

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Думанська Ганна Валентинівна

УДК 57.085.23+612.843+612.826.5

**СИНАПТИЧНА ПЕРЕДАЧА МІЖ ГАНГЛІОЗНИМИ КЛІТИНАМИ
СІТКІВКИ ТА НЕЙРОНАМИ *COLLICULUS SUPERIOR* В КОКУЛЬТУРІ В
НОРМІ ТА ПРИ ГІПОКСІЇ**

03.00.02 – біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізіології нейронних мереж Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця Національної Академії Наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
професор, академік НАН України

Веселовський Микола Сергійович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділом фізіології нейронних мереж

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,

Жолос Олександр Вікторович

Навчально-науковий центр «Інститут біології»

Київський національний університет ім. Т. Шевченка,
виконуючий обов'язки завідувача кафедри біофізики

доктор біологічних наук, професор,

Борисова Тетяна Олександрівна

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач відділом нейрохімії

Захист відбудеться «27» вересня 2016 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: вул. Богомольця, 4, Київ 01024.

Автореферат розісланий 17 серпня 2016р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Зір – складний багатоступінчатий сенсорний процес, який починається з проєкції зображень на сітківку ока, яка сприймає та трансформує світлові сигнали в послідовності нервових імпульсів. Вихідними нейронами сітківки є гангліозні клітини (ГКС). Їхні аксони формують зоровий тракт і забезпечують передачу візуальних аферентних сигналів у субкортикальні зорові центри головного мозку. *Colliculus superior* (CS, верхні горбки пластинки покрівлі) є первинним субкортикальним центром зорового аналізатора. Проєкції ГКС в верхні шари CS утворюють перші реле у шляхах передачі та обробки аферентних зорових сигналів (Chandrasekaran et al., 2005; Mrsic-Flogel et al., 2005).

Дослідження властивостей нейропередачі між ГКС та нейронами CS традиційно проводилися або *in vivo* (Simon et al., 1992; Razak et al., 2003), або *in vitro* на парасагітальних переживаючих зрізах CS (Colonnese et al., 2003; Shah et al., 2008; Xue et al., 2010). У таких експериментах реєстрували викликані постсинаптичні струми в нейронах CS у відповідь на тотальну електричну стимуляцію *stratum opticum* — оптичного шару CS, який включає в себе велику кількість різноманітних вхідних проєкцій, зокрема і аферентних входів зорового тракту. Принципові недоліки попередніх методик досліджень синаптичних ефектів полягали у відсутності можливості ідентифікації конкретного пресинаптичного входу волокна та контролю виникнення в ньому потенціалу дії. У зв'язку з цим виникло питання розробки більш адекватного в даному аспекті об'єкту.

Розроблений та описаний в даній роботі метод кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS дозволяє отримати зручну та адекватну *in vitro* модель для вивчення синаптичної передачі аферентних впливів, що надходять по зоровому тракту у відповідний зоровий центр. Це дозволяє реєструвати окремі синаптичні події з точною ідентифікацією пре- та постсинаптичного нейрона і, отже, в значній мірі позбавляє відмічених вище недоліків. В даній моделі морфологічні, електрофізіологічні відмінності обох популяцій клітин та візуалізація проєкцій аксонів ГКС на нейрони CS надають можливість дослідження характеристик синаптичного зв'язку на окремих добре візуалізованих та ідентифікованих парах нейронів.

У людини зорова система надає мозку більше 80 % всієї сенсорної інформації (Хьюбел, 1990). Очевидно, що дослідження нейропередачі на рівні окремих високоспеціалізованих ланок цієї системи в нормі та патології є актуальним розділом фізіології та медицини.

Гіпоксія є не тільки патологічним процесом, що лежить в основі багатьох захворювань чи супроводжує їх, вона індукує розвиток фізіологічної адаптації до певних навколишніх умов або фізичних навантажень (Dutton et al., 2004, 2006; Brodsky et al., 2003; Lowery et al., 2006). Висока чутливість нейронів центральної нервової системи (ЦНС) до дефіциту кисню є загальновідомою. Навіть короточасне припинення постачання кисню до тканин головного мозку може призвести до його необоротних пошкоджень. Питоме споживання кисню різними тканинами головного мозку дуже сильно варіює. Цей параметр у тканин сітківки та субкортикальних зорових центрів на порядок вище відповідних показників інших відділів ЦНС (Cohen et al., 1965; Березовский, 1975).

Ключові моменти гіпоксичного ураження саме проекцій сітківки в *CS* досліджені відносно детально на рівні структурних пошкоджень та судинних реакцій за допомогою методів магнітно-резонансної томографії (Duong et al., 2014; Chan et al., 2015; Zhou et al., 2010). Разом з тим ефекти та механізми гіпоксичного впливу на передачу через окремі відповідні з'єднання дотепер досліджені не були. Саме тому визначення властивостей нейропередачі в синапсах між ГКС та нейронами *CS* при дефіциті кисню є важливим для розуміння механізмів гіпоксичних ушкоджень даної ланки зорової системи та створення необхідної теоретичної основи для пошуку нових терапевтичних підходів в корекції індукованих гіпоксією патологічних станів зорового аналізатора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових проєктів Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України «Клітинні механізми реалізації функціональних особливостей нейронів центральної та периферичної нервових систем ссавців» (державний реєстраційний номер № 0113U007274) і «Функціональна геноміка міжнейронної взаємодії та субнейронних процесів за нормальних та патологічних умов» (державний реєстраційний номер № 0112U001476).

Мета дослідження. Метою нашої роботи було встановлення характеристик нейропередачі в синапсах аферентних проекцій сітківки в *colliculus superior* в нормі та за умов моделювання гіпоксії.

Завдання дослідження:

1. Розробити методіку тривалого кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів *CS* для отримання адекватного об'єкта досліджень передачі зорової інформації від сітківки в субкортикальний зоровий центр: окремих пар ГКС — нейрон *CS*.
2. Визначити типи хімічної нейропередачі між ГКС та нейронами *CS* та роль субпопуляцій постсинаптичних рецепторів в її реалізації.
3. Визначити характеристики квантового вивільнення нейротрансмітерів в синапсах між кокультивованими ГКС та нейронами *CS*.
4. Охарактеризувати властивості короткотривалої пластичності при парній стимуляції у парах ГКС — нейрон *CS*.
5. Виявити ефекти та механізми гіпоксичних впливів на синаптичну передачу між ГКС та нейронами *CS*.

Об'єкт дослідження. Первинна кокультура дисоційованих клітин сітківки та нейронів *CS*.

Предмет дослідження. Властивості нейропередачі в синапсах між ГКС та нейронами *CS* в нормі та при моделюванні гіпоксії.

Методи дослідження. Кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів *CS*; відведення активності окремих нейронів в режимах фіксації струму/потенціалу в конфігурації «ціла клітина»; реєстрація трансмембранних струмів та потенціалів (парна реєстрація в конфігурації «ціла клітина») в режимах фіксації струму/потенціалу одночасно на пре- та постсинаптичній клітинах; моделювання стану гіпоксії, використовуючи аплікацію гіпоксичних розчинів методом швидкої локальної суперфузії; аналіз результатів методами базового та повного квантового аналізу; статистичний аналіз результатів дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. В дисертаційній роботі вивчені та кількісно охарактеризовані властивості синаптичної передачі між ГКС та нейронами *CS* на окремих кокультивованих синаптично зв'язаних парах нейронів за нормальних та гіпоксичних умов.

Вперше розроблено метод кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів *CS*. Визначено, що збуджувальна синаптична передача між ГКС та нейронами *CS* опосередковується вивільненням глутамата та активацією НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів. Гальмівна синаптична передача відбувається завдяки вивільненню ГАМК та активації ГАМК_A-рецепторканалних комплексів на постсинаптичній мембрані нейронів *CS*.

Визначено параметри квантового вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах між кокультивованими ГКС і нейронами *CS* та показано, що ймовірність вивільнення обох нейротрансмітерів задовільно описується біноміальним законом.

Вперше описані характеристики короткочасної синаптичної пластичності між ГКС та нейронами *CS* (депресії глутаматергічної та потенціації ГАМК-ергічної синаптичної передачі) за умов парної пресинаптичної стимуляції. Визначено, що в реалізації даних пластичностей превалюють пресинаптичні механізми.

Вперше досліджено індуковану гіпоксією пластичність синаптичної передачі між ГКС та нейронами *CS*. Методами базового та повного квантового аналізу оцінено ймовірні пре- та постсинаптичні механізми синаптичної пластичності, зумовленої дефіцитом кисню.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи мають передусім фундаментальну цінність, оскільки в ній отримано нові дані стосовно властивостей нейропередачі в синапсах аферентних проєкцій сітківки в *CS* в контролі та при моделюванні гіпоксії. Визначено механізми, які можуть опосередковувати зміни ефективності глутамат- та ГАМК-ергічної синаптичної передачі, індуковані дефіцитом кисню. Отримані результати мають практичне значення для розуміння проблематики гіпоксичних ушкоджень даної ланки зорової системи та створюють теоретичну основу для пошуку нових терапевтичних підходів в корекції індукованих гіпоксією патологічних станів зору.

Особистий внесок здобувача. Аналіз відомостей, поданих в літературних джерелах, виконання експериментів та інтерпретація отриманих результатів проводились здобувачем особисто за участі керівника наукової роботи. Приготування кокультури дисоційованих клітин сітківки та нейронів *CS*, проведення електрофізіологічних досліджень, налагодження системи локальної швидкої суперфузії, аналіз та узагальнення результатів досліджень виконані особисто автором.

Апробація результатів дисертації. Загальні положення роботи доповідались на наступних наукових конференціях: V Конгрес Українського товариства нейронаук (6–10 червня 2011р., Київ, Україна); V з'їзд Українського біофізичного товариства (22–25 червня 2011 р., Луцьк, Україна); Всеукраїнська конференція молодих вчених “Фізіологія від молекули до організму” (20–21 жовтня 2011 р., Київ, Україна); 8th FENS Forum of Neuroscience (14–18 липня 2012 р., Барселона, Іспанія); II International symposium “Molecular mechanisms of synaptic transmission regulation” in memory of V. Skok (6–9 жовтня 2012 р., Київ, Україна); II Scientific Conference of Young

Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body” (8–9 жовтня 2012 р., Київ, Україна); Російсько-Український семінар «Современные экспериментальные подходы для поиска и характеристики новых нейротропных фармакологически активных веществ» (23–25 вересня 2012 р., Москва, РФ); VI Конгрес Українського товариства нейронаук (4–8 червня 2014р., Київ, Україна); XIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (21–23 травня, 2015, Київ, Україна).

Публікації. За результатами роботи опубліковано 5 статей у наукових фахових журналах, 9 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з’їздів та один патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та списку використаних джерел (257 найменувань). Обсяг дисертації складає 130 стор. Дисертаційна робота ілюстрована 33 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних складається з трьох розділів, в яких наведено інформацію про структуру та функції ГКС та нейронів CS ссавців, висвітлені відомості про синаптичну передачу в синапсах первинних проекцій сітківки в CS, описано різні типи гіпоксії та захворювання зорової системи, які зумовлені або супроводжуються дефіцитом кисню.

Матеріали та методи досліджень. В розділі обґрунтовано вибір об’єкту дослідження – кокультури дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS – як адекватної моделі щодо цілі та завдань дослідження.

