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

КОЛЕСНИК ОКСАНА ПАВЛІВНА

УДК 577.352.5+612.822

РЕГУЛЯЦІЯ КОРОТКОТРИВАЛОЇ ПЛАСТИЧНОСТІ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ МІЖ НЕЙРОНАМИ ГІПОКАМПА

03.00.02 – біофізика

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

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,
Федулова Світлана Анатоліївна
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
завідувач лабораторією біофізики синаптичної передачі

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор
Говорун Дмитро Миколайович
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу молекулярної та квантової біофізики

доктор біологічних наук, професор
Борисова Тетяна Олександрівна
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу нейрохімії

Захист відбудеться "12" червня 2018 р. о 14.00 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 та на сайті Інституту http://biph.kiev.ua/

Автореферат розісланий 25 квітня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук **Любанова О. П**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним з актуальних завдань сучасної нейрофізіології є з'ясування механізмів та особливостей регуляції пластичності нейропередачі між нейронами ЦНС. Короткотривала пластичність синаптичної передачі - це здатність синапсів до функціональних змін в результаті їх попередньої активності, які зберігаються в проміжку часу від десятків мілісекунд до декількох секунд і проявляються в зміні ефективності синаптичної передачі при повторній стимуляції (Regehr and Stevens, 2001; Abbott et al., 1997a; Jensen et al., 1999b). В гіпокампі ці зміни лежать в основі процесів навчання, формування пам'яті, вдосконалення навичок людини, а також відновлення її нервової діяльності після травм і хвороб головного мозку. Гальмівна синаптична передача відіграє важливу роль у роботі нервової системи оскільки співвідношення гальмівної та збуджуючої систем нейропедачі в ЦНС є основою для обробки і збереження інформації мозком. Основним гальмівним медіатором у головному мозку ссавців є γ-аміномасляна кислота (ГАМК) (Fagg and Foster, 1983; Sivilotti and Nistri, 1988). Дослідження принципів та механізмів модуляції пластичності саме ГАМК-ергічної синаптичної передачі є важливими у зв'язку з її винятковою роллю у регуляції збуджувальної нейропередачі. Різні дисфункції ГАМК-ергічної системи корелюють з підвищенням тривоги і розвитком депресії та інших невротичних розладів.

Незважаючи на велику кількість сучасних даних про короткотривалу пластичність синаптичної передачі між нейронами гіпокампа, проблема розкриття принципів та механізмів її кальційзалежної регуляції, залишається далекою від остаточного вирішення. Загальновідомо, що вивільнення нейромедіатора та ГАМК зокрема є кальційзалежним процесом, і залежить від формування ділянок з високою концентрацією іонів Ca^{2+} у пресинаптичній терміналі, у безпосередній близькості від активної зони. Поява таких кальцієвих мікродоменів може бути наслідком процесів, пов'язаних або з входженням іонів кальцію через високопорогові потенціалкеровані кальцієві канали (Dunlap et al., 1995c; Horne and Kemp, 1991a; Ohno-Shosaku et al., 1994c) або з вивільненням кальцію з внутрішньоклітинного депо, сформованого ендоплазматичним ретикулумом (Empage at al., 2001; Zucker and Regehr, 2002). Саме ГАМК-ергічні нейрони відзначаються особливою неоднорідністю розподілу високопорогових кальцієвих каналів у пресинаптичному закінченні (Reid et al., 1998b; Reuter, 1995a). Безліч механізмів прямо чи опосередковано модулюють функції цих каналів і таким чином регулюють ефективність синаптичної передачі. Отже, з'ясування особливостей розподілу та внеску різних типів пресинаптичних кальцієвих каналів у здійснення регуляції короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі може пролити світло на специфіку будови та функціонування гальмівної передачі в гіпокампі.

Неоднозначною є також інформація про роль пресинаптичного ендоплазматичного ретикулума у регуляції депресії та полегшенні синаптичної передачі. Існують експериментальні дані, які вказують, що кальцій, який вивільнюється з внутрішньоклітинного депо бере участь у регуляції довготривалої пластичності синаптичної передачі (Welsby et al., 2006; Martin and Buno, 2003; Grigoryan et al., 2012; Harvey and Collingridge, 1992; Reyes and Stanton, 1996) та впливає на частоту спонтанної активності (Savic and Sciancalepore**,** 1998; Emptage, et al., 2001; Simkus and Stricker, 2002).

Проте роль кальцію, який вивільнюється з кальцієвого депо в регуляції короткотривалої пластичності досі є суперечливою.

Відомо, що ефективність синаптичної передачі може істотно змінюватися, і така модуляція може залежати від частоти та тривалості попередньої активності пресинаптичних нейронів. Характеристика діапазону пластичних властивостей ГАМК-ергічних синапсів дозволить спрямовано впливати на ефективність гальмівного контролю над збуджуючою системою в гіпокампі.

Усе вищезгадане й визначило доцільність дослідження короткотривалої кальційзалежної модуляції ефективності ГАМК-ергічної синаптичної через вплив на пресинаптичні кальцієві канали та на кальцієве депо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових програм відділу фізіології нейронних мереж Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Дослідження збуджуючої та гальмівної синаптичної передачі центральних та периферичних нейронів в залежності від функціональних властивостей їх пре - та постсинаптичних мембран» (державний реєстраційний номер теми: 0105U003232) та «Участь хемо- та потенціалкерованих каналів у зміні внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} центральних та периферичних нейронів в умовах наявності синаптичних зв'язків» державний реєстраційний номер теми: 0108U003919).

Мета дослідження.

Метою роботи було виявлення особливостей кальційзалежної модуляції ефективності синаптичної ГАМК-ергічної передачі між культивованими нейронами гіпокампа через вплив на пресинаптичні кальцієві канали та на кальцієве депо.

Завдання дослідження:

1. Визначити механізми, що обумовлюють короткотривалу пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа.
2. Проаналізувати квантові показники, які характеризують вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні синаптичної передачі при парній стимуляції.
3. Дослідити частотну модуляцію короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі та динаміку її відновлення.
4. Оцінити внесок кожного типу високопорогових кальцієвих каналів у регуляцію короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі.
5. Визначити роль Ca^{2+}-депо в регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі за умов блокування Ca^{2+}–АТФази ендоплазматичного ретикулума.

Об'єкт дослідження. Первинна культура дисоційованих нейронів гіпокампа щура.

Предмет дослідження. Механізми модуляції короткотривалої пластичності в ГАМК-ергічних синапсах нейронів гіпокампа.

Методи дослідження. Культивування дисоційованих нейронів гіпокампа щурів; парна позаклітинна локальна електрична стимуляція аксона пресинаптичного нейрона; відведення іонних струмів з соми постсинаптичного нейрона в режимі фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина»; кількісна обробка отриманих результатів за допомогою стандартних статистичних методів аналізу.

Наукова новизна. У дисертаційній роботі досліджені і кількісно охарактеризовані властивості короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа та механізми її регуляції. Встановлено, що короткотривала депресія та полегшення при парній стимуляції, що ми спостерігали, обумовлені переважно пресинаптичними механізмами. Вперше був проведений детальний аналіз квантових показників ГАМК-ергічної синаптичної передачі одночасно для депресії і полегшення при парній стимуляції. Вперше визначено, що тільки P/Q- та N-типи кальцієвих каналів беруть участь у модуляції короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної передачі. Вперше доведено, що кальцієва АТФаза пресинаптичного ендоплазматичного ретикулума не задіяна в цьому процесі. Отримані експериментальні дані суттєво доповнюють сучасні уявлення стосовно механізмів, відповідальних за кальційзалежну регуляцію ефективності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між нейронами гіпокампа.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи мають передусім фундаментальне значення, оскільки розширюють існуючі уявлення про короткотривалу регуляцію пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі при парній стимуляції пресинаптичного аксона. Розкриття принципів та механізмів регуляції короткотривалої пластичності та модуляції синаптичної передачі має також прикладне значення. Результати наших досліджень показали, що кальційзалежні зміни ефективності синаптичної передачі модулюються тільки певними типами високопорогових кальцієвих каналів, а кальцієва АТФаза ендоплазматичного ретикулума не має впливу на цей процес. Детально описаний частотний діапазон регуляції короткотривалих пластичних властивостей депресії та полегшення в ГАМК-ергічних синапсах гіпокампа. Ці дані є важливими для формування більш повних уявлень про механізми, які відіграють фундаментальну роль в нормальному функціонуванні ЦНС та розвитку нейрональних мереж. Практичне значення отриманих результатів полягає в можливості застосування селективних блокаторів кальцієвих каналів та певних частот стимуляції ГАМК-ергічних нейронів для досягнення терапевтичних ефектів посилення або послаблення гальмівного контролю над збуджуючою системою в гіпокампі, що може застосовуватися у клінічній практиці.

Особистий внесок здобувача. Опрацювання літературних джерел, виконання експериментів та інтерпретація отриманих результатів проводились здобувачем особисто за участі керівника наукової роботи. Виготовлення культури нейронів гіпокампа, електрофізіологічні досліди, обробка експериментальних даних, аналіз результатів досліджень, написання всіх розділів дисертації та підготовка її до друку виконані особисто автором. Робота з налагодження установки для електрофізіологічних досліджень проводилася при співучасті м.н.с. Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ О.В. Рихальського. В розробці загальної концепції роботи, її обговоренні та редагуванні брали участь співавтори публікацій.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження були представлені на наступних наукових конференціях: симпозіумі “Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation” (27-29 вересня 2007, Київ, Україна); 2-му з’їзді Українського товариства клітинної біології (23-26 жовтня 2007, Київ, Україна); PENS Spring School “Models in neuroscience: turning experiments into knowledge” (27 квітня – 5

травня 2008, С.-Петербург, Росія); European Synapse Summer School (7-27 вересня 2008, Бордо, Франція); Симпозіум “Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling” (11-13 жовтня 2009, Київ, Україна); IX Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні» (28-29 жовтня 2009 , Київ, Україна); FENS-IBRO HERTIE Winter School “Multiple Facets of GABA in Brain Development” (10-17 січня 2010, Обергугль, Австрія); 5-ий з’їзд Українського товариства нейронаук (6-10 червня 2011, Київ, Україна); 5-ий з’їзд Українського біофізичного товариства (22-25 червня 2011, Луцьк, Україна); The 8th IBRO World Congress of Neuroscience (14-18 липня 2011, Флоренція, Італія); Conference for young scientist (21-25 вересня, Київ, Україна), VII конгрес Українського товариства нейронаук (7-11 червня 2017, Київ, Україна) та на поточних наукових семінарах Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, 2008, 2016 р.).

