

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

*Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису*

Колесник Оксана Павлівна

УДК 577.352.5+612.822

**РЕГУЛЯЦІЯ КОРОТКОТРИВАЛОЇ ПЛАСТИЧНОСТІ ГАМК-
ЕРГІЧНОЇ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ МІЖ НЕЙРОНАМИ
ГШОКАМПА**

Спеціальність 03.00.02 – Біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело Колесник О.П. _____

Науковий керівник: Федулова Світлана Анатоліївна, д.б.н., професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Колесник О.П. Регуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між нейронами гіпокампа. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 «Біофізика». - Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2018.

У дисертаційній роботі представлені результати електрофізіологічних досліджень присвячених виявленню особливостей кальційзалежної модуляції ефективності синаптичної ГАМК-ергічної передачі між нейронами гіпокампа.

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 постсинаптичній клітині. Аплікацію розчинів, що містили блокатори кальцієвих каналів та кальцієвої АТФази, проводили за допомогою швидкої локальної перфузії.

У дисертаційній роботі досліджені і кількісно охарактеризовані властивості короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа та механізми її регуляції. 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 переважно 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 була визначена

достовірна різниця в квантовій природі вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні проведення 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 ретикулула не задіяна у регуляцію короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

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 важливе прикладне значення. Результати наших досліджень стосовно ролі пресинаптичних високопорогових кальцієвих каналів та кальцієвої АТФази ендоплазматичного ретикулула дають нове розуміння пресинаптичного регулювання депресії та полегшення проведення ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Детально описаний частотний діапазон регуляції короткотривалих пластичних властивостей депресії та полегшення в ГАМК-ергічних синапсах гіпокампа 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 нових підходах лікування певних невротичних розладів.

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

SUMMARY

Kolesnyk O.P. Regulation of short-term plasticity GABAergic synaptic transmission between hippocampal neurons. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts. Thesis for PhD degree by specialty 03.00.02 “biophysics”. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation presents the results of electrophysiological studies devoted to revealing of features of calcium-dependent modulation of efficiency of GABAergic synaptic transmission between hippocampal neurons.

In our research, the primary culture of the dissociated neurons of the rat's hippocampus was used. 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. The application of solutions containing calcium channel and calcium ATPase blockers was performed by rapid local perfusion.

In the present study, the properties of short-term plasticity of the GABAergic synaptic transmission and its mechanisms of regulation are investigated and quantitatively characterized. It is shown that fast inhibitory synaptic transmission in these synapses is due to the presynaptic release of GABA and its interaction with post-synaptic GABA_A receptors.

According to coefficient of variance analysis (CV) and studying paired pulse ratio 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. It has been determined that 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.

The results of this study have fundamental importance since they expand the existing knowledge of the short-term regulation of the plasticity of the GABAergic synaptic transmission with the paired stimulation of the presynaptic axon.

The disclosure of the principles and mechanisms of regulation of short-term plasticity and modulation of synaptic transmission has an important application value. The results of our research about the role of presynaptic high-threshold calcium channels and calcium ATPase of the endoplasmic reticulum provide a new understanding of presynaptic regulation of depression and facilitating of GABAergic synaptic transmission. A detailed description of the frequency range of short-term plastic properties of regulation depression and facilitation in the GABAergic

hippocampal synapses is important for the formation of more complete representations about mechanisms that play a fundamental role in the normal functioning of the central nervous system and the development of neuronal networks.

Practical importance of obtained results is to find new approaches for using selective calcium channel blockers and certain rates of stimulation of GABAergic neurons to achieve therapeutic effects of enhancing or relaxing inhibitory control of the excitatory system in the hippocampus, which can be used in new approaches for the treatment of certain neurotic disorders.

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

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Вплив тапсигаргіну на гальмівну синаптичну передачу в культурі нейронів гіпокампа щура. *Нейрофізіологія*. 2007;4/5(39):374-76. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*
2. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Участь N-типу потенціалкерованих кальцієвих каналів в регуляції пластичності гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. *Фізіол.журн*. 2009; 4(55):17-23. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*
3. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Кальційзалежна регуляція депресії гальмівної синаптичної передачі блокатором N-типу кальцієвих каналів у культурі нейронів гіпокампа. *Фізіол.журн*. 2010;1(56):118-26. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень,*

статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

4. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Неоднорідний розподіл і внесок P- та P/Q-типів кальцієвих каналів у короткочасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. Фізіол.журн. 2010;6(56):3-11. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

5. Колесник ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткочасній депресії та полегшенні синаптичної передачі. Фізіол.журн. 2016;5(62):12-18. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

6. Колесник ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Частотна модуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Фізіол.журн. 2017;4(63):10-16. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Дослідження короткочасної пластичності гальмівної синаптичної передачі за допомогою парної стимуляції аксонів в культурі нейронів гіпокампа щура. Збірник тез 2-го З'їзду Українського Товариства Клітинної Біології. Київ. 2007:183. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
2. Mizerna OP, Fedulova SA, Veselovsky NS. Dependence of inhibitory synaptic transmission efficiency on various extracellular calcium concentrations. School

Program of European Synapse Summer School. Bordeaux, France. 2008.
Публікація тез, участь у постерній сесії.

3. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Кальційзалежна регуляція депресії при парній стимуляції ω -конотоксином–GVIA. Матеріали ІХ Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих науковців “Біологічні дослідження молодих учених в Україні”. Київ. 2009: 66 с.
Публікація тез, участь у постерній сесії.
4. Mizerna OP, Fedulova SA, Veselovsky NS. Effect of omega-conotoxin- GVIA on calcium-dependent paired pulse depression in cultured hippocampal neurons, Symposium “Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling”. Program & Abstract book. 2009: 25. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
5. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Регуляція пластичності ГАМК-ергічних вГПСС, що зумовлена попередньою активністю синапса в культурі нейронів гіпокампа щура, V Конгрес Українського Товариства Нейронаук. Програма. Київ. 2011:95. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
6. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Розподіл і вклад P/Q-типу кальцієвих каналів у короточасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. V З’їзд Українського Біофізичного Товариства: Тези доповідей. Луцьк. 2011:96. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
7. Kolesnyk OP, Fedulova SA, Veselovsky NS. Frequency-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission, Conference for young scientist. Abstract Book. 2015:148. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
8. Колесник ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткотривалій депресії та полегшенні синаптичної передачі. VII конгрес Українського товариства нейронаук. Київ. 2017:89. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	12
ВСТУП.....	13
РОЗДІЛ 1	21
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ	21
1.1 ГАМК-ЕРГІЧНА СИНАПТИЧНА ПЕРЕДАЧА.....	21
1.1.1 ГАМК як основний гальмівний медіатор у головному мозку ...	21
1.1.2 Класифікація ГАМК-рецепторів.....	22
1.2 Роль іонів кальцію у синаптичній передачі	25
1.2.1 Участь іонів кальцію у процесі вивільнення нейромедіатора ...	25
1.2.2 Молекулярний механізм процесу вивільнення нейромедіатора	26
1.3 КВАНТОВА ПРИРОДА СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ В СИНАПСАХ ЦНС.....	28
1.4 ПЛАСТИЧНІСТЬ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ	30
1.4.1 Короткочасна пластичність синаптичної передачі	31
1.4.2 Полегшення при парній стимуляції.....	32
1.4.3 Депресія при парній стимуляції.....	33
1.5 Роль кальцієвих каналів у регуляції пластичності синаптичній ПЕРЕДАЧІ.....	35
1.5.1 Низькопорогові кальцієві канали.....	35
1.5.2 Високопорогові кальцієві канали.....	36
1.5.3 Роль кальцієвих каналів у здійсненні синаптичної передачі	39
1.5.4 Участь пресинаптичних кальцієвих каналів в регуляції пластичності синаптичної передачі	40
1.5.5 Ендоплазматичний ретикулум – депо іонів кальцію	42
РОЗДІЛ 2	44
МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ.....	44

2.1	ОТРИМАННЯ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ ДИСОЦІЙОВАНИХ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА	
	44	
2.2	МЕТОДИКА ФІКСАЦІЇ ПОТЕНЦІАЛУ В КОНФІГУРАЦІЇ «ЦІЛА КЛІТИНА»	45
2.3	МЕТОДИКА ПОЗАКЛІТИННОЇ ЕЛЕКТРИЧНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ АКСОНА	
	ПРЕСІНАПТИЧНОГО НЕЙРОНА	46
2.4	СИСТЕМА ПІДВЕДЕННЯ РОЗЧИНІВ	47
2.5	РОЗЧИНИ ТА РЕАКТИВИ	50
2.6	АНАЛІЗ ДАНИХ	51
РОЗДІЛ 3		52
РЕЗУЛЬТАТИ		52
3.1	ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТИПУ ІОНІВ, ЯКІ ОПОСЕРЕДКОВУЮТЬ ВИКЛИКАНІ	
	ПОСТСІНАПТИЧНІ СТРУМИ, ЗАРЕЄСТРОВАНІ МІЖ КУЛЬТИВОВАНИМИ НЕЙРОНАМИ	
	ГІПОКАМПА ЩУРА	52
3.2	ВИЗНАЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ, ЯКІ ОБУМОВЛЮЮТЬ КОРОТКОТРИВАЛУ	
	ПЛАСТИЧНІСТЬ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СІНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ	55
3.3	АНАЛІЗ КВАНТОВИХ ПОКАЗНИКІВ, ЯКІ ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ ВИВІЛЬНЕННЯ	
	ГАМК ПРИ ПЛАСТИЧНОСТІ СІНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ	59
3.4	ЧАСТОТНА МОДУЛЯЦІЯ КОРОТКОТРИВАЛОЇ ПЛАСТИЧНОСТІ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ	
	СІНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ	65
3.5	УЧАСТЬ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ПЛАСТИЧНОСТІ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ	
	СІНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ МІЖ КУЛЬТИВОВАНИМИ НЕЙРОНАМИ ГІПОКАМПА	69
	3.5.1 Участь P-, Q- та N-типів кальцієвих каналів у регуляції	
	пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі	69
	3.5.2 Загальна участь високопорогових кальцієвих каналів у регуляції	
	гальмівної синаптичної передачі	75
3.6	ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ПОПУЛЯЦІЇ ГАЛЬМІВНИХ НЕЙРОНІВ В ГІПОКАМПІ	80
3.7	АНАЛІЗ КВАНТОВИХ ПОКАЗНИКІВ СІНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ У КОНТРОЛІ ТА	
	ПРИ АПЛІКАЦІЇ БЛОКАТОРІВ P/Q- ТА N-ТИПІВ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ	84

3.8	Роль еНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА У РЕГУЛЯЦІЇ ПЛАСТИЧНОСТІ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ	86
3.9	ЗАЛЕЖНІСТЬ ПЛАСТИЧНОСТІ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ ВІД ЗОВНІШНЬОКЛІТИННОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ КАЛЬЦІУ	89
РОЗДІЛ 4		93
ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ		93
4.1	Пресинаптичні механізми регулюють вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні синаптичної передачі	93
4.2	Роль кальцієвих каналів в регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі	97
4.3	Роль еНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА В РЕГУЛЯЦІЇ КОРОТКОТРИВАЛОЇ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ ПЛАСТИЧНОСТІ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ	100
4.4	Роль зовнішньоклітинного кальцію в регуляції короткочасної ГАМК-ергічної пластичності синаптичної передачі	102
РОЗДІЛ 5		104
ВИСНОВКИ		104
РОЗДІЛ 6		105
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		105

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-аміноетилловий ефір)- тетраоцтова кислота
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 амплітуди струму

ВСТУП

Актуальність теми

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) [51, 186]. Різні дисфункції ГАМК-ергічної системи корелюють з підвищенням тривоги і розвитком депресії та інших невротичних розладів.

Одним з завдань сучасної нейрофізіології є з'ясування механізмів та особливостей регуляції пластичності нейропедачі між нейронами ЦНС. Гіпокамп є однією з ключових ланок в механізмі формування короткотривалої пам'яті, його активність тісно пов'язана з ГАМК-ергічною передачею. Одним з завдань сучасної нейрофізіології є з'ясування механізмів та особливостей регуляції пластичності нейропедачі між нейронами ЦНС.

Пластичність синаптичної педачі – це здатність синапсів до функціональних і морфологічних змін в процесі активності, для яких характерне збереження їх протягом певного часу [1, 88, 117, 170, 237].

В гіпокампі ці зміни лежать в основі процесів навчання, формування пам'яті, вдосконалення навиків людини, а також відновлення її нервової діяльності після травм і хвороб головного мозку.

В залежності від часу, протягом якого зберігаються зміни ефективності синаптичної педачі, розрізняють короткотривалу та довготривалу пластичність. В нашій роботі досліджується короткотривала пластичність, що спостерігається від десятків мілісекунд до декількох секунд і проявляється в зміні ефективності синаптичної педачі при повторній стимуляції.

Тому дослідження принципів та механізмів модуляції пластичності саме ГАМК-ергічної синаптичної передачі є актуальним і важливими у зв'язку з її виключною роллю у регуляції збуджувальної нейропередачі.

Загальновідомо, що вивільнення ГАМК 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 [47, 83, 84, 140], або з вивільненням кальцію з внутрішньоклітинного депо, сформованого ендоплазматичним ретикуломом [48, 240].

З електрофізіологічних досліджень відомо, що нейрони гіпокампа експресують набір різних потенціалкерованих кальцієвих каналів з відмінними фармакологічними і кінетичними характеристиками [12, 75, 120, 205, 207, 235]. Крім того, в одній популяції нейронів гіпокампа вивільнення нейромедіатора може контролюватися різним набором кальцієвих каналів. Саме ГАМК-ергічні нейрони відзначаються особливою неоднорідністю розподілу цих каналів у пресинаптичному закінченні [159, 161].

Безліч механізмів прямо чи опосередковано модулюють функції пресинаптичних кальцієвих 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 і функціонування гальмівної передачі в гіпокампі.

Оскільки вхід кальцію під час активації потенціалкерованих кальцієвих каналів забезпечує подальше Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} з депо внаслідок активації ріанодинових рецепторів ендоплазматичний ретикулум є важливим джерелом кальцієвого сигналу який може призводити до пластичності в центральних синапсах і відігравати важливу роль у регуляції ефективності

синаптичної передачі [8, 9]. Існують експериментальні дані, які вказують, що кальцій, який вивільнюється з внутрішньоклітинного депо, бере участь у регуляції довготривалої пластичності синаптичної передачі [217, 116, 68, 71, 163] та впливає на частоту спонтанної активності [175, 48, 185]. Проте, роль кальцію, який вивільнюється з кальцієвого депо, в регуляції короткотривалої пластичності досі є суперечною.

Розкриття принципів та механізмів модуляції ефективності синаптичної передачі є важливими для формування більш повних уявлень про механізми, які відіграють фундаментальну роль в нормальному функціонуванні ЦНС та розвитку нейрональних мереж.

Як відомо, виникнення короткотривалої пластичності в різних синапсах є результатом пре- і/або постсинаптичних змін [230, 57, 223, 225]. Співвідношення внеску таких механізмів у забезпеченні короткотривалої пластичності залежить від відділу мозку та, типу синаптичних контактів. Тому актуальним є дослідження цього питання оскільки отриманні данні можуть внести ясність стосовно ГАМК-ергічних нейронів гіпокампа.

Зміна частоти та тривалості попередньої активності пресинаптичних нейронів здатна моделювати ефективність синаптичної передачі. 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 кальційзалежної регуляції короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дана робота виконана 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: 105U003232) 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 та завдання 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. Для досягнення цієї мети було поставлено наступні задачі:

1. Визначити механізми, що обумовлюють короткотривалу ГАМК-ергічну синаптичну передачу між культивованими нейронами гіпокампа.
2. Проаналізувати квантові показники, що 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.

Новизна отриманих результатів

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 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.

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 насамперед мають фундаментальний інтерес, оскільки отримані принципові дані про короткотривалу регуляцію пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі при парній стимуляції пресинаптичного аксона. Результати наших досліджень показали, що кальційзалежні зміни ефективності синаптичної передачі модулюються тільки певними типами високопорогових кальцієвих каналів, а кальцієва АТФаза ендоплазматичного ретикулула 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. Практична цінність роботи полягає у 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 як методи лікування певних невротичних розладів.

Особистий внесок пошукувача

Опрацювання літературних джерел, виконання експериментів та інтерпретація отриманих результатів проводились здобувачем особисто за участі керівника наукової роботи. Виготовлення культури нейронів гіпокампа, електрофізіологічні дослідження, 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

Загальні положення роботи доповідались на поточних наукових семінарах Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та наступних наукових конференціях:

симпозіум “Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation” (27-29 вересня 2007 р., 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 аркушу, 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

1.1 ГАМК-ергічна синаптична передача

Пріоритет в ідентифікації ГАМК як нейромедіатора належить Бейземуру, Елліоту і Флорі (1957). Вони знайшли в сенсорному нерві рецептора розтягнення ракоподібних інгібіторний еферентний компонент і продемонстрували, що екстракт мозку людини діє аналогічним чином. Пізніше ГАМК була ідентифікована в мозку хребетних як медіатор клітин Пуркін'є мозочка, а також багатьох інгібіторних проміжних нейронів спинного мозку і кори.

Порушення сигнальної функції ГАМК спостерігається при таких неврологічних і психіатричних захворюваннях, як: хвороба Хантінгтона, епілепсія, алкоголізм, шизофренія, порушення сну, хвороба Паркінсона.

1.1.1 ГАМК як основний гальмівний медіатор у головному мозку

Основним гальмівним медіатором у головному мозку ссавців є γ -аміномасляна кислота (ГАМК) [51, 186]. ГАМК була виявлена в тканині мозку в 1950 році [215]. Кертіс та Уоткінс першими показали, що ГАМК гальмує здатність нейронів ссавців розряджатися потенціалом дії [30]. Вважається, що близько 30% усіх синапсів головного мозку є ГАМК-ергічними [60].

ГАМК-ергічне гальмування здійснюється двома шляхами. При постсинаптичному механізмі гальмування ГАМК діє на рецептори, які знаходяться на сомі і на дендритах, викликаючи збільшення хлорної провідності, що приводить до гіперполяризації постсинаптичної мембрани. При

пресинаптичному механізмі дії ГАМК викликає деполяризацію терміналей, діючи через аксо-аксональні контакти на ГАМК_A-рецептори.

В організмі хребетних практично вся ГАМК синтезується при декарбоксилюванні глутамата. Існує дві ізоформи глутаматдекарбоксилази: GAD67 і GAD65. GAD67 розповсюджена у всій цитоплазмі нейронів, а GAD65 в основному локалізована в пресинаптичних терміналях ГАМК-ергічних інтернейронів. Експресія GAD65 ферменту суттєво змінюється в залежності від рівня активності нейрона. Це вказує на те, що даний фактор відіграє певну роль в регуляції ГАМК-ергічної передачі. Молекули ГАМК в пресинаптичній ділянці переносяться з цитоплазми до везикул за допомогою спеціальних транспортерів, які використовують протонний градієнт, що утворюється везикулярними АТФазами. У випадку ГАМК по протонному градієнту рухаються спочатку аніони Cl⁻, які потім обмінюються на аніони ГАМК [61]. Після вивільнення ГАМК у синаптичну щілину починається її захват електрогенними транспортерами. На сьогоднішній день відомі три такі транспортери: GAT1, GAT2 і GAT3 [181]. Ці транспортери локалізуються як в астроцитах, так і в самих нейронах. Оскільки транспорт є електрогеним, аніон амінокислоти переноситься разом із двома катіонами Na⁺ і одним аніоном Cl⁻ [23, 98]. Вказані типи транспортерів різняться специфікою локалізації.

1.1.2 Класифікація ГАМК-рецепторів

ГАМК діє на дві основні групи молекулярних рецепторів – іонотропні рецептори типу ГАМК_A/ГАМК_C і метаботропні рецептори типу ГАМК_B [18].

ГАМК_A-рецептори.

ГАМК_A-рецептори у ссавців складаються принаймні з 16 субодиниць, котрі згруповані в сім класів: α, β, γ, δ, ε, π і σ [122]. Комбінації цих субодиниць дають велику кількість ізоформ рецепторів. Композиція субодиниць також

визначає кінетику активації рецепторів і може мати вплив на їх десенситизацію. В гіпокампі з 16 субодиниць ГАМК_A-рецепторів тільки 10 експресуються в достатній кількості. Вважається, що типові гіпокампульні ГАМК-рецептори містять одну-дві α -субодиниці і одну-дві β -субодиниці. Оскільки рецептор складається з п'яти субодиниць, то в додачу до них приєднуються одна-дві або γ -, або δ -субодиниці (припускається, що γ - і δ -субодиниці не входять разом до складу одного рецептора). В синаптичній відповіді ГАМК_A-рецептори визначають “швидкий” компонент відповідного синаптичного струму. Канал ГАМК_A-рецептора проникний для іонів хлору і в деякій мірі для бікарбонату. Тому ефект активації даних рецепторів буде залежати від електрохімічного градієнта для цих іонів на постсинаптичній мембрані [114].

У нервовій системі дорослих тварин зовнішньоклітинна концентрація іонів хлору більша за внутрішньоклітинну, що призводить до більш негативного потенціалу реверсії для хлорного струму, ніж потенціал спокою клітин. Таким чином, активація ГАМК_A рецепторів призводить до входу іонів Cl⁻ в нейрон і до гіперполяризації клітини. Необхідний градієнт іонів хлору підтримується калій/хлор котранспортером KCC2 (Rivera et al., 1999), котрий починає викачувати Cl⁻ назовні після синаптичної події.

ГАМК_A-рецептори, чутливі до барбітуратів, більш широко розповсюдженні в мозку, ніж ГАМК_A-рецептори, чутливі до бензодіазепінів (Johnston, 1996). На відміну від бензодіазепінів, які підвищують афіність ГАМК-рецептора по відношенню до агоністу, барбітурати збільшують час відкритого стану і провідність каналу такого рецептора. Крім бензодіазепінів і барбітуратів специфічну моделюючу дію на ГАМК_A рецептори мають нейростероїди і цинк [122].

ГАМК_B-рецептори.

Метаботропні ГАМК_B-рецептори представляють собою гетеродимери, котрі складаються з двох субодиниць: GBR1 и GBR2. Відомо, що ГАМК_B-

рецептори можуть локалізуватися як пре-, так і постсинаптично [135]. Постсинаптичним ефектом активації даних рецепторів є довготривала гіперполяризація, що слідує за швидким іонотропним компонентом ГАМКергічної передачі. Пресинаптичний ефект ГАМК_B рецепторів полягає в тому, що вони знижують як вивільнення ГАМК в гальмівних синапсах, так і вивільнення глутамата в збудливих.

ГАМК_B-рецептори пов'язані з тримірним G-білком [77]. Одним із ефектів їх активації є інгібування аденилатциклази. Крім того, дані рецептори прямо пов'язані за посередництвом G-білка з потенціалзалежними кальцієвими каналами N- та P/Q-типів, які залучені до процесу синаптичного вивільнення нейромедіатора [127].

Таким чином, пресинаптичні ГАМК_B-рецептори знижують вивільнення нейромедіаторів, зменшуючи пресинаптичний вхід кальцію. В постсинаптичних локусах ГАМК_B-рецептори запускають каскад реакцій, що веде до відкриття калієвих каналів, пов'язаних із G-білком (GIRK, G protein-gated inward rectifying K⁺ channels).

ГАМК_C-рецептори.

Відповідно до своєї композиції ГАМК_C-рецептори могли б вважатися філогенетично найстарішим типом іонотропних ГАМК-рецепторів. Цей тип об'єднує гомомірні рецептори, які складаються тільки з ρ-субодиниць, котрі в свою чергу поділяються на три підкласи: ρ1, ρ2 и ρ3. Дані субодиниці в найбільшій кількості зосереджені в сітківці хребетних, хоч виявленні і в структурах ЦНС (також і в гіпокампі). Вважається, що ρ-субодиниці не утворюють гетеромірних рецепторів із участю інших субодиниць.