Приготування кокультури дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS. Для приготування кокультур дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS використовували білих щурів лінії Вістар обох статей (віком одна доба після народження). Очне яблуко та CS брали від однієї тварини та занурювали в мінімальне середовище Ігла з буфером Нерес, до якого додавали 25 од/мл бензилпеніциліну та 25 мг/мл стрептоміцину сульфату (реактиви фірми “Sigma”, США). Після видалення рогівки, кристалика та склоподібного тіла сітківку відокремлювали від хоріоїдної оболонки та розділяли на фрагменти. Ферментативна обробка сітківки трипсином (Trypsin type XI “Sigma”, США) тривала 8 хв при температурі 37 °С. CS очищали від судинної плівки, відділяли поверхневий шар (*superficial CS*) та розділяли на фрагменти. Ферментативна обробка CS трипсином тривала 10 хв при температурі 37 °С. Після ферментації тканини сітківки та CS декілька разів промивали середовищем для культивування наступного складу: мінімальне середовище Ігла з додаванням 26 мМ натрію бікарбонату NaHCO₃, 1,25 % розчину інсуліну, 25 од/мл бензилпеніциліну, 25 мг/мл стрептоміцину сульфату (реактиви фірми “Sigma”, США) та 10 % кінської сироватки (“Gibco”, США). Клітини сітківки та CS механічно розділяли за допомогою піпетування через пастерівські піпетки різного діаметру. Щільність суспензій дисоційованих клітин і сітківки, і CS складала 2×10⁴ клітин/см². Отримані суспензії клітин розміщали в окремих компартментах виготовлених камер для кокультування на скельця в чашках Петрі, попередньо оброблені полі-L-орнітином. Кокультуру

інкубували в атмосфері повітряно-газової суміші з підвищеним вмістом двоокису вуглецю (5 % CO₂), при температурі 37 °С та вологості не менше 80 % протягом 1 години. Після осідання та прикріплення клітин до скла камери знімали і додавали по 2 мл середовища для культивування в кожену чашку Петрі та інкубували за вищезазначених умов. На третю добу кокультивування додавали 7 мкМ цитозин-β-D-арабіно-фуранозиду (ARAC; “Sigma”, США) для пригнічення проліферації гліальних клітин, присутніх в кокультури, та утворення гліального моношару. Електрофізіологічні експерименти проводили з 11 до 35 діб кокультивування.

Електрофізіологія. Трансмембранні струми та потенціали у парах ГКС і нейронів CS реєстрували з використанням методу парного «петч-клемпу» у конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації потенціалу/струму одночасно на пре- та постсинаптичній клітинах. ГКС та нейрони CS ідентифікували за морфологічними та електрофізіологічними особливостями цих популяцій клітин (Guenther et al., 2004; Lilley et al., 2004; Dowling et al., 1987). Експерименти проводили при кімнатній температурі (19–24 °С). Викликані (вПСС), спонтанні (сПСС) та мініатюрні (мПСС) постсинаптичні струми реєстрували при підтримуваному потенціалі –70 мВ.

Покривне скельце з кокультивованими нейронами розміщали в робочій камері, заповненій стандартним зовнішньоклітинним розчином такого складу (мМ): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 20, глюкоза – 10 (всі реактиви фірми “Sigma”, США), рН 7,4. АМПА-рецепторопосередковані (АМПА-Р-опосередковані) вПСС та сПСС реєстрували в стандартному зовнішньоклітинному розчині з додаванням блокатора НМДА-Р-опосередкованої синаптичної передачі D_L-APV (20 мкМ). НМДА-Р-опосередковані вПСС та сПСС реєстрували в безмагнієвому зовнішньоклітинному середовищі з додаванням блокатора АМПА-Р-опосередкованої синаптичної передачі DNQX (20 мкМ). мПСС різної ергічності реєстрували в номінально безкальцієвому розчині з додаванням 1 мкМ тетродотоксину, при наявності блокаторів D_L-APV (20 мкМ) або DNQX (20 мкМ) відповідно.

Петч-піпетки з внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм були виготовленні з боросилікатних скляних капілярів (“World Precision Instruments”, США). Внутрішньоклітинний розчин мав такий склад (мМ): калію глюконат – 155, EGTA – 0,5, MgCl₂ – 1, HEPES – 20, (всі реактиви фірми “Sigma”, США), рН 7,4. Заповненні таким розчином петч-піпетки мали опір 5–7 МОм.

В усіх експериментах концентрації іонів хлору в зовнішньо- та внутрішньоклітинному розчині становили 151–144 та 2 мМ відповідно. За цих концентрацій при підтримуваному потенціалі хлорні постсинаптичні струми (ПСС) через канали ГАМК_A-рецепторканалних комплексів мали вихідний напрямок та зумовлювали гіперполяризацію мембрани нейронів, а струми через канали іонотропних глутаматних рецепторканалних комплексів мали вхідний напрямок і зумовлювали деполяризацію. Таким чином, під час реєстрації було можливо візуально розрізнити збуджувальні та гальмівні постсинаптичні струми.

Аналізували нейрони у яких в перебігу експериментів варіації значень $\tau_{емн}$ (значення сталої часу емнісного струму) та $I_{емт}$ (амплітуда струму витоку) не перевищували 20 %.

Для дослідження короточасної пластичності використовували протоколи парної стимуляції: пари потенціалів дії (ПД) викликали в пресинаптичній ГКС

деполяризуючими поштовхами струму тривалістю 3–5 мс та амплітудою 100–300 пА, з міжстимульними інтервалами 20, 50, 100, 200, 500 та 2000 мс. Пари стимулів струму прикладали з частотою $0,5 \text{ с}^{-1}$.

В перебігу електрофізіологічного експерименту використовували загальноприйнятту модель гіпоксії *in vitro* – короткочасну (до 5 хв) аплікацію гіпоксичного розчину. Аплікацію розчинів на синаптично зв'язану пару проводили за допомогою методу швидкої локальної суперфузії (Veselovsky et al., 1996). Гіпоксичні розчини ($0,19 \text{ мг/л O}_2$) готували безпосередньо перед експериментом шляхом барботування робочого зовнішньоклітинного розчину азотом протягом 20 хв. Концентрацію кисню вимірювали полярографічним методом з використанням платинового мікроелектрода. Наявність 20 мМ *Neres* в робочих розчинах була достатньою для забезпечення сталого рівня рН в контролі, протягом гіпоксії та реоксигенації.

Квантовий аналіз. Основні параметри квантового вивільнення нейротрансмітера q – величина кванта (амплітуда ПСС у відповідь на вивільнення одного кванта трансмітера), p – середня ймовірність вивільнення нейротрансмітера, n – середня кількість сайтів вивільнення, m – середній квантовий вміст (середня кількість квантів медіатора, що вивільняються) визначали наступними двома методами (Voronin et al., 1994). Метод «мініатюр» або «прямий» метод, базується на припущенні про те, що амплітуда мПСС ідентична постсинаптичній відповіді на одиничну квантову подію. Гістограмний метод, з апроксимацією розподілу амплітуд вПСС декількома функціями Гауса, використовували для візуальної ідентифікації рівновіддалених мод із визначеним періодом, що інтерпретуються як набір незалежних квантових подій. Для опису ймовірності вивільнення нейротрансмітера використовували біноміальну статистику.

Аналіз даних. Аналіз кінетичних параметрів струмів, статистичний аналіз та побудову графіків виконували з використанням програмних пакетів Origin 8.5 Pro (“OriginLab Corporation”, США), Excel 2007 (“Microsoft Corporation”, США) та Clampfit 9.0 (“Axon Instruments”, США).

Нормальність розподілу даних перевіряли за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Кількісні результати представлені як середні \pm стандартна похибка середнього. Для статистичної достовірності різниць міжгрупових середніх значень використовували t -тест Ст'юдента. Оцінку достовірності відмінностей між двома функціями проводили за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Автоматичний пошук сПСС та мПСС реалізували в програмному пакеті Clampfit 9.0 (“Axon Instruments”, США) за допомогою функції Event detection – Threshold search. Поріг детекції вибирали за правилом « 2σ ». Рівень достовірності міжгрупових різниць на рисунках позначено наступним чином: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Результати досліджень.

1. Синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами CS.

Нами було досліджено 196 пар нейронів за умов парної реєстрації. У 145 парах у нейронах CS реєстрували АМПА-Р- ($n = 67$) та НМДА-Р-опосередковані ($n = 78$) викликані збуджувальні постсинаптичні струми у відповідь на пресинаптичну генерацію ПД окремих ГКС (рис. 1. Б, В). У 51 парах спостерігалися викликані гальмівні ГАМК_A-Р-опосередковані постсинаптичні струми. Всі струми були ідентифіковані у

відповідності з їх кінетичними характеристиками та фармакологічними властивостями (Sah et al., 1990; Lee et al., 2001; Browne et al., 2001).

ВПСС мали синаптичну затримку в межах 2–5 мс, що давало можливість ідентифікувати ці струми як моносинаптичні (Sabatini et al., 1996).

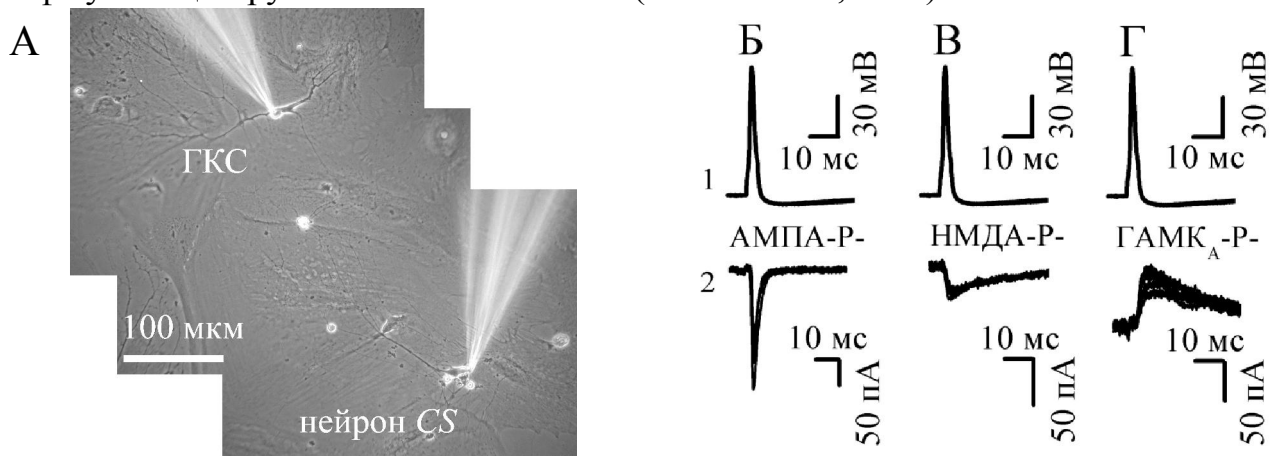


Рис. 1. Парна реєстрація від синаптично зв'язаних пар ГКС — нейрон CS. А – Мікрофотографічне зображення кокультивованої пари нейронів (24 доби *in vitro*) Б, В, Г – приклади типових АМПА-Р-, НМДА-Р- та ГАМК_A-Р-опосередкованих постсинаптичних струмів (2) нейронів CS, викликаних генерацією потенціалів дії (1) в ГКС, відповідно.

