

О.Е.Пурнинь, О.В.Рихальський, С.А.Федулова, М.С.Веселовський

Синаптичні відповіді та внутрішньогангліонарні зв'язки нейронів верхнього шийного вузла щура

Изучены ответы нейронов верхнего шейного ганглия (ВШГ) крысы на пороговое раздражение шейного симпатического (ШСН), наружного сонного (НСН) и внутреннего сонного (ВСН) нервов. В нейронах ВШГ крысы при антидромном раздражении НСН и ВСН кроме антидромных ответов регистрируются ответы синаптической природы. Синаптические ответы каждого нейрона отличаются значительной вариабельностью амплитуд возбуждающих постсинаптических потенциалов и токов, времени нарастания и постоянной времени спада постсинаптического тока. Высказывается предположение, что эта вариабельность постсинаптических ответов обусловлена пространственным распределением синапсов, иннервируемых одним аксоном, по дендритному дереву и соме нейрона.

ВСТУП

Верхній шийний ганглії (ВШГ) – функціонально гетерогенна популяція нейронів, що іннервує велику різноманітність тканин-мішеней [10]. Окрім того, є дані про кластерне розташування гангліонарних клітин біля еферентних провідних шляхів [15, 16]. Нейрони ВШГ щура, що локалізовані в каудальному полюсі ганглія, посилають свої аксони у зовнішній сонний нерв, а ті, що розташовані в ростральній частині ганглія – у внутрішній сонний нерв [4]. Це важливе спостереження про переважну локалізацію нейронів на полюсах ганглія дало можливість досліджувати окремі популяції нейронів [11, 13]. Ще J. Eccles [6] припустив, що деякі автономні ганглії не лише передають інформацію, а в них може існувати і сумація підпорогових входів. Наявність підпорогових синаптичних потенціалів та їх сумація вперше підтверджено у дослідах при внутрішньоклітинних відведеннях R. Eccles [7], і з того часу були показані у більшості автономних гангліїв [3, 5]. Намагаючись з'ясувати внутрішньогангліонарну схему у симпатичному ганглії,

Kawai [12] дійшов висновку, що ВШГ може функціонувати не просто як ретранслятор, а є спеціалізованою нейронною мережею, що може бути задіяна у модуляції холінергічної передачі. Але синаптичні відповіді нейронів на підпорогове та порогове подразнення ще залишаються недостатньо дослідженими, тому метою нашої роботи було визначити особливості синаптичних відповідей нейронів ВШГ щура саме на такі подразнення.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на нейронах ВШГ 21-добових щурів. Перед знекровлюванням тваринам робили інгаляцію CO₂. Видалення ВШГ та його очистку від сполучних тканин здійснювали під бінокулярним мікроскопом МБС-10. Ганглії і нерви, що з ним сполучаються, перенесли до чашки Петрі з фізіологічним розчином Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 134; KCl – 5; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1; KH₂PO₄ – 1; NaHCO₃ – 12; глюкоза – 11 (рН 7,4), де його остаточно препарували. Звільнений від сполучнотканинної капсули ганглії із збереженими

© О.Е.Пурнинь, О.В.Рихальський, С.А.Федулова, М.С.Веселовський

нервами розташовували у робочій камері, акуратно приколювали вольфрамовими голочками (діаметр 30 мкм) до дна камери, що було покрито силгардом (“WPI”, США). Шийний симпатичний нерв, зовнішній та внутрішній сонні нерви щільно втягували у маленькі скляні піпетки для подразнення. Піпетки закріплювали на бокових поверхнях камери за допомогою маленьких сильних магнітів. Робочу камеру закріплювали на предметному столику поляризаційно-інтерференційного мікроскопа з інтерференційною оптикою Номарського BIOLAR (Польща) з об’єктивом водної імерсії Achroplan (x40, числова апертура 0,8, робоча відстань 1,6 мм, “Carl Zeiss”, Німеччина). Препарат постійно перфузували фізіологічним розчином Кребса. Мікроелектроди виготовляли на горизонтальній витяжці Р-97 (“Sutter Instr. Co”, Канада) із скляних заготовок (зовнішній діаметр – 1,5 мм; внутрішній – 0,84 мм, “WPI”, США) та заповнювали 1,5 моль/л розчином КСІ. Мікроелектроди мали опір 30 – 60 МОм. Всі досліди проводили при кімнатній температурі (близько 23 °С).