Публікації. Матеріали дисертації викладені у 14 публікаціях: 6 статей у рекомендованих ДАК України фахових журналах та 8 тез доповідей у наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з титульного аркуша, анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та списку використаних джерел із 250 найменувань та додатком. Робота викладена на 130 сторінках та проілюстрована 29 рисунками та 2 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних складається з шести розділів, в яких наведено інформацію про структуру та функції ГАМК-рецепторів, охарактеризовані такі процеси, як квантове вивільнення нейромедіатора та пластичність синаптичної передачі, наведені відомості про потенціалкеровані кальцієві канали і їх фармакологічні та кінетичні характеристики, наведена інформація про структуру ендоплазматичного ретикулума та його роль у якості кальцієвого депо.

В розділі **Матеріали та методи досліджень** описані методичні підходи, використані при виконанні роботи. Всі експерименти були проведені із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях. Біоетичний комітет Інституту фізіології імені О.О. Богомольця розглянув та схвалив протоколи всіх експериментальних процедур із використанням лабораторних тварин.

Приготування культури нейронів гіпокампа. Для приготування культури використовувались новонароджені щури лінії Вістар. Тварин декапітували, головний мозок вміщували в мінімальне середовище Ігла ("Sigma", США) з додаванням 20 ммоль/л буфера HEPES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Гіпокамп відокремлювали за допомогою скальпеля та нарізали на поперечні смужки 1–2 мм завтовшки. Ферментативну обробку здійснювали 0,05%-м розчином трипсину (тип II, "Sigma", США) при кімнатній температурі (23-25°C) протягом 7 хвилин. Потім тканину промивали два рази розчином для культивування, до складу якого входили: мінімальне середовище Ігла, кінська сироватка - 10%,

інсулін - 6 мкг/мл, бікарбонатний буфер $NaHCO_3$ 2,3 мг/мл, натрієва сіль бензилпеніциліну - 25 од/мл і сульфат стрептоміцину - 25 мкг/мл. Суспензію клітин отримували за допомогою механічної дисоціації набором пастерівських піпеток з діаметрами кінчиків, які послідовно зменшувались. Клітини висаджували в чашку Петрі, яка була попередньо оброблена полі-L-орнітином. У скляне кільце діаметром 6 мм, яке обмежувало площу посадки, наливалось 200 мкл суспензії. Чашки Петрі з суспензією вміщувались в інкубатор ("Jouan", Франція) з контрольованими вмістом двоокису вуглецю (5% CO2) в повітряно-газовій суміші і температурним режимом (37°С) та постійним пасивним зволоженням. На 3-тю добу культивування для пригнічення проліферації гліальних клітин в середовище додавали цитозин-β-D-арабінофуранозид (5 мкмоль/л). Режим обробки культури за допомогою останнього підбирали таким чином, щоб пригнітити проліферацію гліальних клітин на такій стадії, коли кількість астроцитів була достатньою для утворення гліального моношару. Повторну повну заміну розчину для культивування проводили через 24 години.

Електрофізіологічні методи. Для вимірювання викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС), які відводились від культивованих нейронів гіпокампа було застосовано метод фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» ("patch-clamp"). Експериментальна установка для реєстрації іонних струмів була зібрана на базі інвертованого мікроскопа Axiovert 35 (Carl Zeiss, Німеччина). У роботі використовувався підсилювач електричних сигналів Axopatch-1D (Axon Instruments, США), який давав можливість вимірювати постсинаптичні струми та визначати природний потенціал спокою нейронів в режимі фіксації струму. Підтримуваний потенціал в експериментах становив – 50 мВ. Потенціал спокою всіх клітин знаходився у межах від – 50 до – 60 мВ. Значення підтримуваного потенціалу були відкоректовані з урахуванням величини рідинного контактного потенціалу (17 мВ), розрахованого за допомогою калькулятора контактних потенціалів програмного пакету PClamp 9.0 («Axon Instruments», США). Електричні сигнали, які відводились від нервових клітин, піддавались фільтрації за допомогою апаратного високочастотного фільтру Бесселя з частотою зрізу 2 кГц. Оцифровка даних в ході експерименту здійснювалась за допомогою аналого-цифрового перетворювача TL-1 (Axon Instruments, США) з частотою дискретизації 10 кГц. В цифровому вигляді дані зберігались на жорсткому диску комп’ютера за допомогою програмного пакету pClamp 6.0 (Axon Instruments, USA). Для подальшої обробки та аналізу ГПСС використовувався програмний пакет pClamp 9.0 (Axon Instruments, USA). Локальну електричну стимуляцію проводили за допомогою стимулятора з ізольованим виходом ISO-Flex (AMPI, Ізраїль). Стимуляційну мікропіпетку з діаметром отвору близько 2 мкм заповнювали стандартним зовнішньоклітинним сольовим розчином і з’єднували з виходом стимулятора. Опір такої піпетки, заповненої розчином, становив 7 – 9 МОм. Струми реєстрували при подразненні аксона прямокутними імпульсами напруги негативної полярності тривалістю 0,4 мс. Частота стимуляції становила 0,5 Гц, інтервал між імпульсами в парі становив 150 мс. Амплітуда напруги на вході стимуляційної піпетки змінювалась в межах від 0 до 30 В, зміна стимулюючого сигналу на виході була лінійною в межах всіх вхідних напруг. Таким чином ми мали можливість контрольовано подразнювати нервові закінчення клітин під візуальним контролем. Розчин для

заповнення відвідної скляної піпетки вміщував (ммоль/л): глюконат калію – 155, $MgCl_2$ – 2, ЕГТА – 10, HEPES – 20; pH 7,4 (KOH). До зовнішньоклітинного розчину входили (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 2, глюкоза – 30, HEPES – 20; pH 7,4 (NaOH); до цього розчину додавали також блокатори збуджувальної нейропередачі D_L-AP5 і DNQX (20 мкмоль/л). Аплікацію розчинів, що містили блокатори кальцієвих каналів та блокатори кальцієвої АТФази, проводили за допомогою швидкої локальної перфузії, розробленої спеціально для роботи з моношаровою культурою клітин Веселовським та співав. (Veselovsky et al., 1996). Реактиви для електрофізіологічних експериментів були отримані від «Sigma» (США).

Квантовий аналіз. Основні квантові параметри вивільнення нейротрансмітера (величина ефекту вивільнення одного кванту *q*, середній квантовий вміст *m*, кількість місць вивільнення N) визначали за допомогою аналізу мініатюрних та спонтанних гальмівних постсинаптичних струмів (мГПСС та сГПСС відповідно), які відводили від нейронів, використовували для визначення величини окремої квантової події. Для опису ймовірності вивільнення нейротрансмітера використовували біноміальну статистику.

Аналіз даних. Аналіз кінетичних параметрів вГПСС, статистичний аналіз та побудову графіків виконували з використанням програмних пакетів “Clampfit 9.0” («Axon Instruments», США), “Excel 2016” («Microsoft Corporation», США), “OriginPro 8” («OriginLab Corporation», США).

Числові дані представлені як середні ± стандартна похибка середнього (s.e.m.); розміри вибірки усереднення подані в дужках). Для визначення статистичної достовірності різниць між середніми значеннями у групах даних використовували *t*-тест Ст’юдента. Рівень значущості розбіжностей на рисунках позначено наступним чином: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

1. Ідентифікація типу іонів, які опосередковують викликані постсинаптичні струми, зареєстровані між культивованими нейронами гіпокампа щура.

Ідентифікація типу іонів, які опосередковують викликані гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС), проводилась за значенням їхнього потенціалу реверсії. Моносинаптичні вГПСС реєстрували при підтримуваному потенціалі -50 мВ. При реєстрації вГПСС зовнішньоклітинний розчин містив блокатори глутаматергічної нейропередачі D_L-AP5 та DNQX (по 20 мкмоль/л). З побудованої вольт-амперної характеристики було визначено, що вГПСС лінійно залежали від підтримуваного потенціалу на мембрані. Потенціал реверсії дорівнював -90,4 ± 3 мВ (n = 4) і в межах похибки дорівнював рівноважному хлорному потенціалу, розрахованому за допомогою рівняння Нернста для використаних розчинів (E_r = -93 мВ).

Додатково для ідентифікації рецепторів було застосовано аплікацію селективного антагоніста $ГАМК_A$-рецепторів бікукуліну метоброміду в концентрації 20 мкмоль/л, яка на 91 ± 1% (n = 3) пригнічувала амплітуду вГПСС.

Це вказує на те, що отримані вГПСС опосередковані через $ГАМК_A$-рецептори, які розташовані на постсинаптичній мембрані.

2. Механізми, які обумовлюють короткотривалу пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Вважають, що депресія та полегшення синаптичної передачі є результатом численних клітинних механізмів, які можуть включати як пресинаптичні, так і постсинаптичні події. Найбільш поширеним пресинаптичним механізмом вважають зменшення кількості вивільненого нейромедіатора, що може відображати спустошення пулу готових до вивільнення везикул (Wu, 1999; Zucker, 1989) та зміни кількості іонів кальцію, що надходять у пресинаптичну терміналь, інактивації кальцієвих каналів (Forsythe, 1998) і активації метаботропних ауторецепторів в пресинаптичній терміналі (Takahashi, 1996). Постсинаптичний механізм, який може впливати на ефективність синаптичної передачі – це десенситизація ліганд керованих рецепторів постсинаптичного нейрона (Neher, 1998; Zucker, 1989). Для з'ясування локалізації механізмів, що обумовлюють короткотривалу пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі, аксон пресинаптичної клітини стимулювали парними імпульсами з міжстимульним інтервалом 150 мс. В якості кількісної міри синаптичної пластичності було обрано коефіцієнт парної стимуляції (КПС), який обчислювали як відношення амплітуди 2-го вГПСС у парі до 1-го.

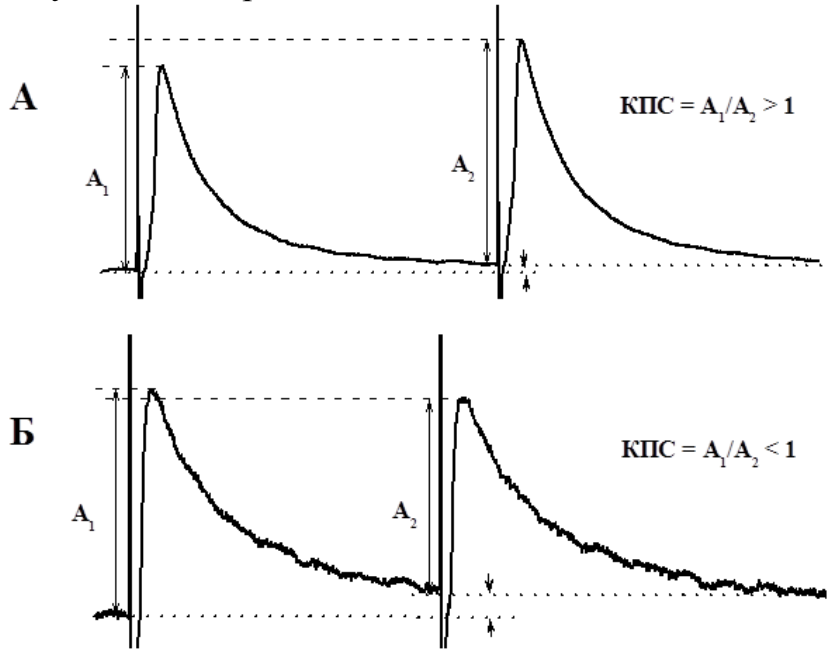


Рис.1. Приклад реєстрації парних викликаних постсинаптичних струмів та розрахунок коефіцієнта парної стимуляції (КПС) при полегшенні (А) та депресії (Б) синаптичної пластичності. A_1 та A_2 – амплітуда 1-го та 2-го вГПСС.