2. Квантове вивільнення нейротрансмітерів в синапсах проєкцій ГКС в CS за умов кокультури. Гістограми амплітуд НМДА-Р-опосередкованих мПСС, були унімодальними з модою $A_{\min} = -10,1 \pm 1,8$ пА ($n = 12$, рис. 2. А). Амплітуда мПСС є корелятом реакції відповідних постсинаптичних рецепторів на вивільнення одного кванта глутамата. Гістограми амплітуд сПСС були полімодальними (рис. 2. Б). Значення середньої відстані між модами не відрізнялися від величини першої моди і дорівнювали в середньому $-9,9 \pm 1,3$ пА ($n = 16$). Амплітудні гістограми вПСС були полімодальними з декількома (2–5) чітко вираженими рівновіддаленими модами (рис. 2. В). Відстань між модами в середньому становила $-10,0 \pm 1,4$ пА ($n = 20$) при -70 мВ. Ми виявили, що значення квантової події, визначене незалежними методами, достовірно ($p < 0,001$) не розрізнялися.

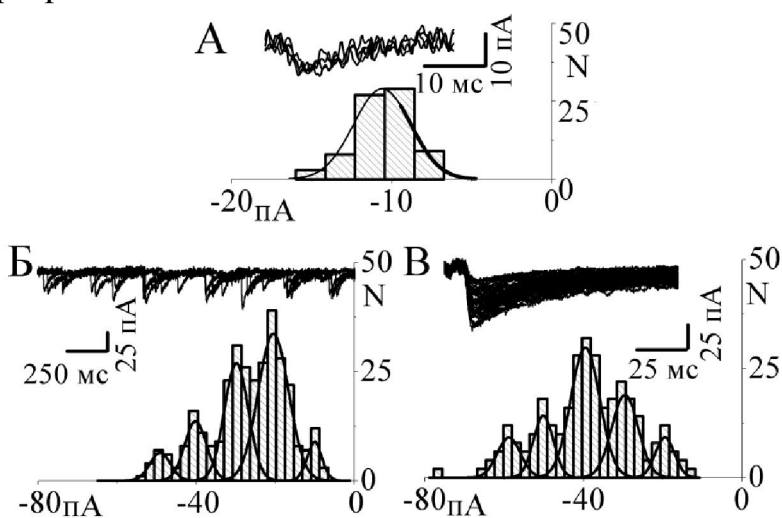


Рис. 2. Квантове вивільнення глутамата в синапсах між ГКС та нейронами CS. А, Б, В – репрезентативні гістограми та апроксимації НМДА-Р-опосередкованих глутаматергічних мініатюрних (мПСС), спонтанних (сПСС) та викликаних (вПСС) постсинаптичних струмів, відповідно. По осі абсцис на А, Б та В – амплітуда мПСС, сПСС та вПСС, по осі ординат – число відповідних подій (N). Нагорі

наведені записи відповідних струмів.

Апроксимація розподілу кількості одночасно вивільнених квантів біноміальним законом представлена на рис. 3. А. Квантовий вміст m для досліджуваних пар ГКС і нейронів CS був розрахований незалежно за допомогою методу «мініатюр» та гістограмного методу. Графічно представлена залежність отриманих значень для НМДА-Р-опосередкованих ПСС добре апроксимувалася лінійною функцією з нахилом 45° та коефіцієнтом кореляції 0,99 (див. рис. 3. а). Висока ступінь кореляції підтверджує придатність початкового припущення щодо значення квантової події та біноміального закону розподілу для опису експериментальних результатів.

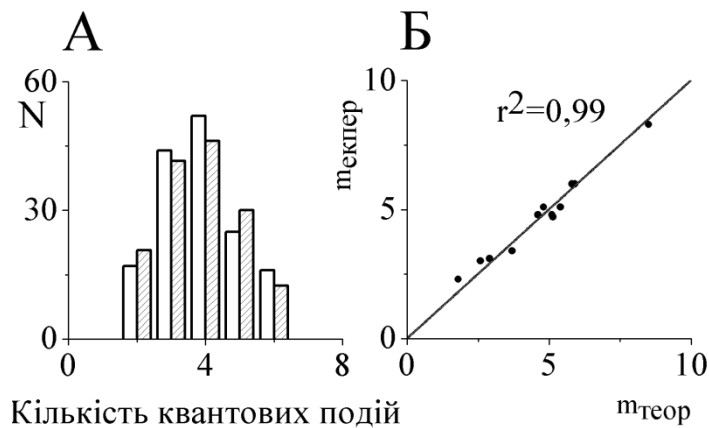


Рис. 3. Описання ймовірності вивільнення глутамата у синапсах кокультивованих ГКС і нейронів CS біноміальною статистикою. А – гістограма кількості одночасно вивільнених квантів, побудована на основі гістограми, наведеної на рис. 2. В. Білі стовпчики відповідають експериментальним результатам, заштриховані – значенням, визначеним при апроксимації біноміальним розподілом. Б – графік лінійної залежності значень

квантового вмісту $m_{\text{експер}}$ та $m_{\text{теор}}$, де $m_{\text{експер}}$ – середній квантовий вміст, розрахований за допомогою методу «мініатюр», $m_{\text{теор}}$ – середній квантовий вміст, розрахований за допомогою гістограмного методу.

Аналогічний квантовий аналіз був проведений для АМПА-Р- та ГАМК_A-Р-опосередкованих струмів. Отримані результати свідчать, що синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами CS характеризується наступними величинами квантового вмісту: 2–35 в глутаматергічних та 2–16 в ГАМК-ергічних контактах. Величина кванта глутамата та ГАМК в синапсах нейронів між ГКС та нейронами CS складала 10 пА. Ймовірність вивільнення обох медіаторів задовільно описувалася біноміальним законом.

3. Короткочасна пластичність глутамат- та ГАМК-ергічної синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS при парній стимуляції. Ми досліджували феномен короткочасної синаптичної пластичності в глутамат- та ГАМК-ергічних синаптичних контактах між ГКС та нейронами CS , що спостерігався за умов періодичної парної стимуляції пресинаптичного нейрона. Така форма пластичності виражається в зміні амплітуди ПСС, викликаного другим стимулом в парі. Коефіцієнт парної стимуляції (КПС) розраховували за формулою: $KPC = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\%$, де A_1 та A_2 – амплітуда

першого та другого вПСС відповідно. У випадку, коли $KPC < 100\%$, можна говорити про депресію, а коли $KPC > 100\%$ – про полегшення.

Парна стимуляція призводила до короткочасної депресії глутаматергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією виключно НМДА- або АМПА-рецепторканалних комплексів на постсинаптичній мембрані нейронів CS (рис. 4. Б, В). ГАМК-ергічна передача зазнавала короткочасної потенціації (рис. 4. Г).

Короткочасна депресія НМДА-Р-опосередкованих вПСС спостерігалася поряд з достовірним зменшенням кількості сайтів вивільнення n у порівнянні з контролем (на 42, 38, 19 та 13 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс, відповідно, рис. 5. А).

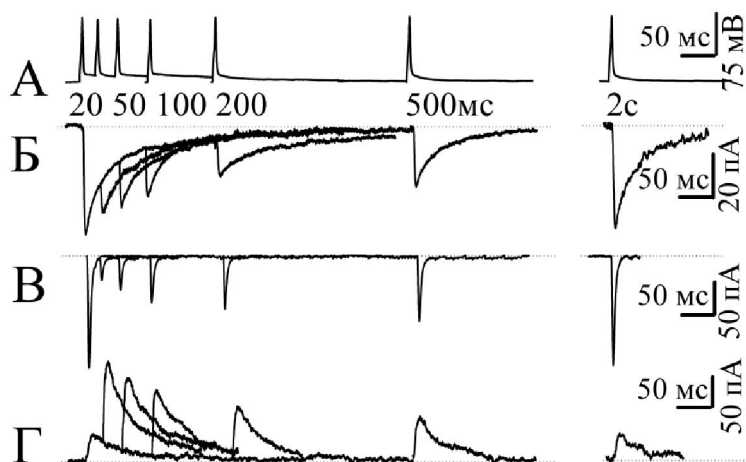


Рис. 4. Короткочасна пластичність синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS за умов парної стимуляції. А – приклади потенціалів дії (ПД) генерованих ГКС при заданих міжстимульних інтервалах. Б, В, Г – приклади реєстрацій НМДА-, АМПА- та ГАМК_A-Р-опосередкованих вПСС, відповідно, при вказаних інтервалах.

Короткочасна депресія АМПА-Р-опосередкованих вПСС була пов'язана з достовірним зменшенням величини кванта q на 27, 24, 22 та 20 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс, відповідно. Ймовірність вивільнення p зменшувалась на 21, 17, 14, 13 та 11 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100, 200 та 500 мс, відповідно; а кількість сайтів вивільнення n зменшувалась на 24, 21, та 16 % при міжстимульних інтервалах 20, 50 та 100 мс, відповідно (рис. 5. Б).

Короткочасна потенціація ГАМК-ергічної нейропередачі між ГКС та нейронами CS була пов'язана з достовірним збільшенням ймовірності вивільнення p на 45, 41, 26, 19 та 11 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100, 200 та 500 мс, відповідно. Кількість сайтів вивільнення n збільшувалась на 55, 43, 37 та 22 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс, відповідно (рис. 5. В).

Максимальні депресію та полегшення спостерігали при мінімальних міжстимульних інтервалах.

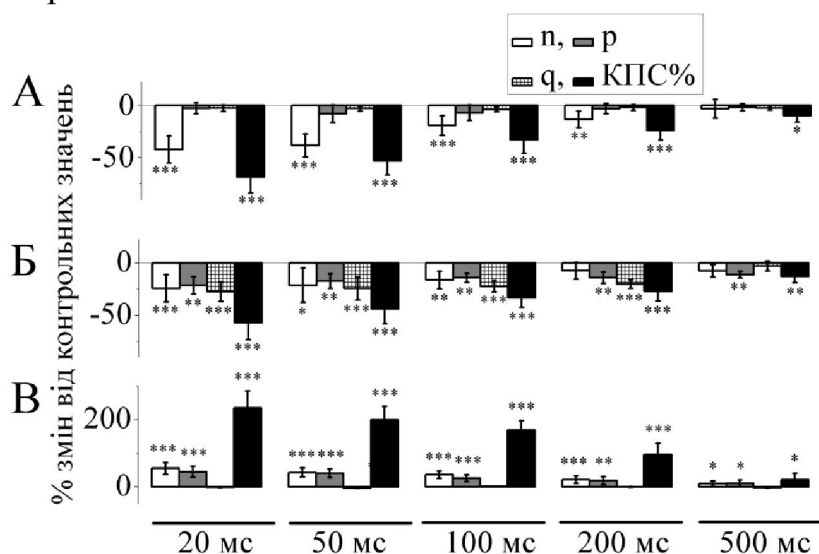


Рис. 5. Діаграми нормованих змін квантових та біноміальних параметрів. А, Б, В – графічні зображення середніх нормованих змін величин n , p , q та коефіцієнта парної стимуляції (КПС) при заданих міжстимульних інтервалах.

4. Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між кокультивованими ГКС та нейронами CS. Ми дослідили зміну ефективності синаптичної передачі в парі ГКС – нейрон CS, опосередковану дефіцитом кисню. Експерименти зі сПСС та мПСС проводили за наступним протоколом: на досліджувану пару нейронів аплікували зовнішньоклітинний розчин протягом 5 хв (контроль), після чого цей розчин заміняли відповідним гіпоксичним розчином (5 хв, гіпоксія), з наступною повторною подачею контрольного зовнішньоклітинного розчину (5 хв, реоксигенація). Достовірних змін потенціалу спокою досліджуваних пар клітин протягом гіпоксії та реоксигенації щодо контролю не спостерігалось.