Блок-схему установки наведено на рис. 1,а. Для стимуляції нервів використовували чотириканальний ізолюючий пристрій. Часові режими стимуляції нервів задавали програмно з комп’ютера через цифровий вихід, а амплітудні – регуляторами з передньої панелі ізолюючого пристрою. Стимуляцію нервів здійснювали з частотою 0,5 Гц короткими (0,1–0,5 мс) прямокутними імпульсами напруги (амплітуду можна було регулювати від –10 до +10 В), які послідовно прикладали до шийного симпатичного, внутрішнього та зовнішнього сонних нервів через 130 мс. Послідовність стимуляції нервів та приклад відповіді нейрона наведено на рис. 1,а,б. Для реєстрації відповідей від нейрона використовували підсилювач Axoclamp 2B (“Axon Instruments”, США) в режимах “міст” і dSEVC (від англ. bridge та discontinues single electrode voltage clamp). Амплітудні

та часові показники струму, що підтримувався (режим Bridge), та потенціалу, що підтримувався (режим dSEVC), задавали програмно з комп’ютера через цифро-аналоговий перетворювач. Всі відведення здійснювали під візуальним контролем від нейронів, що розташовані на поверхні ганглія. Сигнали оцифровували з частотою 10 кГц аналогово-цифровим перетворювачем Digidata 1200A (“Axon Instruments”, США) під керуванням програми WinWCP 3.5.9 (Department of Physiology and Pharmacology Strathclyde Institute for Biomedical Sciences John Arbuthnott Building University of Strathclyde, Глазго, Велика Британія). Обробку результатів виконували за допомогою програми Clampfit 9.0 (“Axon Instruments”, США) та Origin 7.0 (“Microcal Software Inc.”, США). Результати статистичного аналізу подано як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього арифметичного для певної кількості (n) вимірів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Існує достатньо робіт, присвячених вивченню шляхів проведення через ВШГ і тих процесів, що в ньому відбуваються. Більшість авторів розглядає ВШГ як структуру, яка передає сигнали із центральної нервової системи (ЦНС) на периферію [3]. Отже, можна очікувати, що при подразненні шийного симпатичного нерва (вихідний нерв) ми будемо реєструвати збуджувальний постсинаптичний потенціал (рис. 2,а, в, д) або збуджувальний постсинаптичний струм (рис. 3,а) синаптичної природи, що опосередковані реакцією нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAHP) на викид нейропередатчика із синапсів. Водночас при подразненні зовнішнього та внутрішнього сонних нервів (вихідні нерви) ми будемо реєструвати антидромну відповідь, що викликана розповсюдженням потенціалу дії (ПД) по аксону нейрона в

Лише по 7 нейронів із загальної кількості відповідали на стимуляцію тільки зовнішнього чи внутрішнього сонного нервів і 15 нейронів відповідали як на подразнення зовнішнього, так і внутрішнього сонного нерва. Для чотирьох нейронів, що відповідали на стимуляцію зовнішнього сонного нерва, ми не проводили подразнення внутрішнього сонного нерва. При його стимуляції від усіх нейронів були отримані відповіді синаптичної природи, у п'яти з цих нейронів був і антидромний ПД. При стимуляції зовнішнього сонного нерва відповіді тільки

синаптичної природи мали 11 нейронів, антидромні ПД – 9 нейронів, а обидва типи відповідей були отримані від 6 нейронів.

За нашими результатами, досить багато нейронів ВШГ дають синаптичні відповіді на подразнення зовнішнього та внутрішнього сонного нервів і антидромні – на подразнення шийного симпатичного нерва. Існують окремі праці [17, 15], автори яких реєстрували синаптичні відповіді від нейронів ВШГ, отримані при антидромному подразненні зовнішнього і внутрішнього сонних нервів. Пурвес [15] пояснює цей

