в *Practical Methods in Cardiovascular Research*, Berlin, Heidelberg, Springer, 2005, pp. 272-323.
- [12] H. P. Rang, «The characteristics of synaptic currents and responses to acetylcholine of rat submandibular ganglion cells,» *The Journal of physiology*, p. 23–55, 1981.

- [13] W. A. L. H. P. R. P. Ascher, «Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells,» *The Journal of physiology*, pp. 139-170, 1979.
- [14] H. P. R. P. T. Gray, «Analysis of current noise evoked by nicotinic agonists in rat submandibular ganglion neurones,» *British journal of pharmacology*, pp. 235-240, 1983.
- [15] C. J. M. P. T. A. Gray, «The culture of rat submandibular ganglion neurons and their macroscopic responses to acetylcholine,» *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, pp. 265-271, 1983.
- [16] N. K. J. E. S. M. O. K. P. P. G. B. P. G. H. Carpenter, «Altered plasticity of the parasympathetic innervation in the recovering rat submandibular gland following extensive atrophy,» *Experimental physiology*, p. 213–219, 2009.
- [17] D. M. F. D. T. Garrett J. R., «Effects of ductal ligation on the nerves in parotid glands of rats,» *Journal of Dental Research*, p. 1244, 1979.
- [18] J. W. Lichtman, «On the predominantly single innervation of submandibular ganglion cells in the rat,» *The Journal of physiology*, pp. 121-130, 1980.
- [19] J. W. L. D. Purves, «Synaptic sites on reinnervated nerve cells visualized at two different times in living mice,» *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, p. 1492–1497, 1987.
- [20] S. R. K. Kawa, «On the two subdivisions and intrinsic synaptic connexions in the submandibular ganglion of the rat,» *The Journal of physiology*, pp. 301-320, 1984.
- [21] R. B. Stein, «The frequency of nerve action potentials generated by applied currents,» *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, pp. 64-86, 31 Jan 1967.
- [22] Amineh Hoseini Ali Mirzapour A. B., Shirzad A., «Salivary flow rate and xerostomia in patients with», *Electron Physician*, pp. 5244-5249, 2017, 9(9)
- [23] Р. Л. Пархоменко, А. О. Настенко, О. Е. Пурнинь, «Вплив штучної гіперглікемії in vitro на електрофізіологічні властивості нейронів підщелепного та верхнього шийного гангліїв», XXI Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, 2023