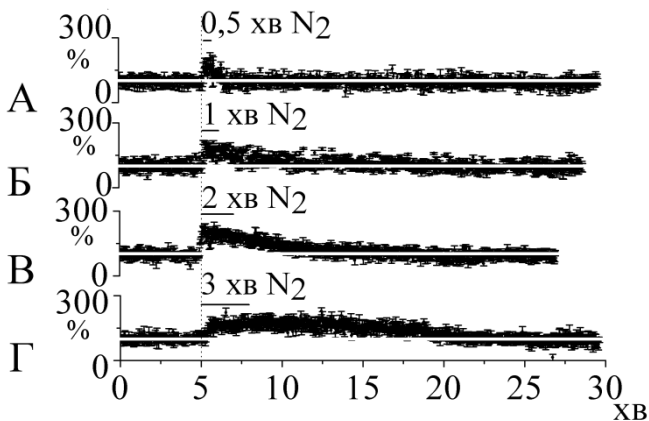


Рис. 6. Короточасна потенціація НМДА-Р-опосередкованої передачі у відповідь на нетривалу аплікацію гіпоксичного розчину. А, Б, В, Г – динаміка нормованих амплітуд НМДА-Р-опосередкованих вПСС в безмагнієвому розчині в присутності 20 мкМ DNQX до, під час та після аплікації гіпоксичного розчину.

4.1. Індукована гіпоксією зміна ефективності глутаматергічної НМДА-Р-опосередкованої передачі між кокультивованими ГКС та нейронами CS. Нетривала аплікація (до 3 хв) гіпоксичного розчину призводила до короточасної потенціації даного виду передачі (рис. 6). Залежність тривалості потенціації від часу аплікації досить добре описувалась лінійною залежністю.

Аплікація гіпоксичного розчину протягом 5 хв призводила до довготривалої потенціації (ДТП) НМДА-Р-опосередкованих вПСС (рис. 7. А). Амплітуди цих вПСС були достовірно ($p < 0,01$; $n = 18$) збільшені щодо контрольних значень на $61 \pm 7\%$ протягом періоду гіпоксії та на $29 \pm 6\%$ протягом періоду реоксигенації.

Ми дослідили гіпоксичний вплив на НМДА-Р-опосередковану синаптичну передачу у стандартному зовнішньоклітинному розчині з додаванням 20 мкМ DNQX ($n = 6$). Локальна аплікація безкисневого розчину на досліджувану пару нейронів призводила до появи НМДА-Р-опосередкованого вПСС у нейроні CS, при чому струм знову зникав у період реоксигенації (рис 7. Б, Б'). Наявність Mg^{2+} у розчині не давала можливості зареєструвати дані струми при підтримуваному потенціалі -70 мВ в контролі (Nowak et al., 1984). Тому постсинаптичний нейрон CS спочатку деполяризували до -40 або -30 мВ для підтвердження наявності функціонального синапсу у візуально ідентифікованій парі ГКС — нейрон CS. Після цього постсинаптичний нейрон утримували за нормальних фізіологічних умов (при -70 мВ). Можливість реєстрації НМДА-Р-опосередкованих вПСС під час гіпоксії ймовірно з'являлась в результаті ослаблення потенціалзалежного магнієвого блоку, який за фізіологічних умов є одним з відомих механізмів нейропротекторної дії (Mayer et al., 1984; Zito et al., 2009).

Гіпоксія зумовлює збільшення частоти НМДА-Р-опосередкованих сПСС ($n = 6$, рис. 8. А, а) і цей параметр залишається підвищеним протягом періоду реоксигенації.

Аналогічне збільшення частоти щодо контрольних значень спостерігалось при реєстрації мПСС ($n = 6$) протягом гіпоксії (рис. 8. б). Порівняльний аналіз амплітуд НМДА-Р-опосередкованих мПСС виявив досить стабільну появу другого піка в амплітудній гістограмі при реєстрації за гіпоксичних умов (рис. 8. 1, 2). Іншими словами, в номінально безкальцієвому розчині в присутності 1 мкМ ТТХ (ймовірність вивільнення нейротрансмітера зафіксована та мінімально можлива) спостерігалися як одно- так і двохквантове вивільнення синаптичних везикул.

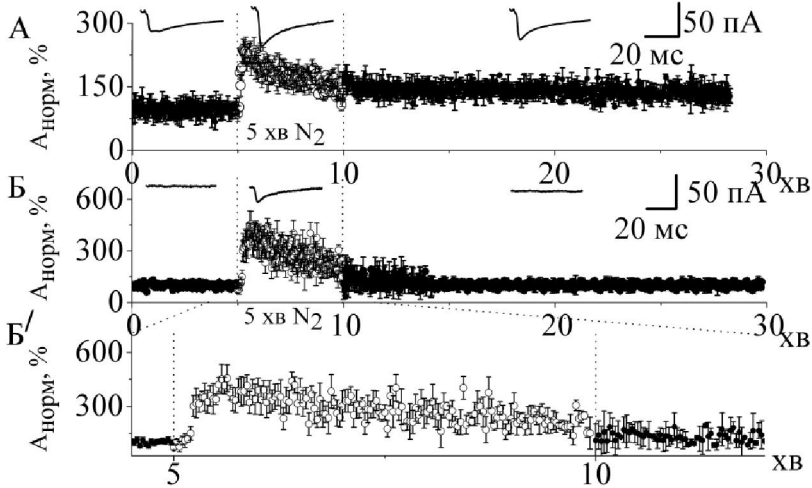


Рис. 7. Вплив довготривалої (5 хв) аплікації гіпоксичного розчину на НМДА-Р-опосередковані вПСС. А, Б – динаміка нормованих амплітуд вПСС до, під час та після аплікації гіпоксичного розчину в безмагнієвому та стандартному (2 мМ Mg^{+2}) зовнішньоклітинних розчинах, відповідно. Нагорі А і Б представлені репрезентативні записи вПСС у відповідному періоді. Б' – збільшене зображення частини графіку Б.

зображення частини графіку Б.

Аналіз значень нормованих змін біноміальних параметрів та коефіцієнту варіації НМДА-Р-опосередкованих вПСС показав, що ДТП спостерігалася поряд з достовірним збільшенням ($p < 0,001$) кількості сайтів вивільнення n у порівнянні з контролем на 56 та 50 % протягом періоду гіпоксії та реоксигенації, відповідно (рис. 8. В). Достовірних змін значень параметрів p та CV при гіпоксії та реоксигенації у порівнянні з контролем не виявлялося.

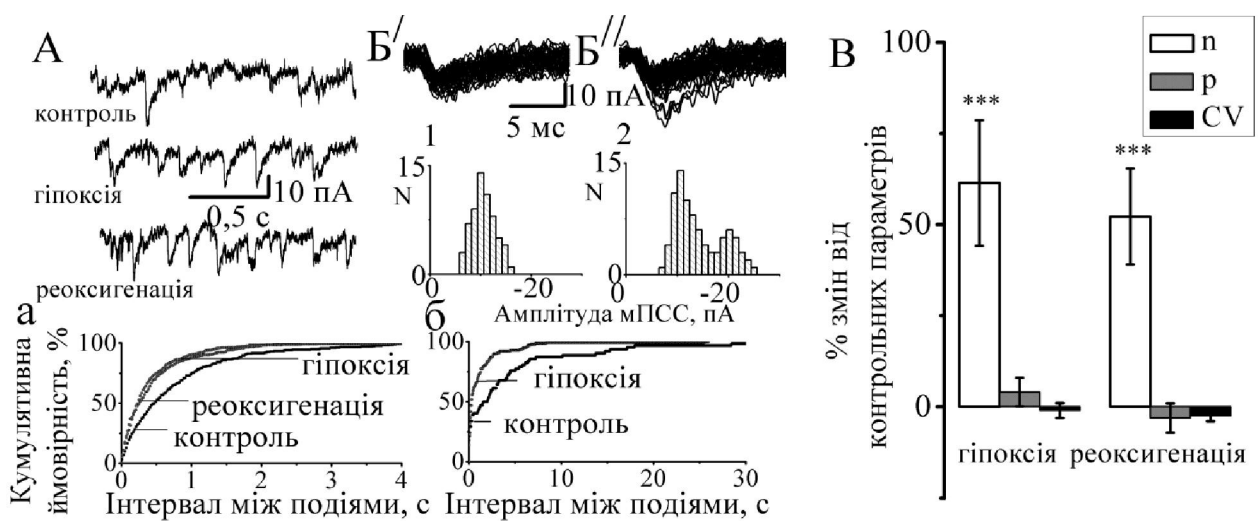


Рис. 8. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на НМДА-Р-опосередковані сПСС та мПСС. А – записи сПСС в контролі та протягом періодів гіпоксії та реоксигенації. а – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними подіями в контролі, при гіпоксії та протягом реоксигенації. Б, Б' – записи мПСС в контролі та протягом гіпоксії. 1, 2 – гістограми амплітуд мПСС в контролі та при гіпоксії, відповідно. б – графік кумулятивної

ймовірності інтервалів між мініатюрними подіями в контролі та при гіпоксії. В – діаграма середніх нормованих змін величин n , p та коефіцієнта варіації (CV) при гіпоксії та реоксигенації.

Отримані результати свідчать, що в реалізацію індукованої гіпоксією ДТП НМДА-Р-опосередкованої синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS залучаються пресинаптичні механізми, незалежні від ймовірності вивільнення нейротрансмітера, і пов'язані зі збільшенням кількості сайтів вивільнення.

4.2. Індукована гіпоксією зміна ефективності глутаматергічної АМПА-Р-опосередкованої передачі між кокультивованими ГКС та нейронами CS . Аплікація гіпоксичного розчину пригнічувала глутаматергічну синаптичну передачу, опосередковану активацією АМПА-рецепторканалних комплексів (рис. 9.). Амплітудні показники таких вПСС достовірно ($p < 0,01$) зменшувались (на $62 \pm 6\%$, $n = 20$) у порівнянні з показниками контролю лише протягом періоду гіпоксії. Гіпоксія зменшувала частоту появи сПСС ($n = 6$, рис. 10. А, а) та мПСС ($n = 5$, рис. 10. б). Амплітуди мПСС ($n = 5$) не виявили достовірних змін протягом періоду дефіциту кисню (рис. 10. Б', Б'', 1, 2).

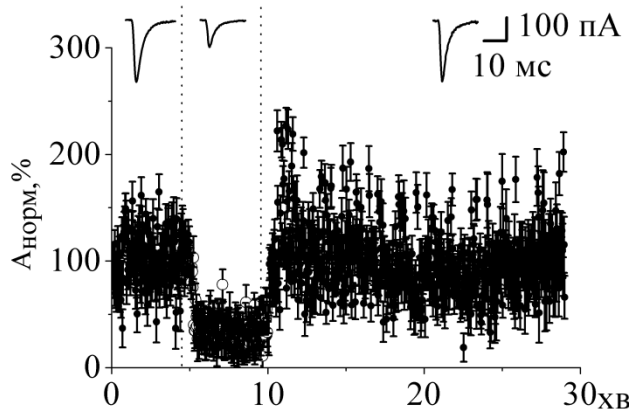


Рис. 9. Пригнічення АМПА-Р-опосередкованих вПСС протягом аплікації гіпоксичного розчину. Динаміка нормованих амплітуд вПСС в стандартному зовнішньоклітинному розчині в присутності $20 \mu\text{M}$ D_L -APV до, під час та після аплікації гіпоксичного розчину. Нагорі показані репрезентативні записи вПСС у межах відповідного періоду.