ГАМК_C-рецептори мають відмінний від ГАМК_A-рецепторів фармакологічний профіль. Вони не чуттєві до бікукуліну, алостеричним модуляторам та специфічним агоністам ГАМК_A-рецепторів.

1.2 Роль іонів кальцію у синаптичній передачі

1.2.1 Участь іонів кальцію у процесі вивільнення нейромедіатора

У нервових клітинах роль іонів кальцію насамперед пов'язують із регуляцією збудливості, вивільненням медіаторів і тривалими змінами ефективності синаптичної передачі.

Вивільнення нейромедіатора відбувається через 200 мкс після поширення потенціалу дії і входу кальцію в нервові закінчення. Для екзоцитозу синаптичних везикул необхідна висока локальна концентрація кальцію біля місць вивільнення нейромедіатора, приблизно від 100 мкмоль/л до 50 ммоль/л, проте, існують данні, що коротке (приблизно 0,5 мс) локальне підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію лише на 25 мкмоль/л вже є достатнім для вивільнення нейромедіатора [177].

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію у нервових клітинах здійснюється за рахунок вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо і його входу ззовні через потенціалкеровані канали. Проте, нано-чи мікродомени високої концентрації в пресинаптичній нервовій терміналі формуються завдяки входу іонів кальцію саме через потенціалкеровані кальцієві канали [96, 189]. Ключовим фактором у співвідношенні ефективності стимул-секреція медіатора є взаємне розташування кальцієвих каналів і везикул, які готові до викиду. У синаптичних терміналях відстань між ними дуже мала. Досліджено, що відстань між кальцієвими каналами в пресинаптичній терміналі і кальцієвим сенсором, який ініціює екзоцитоз, має бути порядку 20 нм [137, 236].

Тісна просторова організація кальцієвих каналів з активними зонами робить вивільнення медіатора дуже швидким і відносно нечутливим до

наявності кальцієвих депо [66]. Безліч механізмів прямо чи непрямо модулюють функції пресинаптичних кальцієвих каналів і таким чином регулюють синаптичну передачу [28].

1.2.2 Молекулярний механізм процесу вивільнення нейромедіатора

У нервовому закінченні секреторні везикули зосереджені в резервному пулі, де вони зв'язані із цитоскелетом. Коли потенціал дії поширюється в нервове закінчення, відкриваються кальцієві канали, які розміщені переважно в активній зоні плазматичної мембрани нервового закінчення. Відбувається локальне накопичення кальцію в активній зоні біля місця вивільнення нейромедіатора, що зумовлює значне збільшення ймовірності злиття пухирців з плазматичною мембраною та вивільнення нейромедіатора в синаптичну щілину. Молекулярний механізм вивільнення нейромедіатора включає декілька стадій: докінг везикул до плазматичної мембрани, праймінг і злиття везикули з плазматичною мембраною. Етапи циклу синаптичних везикул (Рис.1.1, А):

- порожні везикули накопичують нейромедіатор за допомогою активного транспорту за рахунок протонного електрохімічного градієнта, створеного протонною помпою;
- заповнені синаптичні везикули переміщуються до активної зони;
- синаптичні везикули стикаються з активною зоною пресинаптичної плазматичної мембрани;
- синаптичні везикули за участю АТФ набувають здатності до злиття пухирця з плазматичною мембраною й до екзоцитозу у відповідь на кальцієвий сигнал;
- вхід кальцію через потенціалкеровані канали зумовлює злиття й вивільнення нейромедіатора;

- порожні синаптичні везикули вкриваються білком клатрином, що надає їм здатності до ендоцитозу;
- відбувається втрата клатринової оболонки, створення на мембрані пухирця протонного електрохімічного градієнта й транслокація везикули;

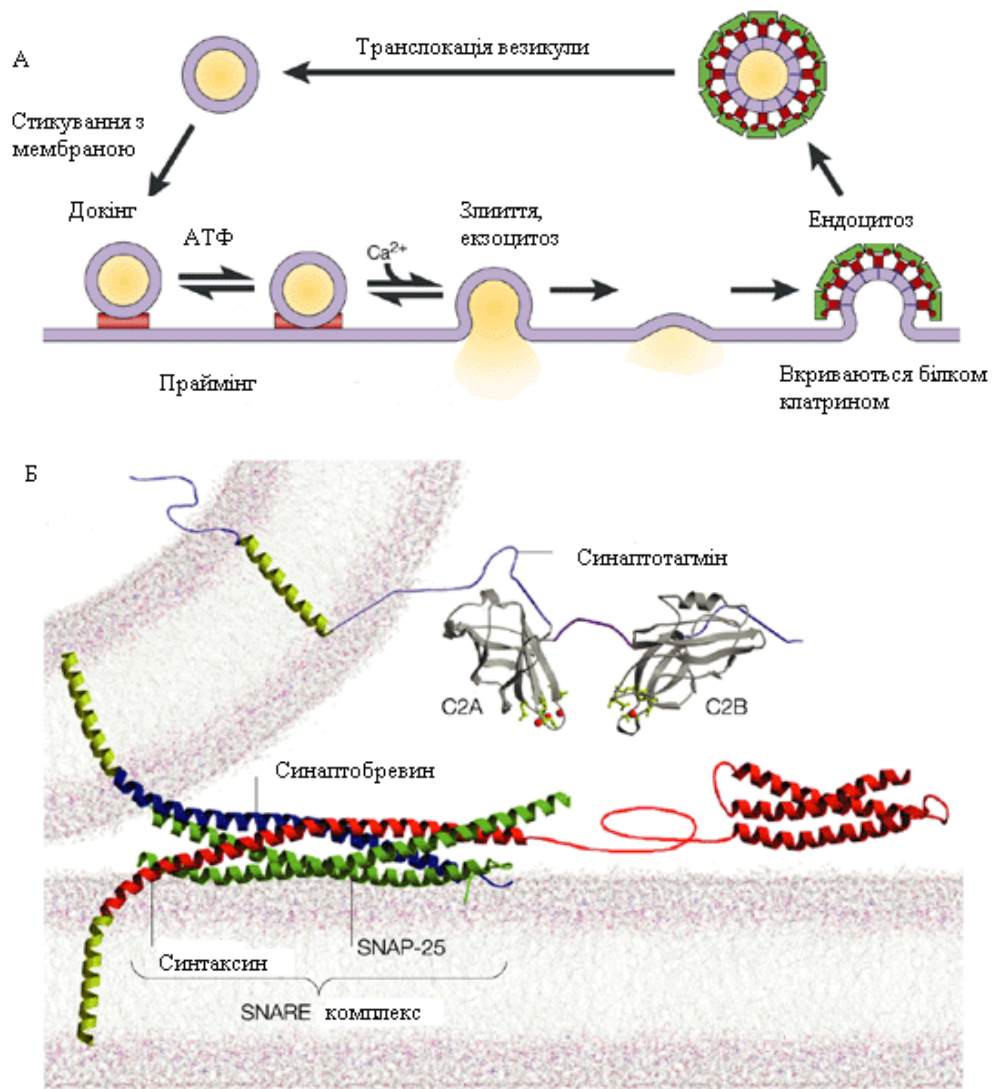


Рис. 2.1. Основні процеси молекулярного механізму вивільнення нейромедіатора (докінг, праймінг, злиття). Показано створення комплексу SNARE і основні білки, які беруть участь в процесі екзоцитозу.

Після ендоцитозу везикули заповнюються відповідним нейромедіатором з використанням енергії протонного електрохімічного градієнта. Для ініціації процесу екзоцитозу необхідним є комплекс, відомий як SNARE, який складається із трьох основних протеїнів. Це везикулярний білок синаптобrevин – протеїн, зв'язаний з везикулою, і протеїни плазматичної мембрани: синтаксин і SNAP-25 – протеїни, зв'язані з плазматичною мембраною (Рис.1.1, Б). SNARE формується стехіометрично 1:1:1 в стійкий трикомпонентний комплекс [72, 192]. Формування цього комплексу відіграє домінуючу роль в становленні і стабілізації мембранного докінгу [172].

Протеїни, які зв'язують кальцій, містять два C2 домени, які взаємодіють з кальцієм. Один із основних протеїнів, які беруть участь в процесі вивільнення медіатора - везикулярний білок синаптотагмін [199]. Синаптотагмін I (і II) напряму взаємодіють з синтаксином. Інші кальційзв'язуючі протеїни, які містять C2 домени, такі як рибфілін3А, Munc13 і Doc2, беруть участь у везикулярному трафіку чи переході везикул до множини готових до вивільнення [143].

1.3 Квантова природа синаптичної передачі в синапсах ЦНС.

У 1952 році Fatt і Katz [52], а пізніше Del Castillo і Katz [37], запропонували квантовий механізм вивільнення нейромедіатору. При повторюваній стимуляції нерву результуючі викликані постсинаптичні потенціали/струми варіюють за амплітудою ступінчастим чином від запису до запису. Відповідно до квантової моделі такий ефект відображує синхронне вивільнення кількості «багатомолекулярних пакетів», або «квантів», медіатору, кожний з яких відповідає вмісту однієї везикули. У стані спокою синапсів на постсинаптичному нейроні можуть бути зареєстровані мініатюрні

потенціали/струми, які виникають випадково і відображають ефекти спонтанного вивільнення поодиноких квантів медіатора (одиночні квантові події) [5, 100, 102].

Квантова природа вивільнення нейромедіаторів у синапсах ЦНС, як правило, простежується при аналізі розподілів амплітуд постсинаптичних відповідей. У поодиноких синапсах ЦНС несиметричні розподіли нерідко відображують багатоквантовий викид медіатора [55, 166]. У розподілах амплітуд поява двох-, трьох-, або багатомодальних піків є наслідком одночасного вивільнення відповідної кількості синаптичних везикул.

За типових умов ймовірність вивільнення нейромедіатора, як правило, описується біноміальним законом. Для опису амплітудних розподілів постсинаптичних відповідей успішно використовують просту біноміальну модель, де: $I \cdot CV_{\text{вГПСС}}^2 = q \cdot (1 + CV_q^2 - P)$, де I – середня амплітуда вГПСС, $CV_{\text{вГПСС}}$ – коефіцієнт варіації вГПСС, q – розмір кванта, CV_q – коефіцієнт варіації мініатюрних вГПСС (мГПСС), P – ймовірність вивільнення ГАМК з пресинаптичного закінчення. Квантовий вміст (середня кількість квантів медіатора, що вивільняється на один пресинаптичний потенціал дії) розраховується як $m = I/q$. Біноміальний показник (число місць вивільнення везикул з медіатором) розраховується як $N = m/P$.

Гістограмний метод базується на припущенні про те, що амплітуда постсинаптичного струму квантована, тобто пропорційна кількості квантів вивільненого нейромедіатора

. За умов суттєвої кількості реєстрацій, гістограми амплітуд ПСС мають полімодальний вид з чітко вираженими рівновіддаленими піками. Середній інтервал між піками приймалися тотожним постсинаптичний відповіді на одиночну квантову подію.

1.4 Пластичність синаптичної передачі

Важливою і невід'ємною властивістю хімічних синапсів як в центральній так і в периферичній нервовій системі є пластичність, тобто здатність синапсів до функціональних і морфологічних змін в процесі активності. Саме завдяки цій властивості синапси виконують велику кількість різноманітних фізіологічних функцій в організмі. Виділяють короткочасні форми синаптичної пластичності, тривалість яких вимірюється секундами та хвилинами, а також довготривалі - часами, місяцями та роками. Довготривалі види пластичності формуються на основі короткочасних, і є базою когнітивних функцій нервової системи – навчання, пам'яті та інше.

Пластичність синапсів центральної нервової системи, що проявляється в результаті їх попереднього активності, вперше була продемонстрована Ларрабі й Бронком, при вивченні зірчастого ганглію кішки [244].

В залежності від частоти пресинаптичних імпульсів і типу синапсів можуть відбуватися різні зміни ефективності синаптичної передачі [237, 240]. Практично всі типи синапсів регулюються різними короткочасними й довготривалими процесами - одні ведуть до зменшення, а інші - до збільшення ефективності синаптичної передачі [3, 91, 103, 115]. У синапсах, в яких потенціал дії виникає з великою частотою, відбувається збільшення ефективності синаптичної передачі, тобто домінують процеси, що полегшують синаптичну передачу. В інших синапсах подібна активність призводить до зменшення ефективності синаптичної передачі, тобто в них домінують процеси, що приводять до пригнічення вивільнення нейромедіатора [4, 118]. У більшості синапсів, очевидно, присутні й ті, й інші процеси, що в результаті може привести до комбінації процесів полегшення й депресії, і сумарний ефект сильно залежатиме від специфіки синаптичної активації [208, 212].

У тому ж самому синапсі різні типи активності можуть викликати або частотно-залежне полегшення (потенціацію), або депресію [3, 4, 118]. З іншого

боку, той самий тип активності може приводити до протилежних ефектів у різних синапсах [162, 204].

У гальмівних ГАМК-ергічних синапсах було охарактеризовано депресію при парній стимуляції [31], полегшення при парній стимуляції [136, 203], тривалу депресію (long-term depression, LTD) [29, 153] та тривалу потенціацію (long-term potentiation, LTP) [22, 93, 108] і посттетанічну потенціацію [89].

1.4.1 Короткочасна пластичність синаптичної передачі

До короткочасної відносять пластичність, для якої характерне збереження змін ефективності синаптичної передачі протягом кількох хвилин [1, 87, 117, 170, 237].

Короткочасна синаптична пластичність є результатом зміни величини секреції медіатора, і може проявлятися чи в полегшенні (збільшенні), чи в депресії (зменшенні). Було показано, що в основі короткочасних форм синаптичної пластичності лежать різноманітні пресинаптичні механізми, пов'язані з підвищенням концентрації і зміною динаміки спаду внутрішньоклітинного кальцію, зміною потоку вхідного кальцієвого струму, збільшенням часу ходу секреції, порушенням співвідношення між втратою і поповненням медіатора. Крім пресинаптичних, існують також і постсинаптичні механізми короткочасної синаптичної пластичності, які пов'язані з підвищенням (потенціацією) або зниженням (десенситизацією) чуттєвості постсинаптичних рецепторів до медіатора. В залежності від вираженості тих чи інших процесів при різних параметрах активності і умовах функціонування синапса переважає або полегшення, або депресія секреції медіатора.

Для дослідження короткочасної пластичності синаптичної передачі може бути використаний протокол стимуляції парою імпульсів. У результаті такої стимуляції може спостерігатися полегшення при парній стимуляції (paired-pulse facilitation, PPF), або депресія при парній стимуляції (paired-pulse depression,

PPD). При стимуляції парами імпульсів полегшення або депресія синаптичної передачі відбувається в залежності від інтервалу між стимулами й типу синапса [4, 118].

1.4.2 Полегшення при парній стимуляції

Під полегшенням при парній стимуляції розуміють збільшення відповіді на другий стимул у парі в порівнянні з відповіддю на перший стимул. Така форма пластичності характерна, зокрема, для глутаматергічної синаптичної передачі [50, 240]. При стимуляції парою імпульсів ефективність глутаматергічної синаптичної передачі збільшується на часових інтервалах близько сотень мілісекунд. В результаті такої стимуляції відповідь на другий стимул може бути більше відповіді на перший у п'ять разів.

В той час як полегшення при парній стимуляції є широко розповсюдженим явищем в глутаматергічних синапсах, воно досить рідко зустрічається в ГАМК-ергічних синапсах.

Дель Кастильо та Катц [37] були першими, хто провів квантовий аналіз під час полегшення і припустив, що полегшення відбувається через збільшення ймовірності вивільнення нейромедіатора і відображає пресинаптичні зміни в синапсі. За допомогою квантового аналізу було показано, що у всіх вивчених синапсах в основі полегшення і збільшення ефективності синаптичної передачі лежать пресинаптичні зміни – збільшується кількість квантів нейромедіатора, які виділяються з приходом потенціалу дії, без змін розміру кванта й постсинаптичної ефективності [56]. Полегшення синаптичної передачі відбувається в результаті збільшення або кількості готових до вивільнення квантів, або збільшення ймовірності вивільнення везикул з медіатором [240].

Вважається, що підвищення ефективності синаптичної передачі при короточасній пластичності відображає збільшення ймовірності вивільнення

доступних квантів, хоча при цьому не виключається й збільшення кількості місць вивільнення квантів [225].

1.4.3 Депресія при парній стимуляції

Депресія при парній стимуляції - це зменшення ефективності синаптичної передачі в результаті попередньої активності тобто зменшення амплітуди другого постсинаптичного струму у порівнянні з амплітудою першого при стимуляції парою стимулів [167, 183, 223].

У глутаматергічних синапсах ссавців депресія при парній стимуляції звичайно спостерігається лише при дуже коротких міжімпульсних інтервалах у парі (близько 10 мс) і істотно пригнічується речовинами, що блокують десенситизацію глутаматних рецепторів. З іншого боку, в ГАМК-ергічних синапсах депресія амплітуди другого гальмівного постсинаптичного струму може спостерігатися протягом декількох секунд після поодинокого потенціалу дії в пресинаптичній клітині [36, 131, 231] й, імовірно, пов'язана з іншими механізмами. Постсинаптичні механізми, які могли б пояснити зменшення амплітуди другого ГПСС, яке спостерігається при стимуляції парою імпульсів, включають:

- 1) зменшення електрорушійної сили в результаті внутрішньоклітинного накопичення іонів хлору [4, 118];
- 2) десенситизацію ГАМК_A-рецепторів [4];
- 3) зміну провідності ГАМК_A-рецепторів, викликану спільним вивільненням (co-release) різних нейроактивних модуляторів [4, 38].

Такі механізми, очевидно, здатні робити відчутний внесок у депресію при коротких (менше 50 мс) міжімпульсних інтервалах і при тривалій стимуляції [31]. Однак при більш тривалих міжімпульсних інтервалах пресинаптичні механізми розглядаються як основні. Вважається, що зменшення амплітуди

другого ГПСС відбувається через тимчасове зменшення квантового вмісту везикул [99, 198].

Зменшення квантового вмісту може бути обумовлено різноманітними механізмами:

- нестача везикул з нейротрансмітером, які готові до вивільнення [33, 67, 169];
- зменшення ймовірності вивільнення цих везикул [40]; зменшення числа вільних активних зон, у яких може відбутися злиття везикули із плазматичною мембраною;
- аутоінгібування, яке пов'язане з активацією пресинаптичних ГАМК_B-рецепторів молекулами ГАМК, які вивільнились під час стимуляції наступного вивільнення ГАМК [31, 32, 36, 144]. Аутоінгібування може бути зумовлене двома механізмами, до яких прямо причетні ГАМК_B-рецептори:
 - 1) безпосереднім зменшенням кальцієвого струму в пресинаптичних терміналях, що обумовлено активацією ГАМК_B-рецепторів [42,] (Scholz and Miller, 1991);
 - 2) зменшенням входу іонів кальцію, що обумовлене гіперполяризацією пресинаптичної терміналі, яке, в свою чергу, було викликане збільшенням провідності для іонів калію [17, 62].

При стимуляції поодиноких нейронів участь ГАМК_B-рецепторів у депресії постсинаптичних струмів при парній стимуляції як у культурі нейронів, так і в зрізах найчастіше знаходиться під сумнівом [223].

Імовірно, що при стимуляції поодиноких інтернейронів підвищення концентрації ГАМК буде недостатнім для активації механізмів аутоінгібування, зумовленого активацією ГАМК_B-рецепторів.

1.5 Роль кальцієвих каналів у регуляції пластичності синаптичної передачі

Усі іонні канали по механізму їхньої активації поділяються на потенціалкеровані, стан яких визначається напруженістю трансмембранного електричного поля та хемокеровані, які активуються різноманітними хімічними речовинами. До потенціалкерованих каналів відносять натрієві, калієві, кальцієві, хлорні канали.

За ознакою величини порога активації кальцієвого струму розрізняють два класи потенціалкерованих кальцієвих каналів: низькопорогові та високопорогові [24, 25, 53] (Schneppenburger and Neher, 2000b). Потенціалкеровані кальцієві канали є різноманітними за структурою й механізмами регуляції. На підставі фармакологічних і біофізичних характеристик розрізняють T-, L-, N-, P-, Q- і R-типи кальцієвих каналів [12, 75, 119, 205, 206, 235].

1.5.1 Низькопорогові кальцієві канали

T-тип (Ca_v3.1, Ca_v3.2, Ca_v3.3).

Цей тип кальцієвих каналів активується при найбільш негативних потенціалах (від -70 до -50 мВ) [11, 53, 69]. Низькопорогові кальцієві канали швидко інактивуються, метаболічно більш стабільні, ніж високопорогові, приймають участь в генерації ритмічної активності нейронів. Інактивація T-струму розвивається за час порядку 100 мс, виявляє сильну потенціал-залежність [25, 53]. T-тип є фармакологічно чутливим до іонів нікелю та менш чутливим до блокування іонами кадмію. Також T-тип кальцієвих каналів блокує пептид отрут и скорпіона куртоксин.

1.5.2 Високопорогові кальцієві канали

L-, N-, P-, Q- і R-типи високопорогових кальцієвих каналів активуються при більш позитивних мембранних потенціалах. Різні типи високопорогових кальцієвих каналів відрізняються чутливістю до специфічних блокаторів і токсинів. Проте кадмій в концентрації приблизно 20 мкмоль/л селективно блокує всі високопорогові кальцієві канали і, в той же час, не впливає на низькопорогові (Fox et al., 1987b; Fox et al., 1987c).

L-тип (Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3, Ca_v1.4).

Канали, які відносяться до L-типу, активуються в діапазоні мембранних потенціалів -20...-10 мВ, відрізняються повільною кінетикою активації і, як правило, розташовані на сомі клітин [70], де вони, беруть участь у регуляції роботи ферментів, експресії генів, а в м'язовій тканині - в регуляції процесу скорочення. Інактивація цих каналів розвивається дуже повільно. Кальцієві канали L-типу, поряд з іонами Ca²⁺, здатні ефективно пропускати іони Ba²⁺ і Sr²⁺. Одиночні L-канали відрізняються досить значною провідністю 20-25 пСм. Дигідропіридини вважаються специфічними блокаторами для L-типу кальцієвих каналів [10,13, 45, 147].

N-тип (Ca_v2.2).

N-, P- і Q-типи кальцієвих каналів експресуються в пресинаптичних закінченнях і прямо пов'язані з процесом вивільнення нейромедіаторів [218, 219,] (Wheeler et al., 1994a). Поріг активації каналів N-типу лежить в діапазоні -40...-30 мВ. Інактивується N-тип кальцієвих каналів швидше ніж L-, P- і Q-типи. Потенціал їх повної стаціонарної інактивації становить приблизно -30 мВ. Провідність одиночних N-каналів складає близько 18 пСм [148]. ω-конотоксин-GVIA, пептидний токсин молюска *Conus geographus*, є специфічним блокатором N-типу кальцієвих каналів для більшості нейронів [16, 119].

Фоксом і співавторами у 1987 році було визначено, що N-тип кальцієвих струмів чуттєвий до наномолярних концентрацій цього токсину (100 нмоль/л). Серед особливостей фармакології N-каналів слід зазначити високу чутливість до блокування також іонами кадмію і стійкість до нікелю та до дигідропіридинів [26, 119, 206]. Присутність кальцієвих каналів N-типу одночасно з кальцієвими каналами інших типів було показано в основному для клітин нейрональної природи [79, 155].

P- та Q-типи ($Ca_v2.1$).