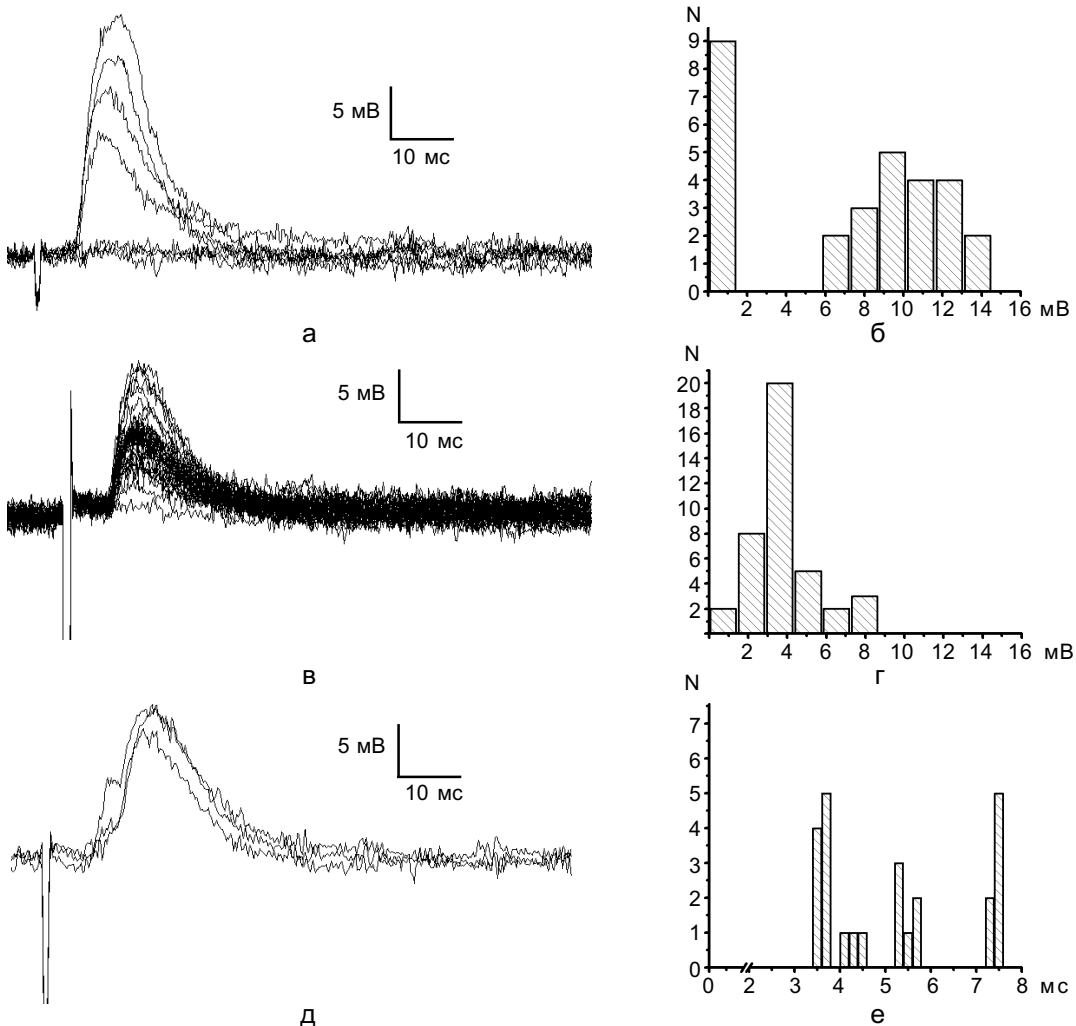


Рис. 2. Збуджувальні постсинаптичні потенціали (ЗПСП), що відведені від одного нейрона при стимуляції шийного симпатичного нерва (ШСН) (а), внутрішнього (ВСН) (в) і зовнішнього (ЗСН) сонних нервів. Стрілками вказано моменти виникнення сходинок. Гістограми розподілу амплітуд ЗПСП, що відведені при стимуляції ШСН (б), ВСН (г). Гістограма розподілу затримок від стимула до початку “сходинок” ЗПСП, що відведені при стимуляції ШСН (е)

ефект у нейронах ВШГ морської свинки наявністю колатералей від прегангліонарних волокон, що ідуть у внутрішній і зовнішній сонні нерви. Водночас за літературними даними, передача в зворотному напрямку (від внутрішнього та зовнішнього сонних нервів у шийний симпатичний нерв) у шурів не була знайдена, як і передача проведення між внутрішнім та зовнішнім

сонними нервами [2], що ставить під сумнів цю гіпотезу.