В залежності від значення КПС при стимуляції парою імпульсів може спостерігатись явище депресії (при КПС < 1) або полегшення (при КПС > 1) (рис. 1).

Відповідно до біноміальної моделі вивільнення медіатора, непрямим методом визначення пре- або постсинаптичних факторів є вивчення зміни коефіцієнта варіації амплітуд постсинаптичних струмів (CV) (Faber and Korn, 1991; Larkman et al., 1992; Sjostrom et al., 2007). Він визначається як відношення стандартного відхилення амплітуд до усередненого їх значення. При пластичності синаптичної передачі, залежно від пре- або постисинаптичних механізмів, що беруть у цьому участь, може спостерігатися два випадки: квадрат відношення коефіцієнтів варіації першої відповіді (CV_1) у парі до другої (CV_2) може збільшуватися або зменшуватися так само, як і коефіцієнт парної стимуляції. Для парних вГПСС, при яких спостерігалося явище короткочасної пластичності синаптичної передачі, були побудовані відношення $(CV_1/CV_2)^2$ до КПС (рис. 2) і розраховано усереднене значення, що відображається у вигляді точки. При явищі депресії вона лежить нижче від діагоналі і має координати

(0,7 ± 0,02; 0,52 ± 0,04; n = 26), а при полегшенні − вище від діагоналі і має координати (1,15 ± 0,03; 1,56 ± 0,19; n = 17).

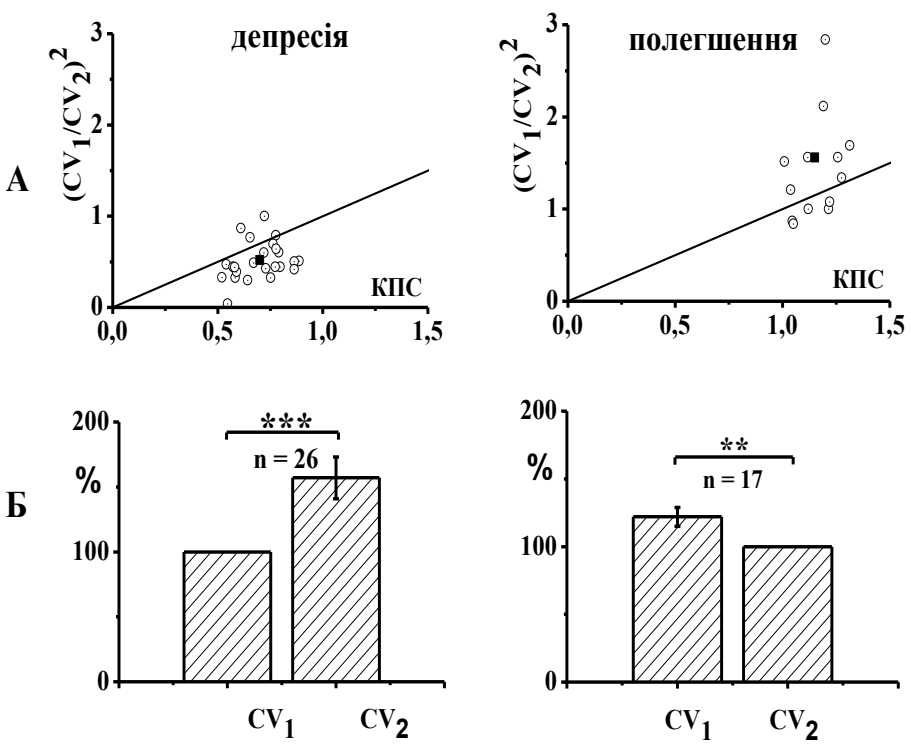


Рис. 2. Аналіз коефіцієнта варіації струмів (CV) при депресії та полегшенні синаптичної передачі. А – залежність квадрата відношення коефіцієнтів варіації амплітуди першої відповіді (CV_1) до другої (CV_2) від коефіцієнта парної стимуляції (КПС). Б – нормовані усередненні значення CV_1 та CV_2.

Для цих же нейронів було розраховано, що при депресії CV_2 достовірно більше за CV_1 на 57 ± 16 %, а при полегшені - менше на 22 ± 7 %. Отже, короткотривала депресія та полегшення, що ми спостерігали, зумовлені переважно пресинаптичними механізмами.

Для виключення впливу постсинаптичних механізмів на короткочасну зміну ефективності синаптичної передачі ми змінювали підтримуваний потенціал від 0 мВ до -110 мВ та одночасно реєстрували вГПСС. Отримані результати надали можливість зробити висновок про не залежність значення КПС від підтримуваного потенціалу, тобто постсинаптичні події не мають вплив на короткотривалу пластичність синаптичної передачі.

Отже, згідно з аналізом коефіцієнта варіації вГПСС та коефіцієнта парної стимуляції було показано, що короткотривала депресія та полегшення, що ми спостерігали, зумовлені тільки пресинаптичними механізмами.

3. Аналіз квантових показників, що характеризують вивільнення ГАМК при пластичності синаптичної передачі.

Пластичність синаптичної передачі може бути описана в рамках стандартної квантової моделі вивільнення медіатора, де амплітуда постсинаптичної відповіді відображає суму квантів медіатора з усіх місць вивільнення в синапсі. Параметрами, що описують вивільнення медіатора тоді є: q – величина кванта, m – квантовий вміст (середнє число квантів, що вивільнюється одним стимулом), N – біноміальний показник (кількість активних зон) та P – ймовірність, яка враховує ймовірність перезаповнення везикули та того, що потенціал дії призведе до її вивільнення.

Мініатюрні ГПСС (мГПСС) та спонтанні ГПСС (сГПСС) відводили від нейронів гіпокампа при підтримуваному потенціалі -50 мВ за наявності в зовнішньоклітинному розчині блокаторів збуджувальної нейропередачі. Для реєстрації мініатюрних струмів використовували зовнішньоклітинний розчин, що містив 0,5 ммоль/л Ca^{2+}, 10 ммоль/л Mg^{2+} та 0,25 мкмоль/л тетродотоксину. Амплітудні розподіли

мГПСС були унімодальними і задовільно апроксимувалися однією кривою Гауса з середнім значенням 13,9 ± 0,3 пА (n = 3; рис. 3, А).

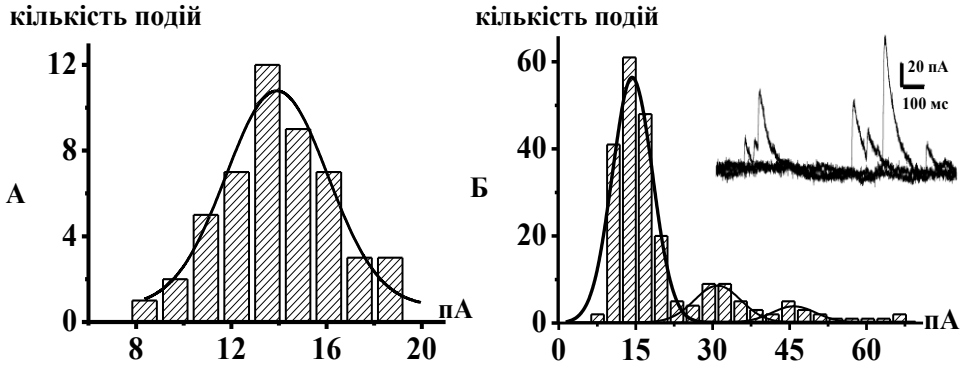


Рис. 3. Амплітудні розподіли мініатюрних (А) та спонтанних (Б) постсинаптичних струмів.

Амплітудні розподіли сГПСС, зареєстрованих у різних клітинах гіпокампа, демонстрували наявність 2–3 піків на гістограмах, які добре апроксимувалися сумою кривих Гауса (рис. 3, Б) та відповідали величині кванта мГПСС (q =14 пА). Розрахований коефіцієнт варіації мГПСС становив 0,34 ± 0,07 (CV_q).

Для парних вГПСС, при яких спостерігалося явище короткочасної пластичності синаптичної передачі, був проведений порівняльний аналіз квантових показників синаптичної передачі для першого і другого стимулу (рис. 4).

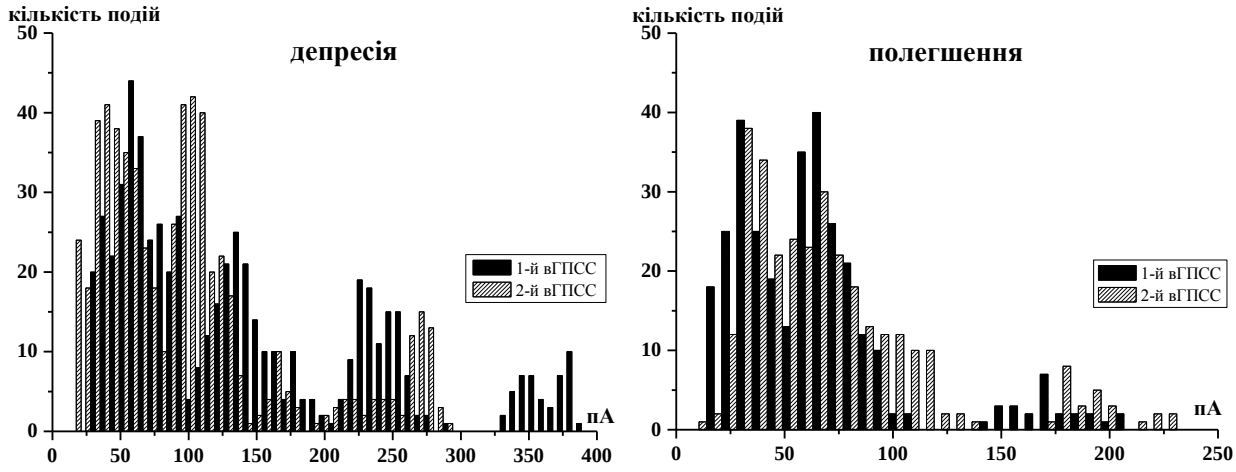


Рис. 4. Амплітудні розподіли 1-го та 2-го викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) у парі при депресії та полегшенні ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Квантовий вміст розраховувався як m = I/q. Ймовірність вивільнення медіатора знаходили як $P = 1 + CV_q^2 - m \cdot CV^2_{вГПСС}$. Біноміальний показник розраховувався як N = m/P. Для першої відповіді у парі середнє значення квантового вмісту було 9,7±1,3 і 5,0 ± 0,6 відповідно при депресії (n = 26) та полегшенні (n = 17) синаптичної передачі. Біноміальний показник також відрізнявся при депресії та полегшенні і становив 9,3 ± 1,2 та 4,9 ± 0,6 відповідно (рис. 5, А). Тобто, якщо початковий квантовий вміст

та число місць вивільнення везикул з ГАМК відносно невеликі, то буде спостерігатися полегшення синаптичної передачі, якщо навпаки – то депресія.