Високопорогові кальцієві канали P-типу поширені як у багатьох структурах ЦНС, так і в периферичній нервовій системі [125, 126]. Поріг активації струмів, що проходять по P-каналам, знаходиться в діапазоні -60...-40 мВ. Максимум їх вольтамперної характеристики знаходиться біля -20 мВ. Інактивація цього струму розвивається дуже повільно (кілька секунд) і залежить від мембранного потенціалу. Дослідження провідності одиночних каналів ізольованих клітин Пуркін'є дорослих тварин показали широкий діапазон провідності (9...19 пСм) [211]. Серед особливостей фармакології P-каналів слід зазначити стійкість до дигідропіридинів і ω -конотоксину-GVIA [155] та високу чутливість до блокування за допомогою ω -агатоксину-IVA.

Q-тип кальцієвих каналів має поріг активації струму (приблизно -50...-40 мВ) і максимуму вольтамперної характеристики (0...10 мВ). Q-типи кальцієвих каналів мають більш швидку кінетику інактивації ніж P-типи [42]. Проникність Q-каналів однакова як для іонів кальцію, так і іонів барію [235]. Ці канали не чуттєві до дигідропіридинів та конотоксину, але можуть бути цілком заблоковані ω -конотоксином-MVІІС у мікромольних концентраціях, проте цей токсин блокує і N-тип кальцієвих каналів також. ω - агатоксин-IVA, пептид, виділений із отрути павука *Agelenopsis aperta* [2], вважається специфічним блокатором P- і Q-типів кальцієвих каналів, однак, якщо P-тип кальцієвих

струмів чуттєвий до наномолярних концентрацій цього токсину (20-30 нмоль/л), то для блокування Q-типу необхідна концентрація в 10-100 раз більша [127]. Селективних блокаторів для даного типу каналів поки не виявлено.

R-тип (Ca_v2.3).

В багаточисельних нейрональних об'єктах був виявлений кальцієвий струм, нечуттєвий ні до дигідропіридинів, ні до ω -конотоксину GVIA і ω -агатоксину IVA [235]. Поріг активації його складав приблизно -50 мВ. Максимальна амплітуда R-струму спостерігається при потенціалі 0 мВ. Під час тривалої деполяризації відбувається швидка інактивація струму (постійна часу $\tau=20\dots30$ мс). Проте, деактивація струму через канали R-типу може бути апроксимована однією експонентою з постійної часу порядку $\tau=300$ мкс [224]. Провідність одиночних кальцієвих каналів складає близько 14 пСм [26, 119, 178]. Єдиний відомий токсин, що блокує R-тип каналів, це пептид отрути тарантула SNX-482. Проте, селективних блокаторів для цього типу кальцієвих каналів дотепер не виявлено.

Результати численних досліджень показали, що кальцієві канали різних типів розподілені в мозку неоднорідно і що кожний з них, швидше за все, виконує деяку специфічну функцію. У дослідженнях на нервових клітинах було встановлено, що канали різних типів нерівномірно локалізовані й у межах однієї клітини.

Проте відомо, що в пресинаптичній терміналі нейронів CA3-CA1 регіонів гіпокампа присутні принаймні три фармакологічно різних компонента кальцієвого струму: N-тип, P- та Q-тип, і компонент, резистивний до високих концентрацій ω -конотоксину-GVIA, ω -агатоксину-IVA, дигідропіридинів і неспецифічного блокатора ω -конотоксина MVIIIC [226, 227].

1.5.3 Роль кальцієвих каналів у здійсненні синаптичної передачі

Літературні дані засвідчують про виняткову роль потенціалкерованих кальцієвих каналів пресинаптичної мембрани в здійсненні синаптичної передачі між нейронами. Синаптична передача в ЦНС ссавців є результатом одночасної активації різних типів високопорогових кальцієвих каналів: L, N, P/Q і R [47].

Хоча присутність L-типу кальцієвих каналів на пресинаптичних терміналях центральних синапсів є беззаперечною [135], проте цей тип каналів не бере участі у регуляції низькочастотного синхронного вивільнення нейромедіатора, а важливий тільки при високочастотній стимуляції [44, 87, 88] (Wheeler et al., 1994b). Наприклад, аплікація 3 мкмоль/л нілвадіпіна, блокатора L-типу кальцієвих каналів, не мала жодного ефекту на вГПСС, що були викликані низькочастотною стимуляцією в зрізах гіпокампа [135]. Тому участь у регуляції швидкої синаптичної передачі беруть тільки N, P/Q і R-типи кальцієвих каналів [110, 128, 157, 201].

Дослідження на синаптосомах мозку ссавців і зрізах мозку показали, що, в основному, Q- та P-типи кальцієвих струмів являються основними компонентами високопорогового кальцієвого струму, які запускають процес вивільнення нейромедіатора [21, 65, 109, 125, 209], тоді як N-тип кальцієвих каналів бере участь в цьому процесі в меншій мірі [21, 43, 112, 149, 164, 176, 200].

В гіпокампі швидка синаптична передача є результатом активації переважно тільки N- та P/Q-типів кальцієвих каналів. Хоча R – тип кальцієвих каналів бере участь у регуляції швидкої збудливої синаптичної передачі між нейронами гіпокампа [64], його вклад в процес швидкого вивільнення медіатора на відміну від N- та P/Q-типів дуже малий [39,47, 142, 229, 230].

Роль N- та P/Q - типів кальцієвих каналів в регуляції збудливої [83, 110, 226, 227] та гальмівної [84, 140] синаптичної передачі в гіпокампі була продемонстрована за допомогою використання селективних блокаторів цих каналів.

Проте потрібно мати на увазі, що розподіл потенціалкерованих пресинаптичних кальцієвих каналів в культурі нейронів гіпокампа є неоднорідним [160, 161]. Особливою неоднорідністю розподілу P/Q- і N-типів каналів в поодинокій терміналі відзначаються ГАМК-ергічні нейрони культури гіпокампа [135]. Пресинаптичні терміналі одного й того ж нейрона дуже різняться за вкладом різних типів кальцієвих каналів у вивільнення нейромедіатора, в одних домінують P/Q- типи, в інших - N-типи, а є й такі, що мають однаковий вклад їх обох [129, 159]. Дослідження, що були проведені на збудливих синапсах між культивованими нейронами гіпокампа підтвердили неоднорідний розподіл кальцієвих каналів у пресинаптичній терміналі: 45% містять тільки P/Q-тип, 45% містять і P/Q- і N- тип, і 10% містять лише N-тип кальцієвих каналів [159].

Ця відмінність може бути наслідком гетерогенності пресинаптичних нейронів, постсинаптичних нейронів чи стадій розвитку [160].

1.5.4 Участь пресинаптичних кальцієвих каналів в регуляції пластичності синаптичної передачі

Короткотривала пластичність синаптичної передачі в основному відображає пресинаптичні зміни у процесі вивільнення нейромедіатора. Всі форми короткотривалої пластичності є кальційзалежними [37, 97, 240]. Дослідження, що були проведені на центральних синапсах ссавців, визначили, що регуляція потенціалкерованих кальцієвих каналів є важливою в опосередкуванні короткотривалої синаптичної пластичності [232]. Вклад R-типу кальцієвих каналів у процес вивільнення нейромедіатора досить малий

[64, 86] проте цей тип каналів відіграє важливу роль у регуляції довготривалої пластичності синаптичної передачі. Було продемонстровано, що кальцій, який входить в пресинаптичну терміналь через канали R-типу бере участь у регуляції тривалої та посттетанічної потенціації, проте не відіграє ніякої ролі в швидкій синаптичній передачі, полегшенні чи депресії при парній стимуляції чи частотному полегшенні [39].

В дослідженнях на нейронах гіпокампа, було показано, що вклад L-типу кальцієвих каналів у процес вивільненні нейромедіатора є незначним або взагалі відсутнім [44, 110, 180, 201, 226, 228]. Отже, L-тип не бере участі у регуляції низькочастотного синхронного вивільнення нейромедіатора, проте сприяє акумуляції пресинаптичного кальцію протягом високочастотної активності. Це допомагає підтримувати вивільнення везикул протягом тетанічної стимуляції і також підсилювати ймовірність вивільнення нейромедіатора протягом посттетанічного періоду, який ще називають посттетанічною потенціацією [89]. Отже, L-тип каналів приймає участь у фасилітації та потенціації [81, 90, 241].

На поодинокій ГАМК-ергічній терміналі було показано, що L-тип кальцієвих каналів відіграє значну роль в генерації потенціалу дії, який згодом активує P/Q- і N-типи каналів в активній зоні [135]. В дослідженнях на нейронах гіпокампа, з використанням селективних блокаторів кальцієвих каналів, було показано, що P/Q- і N-типи кальцієвих каналів домінують у регуляції вивільненні нейромедіатора як в збудливих так і в гальмівних синапсах. Дослідження на синапсах the calyx of Held показали, що фасилітація кальцієвого струму є специфічною властивістю пресинаптичних кальцієвих каналів P/Q-типу [85].

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 і функціонування гальмівної передачі в гіпокампі.

1.5.5 Ендоплазматичний ретикулум – депо іонів кальцію

Іони кальцію відіграють провідну роль у процесах внутрішньоклітинної регуляції [154]. У стані спокою концентрація вільного кальцію в клітині підтримується приблизно $50 \div 150$ нМ. Коефіцієнт дифузії кальцію у цитозолі приблизно дорівнює $10\text{-}13$ $\text{мкм}^2\text{с}^{-1}$. Регуляція рівня вільного кальцію здійснюється рядом систем, що забезпечують як його підвищення у відповідь на стимуляцію, так і повернення до вихідного рівня після припинення стимуляції. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію відбувається в результаті входу кальцію ззовні та вивільнення його з внутрішньоклітинних кальцієвих депо таких як ендоплазматичний ретикулум. Починаючись в сомі у вигляді неперервного продовження зовнішньої ядерної мембрани, ендоплазматичний ретикулум розповсюджується далі в аксон і в дендрити. Всередині соми та в основі дендритного дерева окремі ділянки ендоплазматичного ретикулума підходять впритул до плазматичної мембрани, формуючи так звані цистерни [73, 168]. Вздовж аксона ендоплазматичний ретикулум поширюється у вигляді з'єднаних між собою трубочок. Час від часу трубочки приєднуються до гіполемальних цистерн, що являють собою розпластані ділянки мембрани, які впритул прилягають до плазматичної мембрани, нагадуючи таким чином підповерхневі цистерни. Ця ендоплазматична мережа простягається аж до синапсів [121, 220]. З протилежного відносно соми боку ендоплазматичний ретикулум проникає всюди в дендритне дерево, закінчуючись в дендритних шипиках у вигляді шипикового апарату.

Ендоплазматичний ретикулум здатний накопичувати, зберігати і вивільняти іони кальцію в цитоплазму під впливом внутрішньоклітинних факторів. Зниження внутрішньоклітинної концентрації кальцію до базового рівня забезпечується виведенням кальцію в позаклітинне середовище за

допомогою кальцієвих насосів і іонообмінних механізмів плазматичної мембрани і зворотним захопленням у внутрішньоклітинні депо.

Група кальцієвих АТФаз, що розрізняються за локалізацією у клітині, будовою і способом регуляції, підтримує різницю концентрації іонів кальцію між цитоплазмою клітини та зовнішньоклітинним середовищем. АТФази переносять іони кальцію з цитозолу у внутрішньоклітинні депо за рахунок енергії гідролізу АТФ, таким чином підтримуючи низьку концентрацію іонів кальцію у цитоплазмі.

В збудливих клітинах викид Ca^{2+} з внутрішньоклітинних кальцієвих депо відбувається внаслідок деполяризації клітинної мембрани або підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до рівня 1-2 мкМ відповідно, і опосередковується ріанодин-чутливими Ca^{2+} -депо. Згідно однієї з гіпотез, ріанодин-чутливі кальцієві депо в периферичних нейронах та нейронах ЦНС підсилюють амплітуду та подовжують тривалість Ca^{2+} -сигналів завдяки механізму « Ca^{2+} -активованого викиду Ca^{2+} » (CICR) [80, 94]. Потрібно відзначити, що не всі експериментальні дані вказують на важливість процесу вивільнення кальцію з ЕР для регуляції синаптичної передачі. Так, наприклад, дослід з одночасної реєстрації внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у пресинаптичному нейроні та постсинаптичних струмів у препаратах гіпокампу та мозочка не змогли визначити будь-якого внеску процесу вивільнення Ca^{2+} з ЕР у регуляцію викиду нейромедіатора [27]. Аналогічні експерименти, проведені на синапсах, сформованих моховидними волокнами на нейронах СА3 зони гіпокампу показали, що блокування ЕР за допомогою ріанодину, тапсигаргіну або циклопіазонової кислоти дуже мало позначалось на параметрах постсинаптичних потенціалів [74]. Тобто, експериментальні дослідження на клітинах з одних і тих самих ділянок нервової системи не змогли ані остаточно підтвердити, ані спростувати ролі ЕР у регуляції вивільнення нейромедіатора.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Отримання первинної культури дисоційованих нейронів гіпокампа

Для отримання 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 ("Joan", Франція) з контрольованими вмістом двоокису вуглецю (5% CO_2) в повітряно-газовій суміші і температурним режимом (37°C) та постійним пасивним зволоженням.

На 3-тю добу культивування для пригнічення проліферації гліальних клітин в середовище додавали цитозин- β -D-арабіно-фуранозид (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.

2.2 *Методика фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина»*

Для вимірювання викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС), які відводились від культивованих нейронів гіпокампу було застосовано метод фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» ("patch-clamp"), який було описано Неєром та Сакманом (Hamill et al., 1981; Naeia and Iaa?, 1987; Neher and Sakmann, 1976).

Основна ідея полягає у використанні підсилювача електричних сигналів з низьким рівнем шуму у схемі з зворотним зв'язком, що дає змогу контролювати мембранний потенціал з одночасною безпосередньою реєстрацією трансмембранного іонного струму. За допомогою цього метода можна досліджувати струми (а при деякій модифікації методики - й потенціали) в рамках класичних електрофізіологічних підходів, реєструвати струми амплітудою порядку пікоампер, вивчати вплив фармакологічних препаратів на мембранні структури.

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.

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).

2.3 Методика позаклітинної електричної стимуляції аксона пресинаптичного нейрона

Локальну електричну стимуляцію проводили за допомогою стимулятора з ізольованим виходом ISO-Flex (AMPI, Ізраїль). Стимуляційну мікропіпетку з діаметром отвору близько 2 мкм, яку виготовляли за технологією аналогічно піпеткам для реєстрації струмів, 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.

При розташуванні кінчика піпетки поряд з аксоном пресинаптичної клітини пропускання електричного струму негативної полярності буде викликати деполяризацію мембрани аксону. При досягненні порогового рівня

трансмембранного потенціалу це призведе до відкриття натрієвих каналів і виникнення потенціалу дії. ПД буде розповсюджуватись по аксону до пресинаптичних закінчень на клітині, від якої відводяться постсинаптичні струми. Методика дозволяє контролювано подразнювати нервові закінчення клітин під візуальним контролем.

2.4 Система підведення розчинів

Для аплікації фармакологічних речовин в процесі дослідів було застосовано методику швидкої локальної суперфузії, розробленої спеціально для роботи з моношаровою культурою клітин Веселовським та співавторами [213]. Система дозволяє контролювати концентрацію речовини біля поверхні клітини і забезпечує достатньо високу швидкість аплікації та видалення розчинів.

Згадана система являє собою дві скляні піпетки з діаметром кінчика 20 - 40 мкм (діаметр піпетки для подачі розчину звичайно дещо більший за діаметр піпетки для відсмоктування) (

Рис. 2.1). Рисунок скопійований з роботи автора методики локальної суперфузії [242].

Всередині піпетки для подачі розчину (на малюнку - справа) знаходяться подаюча та відвідна трубки, що дозволяє безперервно видаляти розчин з «мертвого простору» у кінчику піпетки.

Подаючу трубку з'єднано з кількома резервуарами, які заповнюються необхідними розчинами. До відвідної трубки приєднаний електромагнітний клапан, який дозволяє швидко змінювати від'ємний гідростатичний тиск -P2 на менший тиск -P3.

Робота цього клапану забезпечує швидкість локальної аплікації речовини на досліджувані клітини. Зліва (на малюнку) розташована піпетка для відсмоктування, яка забезпечує відведення розчину з реєстраційної камери, в якій знаходиться препарат.

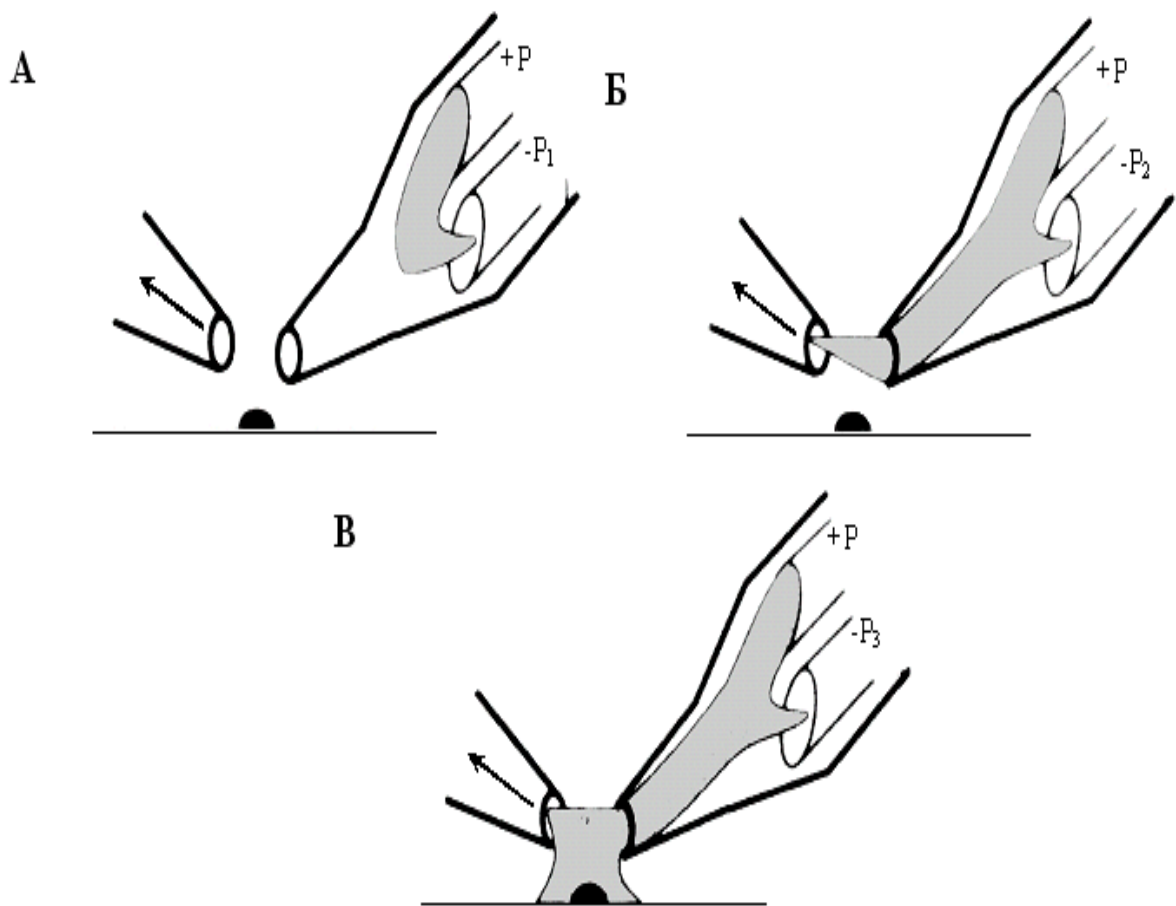


Рис. 2.1. Система швидкої локальної аплікації розчинів. А – «неробочий» стан (налагодження аплікаційної системи); Б – стан «готовність» (аплікацію розчину на клітину вимкнено); В – «робочий» стан (аплікацію розчину на клітину ввімкнено). +P – додатній тиск; -P1 ÷ -P3 – три різних рівня від’ємного тиску ($|P1| > |P2| > |P3|$). На всіх малюнках аплікаційна (подаюча) піпетка розташована справа, відсмоктуюча піпетка (напрямок потоку рідини всередині піпетки показано стрілкою)– зліва.

В першому, «неробочому», стані (

Рис. 2.1, А) гідростатичні тиски підібрано таким чином, що тестовий розчин з аплікаційної трубки повністю перетікає в трубку для відсмоктування. В другому стані «готовність», (Рис. 2.1, Б) електромагнітний клапан

відкривається, через що відбувається швидка зміна величини від'ємного тиску у відвідній трубці.

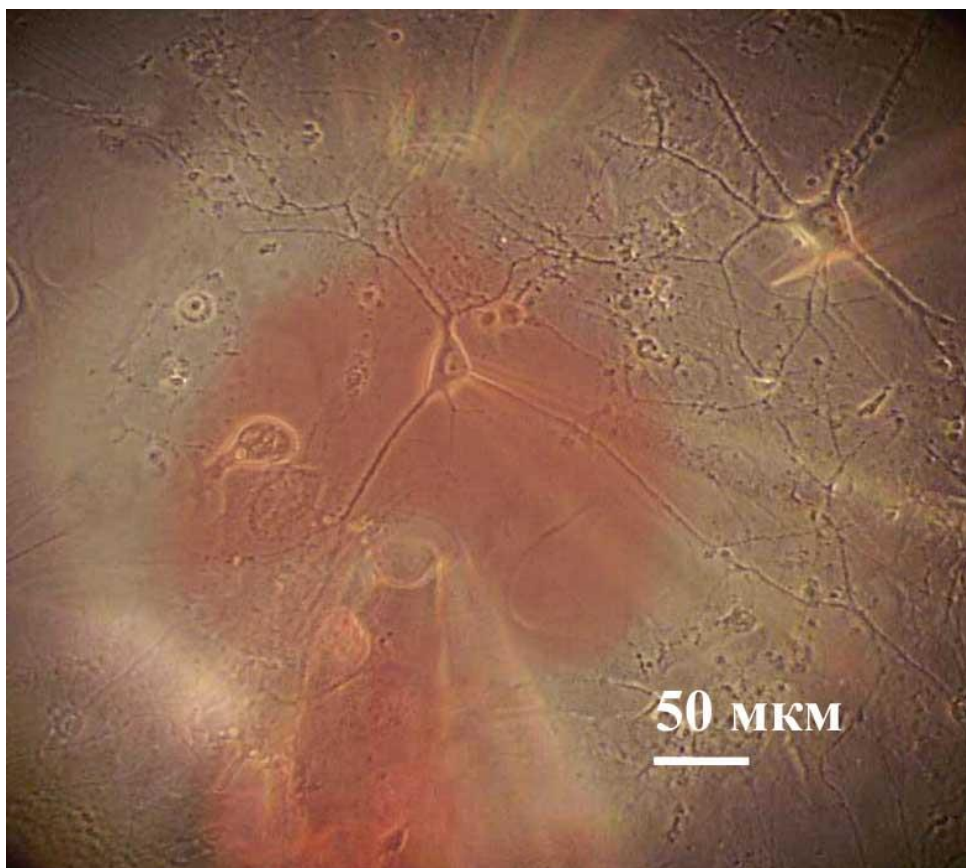


Рис. 2.2. Мікрофотографія швидкої локальної аплікації в процесі досліду (оптичний мікроскоп, фазовий контраст). 1 – піпетка для подачі розчину; 2 – піпетка для відсмоктування розчину; 3 – піпетка для відведення ПСС; 4- стимуляційна піпетка. Область аплікації з ламінарним потоком рідини чітко виділяється завдяки додаванню штучного барвника в тестовий розчин.

В третьому, «робочому», стані (Рис. 2.1, В) від'ємний тиск у відвідній трубці знижено і тестовий розчин витікає через отвір піпетки, повністю покриваючи область аплікації. При цьому додатний та від'ємні гідростатичні тиски в обох піпетках підібрані таким чином, щоб ламінарні лінії потоку тестового розчину обмежували опуклу видовжену область з чіткою границею, всередині якої потік рідини буде стаціонарним.