Опосередковане гіпоксією пригнічення АМПА-Р-опосередкованої передачі між ГКС та нейронами CS збігалось з достовірним ($p < 0,001$) зменшенням CV (на 47%) протягом гіпоксії та зі збільшенням цього показника (на 87%) протягом реоксигенації; а також зі зменшенням ймовірності вивільнення нейротрансмітера p на 24 та 13% ($p < 0,001$) протягом періодів гіпоксії та реоксигенації відповідно. Відбувалося також зменшення кількості сайтів вивільнення n (на 55% при $p < 0,001$) протягом гіпоксії (рис. 10. В). При цьому, як вже зазначалося раніше, гіпоксія лише пригнічувала дану синаптичну передачу, тобто достовірних змін амплітуд вПСС у періоді реоксигенації в порівнянні з контролем не спостерігалось.

Отже, аплікація гіпоксичного розчину пригнічувала АМПА-Р-опосередковану синаптичну передачу, за рахунок пресинаптичних механізмів.

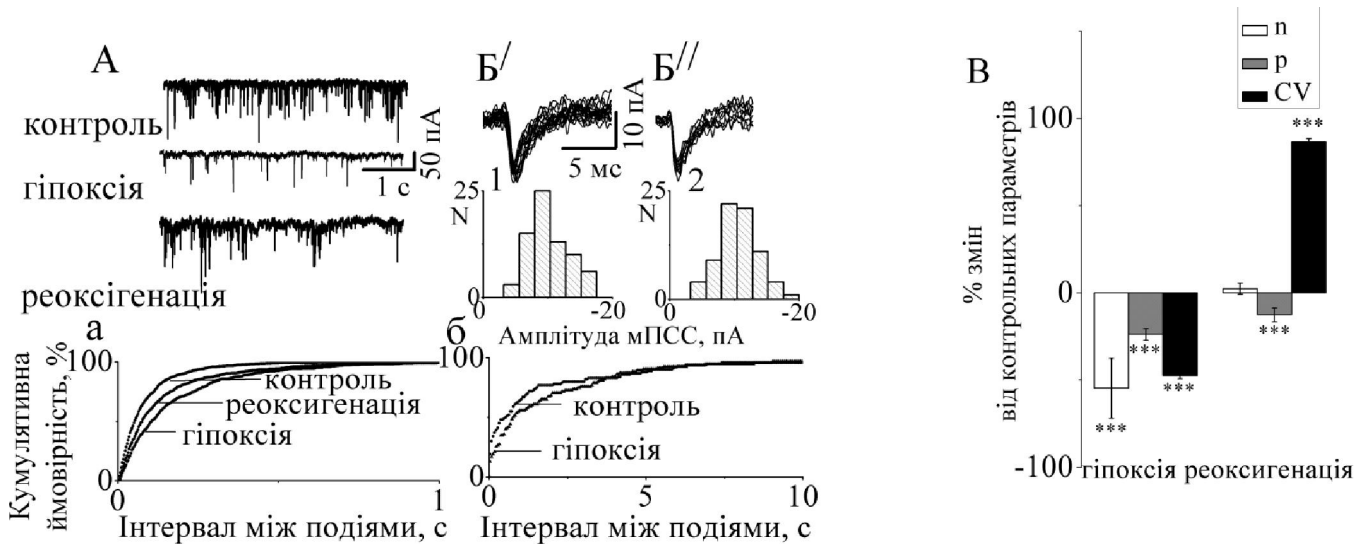


Рис. 10. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на АМПА-Р-опосередковані сПСС та мПСС. А - записи сПСС в контролі, протягом періодів гіпоксії та реоксигенації. а – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між сПСС в контролі, протягом гіпоксії та реоксигенації. Б', Б'' - записи мПСС в контролі та протягом гіпоксії. 1, 2 – гістограми амплітуд мПСС в контролі та при гіпоксії, відповідно. б – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між мініатюрними подіями в контролі та при гіпоксії. В – діаграма середніх нормованих змін величин n , p , та коефіцієнта варіації (CV) при гіпоксії та реоксигенації.

4.3. Індукована гіпоксією зміна ефективності ГАМК-ергічної нейропередачі між кокультивованими ГКС та нейронами CS. Аплікація гіпоксичного розчину призводила до довготривалої депресії (ДТД) ГАМК_A-Р-опосередкованої синаптичної передачі (рис. 11.). Достовірно ($p < 0,001$) зменшення амплітуди ГАМК_A-Р-опосередкованих вПСС на $47 \pm 9\%$ та на $39 \pm 6\%$ спостерігалось протягом гіпоксії та реоксигенації, відповідно. Гіпоксія майже повністю припиняла спонтанну активність (рис. 12. А, а). Аналіз гістограм амплітуд мПСС вказав на достовірне ($p < 0,01$) зменшення величини кванта протягом періоду дефіциту кисню ($A_{\min} = 10 \pm 2$ пА в контролі, $A_{\min} = 6 \pm 1$ пА протягом гіпоксії, рис. 12. Б', Б'', 1, 2) та частоти виникнення мПСС (рис. 12. б).

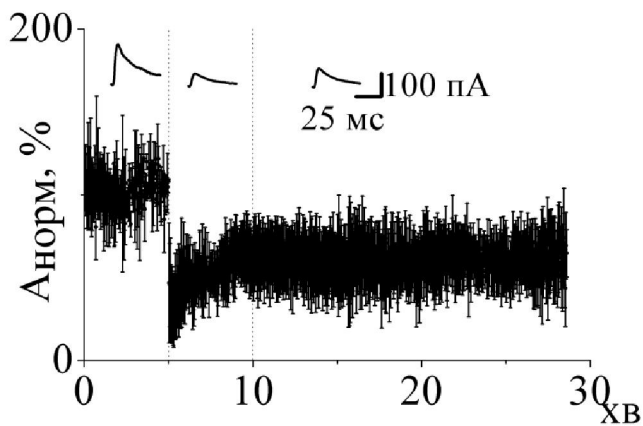


Рис. 11. Індукована гіпоксією довготривала депресія (ДТД) ГАМК_A-Р-опосередкованої синаптичної передачі. Динаміка нормованих амплітуд вПСС до, протягом та після аплікації гіпоксичного розчину. Нагорі представлені репрезентативні записи вПСС у відповідному періоді.

ДТД ГАМК-ергічної передачі між ГКС та нейронами CS супроводжувалась достовірним ($p < 0,001$) зменшенням кількості сайтів вивільнення n у порівнянні з контролем (на 51 та 47 % при гіпоксії та реоксигенації відповідно, рис. 12. В). Статистично достовірних змін значень p та CV при

гіпоксії та реоксигенації у порівнянні з контролем не виявлялося. Загалом індукована гіпоксією ДТД ГАМК-ергічної передачі, вірогідно, пов'язана як зі зменшенням кількості діючих сайтів вивільнення, так і зі зменшенням чутливості постсинаптичної мембрани до нейротрансмітера.

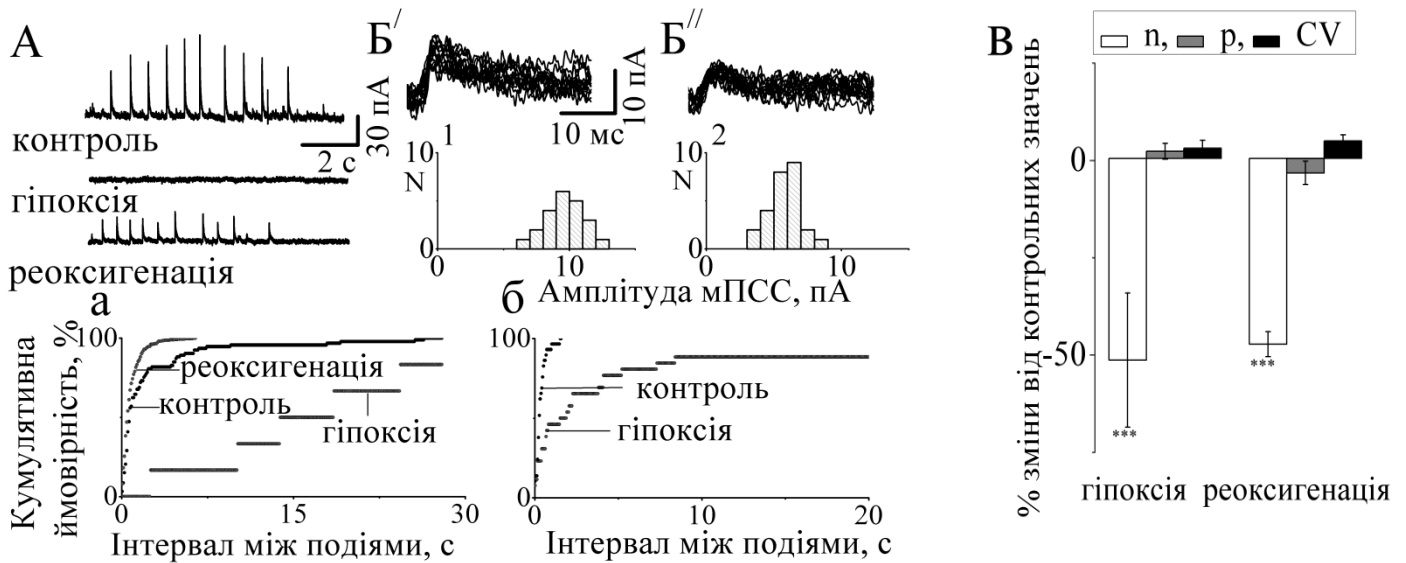


Рис. 12. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на ГАМК_A-Р-опосередковані сПСС та мПСС. А – записи сПСС в контролі, протягом гіпоксії та реоксигенації. а – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними подіями в контролі, протягом гіпоксії та реоксигенації. Б', Б'' – записи мПСС в контролі та протягом гіпоксії. 1, 2 – гістограми амплітуд мПСС в контролі та при гіпоксії відповідно. б – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між мініатюрними подіями в контролі та при гіпоксії. В – діаграма нормованих змін величин *n*, *p*, та коефіцієнта варіації (*CV*) при гіпоксії та реоксигенації.

Обговорення.

Результати проведених нами досліджень продемонстрували, що збуджувальна передача між ГКС та нейронами CS опосередковується вивільненням глутамата та активацією НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів. Гальмівна синаптична передача реалізується завдяки вивільненню ГАМК та активації ГАМК_A-рецепторканалних комплексів на постсинаптичних мембранах нейронів CS. Раніше було показано, що переважна більшість первинних аферентних входів аксонів ГКС в CS є глутаматергічними (Shi et al., 1997, Shah et al., 2008). У той же час близько 20% проєкцій гангліозних клітин на нейрони субкортикального зорового центру є ГАМК-ергічними (Shi et al., 1997; Binns et al., 1999; Lee et al., 2001). Фізіологічна роль ГАМК-ергічних проєкцій від ГКС до CS полягає в гетеросинаптичному контролі інтенсивності збудження і синаптичної пластичності глутаматергічної нейропередачі, зокрема в регулюванні НМДА-Р-опосередкованої активності (Aamodt et al., 2000; Shi et al., 1997; Juttner et al., 2001).