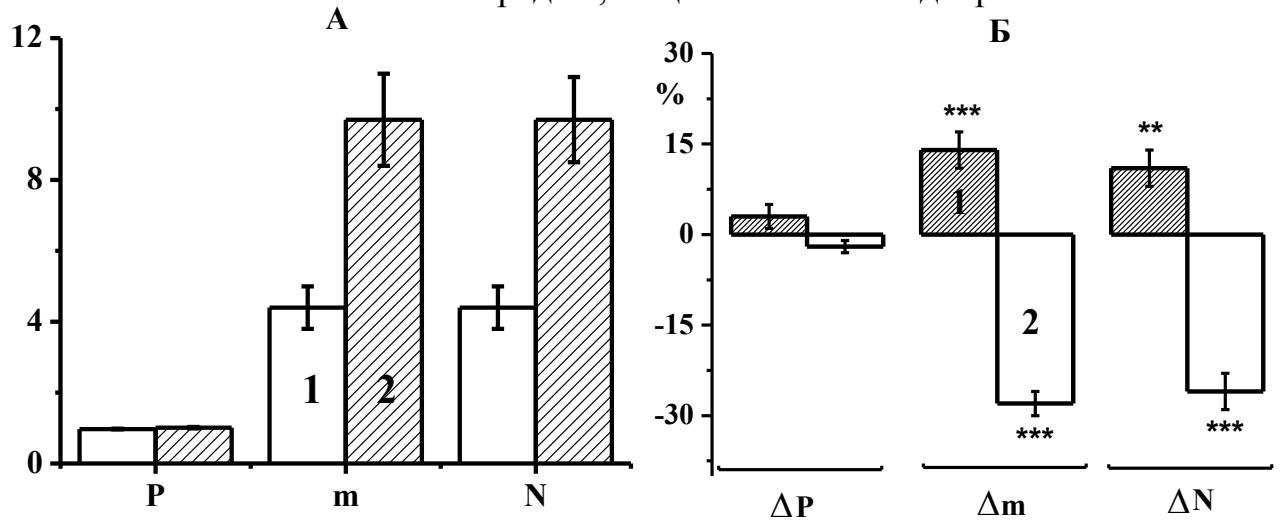


Рис. 5. Аналіз квантових показників при депресії та полегшенні синаптичної передачі. А – гістограма, що показує значення квантових показників вивільнення ГАМК для 1-го вГПСС. Б - зміни значень нормованих квантових показників вивільнення ГАМК для 2-го вГПСС. За 0 % прийнято нормовані значення квантових показників для 1-го вГПСС у парі. 1 – полегшення, 2 – депресія: ΔP – зміна ймовірності вивільнення ГАМК, Δm – зміна відносного квантового вмісту, ΔN – зміна відносного біноміального показника.

Наші результати підтверджують раніше отримані дані при дослідженні збуджувальної синаптичної передачі між нейронами гіпокампа, що депресія синаптичної передачі при стимулюванні парою поштовхів струму, спостерігається переважно, якщо початкова амплітуда струму велика, в іншому випадку – полегшення (Debanne et al., 1996). Ймовірність вивільнення медіатора була однаковою для двох цих явищ (близько 1) і значення m і N збігалися, отже, в наших експериментальних умовах, на кожний стимул з усіх місць вивільнення в активній зоні вивільнюється одна везикула з ГАМК.

Відомо, що при високій ймовірності вивільнення медіатора коефіцієнт варіації амплітуди струму має бути низьким (Oleskevich et al., 2000). Наші результати це підтверджують: у зареєстрованих струмах коефіцієнт варіації був у межах від 0,02 до 0,20.

Очевидно, що ймовірність вивільнення ГАМК при обох стимулах є майже незмінною як при депресії, так і при полегшені. Проте для другого стимулу зміни квантового вмісту та числа місць вивільнення везикул є неоднаковими при явищах депресії та полегшенні. Для другого стимулу вони достовірно зменшуються порівняно з початковими значеннями на 28 і 26% при депресії та збільшуються на 14 і 11% при полегшенні відповідно (рис. 5, Б).

З наших результатів можна зробити висновок, що в культурі нейронів гіпокампа, за умов високої ймовірності вивільнення ГАМК, короткотривалу пластичність синаптичної передачі можна пояснити одночасним збільшенням (полегшення) або зменшенням (депресія) числа місць вивільнення везикул та квантового вмісту їх.

4. Частотна модуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Відомості про динаміку короткотривалої синаптичної пластичності і час відновлення є важливими для розуміння механізмів регуляції синаптичної передачі між нейронами гіпокампа. Щоб дослідити вплив різних частот стимуляції аксона пресинаптичного нейрона на короткотривалу пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі ми подразнювали пресинаптичний аксон парою стимулів, змінюючи міжстимульний інтервал від 20 мс до 1200 мс. У 12 нейронах спостерігалося явище депресії синаптичної передачі (рис.6, А).

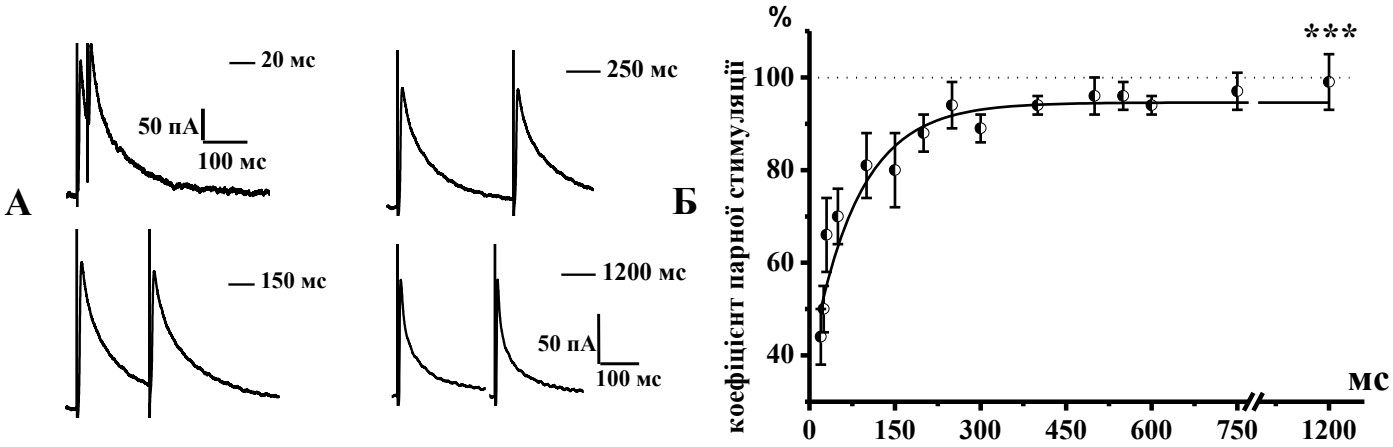


Рис. 6. Динаміка відновлення після депресії синаптичної передачі при парній стимуляції. А – приклад реєстрації усереднених парних викликаних гальмівних синаптичних струмів (вГПСС) при стимуляції з різним міжстимульним інтервалом. Б – залежність коефіцієнта парної стимуляції (КПС) від міжстимульного інтервалу. За 100 % прийнято значення КПС = 1.

Максимальна депресія спостерігалась при найкоротшому міжстимульному інтервалі 20 мс; в цьому разі амплітуда другого ГПСС була меншою ніж амплітуда першого струму, в середньому на 58 ± 6%. Майже повне відновлення після депресії спостерігалося при інтервалі між стимулами 1200 мс, коли різниця між амплітудами 1-го і 2-го вГПСС складала всього 2 ± 6%. Наші результати узгоджуються із повідомленнями про те, що в ГАМК-ергічних синапсах гіпокампа депресія другого вГПСС може бути досить тривалою і спостерігатися протягом декількох секунд після поодинокого потенціалу дії в пресинаптичній терміналі (Jensen et al., 1999; Deisz and Prince, 1989; Mott et al., 1993; Yoon and Rothman, 1991). З графіка залежності КПС від міжстимульного інтервалу визначили, що динаміку відновлення після депресії можна описати експоненційною функцією з τ = 83 мс (рис.6, Б), що узгоджується із даними отриманими на збудливих (Saviane et al, 2002) та гальмівних (Kraushaar et al., 2000) синапсах гіпокампа.

При парному подразненні пресинаптичного аксона з міжстимульними інтервалами від 30 мс до 500 мс у 6 нейронах спостерігалося явище полегшення синаптичної передачі. Максимальне полегшення спостерігалось при інтервалі 150 мс, коли амплітуда 2-го ГПСС була більшою за амплітуда 1-го, в середньому на 18 ± 4%. Майже повне відновлення після полегшення спостерігалося при інтервалі між сти-

мулами 500 мс, при цьому різниця між амплітудами 1-го і 2-го вГПСС складала всього 4 ± 4% (рис.7). Такого ж висновку дійшли дослідники збудливої синаптичної передачі між нейронами гіпокампа (Debanne at al., 1996).