Результати експериментів з проведення збудження від шийного симпатичного нерва у внутрішній і зовнішній сонні нерви показали, що сумарні постгангліонарні ПД складного характеру мають піки з різними латентними періодами, котрі значно перевищують довжину синаптичної затримки [13].

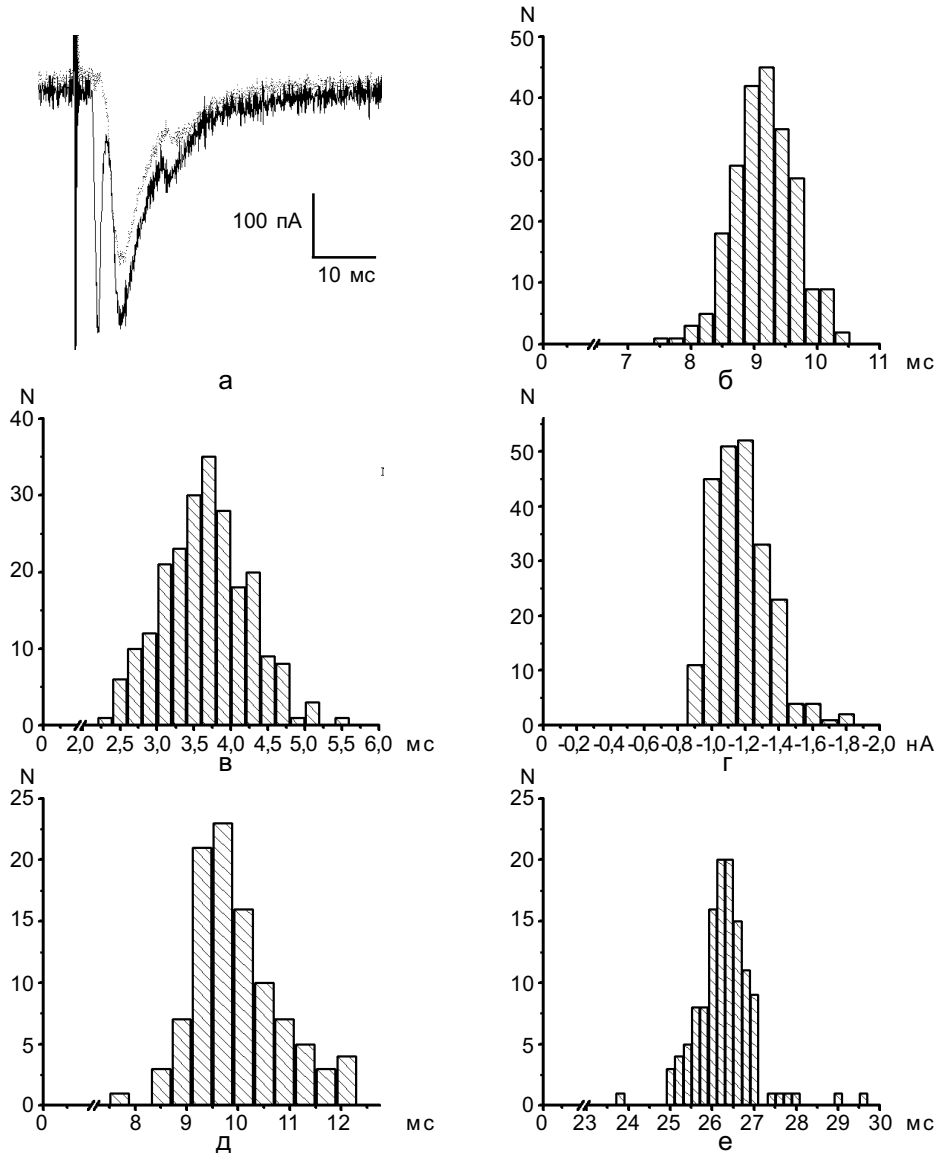


Рис. 3. Збуджувальні постсинаптичні струми (ЗПСС), що відведені від нейрона при стимуляції внутрішнього сонного нерва (ВШН): приклад ЗПСС (1), ЗПСС, якому передують антидромна відповідь (2) (а); (б - е) гістограми розподілу: затримок від стимула до початку ЗПСС (б), часу наростання ЗПСС (в); амплітуд ЗПСС (г); постійної часу спаду ЗПСС (д); затримок від стимула до початку другого компонента ЗПСС (е)