Властивості вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах окремих ГКС в цілому узгоджуються з фундаментальними положеннями квантової теорії (Katz, 1969; Katz, 1971). Визначені нами величини квантових подій – амплітуди НМДА-, АМПА- та ГАМК_A-Р-опосередкованих мПСС – виявилися практично однаковими і становили 10 пА. Дані величини, згідно існуючої теорії, відображають постсинаптичну відповідь на

вивільнення вмісту однієї синаптичної везикули. Гістограми амплітуд мПСС були мономодальними, що може бути інтерпретоване, як доказ незалежності вивільнення поодиноких синаптичних везикул в окремих сайтах вивільнення.

Нами було також показано, що синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами *CS* характеризується наступними величинами квантового вмісту: 2–35 в глутаматергічних та 2–16 в ГАМК-ергічних контактах. Таке співвідношення, вірогідно, гарантує досить високу надійність передачі аферентних сигналів і відображає істотну синхронність вивільнення синаптичних везикул у відповідь на надходження ПД по аксону ГКС. Ми припустили, що даний багатоквантовий характер вивільнення медіаторів може бути пов'язаний зі збудженням декількох терміналей пресинаптичного аксона з однією активною зоною (АЗ) або однієї терміналі з декількома зонами. Класичні роботи з аналізу даних електронної мікроскопії та тривимірної реконструкції структури синапсів ЦНС показали, що поодинока пресинаптична терміналь може мати як одну, так і декілька АЗ, а також виявили наявність лінійної залежності розміру АЗ від кількості синаптичних везикул, що “стикуються” з мембраною пресинаптичної терміналі (Rusakov et al., 1990; Veselovsky et al., 1996; Walmsley et al., 1987). Не виключено, що в нашому випадку, в організації синаптичного контакту могли брати участь декілька, близько розташованих, терміналей з однією АЗ у кожній з них або одна терміналь з декількома зонами. Обидва припущення узгоджуються з результатами статистичної оцінки ультраструктурних параметрів синапсів в *CS* (Vidal-Sanz et al., 1991; Mize et al., 2000). Дані електронної мікроскопії вказують на наявність синаптичних терміналей двох типів в *CS*. Синапси першого типу являють собою угруповання великої кількості малих за розмірами пресинаптичних терміналей з однією АЗ у кожній з них. Вони спостерігаються в верхніх шарах *stratum griseum superficiale* та *stratum opticum CS*. Синапси другого типу характеризуються значними розмірами пресинаптичних терміналей, що мають по декілька АЗ і спостерігаються в нижніх шарах *stratum griseum superficiale* та *stratum opticum CS*.

Ми показали, що розподіл кількості вивільнених квантів обох трансмітерів в синапсах між ГКС та нейронами *CS* відповідає біноміальному закону. Біноміальна модель є загальноприйнятою для опису квантового вивільнення в синапсах ЦНС (del Castillo et al., 1954; Redman et al., 1990; Voronin et al., 1994; Powis et al., 1995).

Нами було досліджено зміну ефективності синаптичної передачі за умов парної стимуляції, як одну з форм короточасної пластичності, в глутаматергічних та ГАМК-ергічних синаптичних контактах між кокультивованими ГКС та нейронами *CS*. Спостерігали депресію глутаматергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією виключно НМДА- або АМПА-рецепторканалних комплексів, на постсинаптичній мембрані нейронів *CS* та полегшення ГАМК-ергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів.

Дослідження механізмів короточасної пластичності синаптичної передачі між вказаними популяціями нейронів проводили раніше на парасагітальних переживаючих зрізах *CS* (Henneberger et al., 2002; Neale et al., 2006; Lu et al., 2004). При цьому через відсутність чіткої ідентифікації пре- та постсинаптичних одиниць за даних умов та певні ліміти у виборі електрофізіологічних методів дослідження, відомості про механізми

депресії та полегшення синаптичної передачі між ГКС та нейронами *CS* поки залишалися досить обмеженими.

У всіх синаптично зв'язаних парах нейронів, в яких спостерігався ефект депресії глутаматергічної синаптичної передачі, кореляційний зв'язок між амплітудами першого та другого вПСС був відсутнім. Проте було виявлено близьку до зворотної нелінійну залежність *KPC* від амплітуди першого вПСС. Наявність зворотної кореляції, а також нерівність дисперсій амплітуд вПСС, викликаних першим та другим стимулами, як правило, інтерпретуються як результат вичерпання пула готових до вивільнення синаптичних везикул. Однак є сумнівним, що дія поодинокого стимула може суттєво зменшити кількість готових до вивільнення везикул. Багаточисельні мікрофотографії свідчать, що в пресинаптичних терміналях *CS* може бути наявними близько двох десятків готових до негайного вивільнення везикул та близько 10^2 синаптичних везикул у терміналі загалом (Vidal-Sanz et al., 1987; Tigges et al., 1973; Kucukdereli et al., 2011). Ми показали, що за умов кокультури та з використанням методу парної реєстрації вПСС у відповідь на одиничний ПД опосередковуються одночасним вивільненням від двох до тридцяти п'яти квантів глутамата. Тому можливість того, що в основі короткочасної депресії глутаматергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами *CS* за умов парної пресинаптичної стимуляції лежить ефект виснаження пула готових до вивільнення синаптичних везикул ми вважаємо малоімовірною.

Аналіз динаміки нормованих біноміальних та квантових параметрів щодо контрольних, отриманих з використанням базового та повного квантового аналізу, показав, що депресія НМДА-Р-опосередкованих вПСС супроводжувалась достовірним зменшенням кількості сайтів вивільнення *n*, а депресія АМПА-Р-опосередкованих вПСС – достовірним зменшенням як величини кванта *q* так і ймовірності вивільнення *p* та кількості сайтів вивільнення *n*. Іншими словами, в першому випадку аналіз вказує на ймовірну пресинаптичну локалізацію механізмів депресії (за рахунок зменшення числа сайтів вивільнення), тоді як в другому – на можливість як пре- так і постсинаптичних механізмів (зменшення числа сайтів та ймовірності вивільнення трансмітера, а також десенситизацію постсинаптичних рецепторів). В обох випадках ефект депресії обумовлювався зменшенням кількості сайтів вивільнення *n* і відповідно зменшенням квантового вмісту *m*.

В літературі наявні роботи, в яких запропоновано гіпотезу про різні механізми короткочасної пластичності при парній стимуляції для синапсів різного розміру та ультраструктури (Royer et al., 2000; Wang et al., 1998; Wandell et al., 2011; Wang et al., 1997). При достовірно однакових параметрах зміни ефективності нейропередачі, що відображається в значеннях коефіцієнту парної стимуляції, механізми пластичності в великих та малих за розмірами синапсах розрізняються. У великому синапсі, що має значну кількість сайтів з великою ймовірністю вивільнення, депресія швидше може бути наслідком зменшення кількості сайтів вивільнення, ніж наслідком зменшення ймовірності вивільнення трансмітера в даних сайтах. Короткочасна депресія в малих за розмірами синапсах – буде наслідком зменшення ймовірності вивільнення.

Короткочасна депресія може обумовлюватись не лише особливостями роботи пресинаптичної терміналі, а і можливою десенситизацією постсинаптичних рецепторів (Wu et al., 1999; Meyer et al., 2001). В деяких роботах зміну величини кванта *q* при

короткочасній синаптичній пластичності асоціюють зі зміною кількості трансмітера в одній везикулі (Fleiderovich et al., 1995).

Ми показали, що при полегшенні ГАМК_A-Р-опосередкованих вПСС відбувається достовірне збільшення пресинаптичних факторів n , p і відповідно квантового вмісту m . Таким чином, ефект полегшення може обумовлюватися модуляцією роботи пресинаптичної терміналі і бути результатом збільшення кількості синаптичних везикул, що вивільнилися (Hess et al., 1987; Jiang et al., 2000).

Синаптична пластичність, що проявляється у довго- або короткотривалих змінах ефективності синаптичної передачі, є однією з основних властивостей ЦНС. Довготривала потенціація, зумовлена збільшенням пресинаптичної імпульсної активності, як одна з форм синаптичної пластичності, в ЦНС опосередковує такі когнітивні процеси вищої нервової діяльності, як навчання та пам'ять, і є кардинальною фізіологічною властивістю нервової системи (Brown et al., 1988; Malenka et al., 1988).

Відомо також, що феномени патологічної синаптичної пластичності асоційовані з механізмами, що лежать в основі таких нейродегенеративних захворювань як епілепсія, хвороба Альцгеймера, шизофренія, інсульт, а також реалізуються в умовах мозкової травми (Rison et al., 1995; McEachern et al., 1999). В патогенезі багатьох подібних захворювань істотним діючим фактором є гіпоксія. Гіпоксичні ураження саме проєкцій сітківки в *CS* досліджені відносно детально на рівні структурних порушень та судинних реакцій за допомогою методів магнітно-резонансної томографії (Duong et al., 2014; Chan et al., 2015; Zhou et al., 2013). Разом з тим ефекти та механізми гіпоксичного впливу на передачу через ці окремі синапси дотепер досліджені не були.

Ми провели серію експериментів, які дозволили охарактеризувати ефекти та механізми гіпоксичного впливу на синаптичну передачу між кокультивованими ГКС та нейронами *CS*. В експериментах в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині в присутності 20 мкМ DNQX та при підтримуваному потенціалі -70 мВ аплікація гіпоксичного розчину тривалістю від 0,5 до 3 хв призводила до короткочасної потенціації НМДА-Р-опосередкованих вПСС. Залежність тривалості потенціації НМДА-Р-опосередкованої передачі від вказаних значень часу аплікації гіпоксичного розчину була лінійною. Довготривала (від 30 до 60 хв) потенціація НМДА-Р-опосередкованої нейропередачі розвалася при тривалостях аплікації порядку 5 хв. Подібне полегшення НМДА-Р-опосередкованої синаптичної активності спостерігалось іншими авторами в умовах *in vivo* при гіпоксично-ішемічних ушкодженнях гіпокампа (Crepel et al., 1993; Hori et al., 1994). Посилення активності цих рецепторканалних комплексів опосередковує надмірне збільшення входу іонів Ca^{2+} всередину клітини і, як наслідок, її загибель. В роботі інших авторів було виявлено зменшення ішемічних ушкоджень під дією антагоністів НМДА-рецепторканалних комплексів (Vidal-Sanz et al., 1997). Також було показано, що прикладання антагоністів НМДА-рецепторканалних комплексів пригнічує індукований ішемією вхід іонів кальцію всередину клітини (von Gersdorff et al., 1996).

Ми виявили, що вплив дефіциту кисню на НМДА-Р-опосередковані сПСС та мПСС призводить до збільшення частоти їх виникнення та появу другої моди в гістограмі амплітуд мПСС (розмір кванта залишався незмінним). Мініатюрні струми реєстрували в номінально безкальцієвому розчині в присутності ТТХ (1 мкМ). У таких умовах

ймовірність вивільнення трансмітера є фіксованою і мінімально можливою. Тому в межах прийнятої нами моделі появу другої моди можна пояснити ймовірним збільшенням кількості сайтів вивільнення n .