За даними розробників, товщина перехідного шару від тестового розчину до нерухомого зовнішньо клітинного розчину становить близько 10 мкм [213].

Отвори піпеток знаходяться на однаковій висоті (близько 5 мкм) над поверхнею покривного скла з культивованими нейронами, і в робочому стані клітина повністю знаходиться в тестовому розчині. Повздовжня відстань між піпетками становить 50 – 150 мкм. Мікрофотографія швидкої локальної аплікації в процесі досліду (Рис. 2.2) була зроблена співробітниками відділу фізіології нейронних мереж і використовувалась в публікаціях для наглядності роботи перфузії.

2.5 Розчини та реактиви

Для приготування всіх розчинів використовувалась деіонізована вода з високим питомим опором. Значення кислотності (показник рН) усіх розчинів контролювалося за допомогою рН-метру рН526 (WTW, Німеччина) з температурним сенсором. Необхідне значення показника рН досягалось за допомогою додавання в розчин мікролітрових об'ємів концентрованої кислоти (HCl) або лугу (NaOH чи KOH), точність вимірювання становила 0,01 од. кислотності.

У дослідах використовували зовнішньоклітинний розчин такого складу (ммоль/л):

NaCl – 140

KCl – 3

CaCl₂ – 2

MgCl₂ – 2

глюкоза – 30

HEPES – 20; рН 7,4 (NaOH).

До цього розчину додавали також блокатори збуджувальної нейротрансмісії DL-2-аміно-5-фосфоновалеріанову кислоту (DL-AP5) і 6,7-динітрохіноксалін-2,3-діон (DNQX) у концентрації 20 мкмоль/л.

Розчин для заповнення відповідної скляної піпетки містив (ммоль/л):

глюконат калію – 155

MgCl₂ – 2

EGTA – 10

HEPES – 20; рН 7,4 (KOH).

Всі реактиви було придбано у компанії Sigma (США).

2.6 *Аналіз даних*

Кінетичні параметри постсинаптичних струмів (амплітуда) визначались за допомогою програмного пакету Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Подальша обробка і представлення результатів, включаючи статистичний аналіз, проводилась за допомогою електронних таблиць Microsoft Excel та аналітичного пакету Microcal Origin.

Величини в тексті представлені у вигляді «середнє значення» ± «середньоквадратична похибка середнього (S.E.M.)», після чого у дужках наведено розмір вибірки, за якою проводилось усереднення.

Для визначення статистичної достовірності різниці між середніми значеннями двох груп даних було використано t-тест Ст'юдента. Рівень значимості критерію на малюнках та у таблицях позначено наступним чином: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ

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

Спочатку були проведені дослідження з визначення іонної природи викликаних постсинаптичних струмів. В даній роботі ми реєстрували виключно гальмівні струми, оскільки до складу всіх зовнішньоклітинних розчинів входили блокатори іонотропних глутаматних рецепторів.

З літературних даних відомо, що основним гальмівним нейромедіатором у гіпокампі є γ -аміномасляна кислота [51, 186]. Оскільки канали ГАМК_A-рецепторів є проникними для іонів хлору, ефект активації даних рецепторів буде залежати від електрохімічного градієнта для іонів хлору на постсинаптичній мембрані. Ідентифікація типу іонів, які опосередковують викликані гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС), проводилась за значенням їхнього потенціалу реверсії.

За допомогою рівняння Нернста:

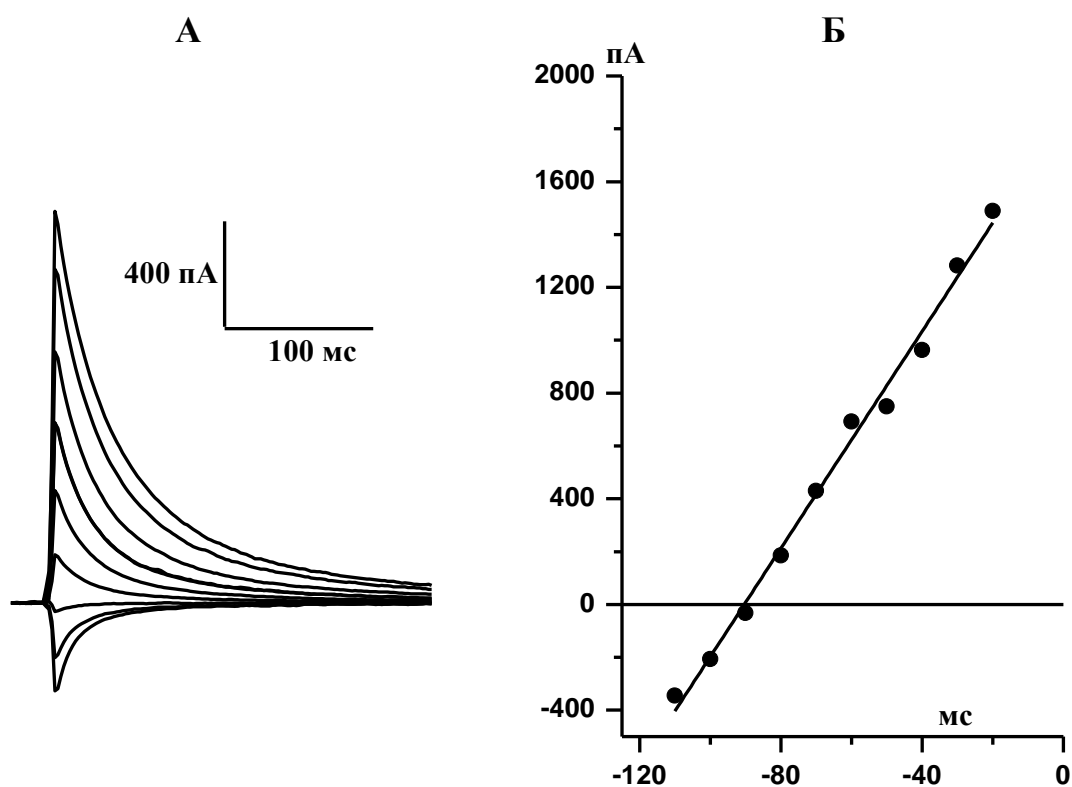
$$E = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}$$

де E – значення потенціалу реверсії, R – універсальна газова стала, T – абсолютна температура, Z – валентність іона, F – число Фарадея (заряд, який переноситься одним молекулою речовини);

ми визначили, що величина рівноважного хлорного потенціалу при використанні описаних вище розчинів (концентрація іонів хлору в зовнішньо-

та внутрішньоклітинному середовищах становить 151 ммоль/л та 4 ммоль/л відповідно) при кімнатній температурі (24 °С = 297 К) дорівнював -92,88 мВ.

В експериментальних умовах, використовуючи стимуляцію аксона пресинаптичної клітини прямокутними імпульсами струму тривалістю 0,4 мс, при різних значеннях підтримуваного потенціалу в межах від -20 до -110 мВ



було зареєстровано викликані постсинаптичні струми (Рис.3.1, А), для яких побудовано вольт-амперні характеристики.

Рис. 3.1. Гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС), викликані електричною стимуляцією аксона пресинаптичного нейрона.

А – приклади реєстрації усереднених вГПСС при значеннях підтримуваного потенціалу від -20 до -110 мВ. Усереднення проводили за 10 послідовними вГПСС.

Б – відповідна вольт-амперна характеристика вГПСС.

Вольт-амперна характеристика мала лінійний вигляд і апроксимувалась прямою з коефіцієнтом подібності $R^2 \geq 0.99$ (Рис.3.1, Б). З графіка було

визначено величину потенціалу реверсії, яка дорівнювала $-90.36 \text{ мВ} \pm 3 \text{ мВ}$ ($n = 4$), що практично відповідала розрахованому рівноважному потенціалу для Cl^- . Це вказує на те, що отримані вГПСС опосередковані через ГАМК_A -рецептори, які розташовані на постсинаптичній мембрані.

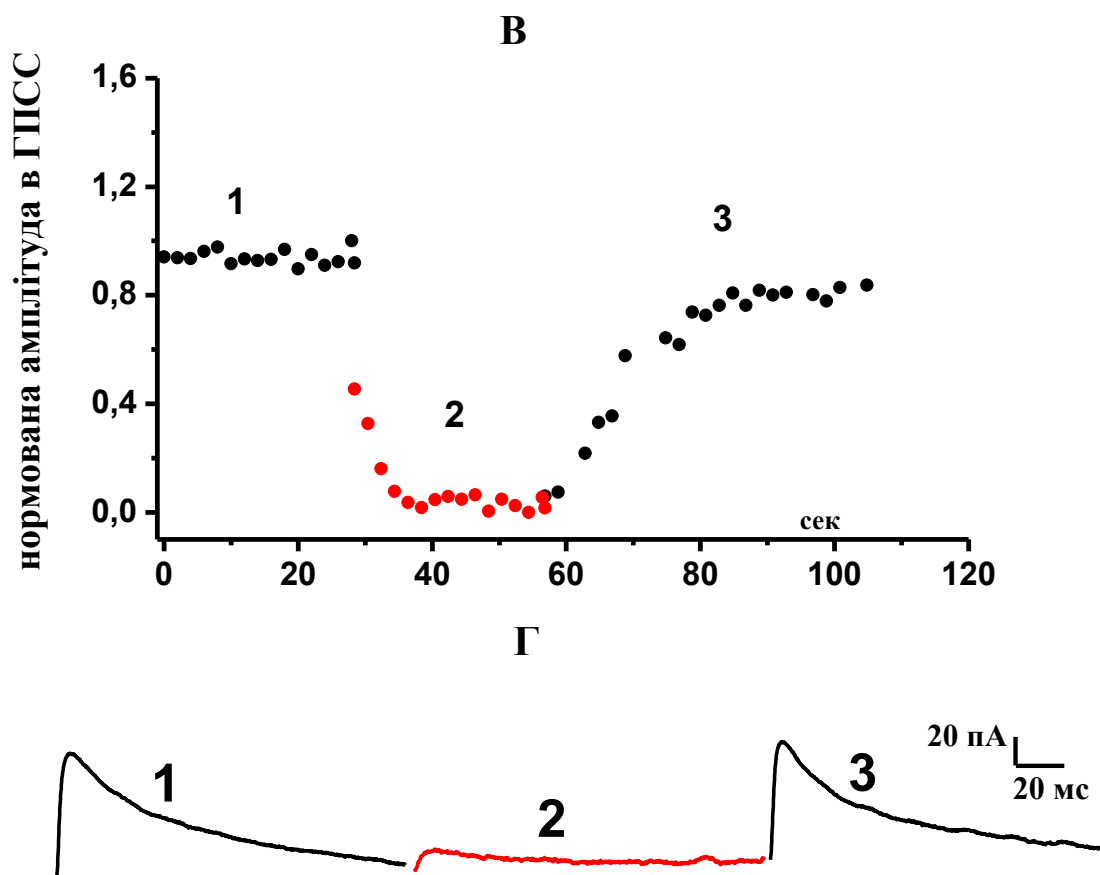


Рис. 3.2 Пригнічення викликаних постсинаптичних струмів (вГПСС) блокатором ГАМК_A -рецепторів бікукуліном.

А – приклад динаміки змін нормованої амплітуди вГПСС під впливом аплікації бікукуліну.

Б – приклад реєстрації вГПСС. Усереднення проводили за 10 послідовними реєстраціями. На А, Б: 1 – контроль, 2 – аплікація 20 мкмоль/л бікукуліну, 3 – відмивання.

Додатково для ідентифікації рецепторів, які беруть участь у проведенні зареєстрованих струмів, було застосовано локальну аплікацію селективного

антагоністу ГАМК_A-рецепторів бікукуліну метоброміду в концентрації 20 мкмол (Рис.3.2). Аплікація бікукуліну майже повністю (на 91% ± 1%) пригнічувала амплітуду вГПСС. Ефект зменшення амплітуди був достовірним (n = 3, **P < 0,01) і оборотним (відновлення амплітуди струму до 80% відносно контролю).

Також було встановлено, що кінетичні характеристики вГПСС в контролі та після відмивання майже не змінювались.

Отже зареєстровані вГПСС було остаточно віднесено до таких, що опосередковуються ГАМК_A-рецепторами.

3.2 Визначення механізмів, 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 депресії вважають зменшення кількості вивільненого нейромедіатора, що може відображати спустошення пулу готових до вивільнення везикул [87, 230, 240] та зменшення ймовірність вивільнення медіатора [40, 223]. Полегшення при парній стимуляції традиційно пов'язують з гіпотезою про залишковий кальцій, згідно з якою невелика його кількість, що потрапила до терміналі внаслідок першого потенціалу дії збільшує ймовірність вивільнення медіатора під час другого потенціалу дії [240].

Для з'ясування локалізації механізмів, які обумовлюють короткотривалу пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі, аксон пресинаптичної клітини стимулювали парними імпульсами, що наносили з інтервалом 150 мс. Амплітуду сили струму підбирали таким чином, що після кожної стимуляції ми

реєстрували відповідь у вигляді постсинаптичного струму. Період між першою парою стимулів і наступною був 3 с. Цей час вважають достатнім для повного відновлення першого вГПСС.

Явище пластичності при парній стимуляції часто спостерігається на інтервалах часу, співрозмірних з константами часу спаду вГПСС. Під час цього спостерігалось накладання другої відповіді на пізні компоненти першої. Тому амплітуда другого вГПСС у парі визначалася так як представлено на рис. 3.4.

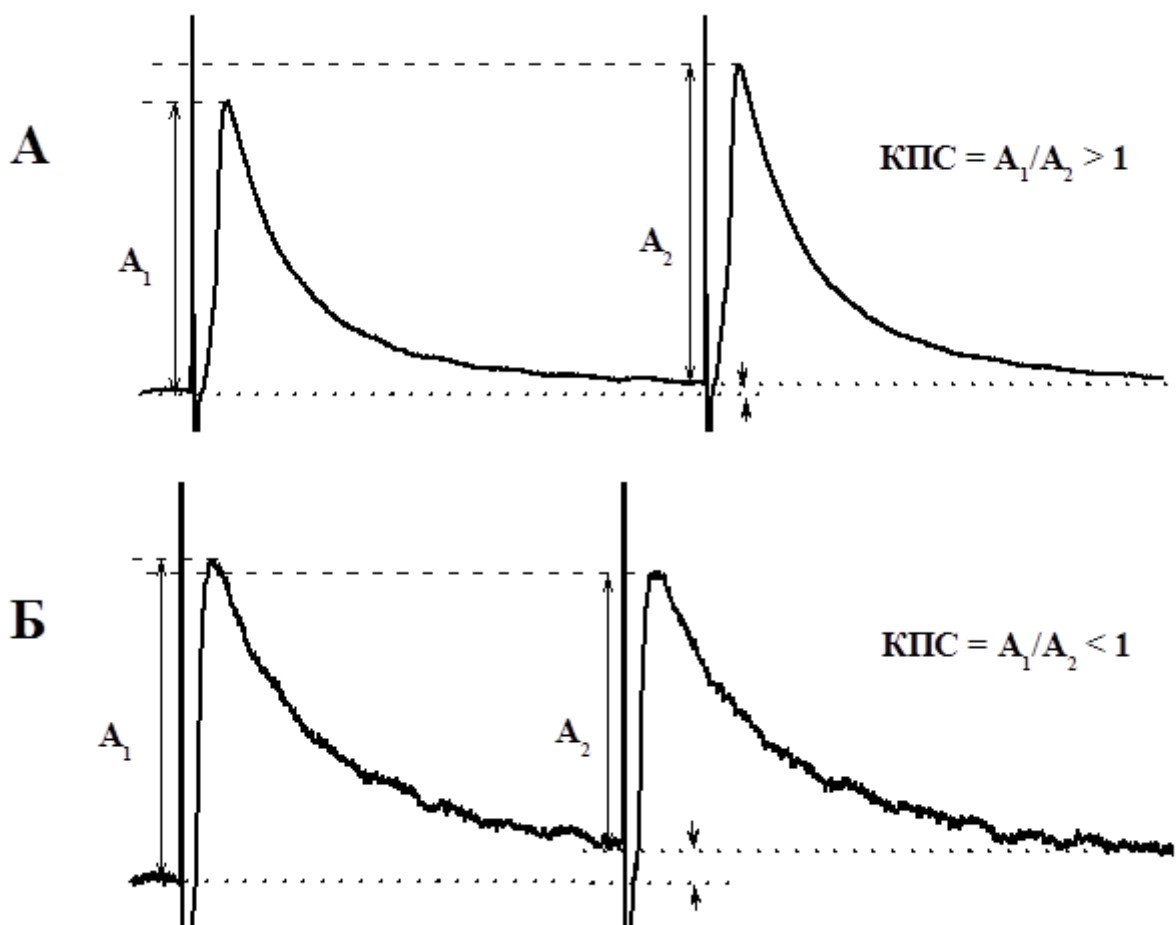


Рис. 3.3. Розрахунок коефіцієнта парної стимуляції (КПС) при явищі полегшення (А) та депресії (Б) при парній стимуляції.

В якості кількісної міри синаптичної пластичності було обрано коефіцієнт парної стимуляції (КПС), котрий обчислювали як відношення

амплітуди другого вГПСС (A_2) у парі до першого (A_1). В залежності від значення КПС при стимуляції парою імпульсів може спостерігатись явище депресії (при $KPS < 1$) або полегшення (при $KPS > 1$).

Для виключення впливу постсинаптичних механізмів на короткочасну зміну ефективності синаптичної передачі ми змінювали електрохімічний

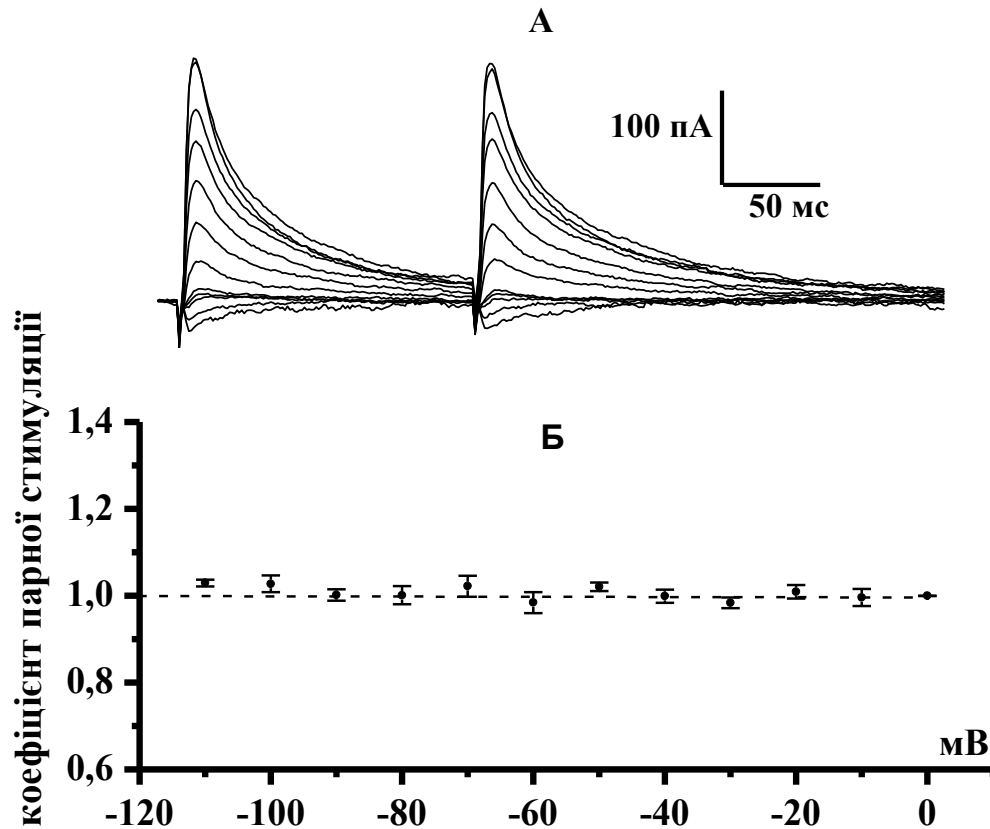


Рис. 3.4. Залежність коефіцієнта парної стимуляції (КПС) від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичної клітини.

А – приклади реєстрації усереднених парних викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) при різному підтримуваному потенціалі. Усереднення проводили за 10 послідовними вГПСС.

Б – залежність КПС від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичної клітини. За 1 прийнято значення КПС при підтримуваному потенціалі 0 мВ.

градієнт для іонів хлору від 0 мВ до -110 мВ та одночасно реєстрували вГПСС (Рис. 3.3, А). Отримані результати з 12 клітин були представленні у вигляді

залежності КПС від підтримуваного потенціалу. Це дало можливість зробити висновок, що значення КПС не залежали від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичного нейрона (рис. 3.3, Б). Отже постсинаптичні події не мають вплив на короткотривалу пластичність синаптичної передачі.

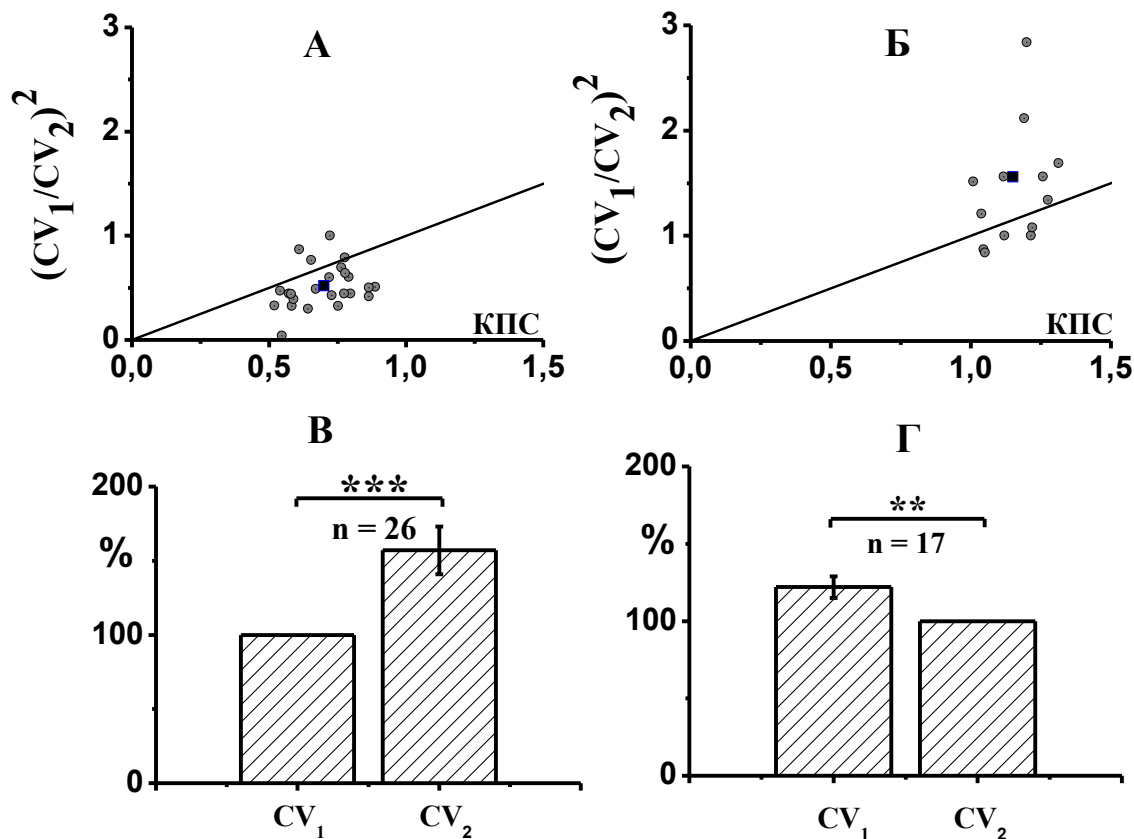


Рис. 3.5. Аналіз коефіцієнта варіації струмів (CV) при депресії (ліворуч) та полегшенні (праворуч) синаптичної передачі.