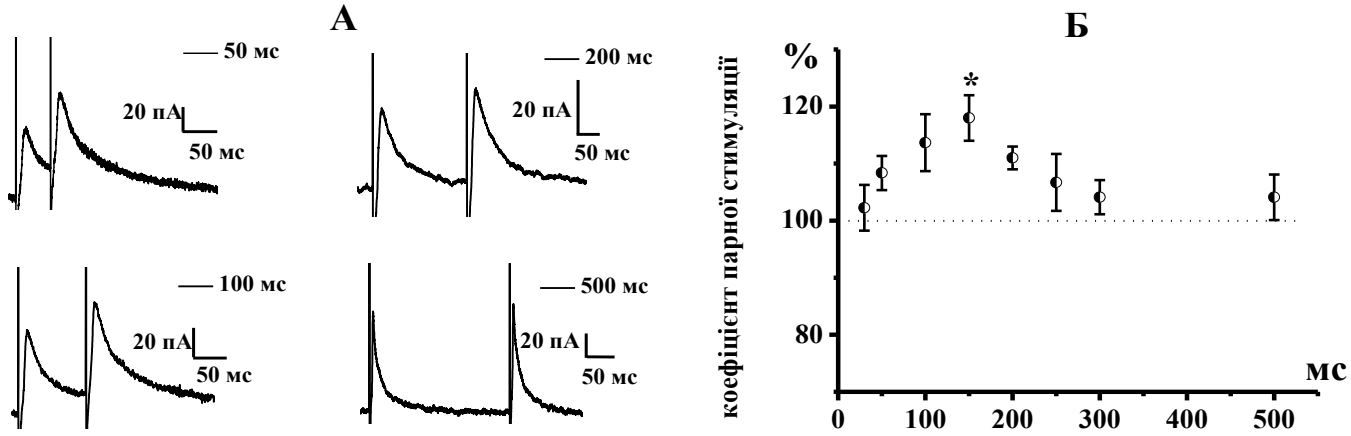


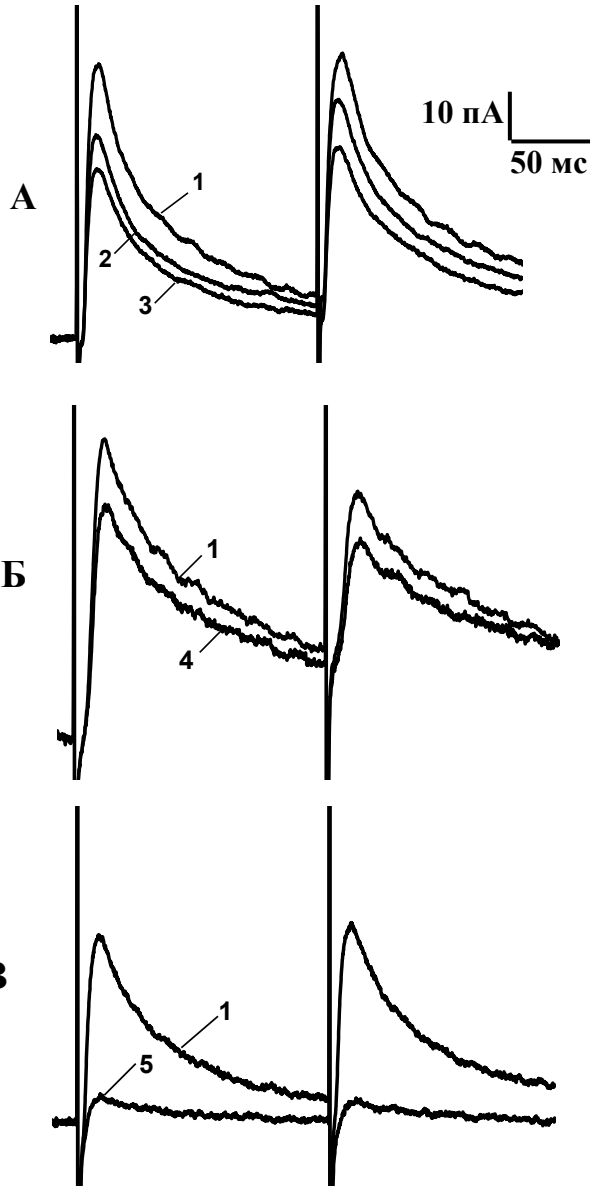
Рис. 7. Динаміка відновлення після полегшення синаптичної передачі при парній стимуляції. А – приклад реєстрації усереднених парних викликаних гальмівних синаптичних струмів (вГПСС) при стимуляції з різним міжстимульним інтервалом. Б – залежність коефіцієнта парної стимуляції (КПС) від міжстимульного інтервалу. За 100 % прийнято значення КПС = 1.

Тобто, короткотривала пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі, зумовлена попередньою активністю синапсів, залежить від частоти стимулювань і обумовлена тільки пресинаптичними механізмами. Депресія та полегшення при парній стимуляції мають різну форму залежності від частоти стимулювань. Динаміка відновлення амплітуди вГПСС після депресії має відмінні часові характеристики ніж після полегшення.

5. Участь високопорогових кальцієвих каналів у регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Дослідження, що були проведені на глутаматергічній терміналі гіпокампа показали, що кількість пресинаптичних кальцієвих каналів, кількість готових до вивільнення везикул та ймовірність їх вивільнення прямо пропорційні площі активної зони (Holderith, N., 2012). Проте інші дослідження, проведені на цьому ж об'єкті, виявили, що не лише абсолютні розміри синапса визначають його ефективність (Branco T. Et al., 2010). Так, ймовірність вивільнення однієї синаптичної везикули збільшується з кількістю кальцієвих каналів в активній зоні (Catterall W. et al., 2013). Відомо, що в механізмах вивільнення нейромедіатора та формування синаптичної пластичності вхід кальцію в пресинаптичну терміналь саме через високопорогові потенціалкеровані кальцієві канали відіграє вирішальну роль. Для того щоб дослідити внесок каналів P- і Q-типів у пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа ми використали специфічний блокатор цих каналів – пептид ω-агатоксин-IVA (Adams et al., 1993a), а для того щоб дослідити внесок N-типу кальцієвих каналів – селективний блокатор ω-конотоксин-GVIA в концентрації (Fox et al., 1987). Для блокування P-типу каналів ми використали 30 нмоль/л ω-агатоксину, а для блокування Q-типу була використана необхідна концентрація в 200 нмоль/л цього ж блокатора. Оскільки при аплікації останньої

концентрації блокуються обидва типи каналів, загальноприйнято позначати таку дію як блокування P/Q-типу кальцієвих каналів. Для блокування N-типу кальцієвих каналів ми використали ω-конотоксин-GVIA в концентрації 200 нмоль/л.



Відомо, що кадмій у досить невеликих концентраціях є блокатором виключно високопорогових кальцієвих каналів (Веселовский, 2004; Ozawa et al., 1989; Mogul and Fox., 1991), тому в своїх експериментах ми використали кадмій у концентрації 5 мкмоль/л. Порівнюючи амплітуди вГПСС у контролі і після аплікації, ми дізнавались про опосередкований внесок конкретного типу каналів у процес регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Аплікація блокаторів достовірно пригнічувала амплітуди обох парних вГПСС (рис. 8, А, Б, В). Усереднена величина амплітуди після блокування P-типу кальцієвих каналів складала для 1-го і 2-го вГПСС 69 ± 4 % і 73 ± 5 % амплітуди у контролі відповідно для 1-го і 2-го вГПСС, після блокування P/Q-типу кальцієвих каналів - 53 ± 4% і 56 ± 4 %, після блокування N-типу кальцієвих каналів - 75 ± 3% і 82 ± 4 %. Усереднена величина амплітуди для 1-го і 2-го вГПСС після послідовного блокування N- та P/Q-типу кальцієвих каналів складала 30 ± 7 % та 36 ± 8 % амплітуди у контролі. Усереднена величина амплітуди для 1-го і 2-го вГПСС після блокуванням кадмієм складала 13 ± 4 % і 17 ± 5 %.

Рис. 8. Дія блокаторів кальцієвих каналів на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС). А, Б, В – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації блокаторів.

На А, Б, В: 1 - контроль, 2 - дія 30 нмоль/л ω-агатоксину, 3 - дія 200 нмоль/л ω-агатоксину, 4 - дія 200 нмоль/л ω-конотоксину, 5 - дія 5 мкмоль/л кадмію.

Таким чином, усереднений опосередкований внесок P-типу каналів у ГАМК-ергічну синаптичну передачу між культивованими нейронами гіпокампа становить приблизно 31 ± 4 %, P/Q-типу – 47 ± 4 %, а N-типу – 25 ± 3 % відносно контролю. Сумісний внесок P/Q- та N-типів склав приблизно 70 ± 7 %, а алгебраїчна сума вкладу P/Q- та N-типів дорівнює приблизно 72%. Отже, сумісне блокування цих каналів є тотожнім почерговому їх блокуванню (Рис. 9, А). За допомогою аплікації ка-

дмію, з'ясовано, що вклад усіх високопорогових кальцієвих каналів становить приблизно 87 ± 4 %, що більше за сумісний внесок P/Q- та N-типів кальцієвих каналів.

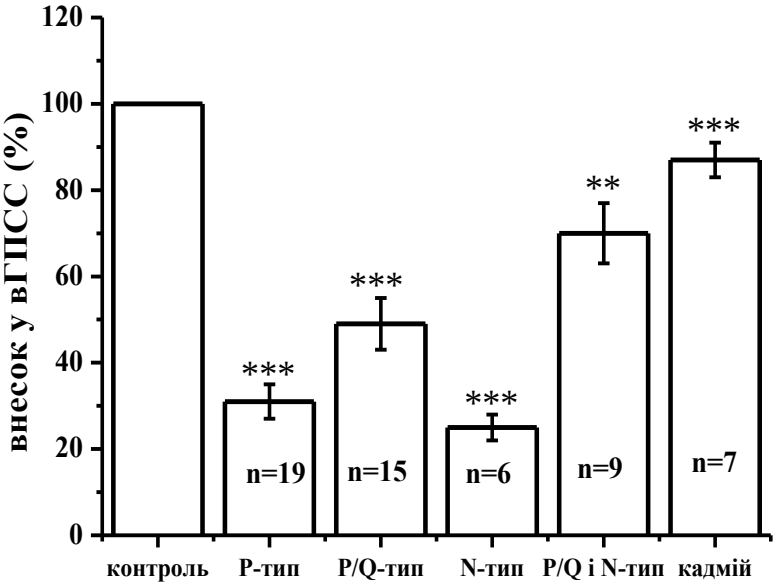


Рис. 9. Нормовані усереднені значення опосередкованого внеску кожного окремого типу високопорогових кальцієвих каналів у амплітуду 1-го вГПСС відносно контролю.

Отже, було виявлено, що лише кальцієві канали N- , P- та Q-типу беруть участь у керуванні процесу вивільнення ГАМК між нейронами культури гіпокампа. Наші результати узгоджуються з даними отриманими на інших об'єктах (Luebke, 1993; Reid, 1998; Takahashi, 1993; Wheeler, 1994; Wu, 1994; Mintz, 1995; Wheeler, 1994).

Порівнюючи усереднені вклади кожного з цих типів кальцієвих каналів, ми дійшли висновку, що 25% кальцію, який задіяний у вивільненні ГАМК проходить саме через N-тип кальцієвих каналів. Із досліджень проведених на окремих ГАМК-ергічних терміналях механічно дисоційованих нейронів, відомо, що аплікація 3 мкмоль/л конотоксину зменшувала амплітуду фокально викликаного ГПСС на 33,3 % (Murakami, 2002). В культурі нейронів гіпокампа, амплітуда вГПСС, що був викликаний електричною стимуляцією пресинаптичного нейрона, була зменшена аплікацією 1 мкмоль/л конотоксину на 59 % порівняно із контролем (Ohno-Shosaku, 1994). Результати наших досліджень узгоджуються з даними отриманими раніше на нейронах гіпокампа, де конотоксин пригнічував синаптичну передачу в CA1 і CA2 зонах гіпокампа на 70% (Kamiya et al., 1988; Dutar et al., 1989; Horne and Kemp, 1991).