Проведений нами аналіз квантових та біноміальних параметрів також вказує на збільшення загальної кількості сайтів вивільнення n . Раніше було досліджено структурні модифікації синапсів протягом гіпоксичного ушкодження та через певний час після нього (Jourdain et al., 2002; Piccini et al., 2001). Автори робіт, використовуючи короткочасну (2—10 хв) киснево-глюкозну депривацію, як модель ішемії *in vitro*, досліджували структурні зміни синаптичних контактів в огранотиповій культурі гіпокампу за допомогою двохфотонної конфокальної мікроскопії. Вони показали, що стійкі структурні зміни (збільшення розмірів постсинаптичних шипиків та розмірів пресинаптичних бутонів) починаються одразу після початку киснево-глюкозної деривації. При збільшенні тривалості ішемії *in vitro* (> 10 хв) автори спостерігали протилежні ефекти – втрату синаптичних контактів.

Відомо, що НМДА-рецепторканальні комплекси потенціалзалежно блокуються іонами Mg^{2+} (Mayer et al., 1984). Тому, аналогічно нашим експериментам у безмагнієвому розчині, ми провели серію досліджень впливу гіпоксії на НМДА-Р-опосередковану передачу в стандартному зовнішньоклітинному розчині (2 мМ Mg^{2+}) в присутності блокатора АМПА-Р-опосередкованої передачі (20 мкМ DNQX) при підтримуваному потенціалі – 70 мВ. За таких умов протягом аплікації гіпоксичного розчину ми спостерігали появу НМДА-Р-опосередкованого вПСС, що імовірно відбувалось за рахунок послаблення магнієвого блоку цих рецепторканальних комплексів.

Індуковане гіпоксією ослаблення магнієвого блоку було описано лише деякими авторами в слайсах гіпокампу, *in vitro*, а також при гіпоксії *in vivo* (Hori et al., 1994; Pohorecki et al., 1990). Механізми подібного ослаблення за нормальних електрофізіологічних умов дотепер не мають чітко визнаної інтерпретації. Було показано, що активація протеїнкінази С призводить до ослаблення магнієвого блоку (Hsu et al., 1998). Раніше було показано, що протеїнкінази наявні в пресинаптичних терміналях проєкцій сітківки в латеральному колінчатому тілі (Calkin et al., 2005) та в CS (Schmidt et al., 2004). Участь залежної від активності активації пресинаптичної протеїнкінази С в розвитку довготривалої пластичності синаптичної передачі була показана в багатьох синапсах ЦНС (Wandell et al., 2011; Bragr et al., 2003). Вважається імовірним, що короткочасна гіпоксія призводить до активації протеїнкінази С, дія якої опосередковує ефект ослаблення і модулює довготривалу потенціацію НМДА-Р-опосередкованої передачі. Підтримує це припущення той факт, що аплікація інгібіторів протеїнкінази С зумовлює нейропротекторний ефект при ішемічному пошкодженні нейронів (Hajimohammadreza et al., 1995; Hsu et al., 1998).

Ми показали, що аплікація гіпоксичного розчину призводила до пригнічення АМПА-Р-опосередкованої глутаматергічної синаптичної передачі, яка без значних затримок відновлювалась протягом реоксигенації. Дефіцит кисню зумовлював зменшення частоти виникнення як сПСС, так і мПСС у порівнянні з контролем. Було виявлено достовірні зміни ймовірності вивільнення трансмітера p та кількості сайтів вивільнення n протягом періоду гіпоксії. Загалом, аналіз результатів незалежних методів базового та повного квантового аналізу вказує на залучення виключно

пресинаптичних механізмів у реалізацію індукованого гіпоксією пригнічення АМПА-Р-опосередкованої передачі між ГКС та нейронами *CS*. В деяких дослідженнях було показано, що ослаблення ефективності синаптичної передачі при короткотривалій гіпоксії пов'язане з пресинаптичною дисфункцією і асоційоване зі зменшенням ймовірності вивільнення синаптичних везикул p та кількості сайтів вивільнення n (Choi et al., 1997; Geiman et al., 2011).

Цікавим є той факт, що індукована гіпоксією довготривала потенціація НМДА-Р-опосередкованої передачі і тимчасове пригнічення АМПА-Р-опосередкованої глутаматергічної синаптичної передачі відбувалися за рахунок пресинаптичних механізмів. Така різноспрямованість дії гіпоксії на глутаматергічну синаптичну передачу в даних синапсах може пояснюватися наявністю блокатора D_L -APV в концентрації 20 мкм при реєстрації АМПА-Р-опосередкованих подій. Цей блокатор впливає як на пре- так і на постсинаптичні НМДА-рецепторканалні комплекси. Модуляційний вплив пресинаптичних рецепторів на параметри вивільнення трансмітера є загальновідомим і був показаний зокрема для вивільнення глутамата в гіпокампі (Maximino et al., 2008), смугастому тілі (Bustos et al., 1992), зоровій корі (Sjostrom et al., 2003). Наявність пресинаптичних НМДА-рецепторканалних комплексів була встановлена в синаптичних контактах між ГКС та нейронами *CS* (Lien et al., 2006). НМДА-Р-опосередкований вхід кальцію в пресинаптичну терміналь може впливати на параметри квантового вивільнення декількома шляхами. По-перше, вхід кальцію через пресинаптичні НМДА-рецепторканалні комплекси деполяризує пресинаптичну мембрану, і кальцій починає входити в терміналь через потенціалзалежні кальцієві канали (Chan et al., 2015). По-друге, кальційзалежні протеїнкінази можуть модулювати параметри вивільнення трансмітера (Strack et al., 2000), що є необхідними умовами для НМДА-Р-опосередкованої довготривалої потенціації.

Аплікація гіпоксичного розчину призводила до ДТД ГАМК-ергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів. Ми виявили суттєве зменшення частоти виникнення сПСС і мПСС та величини кванта при дефіциті кисню. Ймовірніше за все, зменшення величини кванта пов'язане зі зниженням чутливості рецепторів постсинаптичної мембрани, так як досить сумнівно, що за використаних тривалостей періоду гіпоксії при реєстрації мПСС можливі зміни пресинаптичного характеру (такі, як зміна розміру везикули та/або концентрації трансмітера в кожній везикулі). Загалом, в основі ефекту індукованої гіпоксією ДТД ГАМК-ергічної синаптичної передачі лежить комплекс змін, як пресинаптичних (незалежних від ймовірності вивільнення), так і постсинаптичних (зумовлених зменшенням чутливості рецепторів постсинаптичної мембрани).

Нами описано різноспрямованість довготривалих ефектів збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі між ГКС та нейронами *CS* опосередкованих дефіцитом кисню. В багатьох дослідженнях нейродегенеративних захворювань ГАМК-ергічна синаптична передача розглядається як така, що має певну нейропротекторну дію за рахунок контролю збудження та синаптичної пластичності глутаматергічної передачі (Xu et al., 2016; Nava-Mesa et al., 2014). Індукована гіпоксією ДТД ГАМК-ергічної передачі посилює патологічну дію ДТП НМДА-Р-опосередкованої нейропередачі в

синапсах між ГКС та нейронами CS та імовірно є додатковим патологічним механізмом пошкоджуючої дії гіпоксії на передачу зорової інформації від сітківки в ЦНС.

Отримані результати мають істотне практичне значення для розуміння проблематики гіпоксичних ушкоджень зорової системи на рівні аферентних входів сітківки в субкортикальний зоровий центр та розробки відповідних терапевтичних заходів.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі з використанням досліджень окремих кокультивованих пар гангліозних клітин сітківки (ГКС) та нейронів *colliculus superior* (CS) визначено характеристики синаптичної передачі в нормі та при дефіциті кисню.

1. Вперше розроблено метод кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS. Збуджувальна передача між ГКС та нейронами CS опосередковується вивільненням глутамата та активацією НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів. Гальмівна синаптична передача відбувається завдяки вивільненню ГАМК та активації ГАМК_A-рецепторканалних комплексів. Ймовірність вивільнення обох нейротрансмітерів задовільно описується біноміальним законом.

2. В умовах парної стимуляції відбувається короткочасна депресія глутаматергічної передачі та потенціація ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Ці процеси реалізуються переважно за рахунок пресинаптичних механізмів.

3. Вперше виявлено індуковану гіпоксією довготривалу потенціацію НМДА-рецепторопосередкованої передачі в синаптично зв'язаній парі ГКС — нейрон CS. Цей феномен пов'язаний з ослабленням магнієвого блоку даних рецепторів та ймовірним збільшенням загальної кількості сайтів вивільнення в активних синапсах.

4. Вперше показано індуковане гіпоксією пригнічення АМПА-рецепторопосередкованої синаптичної передачі, що реалізується за рахунок пресинаптичних механізмів.

5. Вперше охарактеризовано індуковану гіпоксією довготривалу депресію ГАМК-ергічної нейропередачі між ГКС та нейронами CS. Така модуляція імовірно пов'язана як зі зменшенням кількості діючих сайтів вивільнення, так і зі зменшенням чутливості постсинаптичної мембрани до трансмітера.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. **Думанська Г.В.** Первинна культура дисоційованих клітин сітківки щура в умовах тривалого культивування: властивості гангліозних клітин / Г.В. Думанська, О.Е. Пурнинь, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2011. – Т. 43, № 4. – С. 369–371. (*Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті*).

2. **Думанська Г.В.** Хімічна нейропередача між гангліозними клітинами сітківки та нейронами верхнього чотиригорбикового тіла в умовах тривалого суміжного культивування / Г.В. Думанська, С.О. Кошелева, М.С. Веселовський // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2012. – Т. 44, № 5. – С. 409–415. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

3. **Думанська Г.В.** Характеристики квантового вивільнення глутамату та ГАМК у синапсах між кокультивованими гангліозними клітинами сітківки та нейронами *superior colliculus* / Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський // *Фізіол. журн.* – 2014. – Т. 60, № 1. – С. 3–10. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

4. **Думанська Г.В.** Короткочасна пластичність глутамат- та ГАМК-ергічної синаптичної передачі між кокультивованими гангліозними клітинами сітківки та нейронами *superior colliculus* / Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2014. – Т. 46, № 4. – С. 343–351. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

5. **Думанська Г.В.** Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між гангліозними клітинами сітківки та нейронами *superior colliculus* в умовах кокультури / Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський // *Фізіол. журн.* – 2015. – Т. 61, № 6. – С. 119–128. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

Патент:

1. Пат. 26863 Україна, МПК С12 N 5/02. Пристрій для спільного культивування нейронів різних відділів головного та спинного мозку / **Думанська Г.В.**, Веселовський М.С.; заявник і патентовласник НТУУ “КПІ” – заявл. 25.02.2007; опубл. 10.10.2007, Бюл. №16. *(Особистий внесок здобувача: розробка корисної моделі та оформлення результату у вигляді патенту).*

Тези доповідей:

1. **Думанська Г.В.** Методика отримання первинної культури дисоційованих клітин сітківки / Г.В. Думанська, О.Е. Пурнинь, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський // V Конгрес Українського товариства нейронаук, 6 – 10 червня 2011 р. : тези доп. – Київ, 2011. – С. 82.

2. **Думанська Г.В.** Гангліозні клітини в первинній культурі дисоційованих нейронів сітківки щура / Г.В. Думанська, О.Е. Пурнинь, М.С. Веселовський // V з'їзд Українського біофізичного товариства, 22–25 червня, 2011 р. : тези доп. – Луцьк, 2011. – С. 55.

3. **Думанська Г.В.** Вплив тривалості культивування на властивості гангліозних клітин сітківки щура / Г.В. Думанська, О.Е. Пурнинь, О.В. Рихальський, М.С.