А, Б – залежність квадрата відношення коефіцієнтів варіації першої відповіді у парі до другої від коефіцієнта парної стимуляції (КПС) при депресії та полегшенні синаптичної передачі відповідно.

В, Г – нормовані усередненні значення CV при депресії та полегшенні синаптичної передачі відповідно. За 100 % прийнято значення CV 1-го вГПСС. **P < 0,01, ***P < 0,01.

Тому були проведені експерименти для встановлення пресинаптичних факторів, якими може бути зумовлена ефективність ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Відповідно до біноміальної моделі синаптичної передачі,

непрямим методом визначення пре- або постсинаптичних факторів є вивчення зміни коефіцієнта варіації амплітуд постсинаптичних струмів (CV). Він визначається як відношення стандартного відхилення амплітуд до усередненого їх значення. При пластичності синаптичної передачі, залежно від пре- або постсинаптичних 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 (Larkman et al., 1992; Sjostrom et al., 2007). Для парних вГПСС, при яких спостерігалось явище короткочасної пластичності синаптичної передачі, були побудовані відношення $(CV_1/CV_2)^2$ до КПС (Рис. 3.5, А, Б).

Нами було розраховано усереднене значення, що відображається у вигляді точки. При явищі депресії вона лежить нижче від діагоналі і має координати $(0,7 \pm 0,02; 0,52 \pm 0,04; n = 26)$, а при полегшенні – вище від діагоналі і має координати $(1,15 \pm 0,03; 1,56 \pm 0,19; n = 17)$. Для цих же нейронів було розраховано, що при депресії CV_2 вірогідно більше за CV_1 на $57 \pm 16 \%$, а при полегшенні - менше на $22 \pm 7 \%$ (Рис. 3.5, В, Г).

Отже, згідно з цієї теорії, короткотривала депресія та полегшення, що ми спостерігали, зумовлені пресинаптичними механізмами.

3.3 Аналіз квантових показників, які характеризують вивільнення ГАМК при пластичності синаптичної передачі

Пластичність синаптичної передачі може бути описана з використанням стандартної квантової моделі. Відповідно до теорії квантового викиду, вивільнення медіатора відбувається квантами і має ймовірнісний характер.

Таким чином, амплітуда постсинаптичної відповіді відображає суму квантів медіатора з усіх місць вивільнення в синапсі.

Отже, найважливішими показниками викликаної синаптичної події 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 перезавповнення 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. Перші реєстрували у зовнішньоклітинному розчині, що містив 0,5 ммоль/л Ca^{2+} , 10 ммоль/л Mg^{2+} та 0,25 мкмоль/л тетродотоксину. Такі умови реєстрації сприяли зниженню ймовірності викиду ГАМК. Амплітудні розподіли мГПСС, як правило, були унімодальними і задовільно апроксимувалися однією кривою Гауса з модою на $13,9 \pm 0,3$ пА ($n = 3$; рис. 3.6, А).

Амплітудні розподіли сГПСС, зареєстрованих у різних клітинах гіпокампа, демонстрували наявність 2–3, візуально ідентифікованих, піків на гістограмах, які добре апроксимувалися сумою кривих Гауса (див. рис. 3.6, Б). В усіх випадках середня відстань між піками суміжних гаусових (нормальних) розподілів не відрізнялися від значень першої моди полімодальних амплітудних гістограм і становили у середньому $14,2 \pm 1,7$ пА ($n = 6$). Отже, згідно з аналізом сГПСС та мГПСС, ефект вивільнення кванта ГАМК в наших експериментах дорівнює у середньому 14 пА.

Оскільки у гіпокампі екзоцитоз ГАМК підпорядковується біноміальній статистиці [242] то для знаходження квантових показників вивільнення медіатора використовували біноміальним розподіл. Як вже було зазначено вище, розмір кванта в наших експериментах дорівнював 14 пА (q). Розрахований коефіцієнт варіації мГПСС становив $0,34 \pm 0,07$ (CV_q).

Квантовий вміст розраховується як $m = I/q$.

Ймовірність вивільнення медіатора знаходили як $P = 1 + CVq^2 - m \cdot CV^2_{\text{вГПСС}}$. Біноміальний показник (число місць вивільнення везикул з медіатором) розраховується як $N = m/P$.

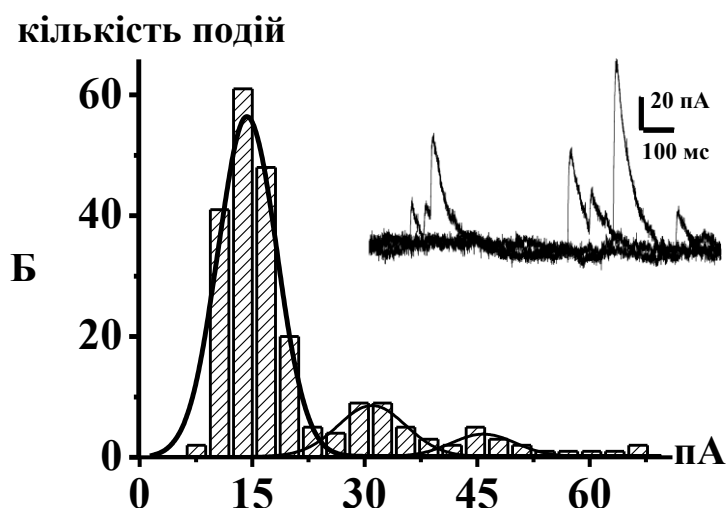
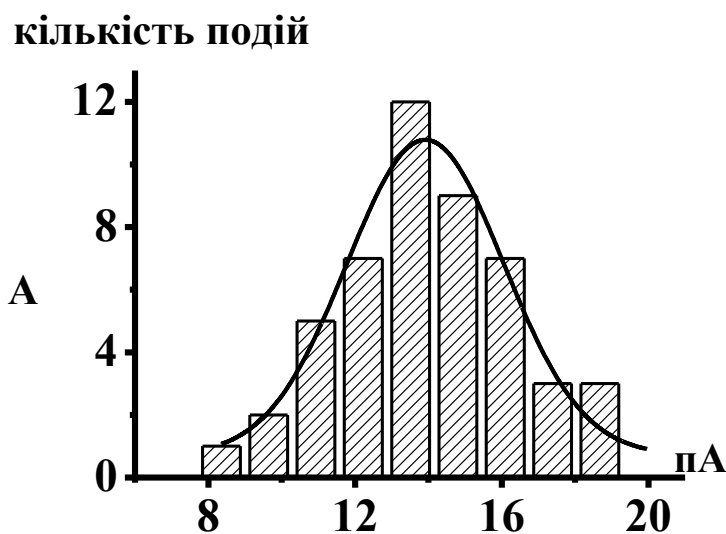


Рис. 3.6. Типові амплітудні розподіли мініатюрних (мГПСС) та спонтанних (сГПСС) ГАМК-ергічних струмів.

А – розподіл амплітуд мГПСС та апроксимація його однією гаусіаною з максимумом на 13,9 пА;

Б – гістограма амплітуд сГПСС та апроксимація її трьома розподілами Гауса із модами на 14, 31 і 45 пА; на верхньому фрагменті – суперпозиція записів сГПСС.

На рисунку 3.7 представленні амплітудні розподіли для амплітуди 1-го та 2-го зареєстрованих парних струмів при депресії та полегшенні синаптичної передачі. Для них і будуть розраховані квантові показники вивільнення ГАМК.

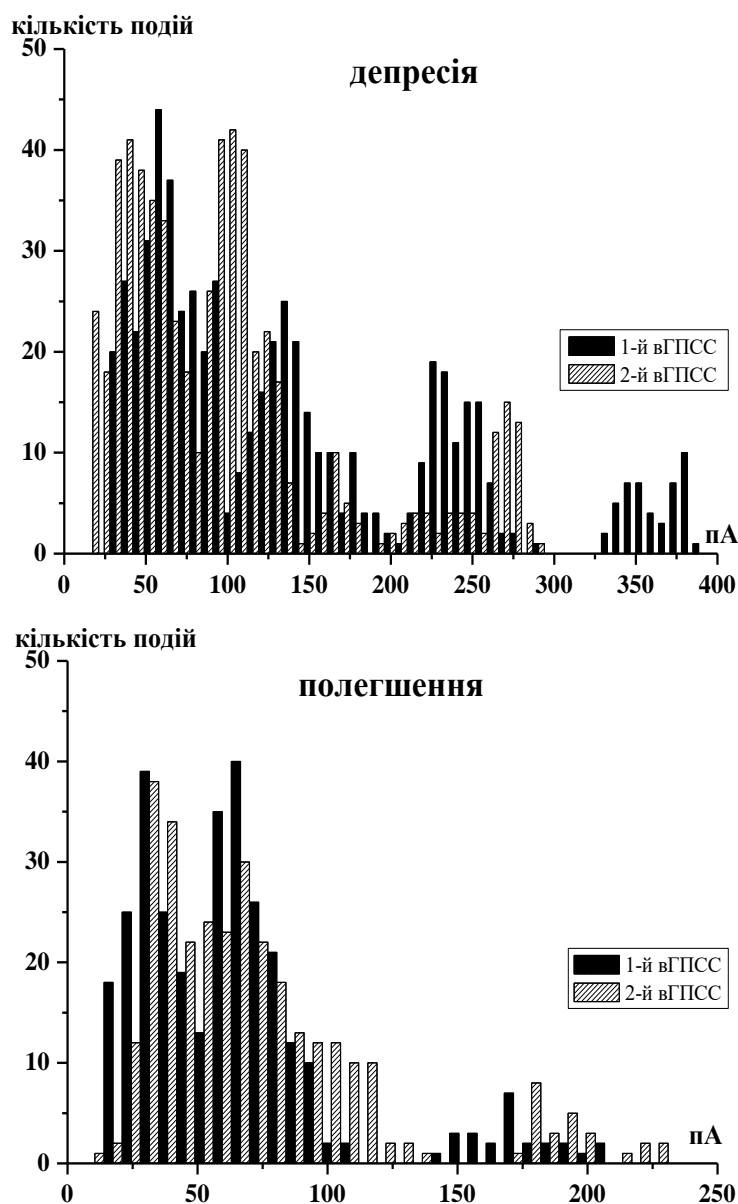


Рис. 3.7. Амплітудні розподіли 1-го та 2-го викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) у парі при депресії та полегшенні ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Для першої відповіді у парі середнє значення квантового вмісту було $9,7 \pm 1,3$ і $5,0 \pm 0,6$ відповідно при депресії ($n = 26$) та полегшенні ($n = 17$) синаптичної передачі. Біномініальний показник також відрізнявся при депресії та полегшенні і становив $9,3 \pm 1,2$ та $4,9 \pm 0,6$ відповідно (Рис. 3.8). Тобто, якщо

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

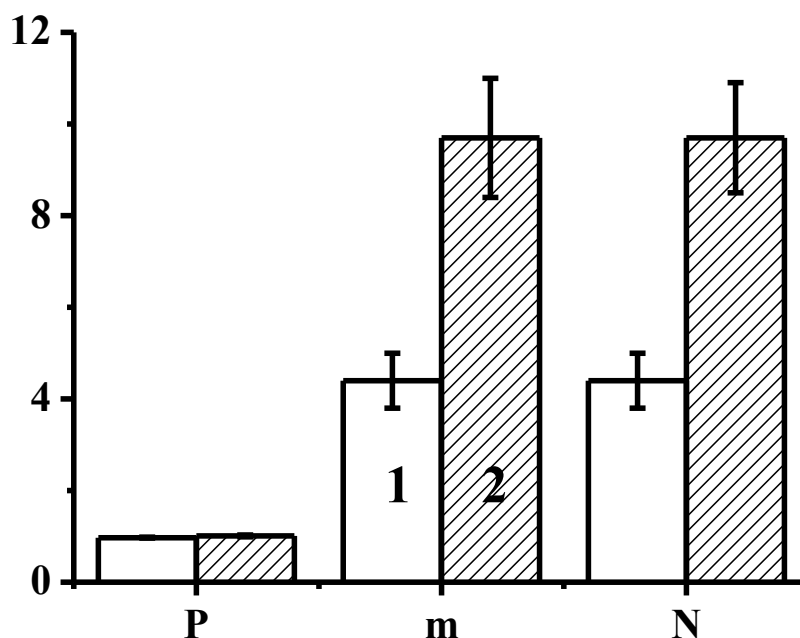


Рис. 3.8. Порівняння квантових показників вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні синаптичної передачі. 1 – полегшення, 2 – депресія: P - ймовірність вивільнення ГАМК, m - відносний квантовий вміст, N - відносний біноміальний показник.

Для парних вГПСС, при яких спостерігалось явище короткочасної пластичності синаптичної передачі, був проведений порівняльний аналіз квантових показників синаптичної передачі для першого і другого стимулу (рис. 3.9).

Очевидно, що ймовірність вивільнення ГАМК при обох стимулах є майже незмінною як при депресії, так і при полегшенні. Проте для другого стимулу зміни квантового вмісту та числа місць вивільнення везикул є неоднаковими при явищах депресії та полегшенні. Для другого стимулу вони вірогідно

зменшуються порівняно з початковими значеннями на 28 і 26% при депресії та збільшуються на 14 і 11% при полегшенні відповідно.

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.

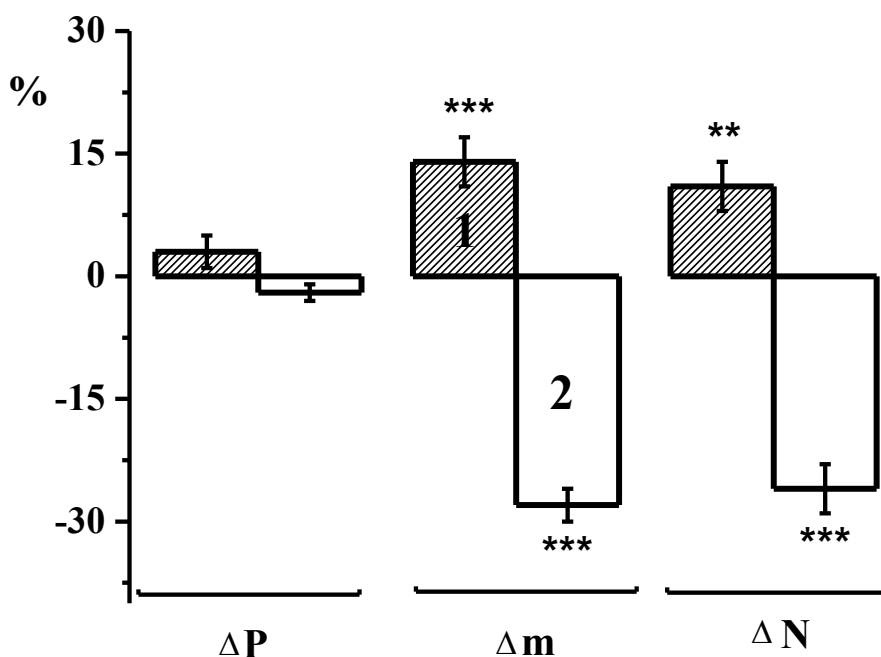


Рис. 3.9. Порівняльний аналіз змін нормованих квантових показників вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні синаптичної передачі після першого стимулу. За 0 % прийнято нормовані значення квантових показників для 1-го викликаного гальмівного постсинаптичного струму у парі.

1 – полегшення, 2 – депресія: ΔP – зміна ймовірності вивільнення ГАМК, Δm – зміна відносного квантового вмісту, ΔN – зміна відносного біноміального показника. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Постсинаптичні фактори у регуляції короткотривалої пластичності швидкої гальмівної синаптичної передачі переважно не задіяні.

3.4 Частотна модуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі

Відомості про динаміку короткотривалої синаптичної пластичності і час відновлення є важливим для розуміння механізмів регуляції синаптичної передачі між нейронами гіпокампа.

Тому 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 спостерігалось явище депресії синаптичної передачі (рис.3.10).

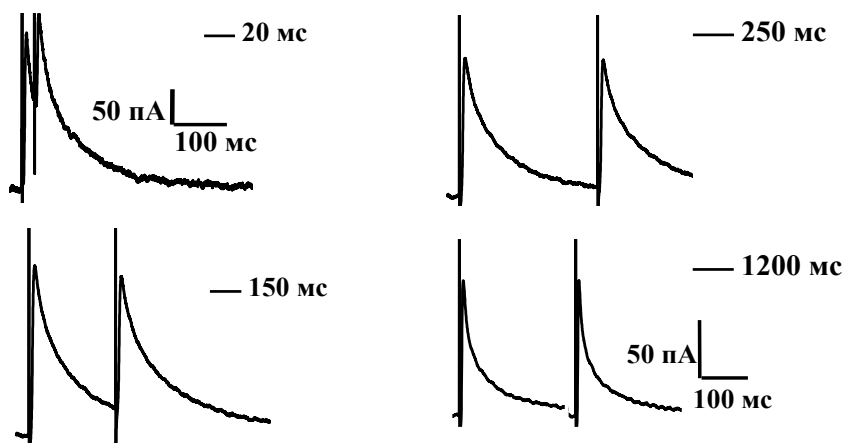


Рис. 3.10. Приклад реєстрації усереднених викликаних гальмівних синаптичних струмів (вГПСС) що демонстрували депресію при парній стимуляції з міжстимульним інтервалом: 20 мс, 150 мс, 250 мс і 1200 мс. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС.

Максимальна депресія спостерігалась при найкоротшому міжстимульному інтервалі 20 мс; в цьому разі амплітуда другого ГПСС була меншою ніж амплітуда першого струму, в середньому на $58 \pm 6\%$. Майже повне відновлення після депресії спостерігалось при інтервалі між стимулами 1200 мс, коли різниця між амплітудами 1-го і 2-го вГПСС складала всього $2 \pm 6\%$ ($P < 0,001$).

З графіка залежності КПС від міжстимульного інтервалу визначили, що динаміку відновлення після депресії можна описати експоненційною функцією з $\tau = 83$ мс (рис.3.11).

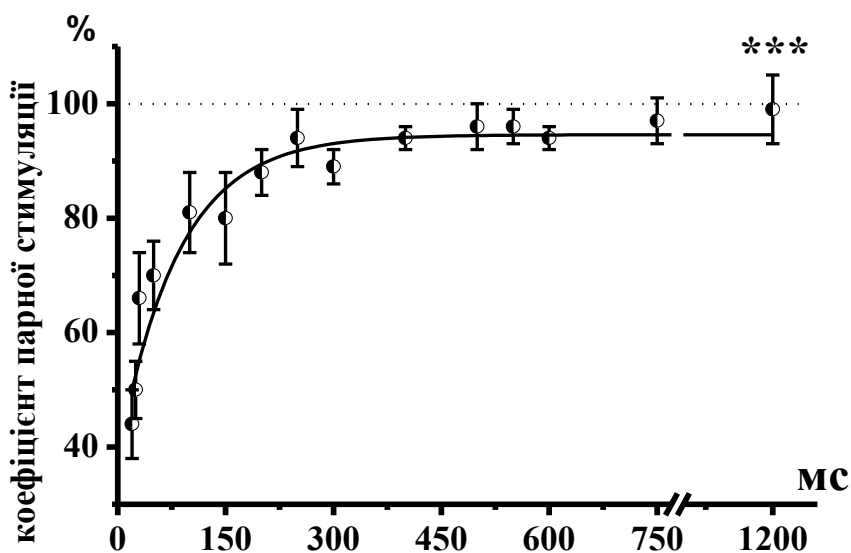


Рис. 3.11. – залежність коефіцієнта парної стимуляції від міжстимульного інтервалу. За 100 % прийнято значення КПС = 1. * $P < 0,05$.

При парному подразненні пресинаптичного аксона з міжстимульними інтервалами від 30 мс до 500 мс у 6 нейронах спостерігалось явище полегшення синаптичної передачі (рис.3.12). Максимальне полегшення спостерігалось при інтервалі 150 мс, коли амплітуда другого ГПСС була більшою за амплітуда першого, в середньому на $18 \pm 4\%$ ($P < 0,05$).

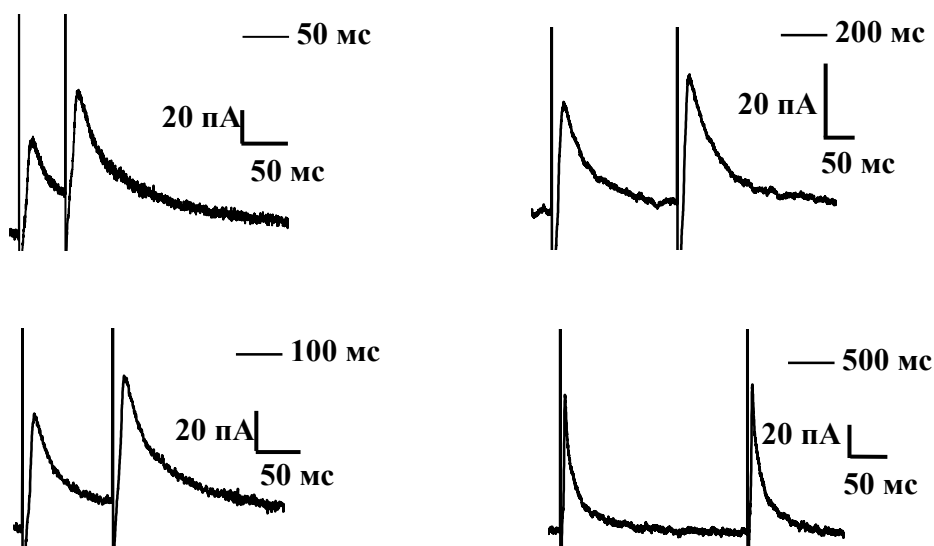


Рис. 3.12. Приклад реєстрації усереднених викликаних гальмівних синаптичних струмів (вГПСС) що демонстрували полегшення при парній стимуляції з міжстимульним інтервалом: 50 мс, 100 мс, 200 мс і 500 мс. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС.

Майже повне відновлення після полегшення спостерігалось при найдовшому інтервалі між стимулами 500 мс, при цьому різниця між амплітудами 1-го і 2-го вГПСС складала всього $4 \pm 4\%$.

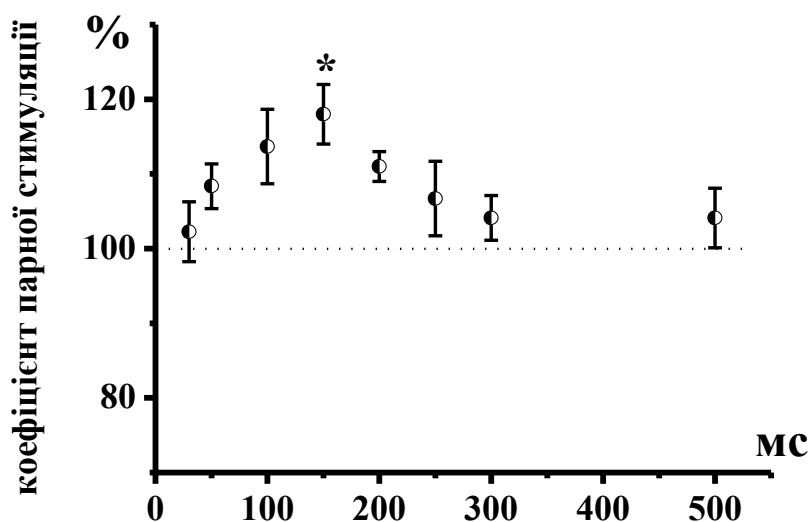


Рис. 3.13. Залежність коефіцієнта парної стимуляції від міжстимульного інтервалу. За 100 % прийнято значення КПС = 1. ***P < 0,001

З графіка залежності КПС від міжстимульного інтервалу визначили, що динаміка відновлення після полегшення має дзвіноподібну форму (рис.3.13).