Крім того, для ВШГ характерна конвергенція прегангліонарних волокон на нейронах ганглія [6]. Ми спостерігали у 15 нейронах відповіді складної форми – декілька стійких збуджувальних постсинаптичних потенціалів або струмів, що зсунуті в часі. В 5 з цих нейронів зсув перевищував 5 мс (див. рис. 3,а), що явно свідчить про полісинаптичні зв'язки. Отже, можна припустити, що ВШГ є не лише передавальним ланцюгом із ЦНС на периферію, а й виконує більш складні завдання та має складну організацію внутрішньої нейронної мережі.

Наступне, на чому треба зупинитися, це значна дисперсія показників синаптичних відповідей. Варіабельність амплітуд як збуджувальних постсинаптичних потенціалів, так і струмів, пояснюється імовірнісним характером процесу викиду нейромедіатора із синапсу. На рис. 2,а, в, д представлені збуджувальні постсинаптичні потенціали, що відведені від одного з нейронів при подразненні шийного симпатичного, внутрішнього та зовнішнього сонних нервів відповідно. Цікаво, що гістограма розподілу амплітуд збуджувальних постсинаптичних потенціалів при пороговій стимуляції шийного симпатичного нерва не має низькоамплітудних відповідей (див. рис. 2,б). Існують тільки пусті пробіги та високоамплітудні збуджувальні постсинаптичні потенціали, які інколи розвивались у ПД. На гістограмі рис. 2,г наведено амплітудний розподіл відповідей на порогову стимуляцію внутрішніх сонних нервів. Вони знаходяться у низькоамплітудній ділянці та їх розподіл починається з нуля. Порогова стимуляція зовнішнього сонного нерва (див. рис. 2,д), на відміну від такої шийного симпатичного та внутрішнього сонного нервів, викликала збуджувальний постсинаптичний потенціал із складним фронтом наростання. Та, хоча амплітуди “сходинок” флюктуують, часові розстановки є доволі стабільними, як видно з гістограми, що на рис. 2,е. Латентні періо-

ди відрізняються менше ніж на 3,5 мс, що важко пояснити наявністю полісинаптичної передачі, тим більше, що для наочності нами вибрано з усіх досліджених клітин нейрон з максимальною різницею латентних періодів “сходинок”. Аналогічна ситуація спостерігається і для збуджувальних постсинаптичних потенціалів – в середньому від 2 до 4 “сходинок”, що рознесені на декілька сотен мкс (близько 600 мкс). Не завжди вдавалося чітко виділити кількість “сходинок”. Приклади таких збуджувальних постсинаптичних потенціалів, що отримані від одного з нейронів при подразненні внутрішнього сонного нерва приведені на рис. 3,а. Видно, що на одному з пробігів наявний лише збуджувальний постсинаптичний струм складної форми, а на другому – йому передуює антидромна відповідь (дещо більша амплітуда стимуляції викликала збудження аксона цього нейрона). У такому разі приклад гістограми розподілу латентних періодів від стимула до напіввисоти відповідей, представлено на рис. 3,б. Розкид фронту збуджувальних постсинаптичних потенціалів тут становить близько 2 мс, час їх наростання (від 0,1 до 0,9 максимальної амплітуди) – приблизно 3,75 мс (див. рис. 3,в), а розкид часу наростання – близько 2 мс. Ці значення особливо контрастують з еквівалентними показниками антидромної відповіді: 280 мкс, 1 мс та 200 мкс відповідно. У антидромній відповіді практично відсутній розкид амплітуд струмів (менше 100 пА). Гістограма амплітудного розподілу збуджувальних постсинаптичних потенціалів цього нейрона представлена на рис. 3,г. Взагалі, спад збуджувальних постсинаптичних потенціалів добре описується однократно експоненціальною функцією: середня постійна часу $\tau = (8,22 \pm 0,23)$ мс по 20 нейронах. Слід зазначити, що постійна часу спаду збуджувальних постсинаптичних потенціалів для окремого нейрона флюктує в широких межах (див. рис. 3,д). У даному прикладі (див. рис. 3,а)

наявні дві, зсунуті у часі, відповіді, що вказує на полісинаптичну природу другої, оскільки різниця між початком першої та другої відповіді перевищує 15 мс. Гістограма розподілу латентних періодів від стимулу до початку другого компонента збуджувального постсинаптичного потенціалу представлена на рис. 3,е.