Веселовський // “Фізіологія: від молекули до організму” : Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених, 20–21 жовтня, 2011р. : тези доп. – Київ, 2011. – С. 106.

4. **Dumanska G.V.** Spontaneous and evoked activity of long-term cultivated retinal ganglion cells / G.V. Dumanska, H.E. Purnyn, N.S. Veselovsky // 8th FENS Forum of Neuroscience, July 14–18, 2012. : Abstract Number : 400, Volume 6. – Barcelona, 2012. – P. 099.07.

5. **Dumanska G.V.** Distribution of functional roles of glutamate receptors subtypes in mediation of excitatory synaptic transmission between retinal ganglion cells and superior colliculus neurons in co-culture / G.V. Dumanska, M.S. Veselovsky // “Molecular mechanisms of synaptic transmission regulation” : II International symposium in memory of V. Skok, October 6–9, 2012. : Abstracts. – Kyiv, 2012. – P. 15.

6. **Dumanska G.V.** Presynaptic modulation of synaptic transmission in cultured retinal ganglion cells / G.V. Dumanska, O.V. Rikhalsky and N.S. Veselovsky // “Physiology: from Molecules to the Body” : II Scientific Conference of Young Physiologists, 8–9 October, 2012. : Abstracts. – Kyiv, 2012. – P. 45.

7. **Думанская А.В.** Особенности химической нейротрансдукции между ганглиозными клетками сетчатки и нейронами верхнего четверохолмия в условиях совместного культивирования / А.В. Думанская // «Современные экспериментальные подходы для поиска и характеристики новых нейротропных фармакологически активных веществ» : Російсько-Український семінар, 23–25 вересня 2012 г. : тезиси докл. – Москва, 2012. – С. 18.

8. **Dumanska G.V.** Short-term plasticity of synaptic transmission between co-cultured retinal ganglion cells and superior colliculus neurons / G.V. Dumanska, O.V. Rikhalsky, and N.S. Veselovsky // VI Congress of the Ukrainian Society of Neuroscience, 4–8 June, 2014. : Abstracts. – Kyiv, 2014. – P. 68.

9. **Думанська Г.В.** Первинна культура дисоційованих клітин верхнього чотиригорбикового тіла (superior colliculus) щура в умовах тривалого культивування / Г.В. Думанська, Д.В. Шарко, // XIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, 21-23 травня, 2015 р. : тези доп. – Київ, 2015. – С. 88-89.

АНОТАЦІЯ

Думанська Г.В. Синаптична передача між гангліозними клітинами сітківки та нейронами *colliculus superior* в кокультурі в нормі та при гіпоксії. – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена з'ясуванню характеристик синаптичної передачі в синапсах аферентних проєкцій сітківки в субкортикальний зоровий центр з використанням досліджень окремих пар кокультурованих гангліозних клітин сітківки (ГКС) та нейронів *colliculus superior* (CS) в нормі та при гіпоксії. Показано, що збуджувальна передача між ГКС та нейронами CS опосередковується пресинаптичним вивільненням глутамата та активацією постсинаптичних НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів. Гальмівна синаптична передача відбувається завдяки вивільненню ГАМК та активації ГАМК_A-рецепторканалних комплексів на постсинаптичній мембрані нейронів CS. Описано характеристики квантового вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах

синаптично зв'язаних пар ГКС – нейрон *CS* та визначено, що ймовірність вивільнення обох трансмітерів описується біноміальним законом. Описано короткочасну депресію глутаматергічної передачі та потенціацію ГАМК-ергічної синаптично передачі в умовах парної стимуляції ГКС. Визначено, що ці процеси реалізуються переважно за рахунок пресинаптичних механізмів. Вперше виявлено індуковану гіпоксією довготривалу потенціацію (ДТП) НМДА-рецепторопосередкованої передачі в синаптично зв'язаній парі ГКС — нейрон *CS*. Цей феномен пов'язаний з ослабленням магнієвого блоку даних рецепторів та ймовірним збільшенням загальної кількості сайтів вивільнення в активних синапсах. Індуковане гіпоксією пригнічення АМПА-рецепторопосередкованої синаптичної передачі реалізується за рахунок пресинаптичних механізмів. Вперше охарактеризовано індуковану гіпоксією довготривалу депресію (ДТД) ГАМК-ергічної нейропередачі. Така модуляція ймовірно пов'язана як зі зменшенням кількості діючих сайтів вивільнення, так і зі зменшенням чутливості постсинаптичної мембрани до трансмітера. Нами описано різноспрямованість довготривалих ефектів збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі між ГКС та нейронами *CS* опосередкованих дефіцитом кисню. Індукована гіпоксією ДТД ГАМК-ергічної передачі посилює патологічну дію ДТП НМДА-Р-опосередкованої нейропередачі та імовірно є додатковим патологічним механізмом пошкоджуючої дії гіпоксії на передачу зорової інформації від сітківки в центральну нервову систему.

Ключові слова: синаптична передача, гангліозні клітини сітківки, нейрони *colliculus superior*, гіпоксія, глутамат, ГАМК, квантовий аналіз, синаптична пластичність.

АННОТАЦІЯ

Думанская А.В. Синаптическая передача между ганглиозными клетками сетчатки и нейронами *colliculus superior* в кокультуре в норме и при гипоксии. – Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02. – биофизика – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена изучению характеристик синаптической передачи в синапсах афферентных проекций сетчатки в субкортикальный зрительный центр посредством исследования отдельных пар кокультивируемых ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) и нейронов *colliculus superior* (*CS*) в норме и при гипоксии. Используя метод парной регистрации трансмембранных токов и потенциалов в конфигурации «целая клетка» было показано, что возбуждающая нейропередача между ГКС и нейронами *CS* опосредуется пресинаптическим выбросом глутамата и активацией постсинаптических НМДА- и АМПА-рецепторканальных комплексов. Тормозная нейропередача осуществляется в результате выброса ГАМК и активацией ГАМК_A-рецепторканальных комплексов на постсинаптической мембране нейронов *CS*. Определены параметры квантового выброса глутамата и ГАМК в синапсах между ГКС и нейронами *CS* и показано, что вероятность выброса обоих нейротрансмиттеров описывается биномиальным законом. Описано кратковременную депрессию глутаматергической и потенцию ГАМК-эргической синаптической передачи в условиях парной стимуляции ГКС. Установлено, что в реализации данных пластичностей преобладают пресинаптические механизмы.

Впервые выявлены эффекты действия гипоксии на синаптическую передачу в условиях исследования отдельных синаптически связанных пар ГКС – нейрон *CS*, используя аппликацию растворов с разным содержанием кислорода на протяжении электрофизиологического эксперимента. Результаты полученные методами базового и полного квантового анализа дали возможность оценить локализацию механизмов лежащих в основе изменений эффективности нейротрансмиссии, опосредованных дефицитом кислорода. Таким образом, было обнаружено индуцируемую гипоксией долгодлящуюся потенциацию (ДДП) НМДА-рецепторопосредованной передачи в синаптически связанной паре ГКС – нейрон *CS*. Этот феномен связан с ослаблением магниевого блока данных рецепторов и вероятным увеличением общего количества сайтов выброса в активных синапсах. Индуцируемое дефицитом кислорода угнетение АМПА-рецепторопосредованной синаптической передачи также реализуется за счет пресинаптических механизмов. Впервые охарактеризовано индуцируемую гипоксией долгодлящуюся депрессию (ДДД) ГАМК-эргической передачи. Такая модуляция вероятно связана как с уменьшением количества действующих сайтов выброса, так и с уменьшением чувствительности постсинаптической мембраны. Нами описано разнонаправленность долгодлящихся эффектов возбуждающей и тормозной синаптической передачи между ГКС и нейронами *CS* опосредованных дефицитом кислорода. Индуцированная гипоксией ДДД ГАМК-эргической передачи усугубляет патологическое действие ДДП НМДА-рецепторопосредованной нейротрансмиссии и вероятно является дополнительным патологическим механизмом повреждающего действия гипоксии на передачу зрительной информации от сетчатки в центральную нервную систему.

Полученные результаты имеют не только теоретическую но и практическую значимость для представления проблематики гипоксических повреждений зрительной системы на уровне афферентных входов сетчатки субкортикальный зрительный центр и разработки соответствующих терапевтических подходов в их коррекции.

Ключевые слова: синаптическая передача, ганглиозные клетки сетчатки, нейроны *colliculus superior*, гипоксия, глутамат, ГАМК, квантовый анализ, синаптическая пластичность.

ANNOTATION

Dumanska H.V. Neurotransmission in cocultivated retinocollicular projections at normal and hypoxic conditions. – Manuscript. Thesis for PhD degree by speciality 03.00.02 – biophysics. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

In this thesis properties of synaptic transmission in cocultivated retinocollicular synapses were studied at normal and hypoxic conditions. It was shown that glutamatergic excitatory synaptic transmission in retinocollicular synapses is mediated by NMDA and AMPA receptors, while GABAergic inhibitory neurotransmission is mediated by GABA_A receptors. Quantal release of glutamate and GABA at retinocollicular synapses could be adequately described by binomial statistics. Paired pulse depression of glutamatergic and paired pulse potentiation of GABAergic retinocollicular synaptic transmission were mainly caused by presynaptic mechanisms.

To characterize the effect and define the mechanisms of hypoxia action on synaptic transmission in retinocollicular synapses we conducted a series of experiments. Application of hypoxic solution resulted in a long-term potentiation (LTP) of NMDAR-mediated synaptic transmission. Analysis of the oxygen deficiency effect on spontaneous and miniature postsynaptic currents (sPSC and mPSC respectively) revealed an increase in occurrence frequency and the second peak appearance in the mPSC histogram. The assessment of quantal and binomial parameters reflects presynaptic changes during the potentiation independent of release probability. Most likely this LTP can be caused by increasing in the total number of release sites and reducing of Mg-block. AMPA receptors mediated glutamatergic synaptic transmission responded to application of hypoxic solution by the brief reduction, as result of presynaptic dysfunction. GABA_A receptors mediated GABAergic synaptic transmission responded to hypoxia by a long term depression(LTD). Analysis of sPSCs and mPSCs showed significant decrease in the occurrence frequency and in the quantal size during oxygen deficiency. Thus, the effect of hypoxia-induced LTD of GABAergic synaptic transmission is based on complex changes of presynaptic (release probability independent) and postsynaptic (decrease insensitivity of receptors in the postsynaptic membrane) mechanisms.

Keywords: synaptic transmission; retinal ganglion cells; *colliculus superior* neurons; hypoxia; glutamate; GABA; quantal analysis; synaptic plasticity.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CS	<i>colliculus superior</i>
ГКС	гангліозні клітини сітківки
НЕРЕС	4-(2-гідроксіетил) піперазин-1-етансульфонова кислота
ПСС	постсинаптичний струм
вПСС	викликаний постсинаптичний струм
сПСС	спонтанний постсинаптичний струм
мПСС	мініатюрний постсинаптичний струм
ПД	потенціал дії
ЦНС	центральна нервова система
АМПА	α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонат
НМДА	N-метил-D-аспартат
ГАМК	гамма-аміномасляна кислота
<i>n</i>	середня кількість сайтів вивільнення
<i>p</i>	середня ймовірність вивільнення трансмітера
<i>q</i>	величина кванта
CV	коефіцієнт варіації
КПС	коефіцієнт парної стимуляції