Для дослідження динаміки зміни амплітуди вГПСС після попередньої активації ми стимулювали аксон пресинаптичного нейрона вже чотирма послідовними поштовхами струму, змінюючи міжстимульний інтервал від 50 мс до 200 мс (рис.3.14, А).

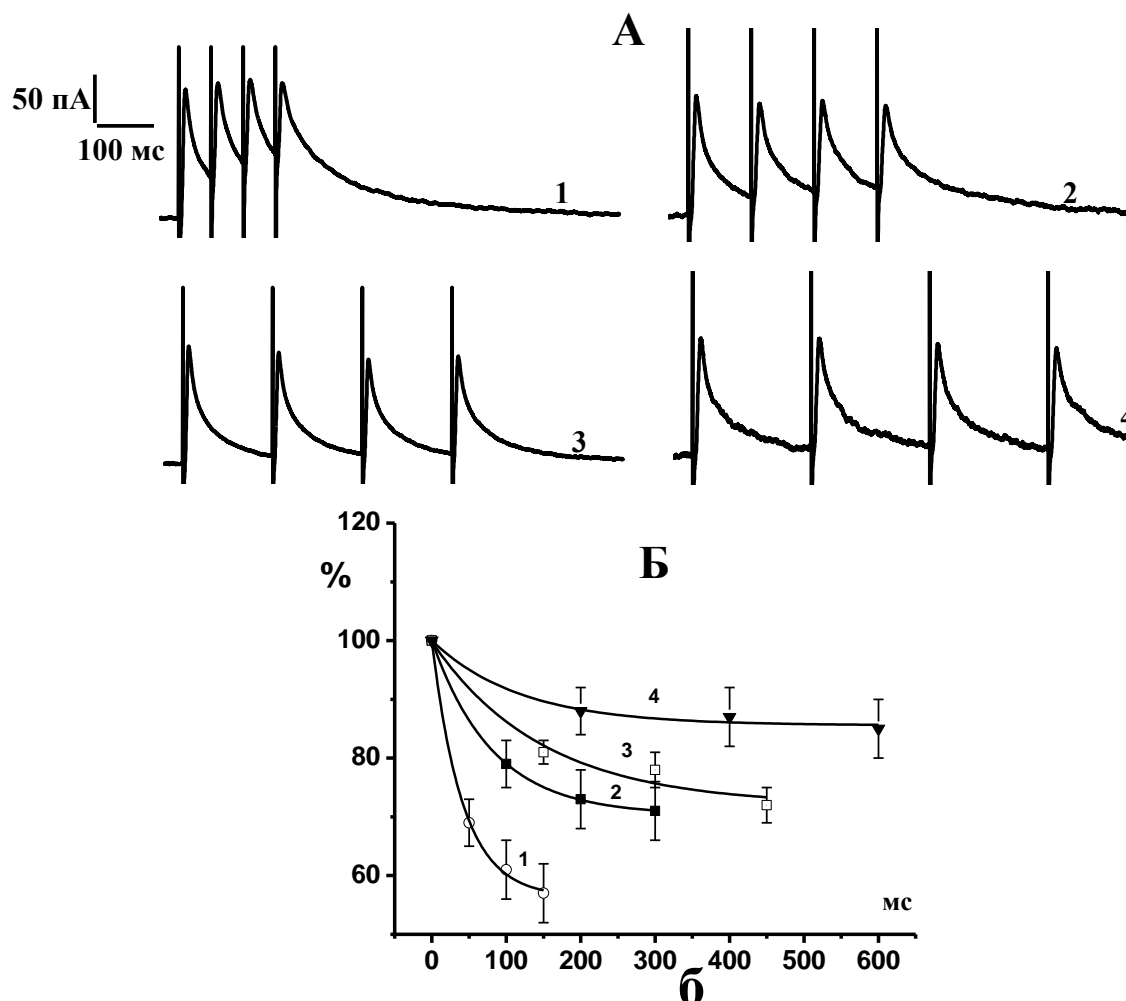


Рис. 3.14. Залежність депресії ГАМК-ергічної синаптичної передачі від частоти стимуляції аксона пресинаптичного нейрона.

А – приклад реєстрації усереднених вГПСС після чотирьох послідовних стимуляцій. Б – залежність відносної амплітуди вГПСС у відповідь на послідовні стимулювання. За 100 % прийнято усереднене значення амплітуди першого вГПСС. Міжстимульний інтервал: 1-50 мс, 2- 100 мс, 3- 150 мс, 4- 200 мс

У досліджених 7 нейронах спостерігалось тільки явище депресії амплітуди наступних вГПСС порівняно з амплітудою попереднього. З графіка залежності нормованої амплітуди вГПСС від міжстимульного інтервалу (рис.3.12,Б) визначили, що динаміку депресії можна описати експоненційною функцією. При найкоротшому інтервалі (50 мс) амплітуда струму після попереднього стимулювання знижувалась найшвидше ($\tau = 41$ мс), а при найдовшому інтервалі (200 мс) – найбільш повільно ($\tau = 119$ мс).

З наших результатів можна зробити висновок, що короткотривала пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі, зумовлені попередньою активністю синапсів, залежить від частоти стимулювань. Депресії 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.

3.5 Участь кальцієвих каналів у регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа

Відомо, що в механізмах вивільнення нейромедіатора та формування синаптичної пластичності вхід кальцію в пресинаптичну терміналь саме через високопорогові потенціалкервані кальцієві канали відіграє вирішальну роль.

3.5.1 Участь P-, Q- та N-типів кальцієвих каналів у регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі

У експериментах, проведених на нейронах культури гіпокампа, з використанням селективних блокаторів кальцієвих каналів, було показано, що P- і Q-типи каналів є домінуючими у регуляції вивільненні нейромедіатора як в збудливих так і в гальмівних синапсах [44, 110, 180, 201, 222, 226].

В даній роботі, для того щоб дослідити їх внесок у пластичність ГАМК-ергічну синаптичну передачу між культивованими нейронами гіпокампа ми використали специфічний блокатор цих каналів – пептид ω -агатоксин-IVA [2]. Для блокування P-типу каналів ми використали 30 нмоль/л цього токсину, а для блокування Q-типу була використана необхідна концентрація в 200 нмоль/л. Оскільки при блокуванні Q-типу блокується і P-тип, загальноприйнято позначати дію такої концентрації блокатора як блокування P/Q-типу кальцієвих каналів.

Зовнішньоклітинне прикладання блокатора виключало певний тип кальцієвих каналів з участі у процесі генерації кальцієвого сигналу в пресинаптичній терміналях. Тому, порівнявши амплітуди вГПСС у контролі і після аплікації, ми дізнавались про опосередкований внесок конкретного типу каналів у процес регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Спершу ми дослідили участь P-типу кальцієвих каналів. Для цього ми електрично стимулювали аксон пресинаптичного нейрона двома стимулами тривалістю 0,4 мс з міжстимульним інтервалом 150 мс і на сомі постсинаптичного нейрона реєстрували парні вГПСС. Для кожної клітини ми реєстрували вГПСС у контролі і після аплікації блокатора.

Аплікація 30 нмоль/л агатоксину достовірно пригнічувала амплітуду обох парних вГПСС (рис. 3.15, А, Б).

Зменшення амплітуди вГПСС було характерне для всіх 19 досліджених нейронів. Що може свідчити про те що кальцій, який входить у пресинаптичне закінчення через ці типи кальцієвих каналів бере участь у вивільненні ГАМК як після першого так і після другого стимулу.

Проте амплітуда першого вГПСС зменшувалась більше порівняно з амплітудою другого. В серії цих експериментів було визначено, що усереднена величина амплітуди після блокування P- типу кальцієвих каналів складала $69 \pm 4 \%$ і $73 \pm 5 \%$ відповідно для 1-го і 2-го вГПСС амплітуди у контролі. Тобто, у здійснення синаптичної передачі після другого стимулу, опосередкований

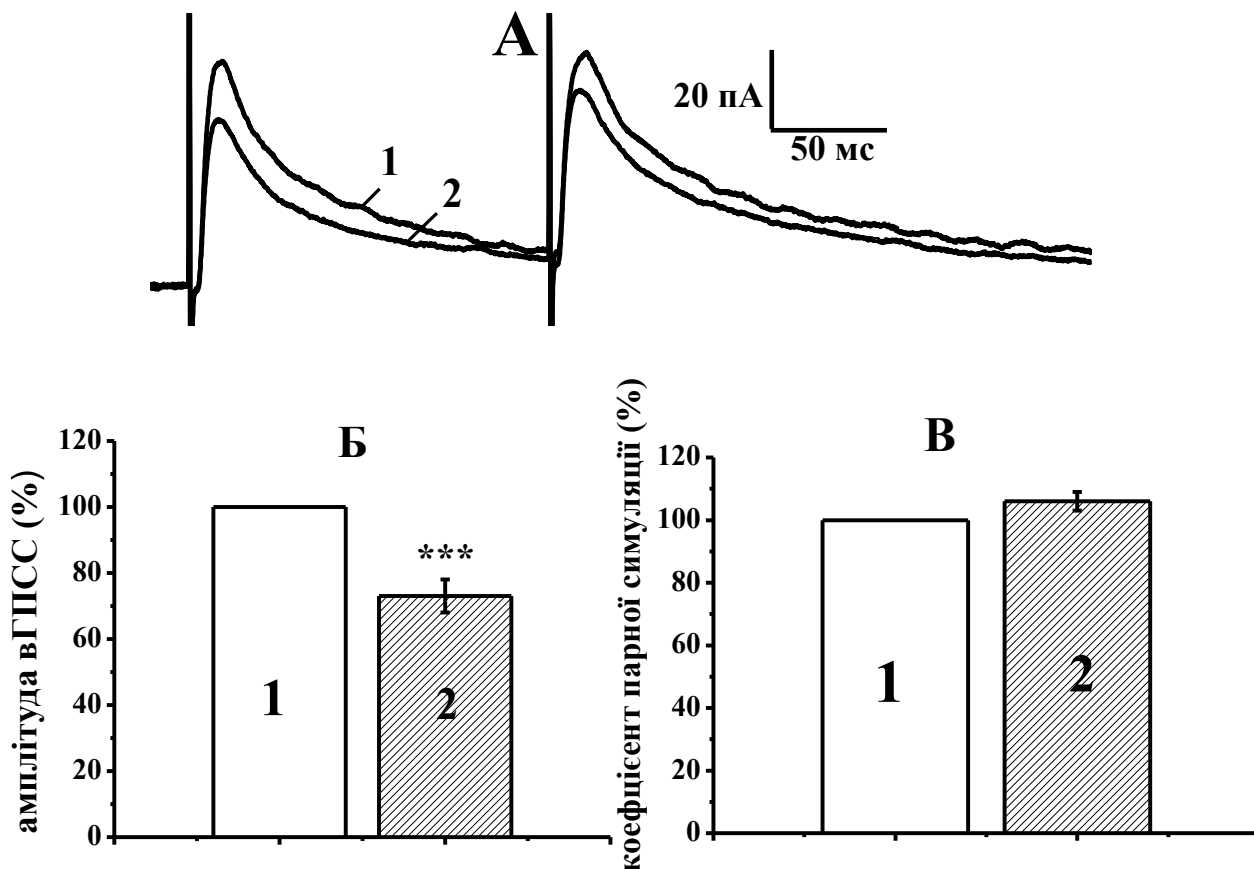


Рис. 3.15. Дія 30 нмоль/л ω -агатоксину на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС).

А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації ω -агатоксину. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС.

Б – нормоване усереднене значення амплітуди 1-го вГПСС відносно контролю.

В – нормоване усереднене значення коефіцієнта парної стимуляції відносно контролю. На А, Б: 1 - контроль, 2 - дія 30 нмоль/л ω -агатоксину. Усереднення проводили за 19 нейронами. *** $P < 0,001$.

вклад досліджених типів кальцієвих каналів у вивільнення нейромедіатора менший ніж після першого стимулу. При реєстрації парних вГПСС спостерігались як полегшення (при КПС > 1), так і депресія (при КПС < 1). Тому для зручності підраховані значення КПС ми представили нормованими відносно значень КПС у контролі.

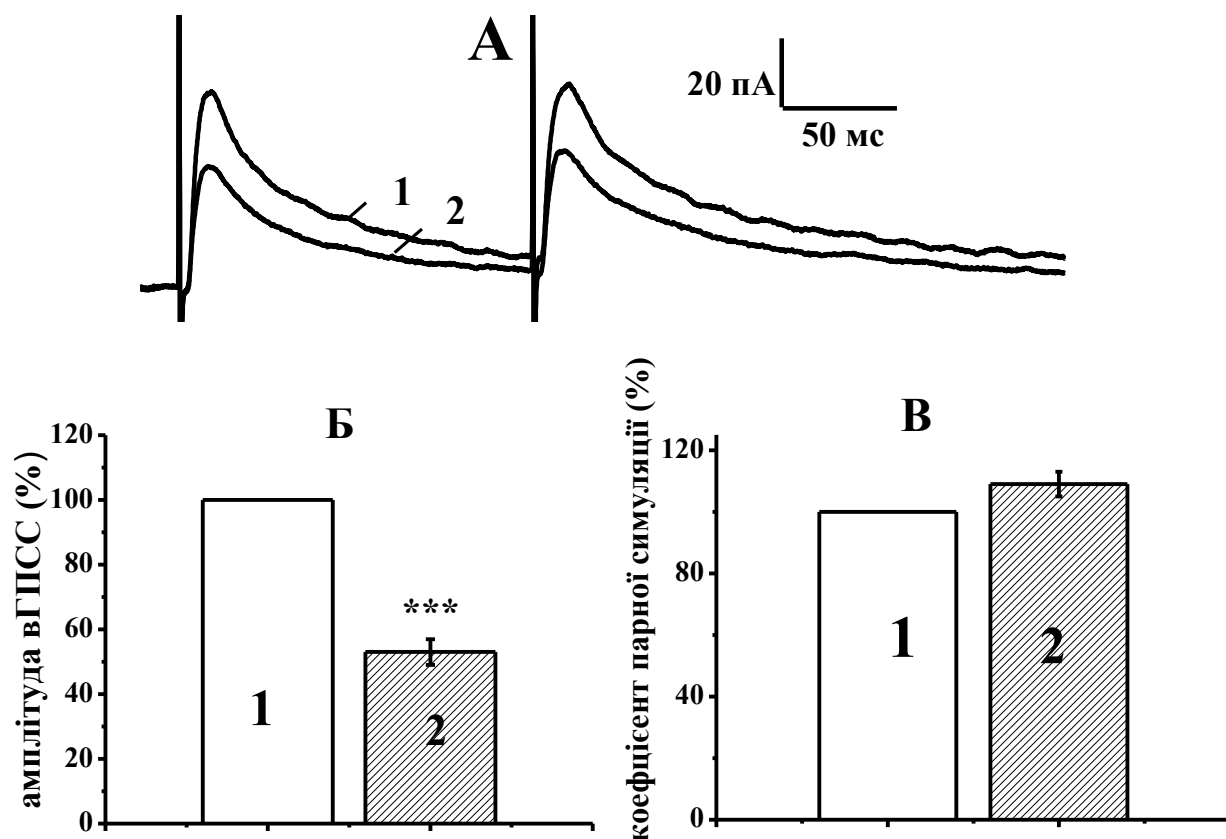


Рис. 3.16. Дія 200 нмоль/л ω-агатоксину на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС).

А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації ω-агатоксину. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС.

Б – нормоване усереднене значення амплітуди 1-го вГПСС відносно контролю.

В – нормоване усереднене значення коефіцієнта парної стимуляції відносно контролю. На **А**, **Б**: 1 - контроль, 2 - дія 200 нмоль/л ω-агатоксину. Усереднення проводили за 19 нейронами. *** $P < 0,001$.

Аплікація 30 нмоль/л агатоксину збільшувала усередненні нормовані значення КПС на $6 \pm 3\%$ (Рис. 3.15, В).

Наступним ми дослідили участь P/Q-типу кальцієвих каналів у регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Аплікація 200 нмоль/л агатоксину достовірно зменшувала амплітуди парних вГПСС (рис. 3.16, А, Б). Зменшення амплітуди вГПСС було характерне для всіх 15 досліджених нейронів.

В серії цих експериментів було визначено, що усереднена величина амплітуди після блокування P/Q-типу кальцієвих каналів складала приблизно $53 \pm 4\%$ і $56 \pm 4\%$ відповідно для 1-го і 2-го вГПСС амплітуди у контролі. Також аплікація 200 нмоль/л агатоксину збільшувала усередненні нормовані значення КПС на $9 \pm 4\%$ (Рис. 3.16, В).

Відомо, що в гіпокампі швидка синаптична передача є результатом активації також і N-типу кальцієвих каналів [140].

Для того щоб відокремити роль саме N-типу від усіх високопорогових кальцієвих каналів в регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі ми використали селективний блокатор цього типу каналів ω -конотоксин-GVIA в концентрації 200 нмоль/л. Ця концентрація є достатньою оскільки половина ефективної концентрації (IC_{50}) пригнічення амплітуди N-типу кальцієвого струму конотоксином становить 50 нмоль/л [214].

Аплікація конотоксину достовірно і незворотно зменшила амплітуду вГПСС (рис. 3.17, А, Б). Зменшення амплітуди вГПСС було характерне для всіх 6 досліджених нейронів.

В серії цих експериментів було визначено, що усереднена величина амплітуди після блокування N-типу кальцієвих каналів складала приблизно $75 \pm 3\%$ і $82 \pm 4\%$ відповідно для 1-го і 2-го вГПСС амплітуди у контролі.

Також аплікація 200 нмоль/л конотоксину збільшувала усередненні нормовані значення КПС на $11 \pm 2\%$ (Рис. 3.17, В).

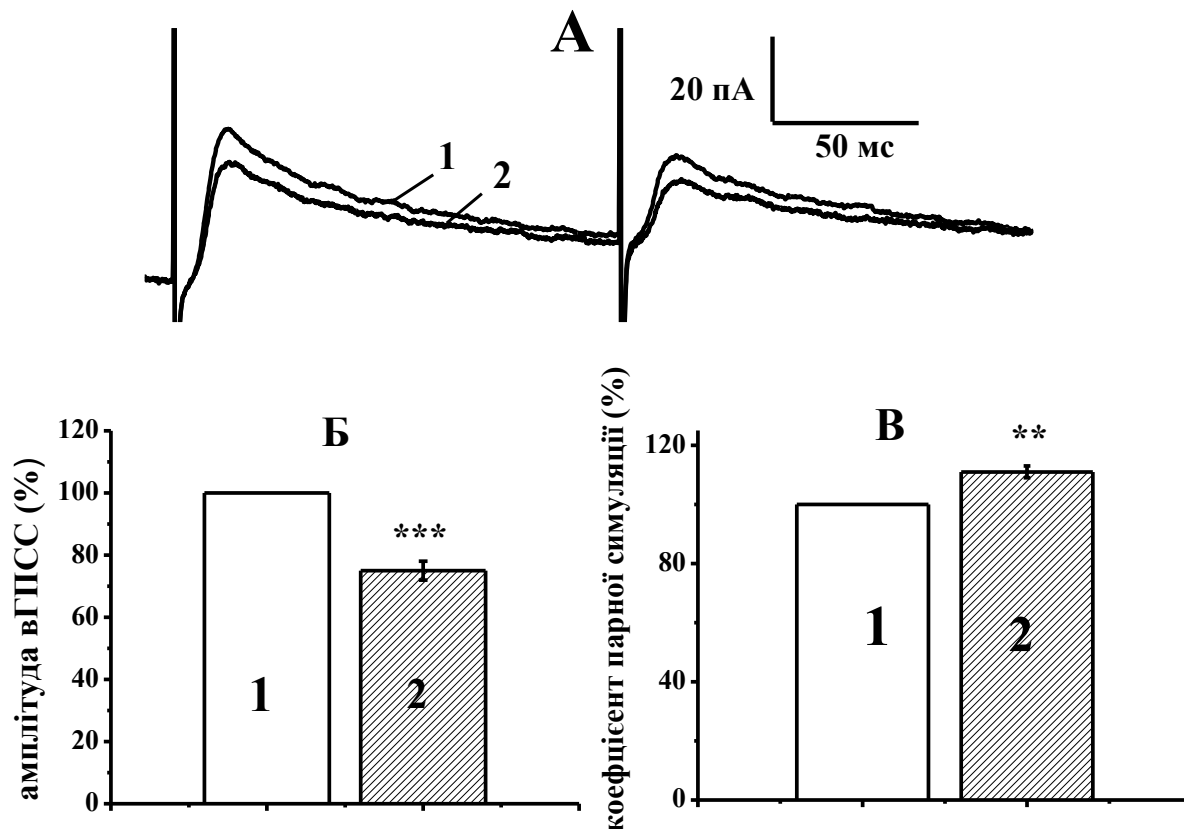


Рис. 3.17. Дія 200 нмоль/л ω -конотоксину на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС).

А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації ω -агатовоксину. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС.

Б – нормоване усереднене значення амплітуди 1-го вГПСС відносно контролю.

В – нормоване усереднене значення коефіцієнта парної стимуляції відносно контролю.

На А, Б: 1 - контроль, 2 - дія 200 нмоль/л ω -конотоксину. Усереднення проводили за 19 нейронами. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.5.2 Загальна участь високопорогових кальцієвих каналів у регуляції гальмівної синаптичної передачі

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 короткотривалу пластичність.

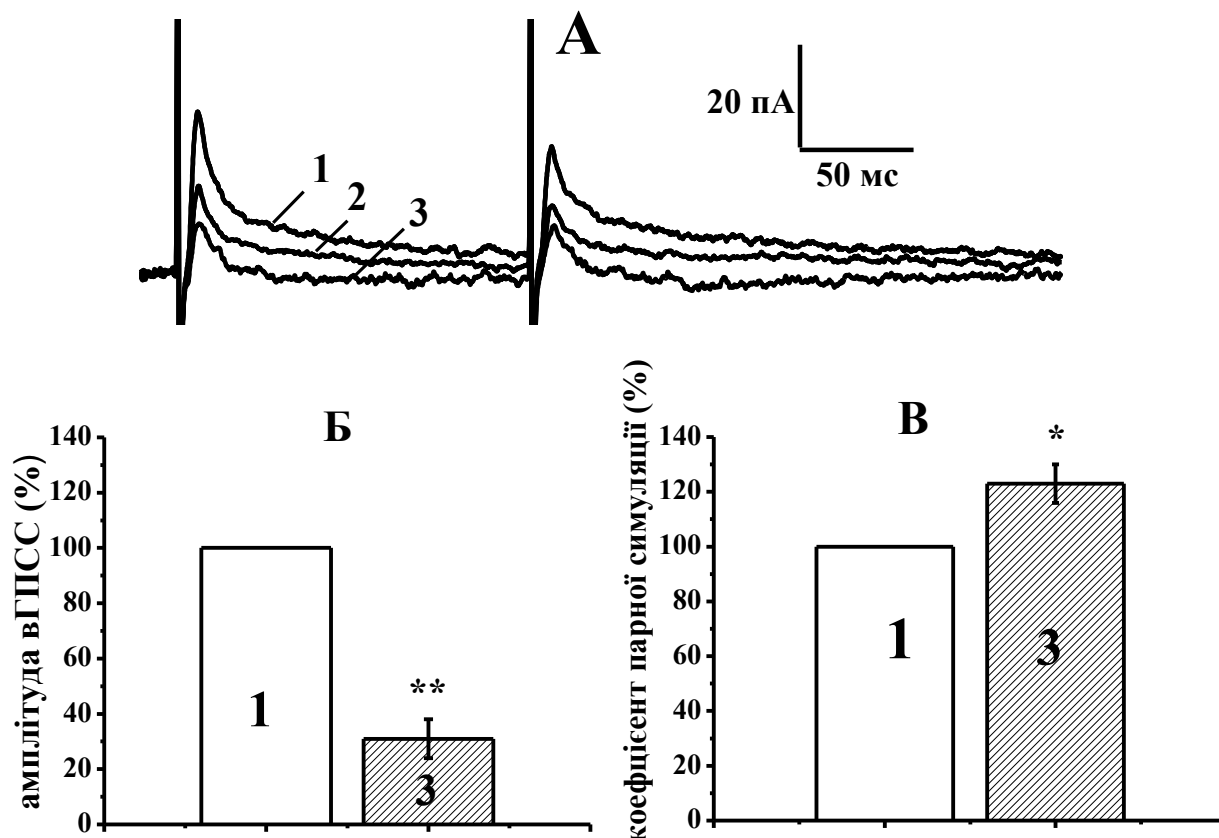


Рис. 3.18. Дія 200 нмоль/л ω -агатоксину та 200 нмоль/л ω -конотоксину на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС).