Отже, можна припустити, що синаптичні відповіді, навіть при пороговому подразненні, складаються із великого числа елементарних подій – майже синхронного спрацьовування великої кількості синапсів. Ця версія підтверджується гістохімічними дослідженнями. Так, за даними Пурвеса та співавт. [16] кожен нейрон ВШГ іннервується в середньому 8–10 прегангліонарними нейронами. Показано на інших гангліях автономної нервової системи, що прегангліонарні аксони утворюють по своєму ходу множину синапсів (60–240) дотикового типу з дендритами та сомами основних нейронів [1, 8, 9]. Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що в вегетативних гангліях наявні аксодендритні, аксосоматичні, аксоаксональні та дендродендритні синапси, а найбільш розповсюджені – аксодендритні синапси [8, 14]. Нейрони ВШГ мають більш розвинене дендритне дерево (6–12 великих гілочок довжиною до 400 мкм [16]), ніж нейрони циліарного ганглія кроля, на якому показана така структура зв'язків прегангліонарних аксонів з сомами та дендритами нейронів ганглія [9, 16]. Такою геометрією дендритного дерева, просторово розподіленою системою синапсів, що іннервуються послідовно одним волокном, можна пояснити варіабельність часових характеристик синаптичних відповідей.

Саме така модель просто пояснює приклади збуджувальних постсинаптичних потенціалів, що наведені на рис. 2. Тут один прегангліонарний аксон із шийного симпатичного нерва рясно іннервує сому нейрона, тому ми отримуємо за принципом “все або

нічого” чи пустий пробіг, або збуджувальний постсинаптичний потенціал великої амплітуди, варіабельність якої визначається імовірнісним характером процесу викиду нейромедіатора із поодиноких синапсів, дисперсії амплітуд яких складаються. Водночас аксон, що активується при подразненні внутрішнього сонного нерва, формує значно меншу кількість синапсів на цьому нейроні і викликає низькоамплітудні збуджувальні постсинаптичні потенціали. Що стосується відповіді на подразнення зовнішнього сонного нерва, то якщо врахувати, що відстань між великими дендритними гілками на віддаленні від соми може перевищувати 400 мкм, а швидкість розповсюдження сигналів у аксоні (менше ніж 0,1 м/с), то наявність “сходинок” на фронті збуджувального постсинаптичного потенціалу можна пояснити послідовною іннервацією одним аксоном рознесених дендритних гілочок. Великий розкид постійної часу спаду збуджувальних постсинаптичних потенціалів теж пояснюється причинами, що зазначені вище, та вірогіднісним характером кількості передатчика, що викидається із синапсів.

За нашою оцінкою швидкість проведення по нерву знаходилась в діапазоні від 0,12 до 1 м/с. Достовірної різниці у кінетиці спаду та у швидкості проведення волокон, що іннервують нейрони ВШГ, аксони яких виходять у внутрішній та зовнішній сонні нерви, ми не виявили. Окрім цього, ми не виявили значущої потенціалзалежності постійної часу спаду збуджувальних постсинаптичних потенціалів у діапазоні підтримуваних мембранних потенціалів від –30 до –70 мВ.

Таким чином, при антидромному подразненні зовнішнього та внутрішнього сонних нервів окрім антидромної відповіді виникають відповіді синаптичної природи – збуджувальні постсинаптичні потенціали та струми. Синаптичні відповіді нейронів ВШГ мають складну форму, що можна пояснити полісинаптичним зв'язком через один чи

декілька вставних нейронів. Відповіді, отримані від окремого нейрона, відрізняються значною варіабельністю амплітуд, часу наростання та постійної часу спаду збуджувальних постсинаптичних потенціалів, що можна пояснити розвиненою геометрією дендритного дерева та просто-риво розподіленою системою синапсів, що іннервуються послідовно одним волокном. Ці результати узгоджуються з гістохімічними даними. Разом можна стверджувати, що ВШГ відіграє не лише роль передатчика сигналу, а виконує більш складні завдання і має непросту організацію внутрішньої нейронної мережі.