За нашими результатами було визначено, що усереднений опосередкований вклад P- та Q-типу каналів у ГАМК-ергічну синаптичну передачу становить відповідно 30% та 45% відносно загального. Із даних, отриманих раніше на ГАМК-ергічних культивованих нейронах гіпокампа при використанні 30 та 100 нмоль/л агатоксину відомо, що внесок P та Q-типу кальцієвих каналів в ГАМК-ергічну синаптичну передачу був визначений як 21% та 36% відповідно (Ohno-Shosaku, 1994). Із досліджень проведених на окремих ГАМК-ергічних терміналях, відомо, що апліка-

ція 300 нмоль/л агатоксину зменшувала амплітуду фокально викликаного ГПСС на 83% (Murakami, 2002).

Цікавим є те, що сумісне блокування цих каналів токсинами ω-Aga-IVA і ω-CTx-GVIA є рівним алгебраїчній сумі усередненої дії цих двох блокаторів при їх окремому прикладанні. Проте дуже рідко сумісне блокування N- та P/ Q-типу призводило до повного пригнічення амплітуди вГПСС, що могло бути пояснене входом кальцію у пресинаптичне закінчення через інші канали, наприклад R-типу. Кальцієвий струм через цей канал резистивний до високих концентрацій ω-конотоксину-GVIA, ω-агатоксину-IVA, тому і не міг бути заблокованим. Цю гіпотезу ми можемо непрямо підтвердити, використавши отримані дані при аплікації кадмію (5 мкмоль/л). Ми показали, що сумарний опосередкований вклад усіх високопорогових кальцієвих каналів у процес вивільнення ГАМК на 17% більше за сумісний вклад P/Q- та N-типів кальцієвих каналів. З літературних даних відомі випадки, коли сумісне блокування P/Q- та N-типів кальцієвих каналів не призводило до повного пригнічення амплітуди вГПСС (Федулова та ін., 2000). Також при низькочастотній стимуляції в зрізах гіпокампа почергова аплікація 3 мкмоль/л конотоксину та 100 нмоль/л агатоксину частково зменшувала амплітуду вГПСС, а залишковий компонент блокувався 100 мкмоль/л кадмію (Murakami, 2002).

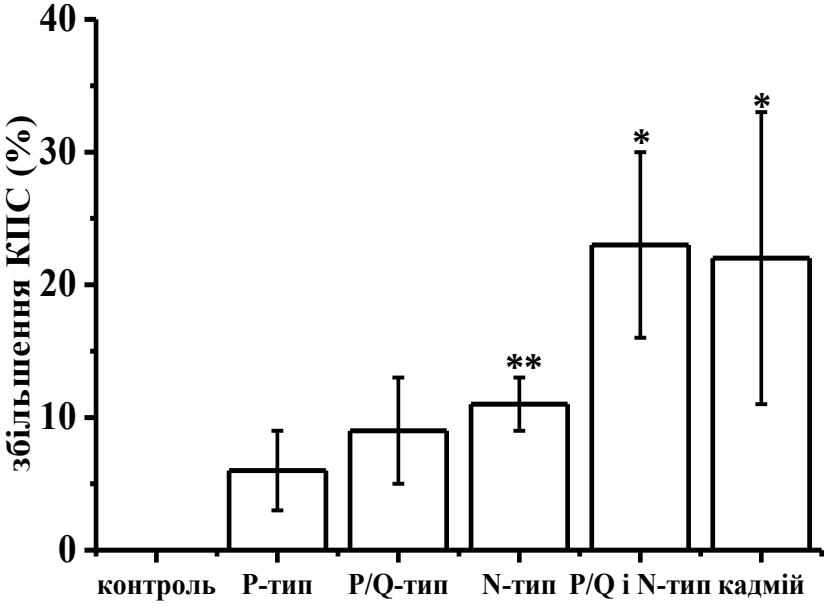


Рис. 10. Збільшення нормованого усередненого значення коефіцієнта парної стимуляції (КПС) при дії блокаторів кальцієвих каналів відносно контролю.

Оскільки, в гіпокампі швидка синаптична передача є результатом активації переважно тільки N- та P/Q-типів кальцієвих каналів, тому ми вирішили дослідити їх загальний внесок у регулчцію короткотривалої пластичності. Для дослідження внеску різних типів кальцієвих каналів у пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі ми реєстрували і аналізували парні вГПСС, а також використовували селективну блокаду певних типів каналів токсинами. При аплікації 30 нмоль/л агатоксину значення КПС збільшилось на 6 ± 3%, при аплікації 200 нмоль/л агатоксину – на 9 ± 4%, а при аплікації 200 нмоль/л конотоксину – на 11 ± 2% (рис. 10). Отже опосередкований внесок P/Q- типу та N-типу кальцієвих каналів у пластичність гальмі-

вної синаптичної передачі в межах похибки є однаковим. Після сумісного блокування P/Q- та N-типів кальцієвих каналів спостерігалося збільшення КПС порівняно із контролем на 23 ± 7%, а при аплікації кадмію – на 22 ± 11 %. Це збільшення є однаковим. Отже, блокування високопорогових кальцієвих каналів зменшує депресію або збільшує полегшення синаптичної передачі. Наші результати узгоджуються із даними, які свідчать, що зменшення потоку Ca^{2+} в пресинаптичну терміналь знижує депресію, зменшуючи початкове вивільнення нейромедіатора (Zucker, 1989). Було підраховано, що при блокуванні P/Q-типу та N-типу кальцієвих каналів коефіцієнт парної стимуляції збільшився майже однаково, а при почерговому блокуванні P/Q- та N-типів кальцієвих каналів коефіцієнт парної стимуляції збільшується на величину, що в межах похибки і є алгебраїчною сумою при окремому блокуванні цих каналів та тотожна зміні КПС при блокуванні всіх високопорогових кальцієвих каналів. Тобто, якщо у регуляції гальмівної синаптичної передачі припускається участь R-типу кальцієвих каналів, то єдиними високопороговими каналами, які здатні моделювати пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі є P/Q- та N-типи кальцієвих каналів.

Для зареєстрованих струмів, був проведений порівняльний аналіз квантових показників синаптичної передачі у контролі та при аплікації блокаторів P/Q- та N-типів кальцієвих каналів.

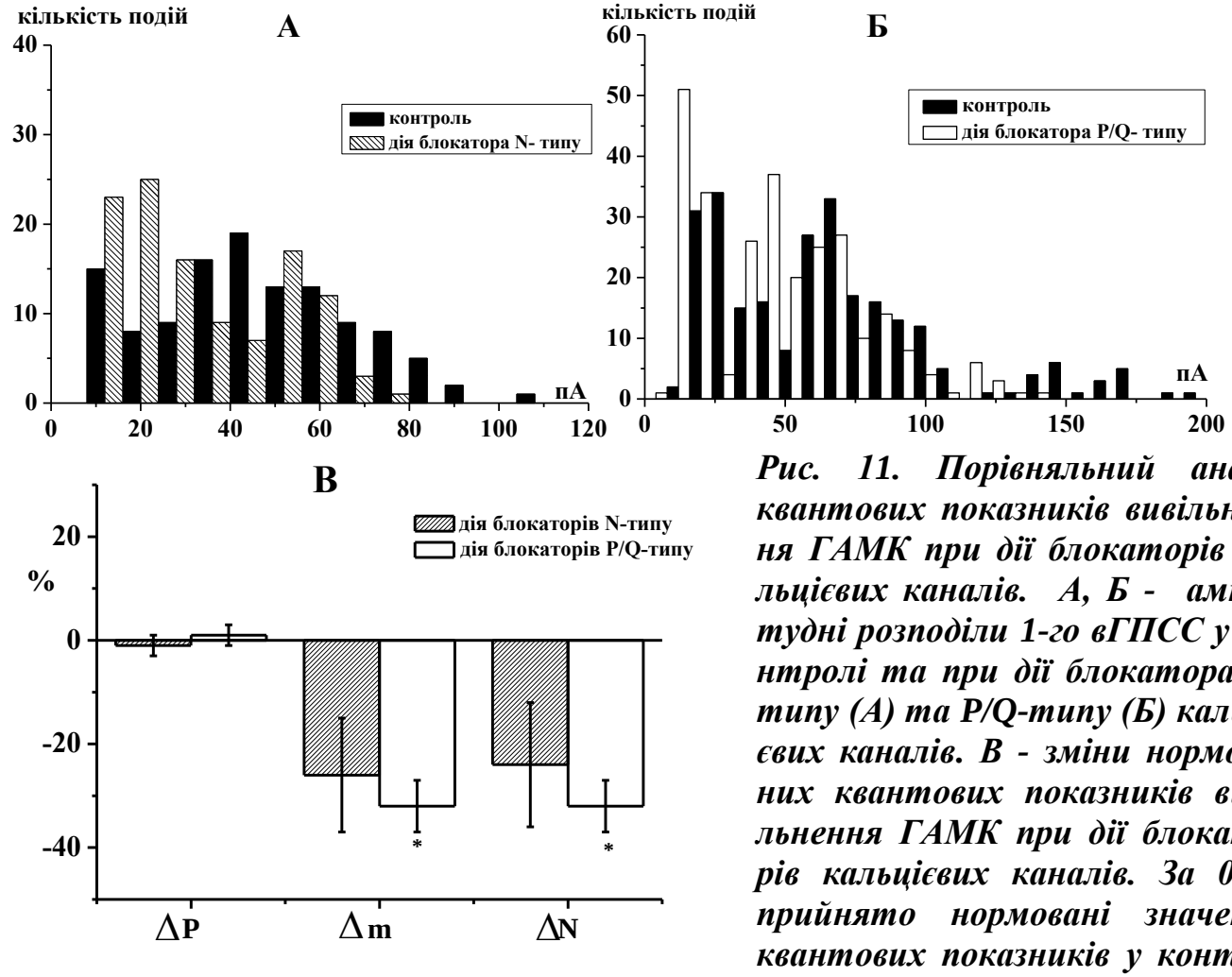


Рис. 11. Порівняльний аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при дії блокаторів кальцієвих каналів. А, Б - амплітудні розподіли 1-го вГПСС у контролі та при дії блокатора N-типу (А) та P/Q-типу (Б) кальцієвих каналів. В - зміни нормованих квантових показників вивільнення ГАМК при дії блокаторів кальцієвих каналів. За 0 % прийнято нормовані значення квантових показників у контролі. ΔP – зміна ймовірності вивільнення ГАМК, Δm – зміна відносного квантового вмісту, ΔN – зміна відносного біноміального показника.