А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації блокаторів. Б – нормоване усереднене значення амплітуди 1-го вГПСС відносно контролю. В – нормоване усереднене значення коефіцієнта парної стимуляції відносно контролю.

На А, Б: 1 - контроль, 2 – дія 200 нмоль/л ω -агатоксину, 3 – дія 200 нмоль/л ω -агатоксину та 200 нмоль/л ω -конотоксину.

Зареєструвавши вГПСС у контролі, ми додавали послідовно у зовнішньоклітинний розчин спочатку блокатор P/Q-типу, а потім і блокатор N-типу кальцієвих каналів, реєструючи вГПСС на сомі одного й того ж нейрона.

Послідовна аплікація блокаторів достовірно зменшила амплітуду парних вГПСС (Рис. 3.18, А).

В серії цих експериментів було визначено, що усереднена величина амплітуди для 1-го і 2-го вГПСС після послідовного блокування N- та P/Q-типу кальцієвих каналів складала $30 \pm 7 \%$ та $36 \pm 8 \%$ амплітуди у контролі. Тобто, після почергової аплікації 200 нмоль/л ω -агатоксину та 200 нмоль/л ω -конотоксину амплітуда вГПСС достовірно зменшилась для кожного із 9 досліджених нейронів в середньому на 70 % та 64 % відповідно (Рис. 3.18, Б).

Після сумісного блокування P/Q- та N-типів кальцієвих каналів спостерігалось збільшення КПС порівняно із контролем на $23 \pm 7\%$ (Рис. 3.18, В).

Для того щоб дізнатися чи блокування N- та P/Q-типів кальцієвих каналів є блокуванням усіх високопорогових кальцієвих каналів на пресинаптичній мембрані, ми використали кадмій.

Відомо, що кадмій у досить великих концентраціях є неселективним блокатором усіх потенціалкерованих кальцієвих каналів, тоді як при концентраціях менших ніж 20 мкмоль/л його можна вважати блокатором лише високопорогових каналів. Прикладання малих концентрацій цього блокатора (2-10 мкмоль/л) викликало суттєве зменшення амплітуди високопорогових кальцієвих струмів і не мало істотного ефекту на амплітуду низькопорогового компоненту кальцієвого струму в культивованих нейронах гіпокампа [243].

В своїх експериментах ми використали кадмій у концентрації 5 мкмоль/л. Аплікація блокатора достовірно зменшила амплітуду вГПСС у всіх 7 досліджених нейронах (Рис. 3.19, А). В серії цих експериментів було визначено, що усереднена величина амплітуди для 1-го і 2-го вГПСС після блокуванням кадмієм складала $13 \pm 4 \%$ і $17 \pm 5 \%$ відповідно (Рис. 3.19, Б).

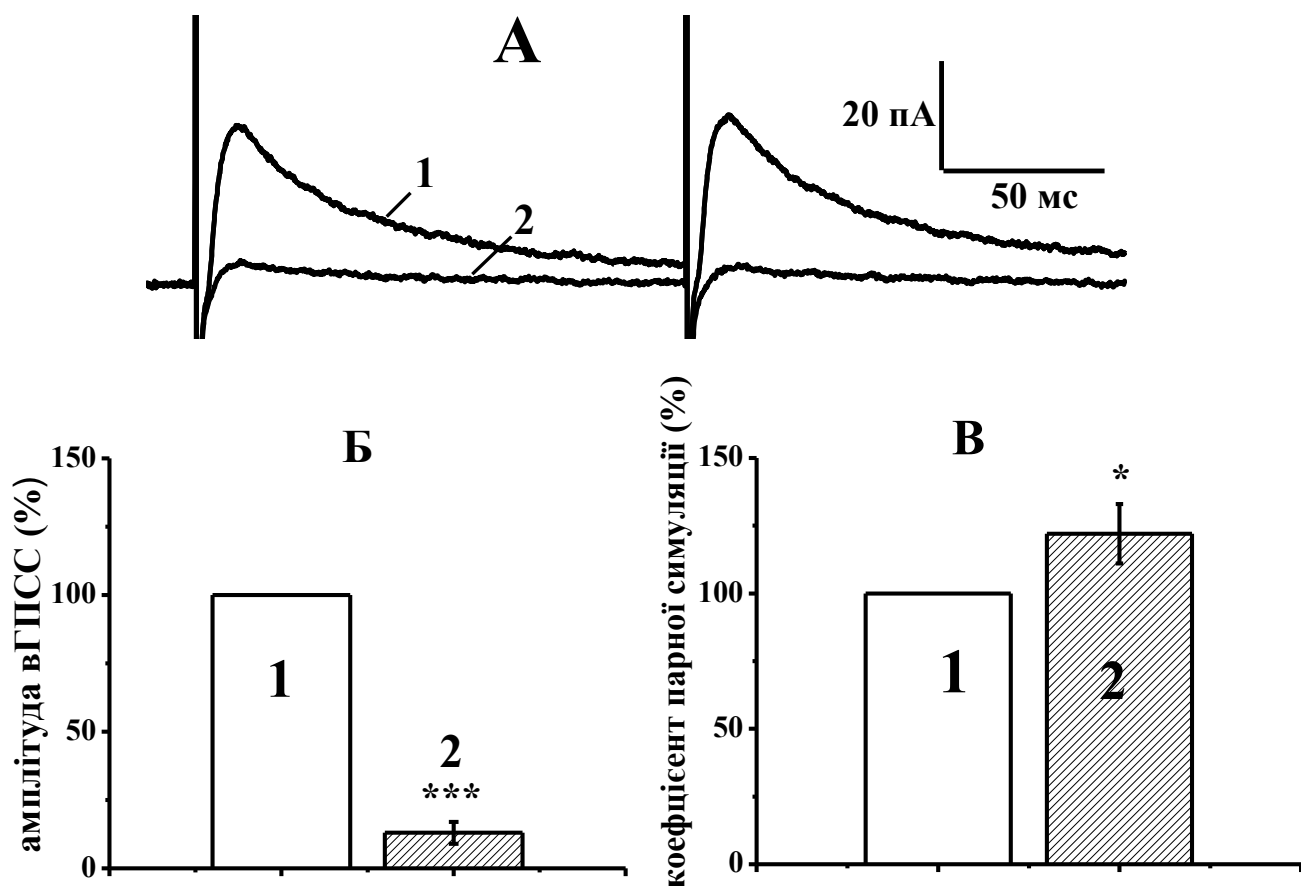


Рис. 3.19. Дія кадмію на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС).

А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації блокаторів. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС.

Б – нормоване усереднене значення амплітуди 1-го вГПСС відносно контролю.

В – нормоване усереднене значення коефіцієнта парної стимуляції відносно контролю. На А, Б: 1 - контроль, 2 – дія 5 мкмоль/л кадмію. Усереднення проводили за 7 нейронами. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Тобто, частка вкладу кадмійчутливих кальцієвих каналів у ГАМК-ергічну синаптичну передачу між культивованими нейронами гіпокампа становить приблизно 87 %.

На рисунку 3.20 представлена опосередкований внесок кожного окремого типу високопорогових кальцієвих каналів та сумісний у здійснення пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Було з'ясовано, що кальцій, який проходить через пресинаптичні P-,Q- та N-типи кальцієвих каналів у терміналь приймає безпосередню участь у процесі вивільнення ГАМК.

Усереднений опосередкований вклад P-типу каналів у ГАМК-ергічну синаптичну передачу між культивованими нейронами гіпокампа становить приблизно $31 \pm 4 \%$, P/Q-типу – $47 \pm 4 \%$, а N-типу – $25 \pm 3 \%$ відносно контролю. Сумісний внесок P/Q- та N-типів склав приблизно $70 \pm 7 \%$, а алгебраїчна сума вкладу P/Q- та N-типів дорівнює приблизно 72%. Отже, сумісне блокування цих каналів є тотожним почерговому їх блокуванню (Рис. 3.20, А). За допомогою аплікації кадмію, з'ясовано, що вклад усіх високопорогових кальцієвих каналів становить приблизно $87 \pm 4 \%$, що більше за сумісний вклад P/Q- та N-типів кальцієвих каналів.

При аплікації 30 нмоль/л агатоксину значення КПС збільшилась на $6 \pm 3\%$, при аплікації 200 нмоль/л агатоксину – на $9 \pm 4\%$, а при аплікації 200 нмоль/л конотоксину – на $11 \pm 2\%$. Отже опосередкований вклад P/Q- типу та N-типу кальцієвих каналів у пластичність гальмівної синаптичної передачі в межах похибки є однаковим.

Після сумісного блокування P/Q- та N-типів кальцієвих каналів спостерігалось збільшення КПС порівняно із контролем на $23 \pm 7\%$, а при аплікації кадмію – на $22 \pm 11 \%$ (Рис. 3.20, Б). Це збільшення є однаковим. Отже, блокування високопорогових кальцієвих каналів може змінювати ефективність синаптичної передачі, в даному випадку – полегшує її

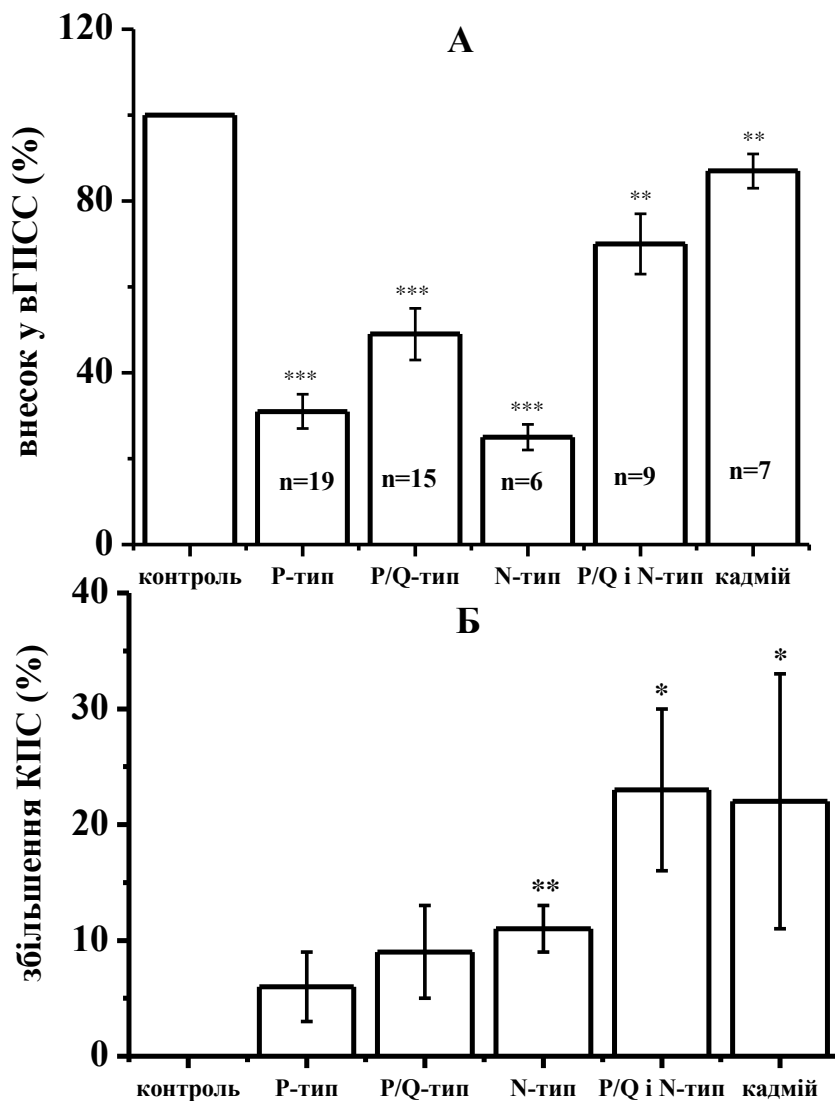


Рис. 3.20. Опосередкований внесок кожного типу високопорогових кальцієвих каналів у регуляцію ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

А – нормоване усереднене значення внеску кожного окремого типу високопорогових кальцієвих каналів у амплітуду 1-го вГПСС відносно контролю.

Б – збільшення нормованого усередненого значення коефіцієнта парної стимуляції (КПС) відносно контролю. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

проведення, зменшуючи депресію або збільшуючи полегшення. Єдиними високопороговими каналами, які здатні моделювати пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі є P-, Q- та N-типів кальцієвих каналів.

3.6 Гетерогенність популяції гальмівних нейронів в гіпокампі

В культурі нейронів гіпокампа показано, що розподіл потенціалкерованих пресинаптичних кальцієвих каналів є неоднорідним, особливою неоднорідністю розподілу відзначаються ГАМК-ергічні нейрони [135, 159, 161].

Оскільки розподіл різних типів кальцієвих каналів у пресинаптичному закінченню для кожного нейрона різний, тому внесок кальцію, що входить у пресинаптичне закінчення саме через певний тип кальцієвих каналів у вивільнення нейромедіатора теж буде різний. Надалі ми будемо називати такий внесок кальцію, що входить у терміналь через певний тип кальцієвих каналів як опосередкований внесок цього типу каналів у амплітуду вГПСС.

Спершу ми дослідили розподіл опосередкованого внеску Р-типу кальцієвих каналів в амплітуду вГПСС в усіх досліджених 19 нейронах. Аплікація 30 нмоль/л агатоксину достовірно пригнічувала амплітуду вГПСС на 31% (Рис. 3.21). Відповідно побудованій гістограмі опосередкований внеску Р-типу каналів у вивільнення ГАМК у культурі нейронів гіпокампа може становити від 5% до 65% відносно контролю. Така якісна різниця у характері синаптичної пластичності пов'язана з гетерогенністю популяції пресинаптичних нейронів.

Ми також дослідили розподіл опосередкованого внеску Р/Q-типу кальцієвих каналів в амплітуду вГПСС в усіх досліджених нами нейронах (Рис.3.22).

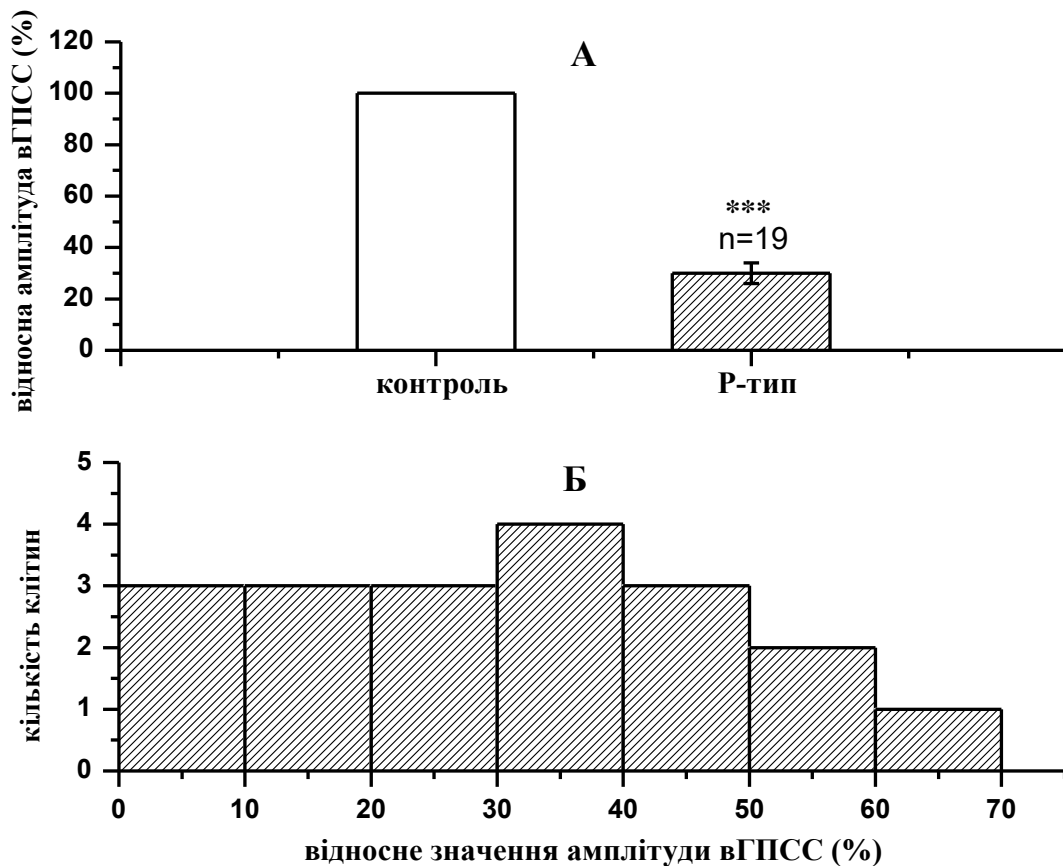


Рис. 3.21. Опосередкований внесок Р-типу кальцієвих каналів у амплітуду викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС).

А – нормоване усереднене значення внеску Р - типу кальцієвих каналів у амплітуду вГПСС відносно контролю.

Б – розподіл амплітуди вГПСС, що характеризує внесок Р-типу кальцієвих каналів у гальмівну синаптичну передачу досліджених нейронів. * $P < 0,001$.**

Аплікація 200 нмоль/л агатоксину достовірно пригнічувала амплітуду вГПСС на 47 %. Відповідно побудованій гістограмі опосередкований внесок Р/Q-типу каналів у вивільнення ГАМК у культурі нейронів гіпокампа може становити від 25% до 65% відносно контролю.

Був досліджений розподіл опосередкованого внеску N-типу кальцієвих каналів в амплітуду вГПСС в усіх досліджених нами нейронах (Рис.3.23).

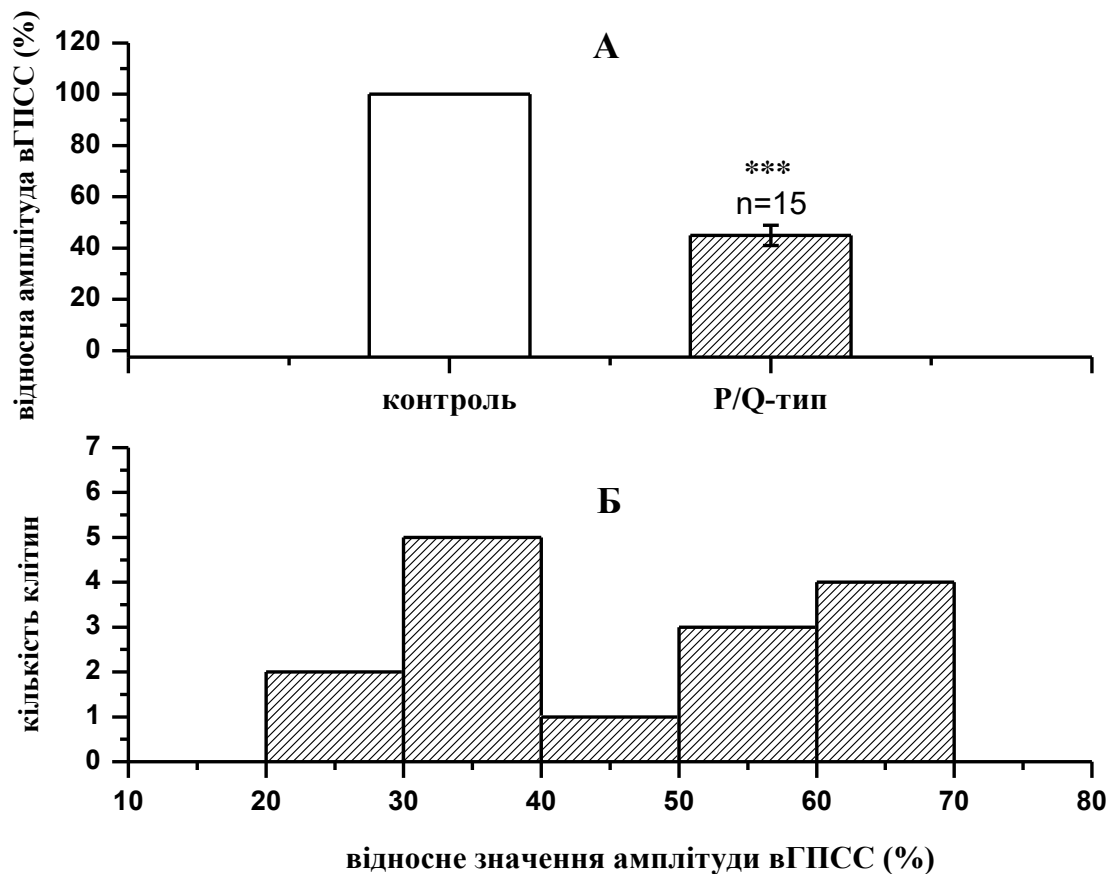


Рис. 3.22. Опосередкований внесок P/Q-типу кальцієвих каналів у амплітуду викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС).

А – нормоване усереднене значення вкладу P/Q - типу кальцієвих каналів у амплітуду вГПСС відносно контролю.

Б – розподіл амплітуди вГПСС, що характеризує внесок P/Q-типу кальцієвих каналів у гальмівну синаптичну передачу досліджених нейронів. ***P < 0,001.

Аплікація 200 нмоль/л конотоксину достовірно пригнічувала амплітуду вГПСС на 25 %.

Відповідно побудованій гістограмі опосередкований внесок N-типу каналів у вивільнення ГАМК у культурі нейронів гіпокампа може становити від 13% до 37% відносно контролю.