Робота виконана за підтримки гранту FIRCA (ref.No. 1R03TWO05909-01)

H.E. Purnyn, O.V. Rikhalsky, S.A. Fedulova, M.S. Veselovsky

SYNAPTIC RESPONSES AND INTRAGANGLIONIC CONNECTIONS OF RAT SUPERIOR CERVICAL GANGLIA NEURONES

The rat superior cervical ganglion (SCG) neurones demonstrate responses on the threshold stimulation of the cervical sympathetic nerve, extrinsic (ECN) and intrinsic (ICN) carotid nerves. Both antidromic and synaptic responses were evoked by antidromic stimulation of ECN and ICN. The synaptic responses of each neuron differ by great variability amplitudes of the excitatory postsynaptic potentials and the currents, the rise time and the time constant decay of the postsynaptic current. We hypothesize that this variability of the synaptic responses is associated with the spatial distribution of synapses on the dendritic tree and on the neuron soma that are innervated by the single axon.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабминдра В.П., Брагина Т.А. Структурные основы межнейронной интеграции. – Л.: Наука, 1982. – 160 с.
2. Иванов А.Я., Скок В.И., Проводящие пути верхнего шейного симпатического ганглия кошки // *Нейро-*

физиология. – 1970. – 2. – С. 216–224.

3. Скок В.И. Физиология вегетативных ганглиев. – Л.: Наука. – 1970. – 235 с.
4. Bowers C.W., Zigmond R.E. Localization of neurons in the rat superior cervical ganglion the project into different postganglionic trunks// *J. Comp. Neurol.* – 1979. – **185**. – P. 381–392.
5. Crowcroft P.J., Szurszewski J.H. A study of the inferior mesenteric and pelvic ganglia of guinea pigs with intracellular recordings// *J. Physiol.* – 1971. – **219**. – P. 421–441.
6. Eccles J. C., Facilitation and inhibition in the superior cervical ganglion // *Ibid.* – 1935. – **85**. – P. 207–238.
7. Eccles R. M. Intracellular potentials recorded from a mammalian sympathetic ganglion// *Ibid.* – 1955. – **130**. – P. 572–584.
8. Elfvin L.G. Ultrastructural studies on synaptology of the inferior mesenteric ganglion of the cat. I. Observations on the cell surface of the postganglionic perikarya // *J. Ultrastructural. Res.* – 1971. – **37**. – P. 411–425.
9. Forehand C.J., Purves D. Regional innervation of rabbit ciliary ganglion cells by the terminals of preganglionic axons// *J. Neurosci.* – 1984. – **4**. – P. 1–12.
10. Gibbins I. L. Vasomotor, pilomotor and secretomotor neurons distinguished by size and neuropeptide content in superior cervical ganglia of mice// *J. Autonomic Nervous System.* – 1991. – **34**. – P.171–183.
11. Headley D.B., Suhan N.M., Horn J.P. Rostro-caudal variations in neuronal size reflect the topography of cellular phenotypes in the rat superior cervical sympathetic ganglion// *Brain Res.* – 2005. – **1057**. – P. 98–104.
12. Kawai Y. Ultrastructure of neuronal circuitry in sympathetic ganglia// *Microsc. Res.Tech.* 1996. – **35(2)** – P. 146–156.
13. Li Ch., Horn J.P. Physiological classification of sympathetic neurons in the rat superior cervical ganglion // *J. Neurophysiol.* – 2006. – **95**. – P. 187–195.
14. Tamarind D.L., Quilliam Y.P. Synaptic organization other ultrastructural features of the rat, kitten and rabbit // *Micron.* – 1971. – **2**. – P. 204–234.
15. Perri V., Sacchi O, Cassella C. Synaptically mediated potentials elicited by the stimulation of post-ganglionic trunks in the guinea-pig superior cervical ganglion // *Pflugers Arch.* – 1970. – **314**. – P. 55–67.
16. Purves D., Snider W. D., Voyvodic J. T. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system // *Nature.* – 1988. – **336**. – № 6195. – P.123–128.
17. Woodward J. K., Bianchi C. P., Erulkar S.D. Electrolite distribution in rabbit superior cervical ganglion // *J. Neurochem.* – 1968. – **16**. – P. 289–299.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 16.05.2007