Імовірність вивільнення ГАМК в обох випадках є майже незмінною. З аналізу розподілу амплітуд вГПСС в контролі та при дії блокаторів кальцієвих каналів визначили, що змінюється величина квантового вмісту та число місць вивільнення везикул (рис.11, А, Б). Використовуючи аналіз квантових показників, з'ясували,що при аплікації 200 нмоль/л ω-конотоксину показники зменшуються порівняно з початковими значеннями відповідно на 26 ± 11% і 24 ± 12 % (n = 6), а при аплікації 200 нмоль/л ω-агатоксину – на 32 ± 5 % (n = 15) однаково обидва показники (рис.11, В). Для цих же нейронів був розрахований коефіцієнт варіації вГПСС. При аплікації блокаторів N- та P/Q-типів кальцієвих каналів значення CV збільшилось відповідно на 38 ± 21 % та на 27 ± 14 %. Проте ці зміни не були достовірними.

6. Вплив блокування кальцієвої АТФази ендоплазматичного ретикулума на пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Крім трансмембранних механізмів входу іонів кальцію важливу роль в регуляції $[Ca^{2+}]_i$ відіграють внутрішньоклітинні кальцієві депо. Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) здатний накопичувати кальцій за допомогою сарко(ендо)плазматичної транспортної АТФази (SERCA). Специфічними блокаторами такого транспорту є тапсигаргін (J. Lytton et al., 1991) та циклопіазонова кислота (Seidler et al., 1989). Загальновідомо, що ендоплазматичний ретикулум присутній в пресинаптичній терміналі нейронів гіпокампа (Sharp et al., 1993;Emptage, et al., 1999). Експериментальні результати, що були отримані на пірамідальних нейронах CA1 зони та вентральному гіпокампі, вказують на те, що кальцій, який вивільнюється з внутрішньоклітинного депо бере участь у регуляції довготривалої пластичності синаптичної передачі (Welsby et al., 2006; Martin and Buno, 2003; Grigoryan et al., 2012).

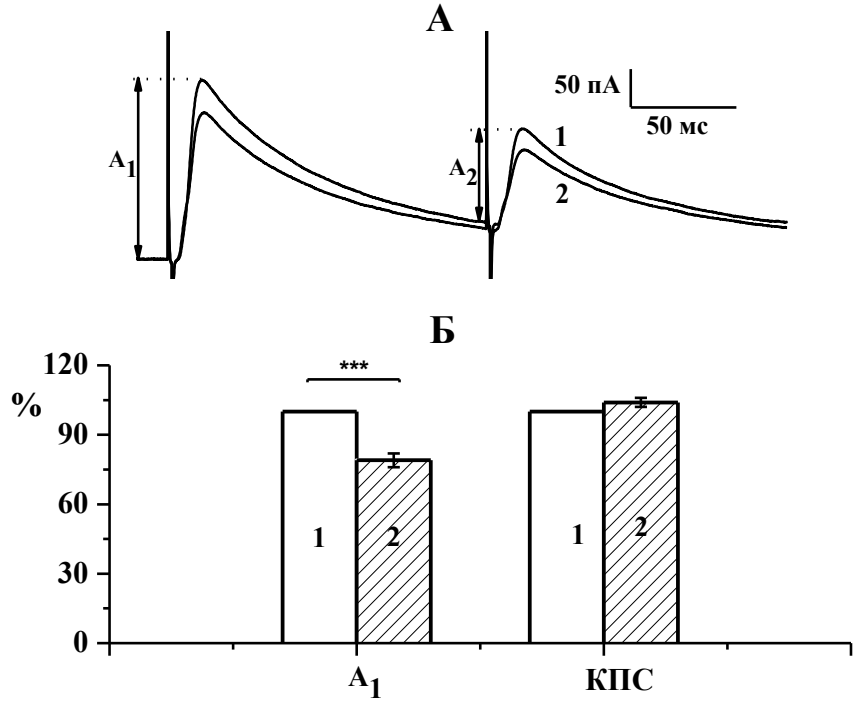


Рис. 12. Дія циклопіазонової к-ти на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС). А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації блокаторів. Б – нормовані значення амплітуди 1-го вГПСС та коефіцієнта парної стимуляції (КПС) відносно контролю. 1-контроль, 2- дія 20 мкмоль/л циклопіазонової к-ти.

Також може змінювати частоту мініатюрних гальмівних та збудливих струмів та частоту спонтанної активності синапсів гіпокампа (Savic and Sciancalepore**,** 1998; Emptage, et al., 2001; Simkus and Stricker, 2002). Проте роль кальцієвого депо, а саме ендоплазматичного ретикулума, в регуляції короткотривалої пластичності досі є суперечливою. Спустошення депо ендоплазматичного ретикулума і, як наслідок, виключення його з участі у процесі генерації кальцієвого сигналу в пресинаптичних терміналях, ви викликалось за допомогою локальної аплікації циклопіазонової кислоти в концентрації 20 мкмоль/л. Як і очікувалось, блокатор зменшив амплітуду 1-го і 2-го вГПСС на 21 ± 3% та 18 ± 3% відповідно проте залишив майже не змінним значення КПС порівняно з контрольними (ΔКПС = 4 ± 2 %, n=8) (Рис. 12). Також було з'ясовано, що розрахований коефіцієнт варіації амплітуд цих струмів у контролі та при дії блокатора у межах похибки не змінювався (0,13 ± 0,02 у контролі та 0,16 ± 0,02 при дії блокатора).

При аплікації тапсигаргіну в концентрації 1мкмоль/л блокатор зменшував амплітуду 1-го і 2-го вГПСС порівняно з контрольними значеннями на 30 ± 4% і 28 ± 4% відповідно та залишив майже не змінним значення КПС (ΔКПС = 3 ±1 %, n=16) та коефіцієнт варіації амплітуди вГПСС (Рис. 13). Отже, оскільки при аплікації блокаторів кальцієвої АТФази ендоплазматичного ретикулума змін у коефіцієнті парної стимуляції не було визначено, можна зробити висновок, що спустошення депо не впливає на регуляції короткочасної пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між нейронами гіпокампа.

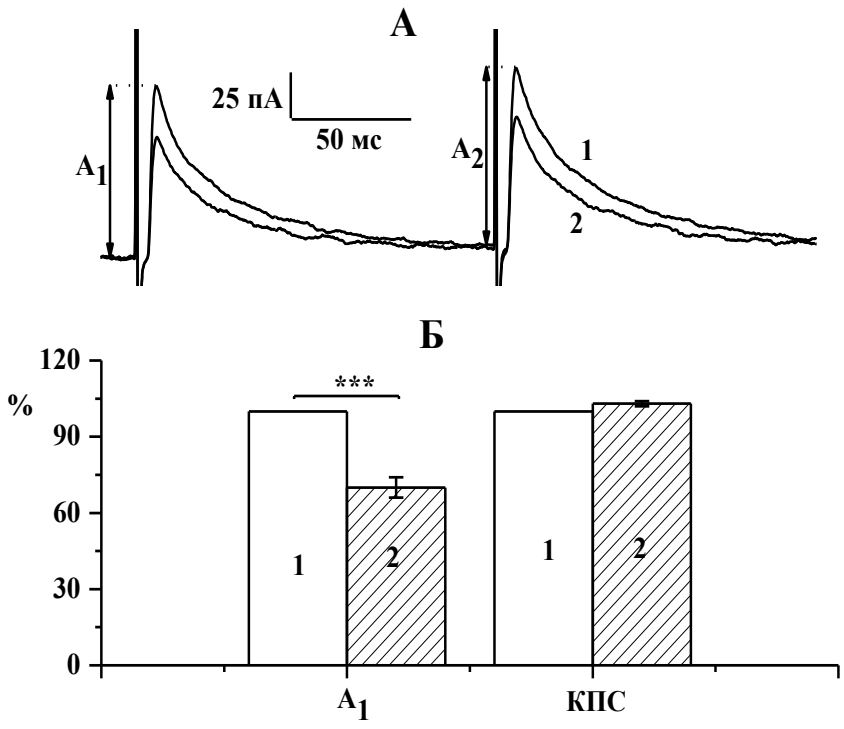


Рис. 13. Дія тапсигаргіну на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС). А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації блокаторів. Б – нормовані значення амплітуди 1-го вГПСС та коефіцієнта парної стимуляції (КПС) відносно контролю. 1- контроль, 2 - дія 1 мкмоль/л тапсигаргіну.

В нашій роботі був досліджений механізм участі кальцієвих депо в процесі екзоцитозу який полягав в тому, що існує вірогідність, що кальцієві депо здатні вивільнювати Ca^{2+} лише після активації плазматичних кальцієвих каналів, і результуюче підвищення $[Ca^{2+}]_i$ відбудеться надто пізно відносно відповідного вГПСС, однак ця активація може підвищити чутливість апарату екзоцитозу до наступного кальцієвого сигналу. В такому випадку, коли депо порожні, перший вГПСС у парі залишиться незмінним, а амплітуда другого повинна змінитись. Проте в наших експериментах

при аплікації у зовнішньоклітинний розчин блокаторів кальцієвої АТФази, зменшувались однаково обидві відповіді, отже і значення коефіцієнта парної стимуляції в межах похибки не змінювалось порівняно з контрольним. Це ставить під сумнів можливість «затриманого підсилення» кальцієвого сигналу ендоплазматичним ретикулумом в досліджуваних ГАМК-ергічних синаптичних з'єднаннях. Хоча в роботі, проведеній на пірамідних нейронах гіпокампа у зрізі, досліджуючи кальцієвий транзієнт на аксонах та пресинаптичних терміналях, автори дійшли висновку, що кальцій, що вивільнюється з внутрішньоклітинного депо задіяний у процесі формування полегшення при парній стимуляції (Emptage, et al., 2001). На противагу, детальне дослідження полегшення при парній стимуляції на збудливих синапсах гіпокампа і мозочка не знайшло підтвердження, що ендоплазматичний ретикулум бере участь у цьому феномені (Carter et al., 2002). Проте депо може брати участь у змінах рівня кальцію між періодами екзоцитозу. Ці зміни, у свою чергу, можуть регулювати загальну готовність пресинаптичної терміналі до вивільнення нейромедіатора при надходженні потенціалу дії (Galante and Marty, 2003). Ендоплазматичний ретикулум за допомогою кальцієвих насосів може ефективно виводити кальцій з цитоплазми, додавши блокатори, ми унеможливили цей процес і як результат амплітуда вГПСС зменшилась оскільки зменшився кальцієвий транзієнт. Такий же результат був отриманий на дендритних шипиках нейронів гіпокампа (Emptage, et al., 1999).

ВИСНОВКИ

За допомогою методів позаклітинної електричної стимуляції пресинаптичного аксона та фіксації потенціалу на постсинаптичній клітині культивованих нейронів гіпокампа було досліджено кальційзалежну регуляцію короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

1. Показано, що короткотривала пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа обумовлюється переважно пресинаптичними механізмами.
2. З'ясовано, що існує достовірна різниця в початкових квантових показниках, що характеризують вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні синаптичної передачі. Короткотривалу пластичність синаптичної передачі можна пояснити збільшенням (при полегшенні) або зменшенням (при депресії) числа місць вивільнення везикул та їх квантового вмісту.
3. Показано, що короткотривала депресія та полегшення ГАМК-ергічної синаптичної передачі мають різну динаміку відновлення. Після депресії відновлення триває більше секунди і описується експоненціальною функцією. Після полегшення відновлення триває не більше 500 мс і має дзвіноподібну форму.
4. Визначено, що у регуляції короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа беруть участь тільки P/Q- та N-типи кальцієвих каналів.
5. Показано, що в ГАМК-ергічних синаптичних з'єднаннях Ca^{2+}–АТФаза ендоплазматичного ретикулума не задіяна в регуляції короткотривалої пластичності швидкої синаптичної передачі.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Мізерна О.П. Вплив тапсигаргіну на гальмівну синаптичну передачу в культурі нейронів гіпокампа щура. /О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. // Нейрофизиология – 2007. – №4/5(39). – С.374-76.
(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

2. Мізерна О.П. Участь N-типу потенціалкерованих кальцієвих каналів в регуляції пластичності гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. /О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. //Фізіол.журн. – 2009. – № 4(55). – С.17-23.
(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

3. Мізерна О.П. Кальційзалежна регуляція депресії гальмівної синаптичної передачі блокатором N-типу кальцієвих каналів у культурі нейронів гіпокампа. /О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. //Фізіол.журн. – 2010. – № 1(56). – С.118-26.
(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

4. Мізерна О.П. Неоднорідний розподіл і внесок P- та P/Q-типів кальцієвих каналів у короткочасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. /О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. // Фізіол.журн. – 2010. – № 6(56). – С.3-11.
(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

5. Колесник О.П. Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткочасній депресії та полегшенні синаптичної передачі. /О.П. Колесник, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. // Фізіол.журн. – 2016. – № 5(62). – С.12-18.
(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

6. Колесник О.П. Частотна модуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі. /О.П. Колесник, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. // Фізіол.журн. - 2017. – № 4(63). – С.10-16.
(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)

Тези доповідей:

1. Мізерна О.П. Дослідження короткочасної пластичності гальмівної синаптичної передачі за допомогою парної стимуляції аксонів в культурі нейронів гіпокампа щура. /О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. // Збірник тез 2-го З'їзду Українського Товариства Клітинної Біології. – Київ. – 2007. – с.183. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

2. Mizerna O.P. Dependence of inhibitory synaptic transmission efficiency on various extracellular calcium concentrations. /O. P. Mizerna, S. A. Fedulova, N. S. Veselovsky. //School Program of European Synapse Summer School. Bordeaux, France. – 2008. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

3. Мізерна О.П. Кальційзалежна регуляція депресії при парній стимуляції ω-конотоксином–GVIA. /О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. //Матеріали IX Всеукраїнської наукова конференції студентів та молодих науковців "Біологічні дослідження молодих учених в Україні". – Київ. – 2009. – 66 с. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

4. Mizerna O.P. Effect of omega-conotoxin- GVIA on calcium-dependent paired pulse depression in cultured hippocampal neurons, Symposium "Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling". /O. P. Mizerna, S. A. Fedulova, N. S. Veselovsky. // Program &Abstract book. 2009. – P. 25. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

5. Мізерна О.П. Регуляція пластичності ГАМК-ергічних вГПСС, що зумовлена попередньою активністю синапса в культурі нейронів гіпокампа щура,V Конгрес Українського Товариства Нейронаук. /О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. // Програма – Київ. – 2011. – с.95. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

6. Мізерна О.П. Розподіл і вклад P/Q-типу кальцієвих каналів у короткочасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. /О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. //V З'їзд Українського Біофізичного Товариства: Тези доповідей. – Луцьк. – 2011 – с.96. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

7. Kolesnyk O.P. Frequency-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission, Conference for young scientist, /O. P. Kolesnyk, S. A. Fedulova, N. S. Veselovsky. //Abstract Book. Kyiv. 2015. – p.148. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

8. Колесник О.П. Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткотривалій депресії та полегшенні синаптичної передачі. /О.П. Колесник, С.А. Федулова, М.С. Веселовський. //VII конгрес Українського товариства нейронаук. Київ. – 2017 – с.89. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

АНОТАЦІЯ

Колесник О.П. Регуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між нейронами гіпокампа .- Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена з'ясуванню кальційзалежних механізмів регуляції короткотривалої пластичності нейропередачі в ГАМК-ергічних синапсах нейронів гі-

покампа в умовах культури. Для проведення досліджень використовували первину культуру дисоційованих нейронів гіпокампа щура. У роботі були використані методи позаклітинної локальної електричної стимуляції пресинаптичного аксона та фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» на постсинаптичному нейроні. Показано, що швидка гальмівна нейропередача в даних синапсах відбувається завдяки пресинаптичному вивільненню ГАМК і взаємодії його з постсинаптичними $ГАМК_A$-рецепторами. За допомогою аналізу коефіцієнта варіації та дослідженню коефіцієнта парної стимуляції з'ясовано, що короткотривала пластичність при парній стимуляції була обумовлена тільки пресинаптичними механізмами. Вперше був проведений детальний аналіз квантових показників ГАМК-ергічної синаптичної передачі одночасно для депресії і полегшення при парній стимуляції. Із застосуванням біноміальної статистики визначена достовірна різниця в квантових показниках вивільнення ГАМК при збільшенні та зменшенні ефективності синаптичної передачі. Детально описаний частотний діапазон регуляції короткотривалих пластичних властивостей депресії та полегшення в ГАМК-ергічних синапсах гіпокампа. Встановлено, що відновлення після депресії та полегшення нейропередачі має відповідно експоненційну та дзвіноподібну форму. Вперше визначено, що кальційзалежні зміни ефективності синаптичної передачі модулюються виключно P/Q- та N-типами високопорогових кальцієвих каналів, а кальцієва АТФаза ендоплазматичного ретикулума не задіяна у регуляції короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Ключові слова: синаптична передача, короткотривала пластичність, гіпокамп, ГАМК, квантовий аналіз, кальцієві канали, ендоплазматичний ретикулум.

АННОТАЦИЯ

Колесник О.П. Регуляция кратковременной пластичности ГАМКергической синаптической передачи между нейронами гиппокампа. - Рукопись

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена изучению кальцийзависимых механизмов регуляции кратковременной пластичности нейропередачи в ГАМКергических синапсах нейронов гиппокампа в условиях культуры. Для проведения исследований использовали культуру диссоциированных нейронов гиппокампа крысы. В работе использовались методы внеклеточной локальной электрической стимуляции пресинаптического аксона и фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» на постсинаптическом нейроне. Показано, что быстрая тормозная нейропередача в данных синапсах происходит благодаря пресинаптичному освобождению ГАМК и его взаимодействию с постсинаптическими $ГАМК_A$-рецепторами. С помощью анализа коэффициента вариации и исследованию коэффициента парной стимуляции установлено, что кратковременная пластичность при парной стимуляции была обусловлена только пресинаптическими механизмами. Впервые был проведен детальный анализ квантовых показателей ГАМКергической синаптической передачи одновременно для депрессии и облегчения при парной стимуляции. С использованием биномиальной стати-

стики определена достоверная разница в квантовых показателях высвобождения ГАМК при увеличении и уменьшении эффективности синаптической передачи. Детально описан частотный диапазон регуляции кратковременных пластичных свойств депрессии и облегчения в ГАМКергических синапсах гиппокампа. Установлено, что восстановление после депрессии и облегчения нейропередачи имеет соответственно экспоненциальную и колоколообразную форму. Впервые показано, что кальцийзависимые изменения эффективности синаптической передачи моделируются исключительно P/Q- и N-типами высокопороговых кальциевых каналов, а кальциевая АТФаза эндоплазматического ретикулума не задействована в регуляции кратковременной пластичности ГАМКергической синаптической передачи.

Ключевые слова: синаптическая передача, кратковременная пластичность, гиппокамп, ГАМК, квантовый анализ, кальциевые каналы, эндоплазматический ретикулум.

SUMMARY

Kolesnyk O.P. Regulation of short-term plasticity GABAergic synaptic transmission between hippocampal neurons. – Manuscript.

Thesis for PhD degree by specialty 03.00.02 – biophysics. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

In the present study, we investigated calcium-dependent mechanisms of regulation of short-term plasticity of GABAergic transmission in cultured hippocampal neurons. Changes in amplitudes of evoked inhibitory postsynaptic currents from rat cultured hippocampal neurons were studied using whole-cell patch-clamp technique in postsynaptic neuron and local extracellular electrical paired pulse stimulation of single presynaptic axon. According to coefficient of variance analysis (CV) and studying paired pulse ratio it was found that CV of second respond was significantly larger than CV first during depression and significantly smaller during facilitation. Thus, only presynaptic mechanism underlies short-term depression and facilitation. For the first time, a detailed analysis of the quantal parameters of GABAergic synaptic transmission was performed simultaneously for depression and facilitation with paired pulse stimulation assuming that transmitter release is reasonably described by a binomial distribution. There is significant difference in quantal parameters characterizing GABA release during increasing and decreasing of efficacy of synaptic transmission. The frequency range of regulation of short-term properties of depression and facilitation at the GABAergic synapse of the hippocampus is described in detail. Rate recovery from paired pulse depression is well described with a single exponential function and recovery from paired pulse facilitation has bell-shaped. For the first time, we showed that calcium-dependent changes in the efficacy of synaptic transmission are modulated only by P/Q and N-types of high-threshold calcium channels, and calcium ATPase of the endoplasmic reticulum is not involved in the regulation of short-term plasticity of the GABAergic synaptic transmission.

Keywords: synaptic transmission, short-term plasticity, hippocampus, GABA, quantal analysis, calcium channels, endoplasmic reticulum.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

$[Ca^{2+}]_i$	внутрішньоклітинна концентрація вільних іонів кальцію
$[Ca^{2+}]_o$	зовнішньоклітинна концентрація вільних іонів кальцію
DL-AP5	DL-2-аміно-5-фосфоновалеріанова кислота
DMSO	диметилсульфоксид
DNQX	6,7-динітрохіноксалін-2,3-діон
EGTA	етиленгліколь-біс(2-аміноетиловий ефір)- тетраоцтова к-та
HEPES	4-(2-гідроксіетил) піперазин-1-етансульфонова кислота
NMDA	N-метил-D-аспартат
АТФ	аденозинтрифосфат
вГПСС	викликаний гальмівний постсинаптичний струм
ГАМК	γ-аміномасляна кислота
КПС	коефіцієнт парної стимуляції
CV	коефіцієнт варіації амплітуд струмів