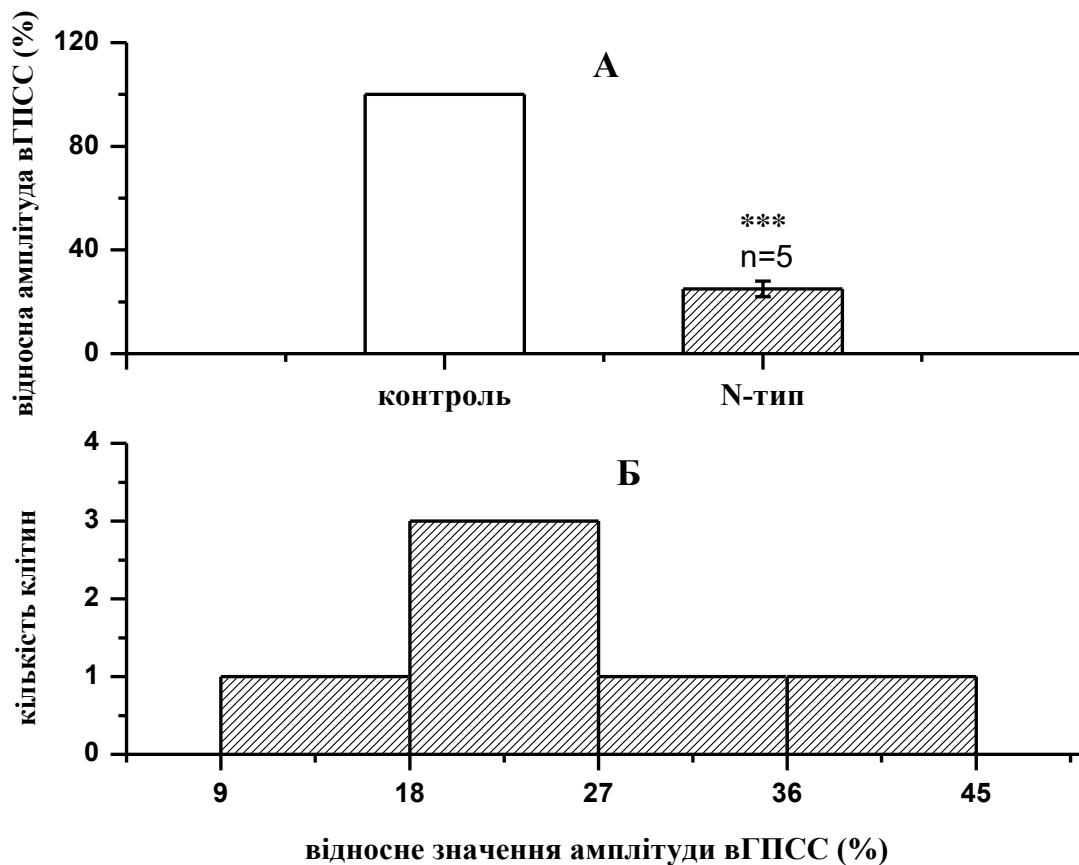


Рис. 3.23. Опосередкований вклад N-типу кальцієвих каналів у амплітуду викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС).

A – нормоване усереднене значення вкладу N - типу кальцієвих каналів у амплітуду вГПСС відносно контролю.

B – розподіл амплітуди вГПСС, що характеризує внесок N-типу кальцієвих каналів у гальмівну синаптичну передачу досліджених нейронів. *P < 0,001.**

Отже, відповідно побудованим діаграмам, опосередкований внесок P-типу каналів у вивільнення ГАМК у культурі нейронів гіпокампа може становити від 5% до 65%, P/Q-типу – від 25% до 65%, N-типу – від 13% до 37% відносно контролю. Сумісний опосередкований внесок P/Q- та N-типів може становити від 40% до 100%, а внесок усіх чуттєвих до кадмію високопорогових кальцієвих каналів становить приблизно від 77% до 96%.

За допомогою наших результатів було підтверджено, що ГАМК-ергічні синапси нейронів гіпокампа мають неоднорідний розподіл різних типів кальцієвих каналів, а отже спостерігається різний вклад кожного типу у процес вивільнення ГАМК.

3.7 *Аналіз квантових показників синаптичної передачі у контролі та при аплікації блокаторів P/Q- та N-типів 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. Імовірність вивільнення ГАМК в обох випадках є майже незмінною.

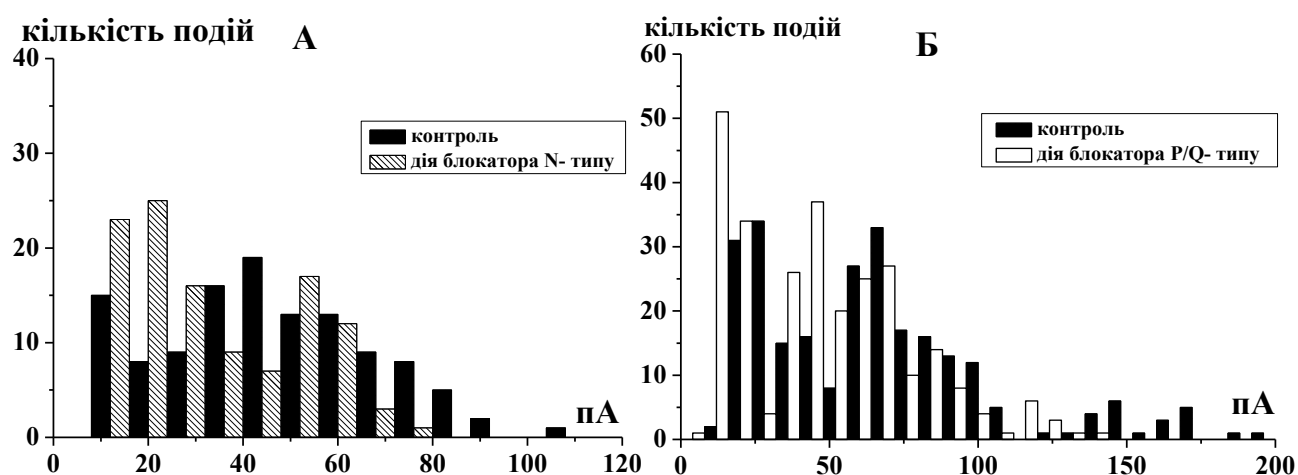


Рис. 3.24. Розподіли амплітуд 1-го викликаного гальмівного постсинаптичного струму у контролі та при дії блокатора N-типу (А) та P/Q-типу (Б) кальцієвих каналів.

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.3.24, А, Б). Використовуючи аналіз

квантових показників, з'ясували, що при аплікації 200 нмоль/л ω -конотоксину показники зменшуються порівняно з початковими значеннями відповідно на $26 \pm 11\%$ і $24 \pm 12\%$ ($n = 6$), а при аплікації 200 нмоль/л ω -агатоксину – на $32 \pm 5\%$ ($n = 15$) однаково обидва показники (рис.3.25). Для цих же нейронів був розрахований коефіцієнт варіації вГПСС. При аплікації блокаторів N- та P/Q-типів кальцієвих каналів значення CV збільшилось відповідно на $38 \pm 21\%$ та на $27 \pm 14\%$. Проте ці зміни не були достовірними.

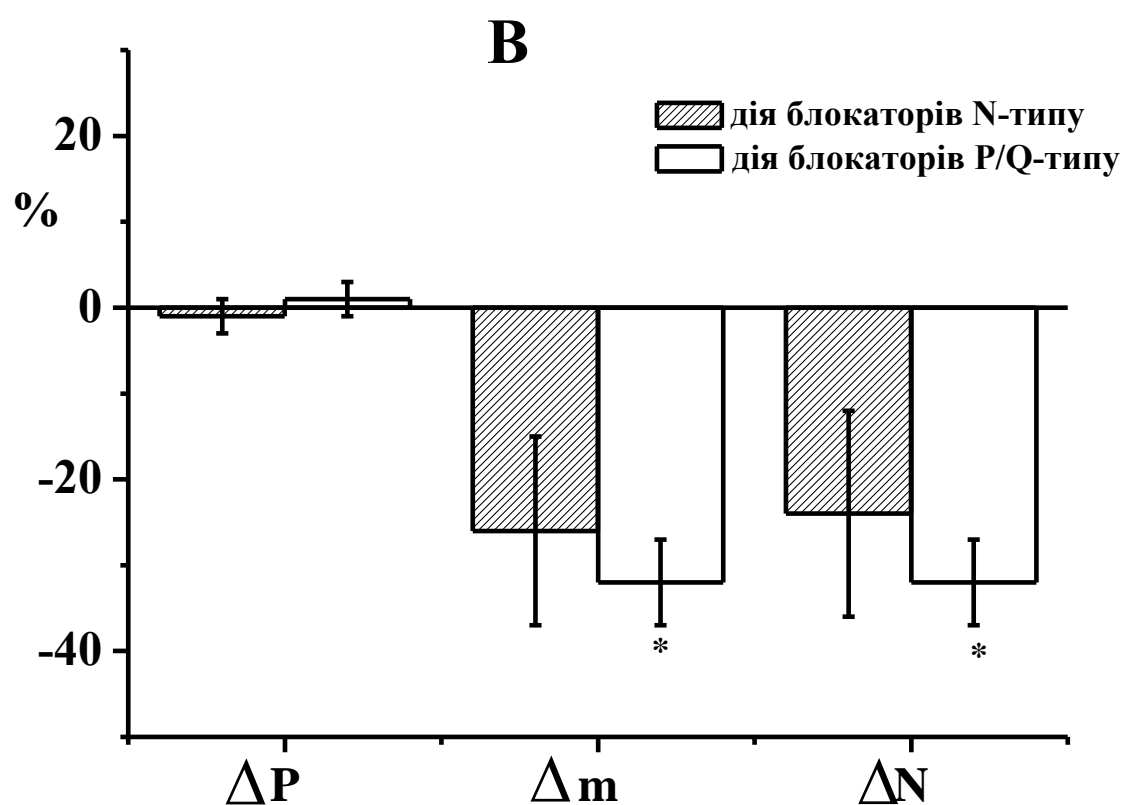


Рис. 3.25. Зміни нормованих квантових показників вивільнення ГАМК при дії блокаторів кальцієвих каналів. За 0 % прийнято нормовані значення квантових показників у контролі.

ΔP – зміна ймовірності вивільнення ГАМК,

Δm – зміна відносного квантового вмісту,

ΔN – зміна відносного біноміального показника.

3.8 Роль ендоплазматичного ретикулула у регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі

Крім трансмембранних механізмів входу іонів кальцію важливу роль в регуляції $[Ca^{2+}]_i$ відіграють внутрішньоклітинні Ca^{2+} -депо. Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) здатний накопичувати, зберігати та вивільняти іони кальцію в пресинаптичне закінчення під дією внутрішньоклітинних факторів. Оскільки ці іони відіграють особливу роль у регулюванні вивільнення нейромедіатора, для експериментальних досліджень таких механізмів використовують фармакологічні речовини, що спроможні змінювати або властивості каналів, через які вивільнюється кальцій, або здатність внутрішньоклітинних депо захоплювати ці іони. Останнє відбувається за допомогою сарко(ендо)плазматичної транспортної АТФази (SERCA). Специфічними блокаторами такого транспорту є тапсигаргін [113] та циклопіазонова кислота [187]. Одним з них є незворотній блокатор тапсигаргін ($K_d \sim 20$ нмоль/л) та зворотний блокатор циклопіазонова кислота ($\sim 10-50$ мкмоль/л). Проте тапсигаргін не ідеальний специфічний блокатор АТФаз, оскільки в концентраціях, які використовують для експериментів $0,2-2$ мкмоль/л, він також блокує L/N- та T-типи кальцієвих каналів на плазматичній мембрані [171, 188].

В серії цих експериментів ми намагалися визначити роль внутрішньоклітинного кальцієвого депо у регуляції короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі в культурі нейронів гіпокампа щура. Спустошення депо ендоплазматичного ретикулула і, як наслідок, виключення їх з участі у процесі генерації кальцієвого сигналу в пресинаптичних терміналях, 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 $21 \pm 3\%$ та $18 \pm 3\%$ і залишив

майже не змінним нормовані значення КПС порівняно з контрольними значеннями ($\Delta\text{КПС} = 4 \pm 2\%$) (Рис. 3.26). В цій серії експериментів було досліджено 8 клітин.

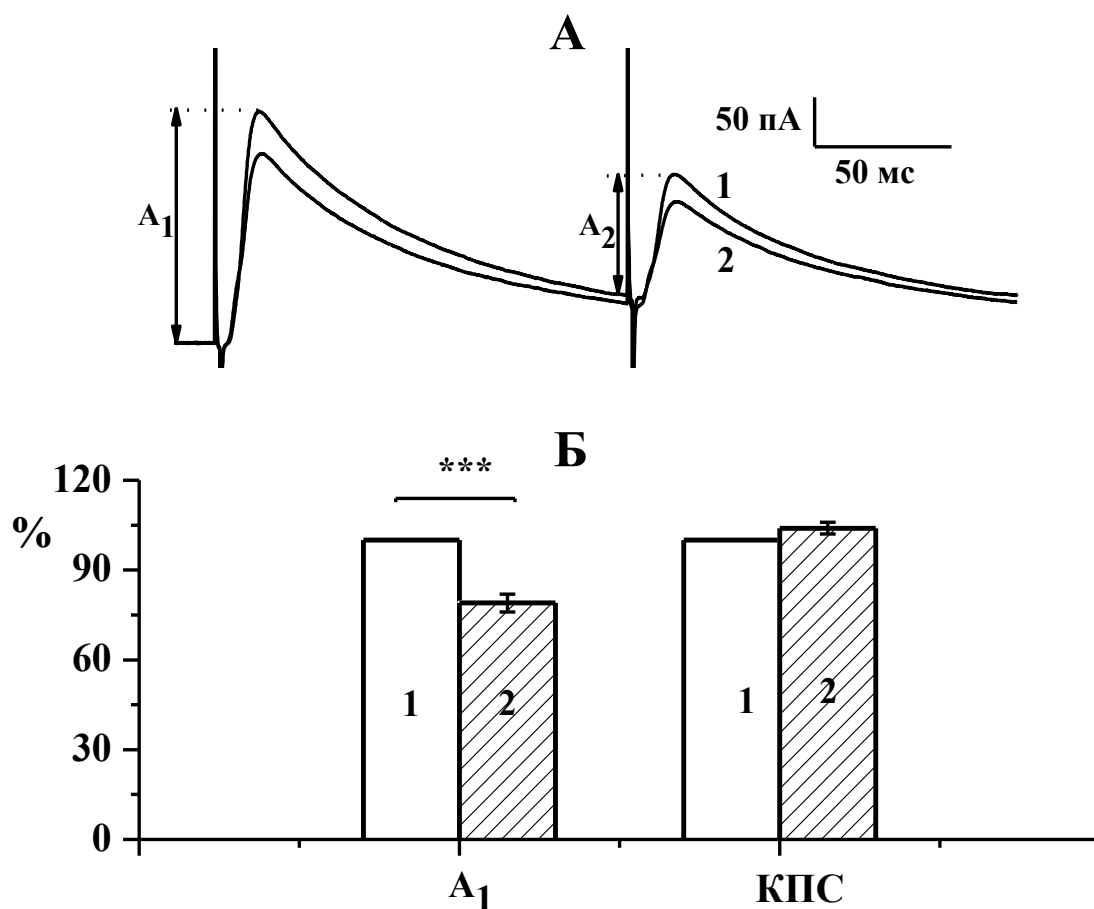


Рис. 3.26. Дія циклопіазонової к-ти на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС).

А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації блокаторів. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС.

Б – нормоване усереднене значення амплітуди 1-го вГПСС (A_1) та коефіцієнта парної стимуляції (КПС) відносно контролю.

1-контроль, 2- дія 20 мкмоль/л циклопіазонової к-ти.

Також було з'ясовано, що розрахований коефіцієнт варіації амплітуд цих струмів у контролі та при дії блокатора у межах похибки не змінювався ($0,13 \pm 0,02$ у контролі та $0,16 \pm 0,02$ при дії блокатора).

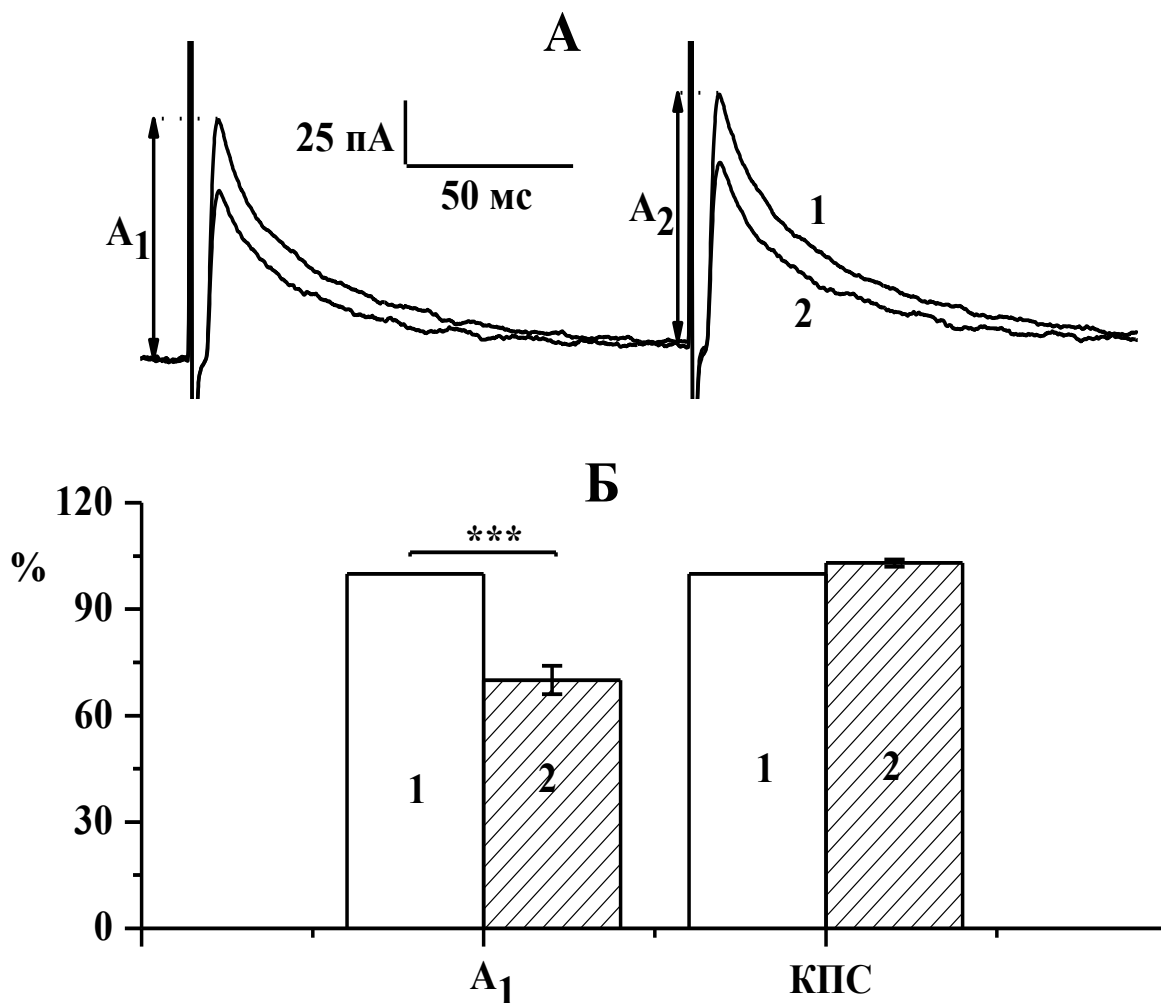


Рис. 3.27. Дія тапсигаргіну на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС).

А – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації блокаторів. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС.

Б – нормоване усереднене значення 1-го вГПСС (А₁) та коефіцієнта парної стимуляції (КПС) відносно контролю.

1- контроль, 2 - дія 1 мкмоль/л тапсигаргіну.

При аплікації тапсигаргіну в концентрації 1 мкмоль/л блокатор зменшував амплітуду 1-го і 2-го вГПСС порівняно з контрольними значеннями на $30 \pm 4\%$ і $28 \pm 4\%$ відповідно та залишив майже не змінним значення КПС ($\Delta\text{КПС} = 3$

± 1 %, $n=16$) та коефіцієнт варіації амплітуди вГПСС (Рис. 3.27). В цій серії експериментів було досліджено 16 клітин.

Отже, оскільки при аплікації блокаторів кальцієвої АТФази ендоплазматичного ретикулула 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.

3.9 Залежність пластичності синаптичної передачі від зовнішньоклітинної концентрації кальцію

Важливим фактором, який здатний впливати на кількість іонів кальцію всередині синаптичної терміналі, а отже і на ефективність проведення синаптичної передачі, є концентрація кальцію у позаклітинному середовищі.

Тому в наступній серії експериментів був досліджений взаємозв'язок між зовнішньоклітинною концентрацією кальцію і амплітудою вГПСС.

При почерговій аплікації зовнішньоклітинного розчину із різним вмістом кальцію (4 ммоль/л, 2 ммоль/л, 1 ммоль/л та 0,5 ммоль/л) за допомогою локальної перфузії, аксон пресинаптичної клітини електрично стимулювали і на постсинаптичній клітині реєстрували вГПСС.

При пониженні в зовнішньому розчині концентрації кальцію амплітуда вГПСС зменшувалась (Рис. 3.28).

Піки усереднених амплітуд для 1-го та 2-го вГПСС у парі, зареєстровані за різної зовнішньоклітинної концентрації кальцію, були нормовані до значень піків амплітуд вГПСС при $[Ca^{2+}]_0 = 4$ ммоль/л, усереднені і представлені як функція від зовнішньоклітинної концентрації кальцію.

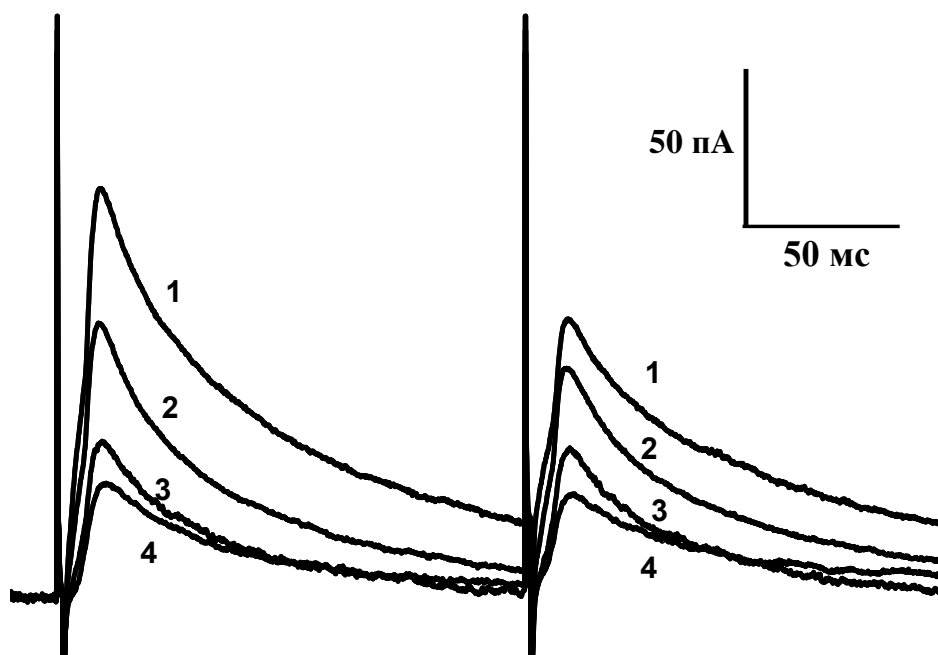


Рис. 3.28. Приклад реєстрації усереднених вГПСС при різній зовнішньоклітинній концентрації кальцію: 1 – 4 ммоль/л, 2 – 2 ммоль/л, 3 – 1 ммоль/л, 4 – 0,5 ммоль/л.

Результати, отримані після усереднення за 8 клітинами були зведені в таблицю (Таблиця 3.1). Статистичну достовірність відмінностей амплітуд розраховано по відношенню до величин при концентрації $[Ca^{2+}]_o = 4$ ммоль/л.

Таблиця 3.1

Усереднені амплітуди парних викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) при різній зовнішньоклітинній концентрації кальцію.

Схема досліду	Відносна амплітуда (%)	
	1-го вГПСС	2-го вГПСС
(n = 8)		
2 ммоль/л	$78 \pm 2^{***}$	$88 \pm 4^*$
1 ммоль/л	$50 \pm 2^{***}$	$64 \pm 5^{***}$
0,5 ммоль/л	$24 \pm 4^{***}$	$35 \pm 4^{***}$

Амплітуди струмів, зареєстрованих при $[Ca^{2+}]_0 = 4$ ммоль/л були визначені за 100 %. Наведено середні значення у дослідженні групі \pm середньоквадратична похибка середнього. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

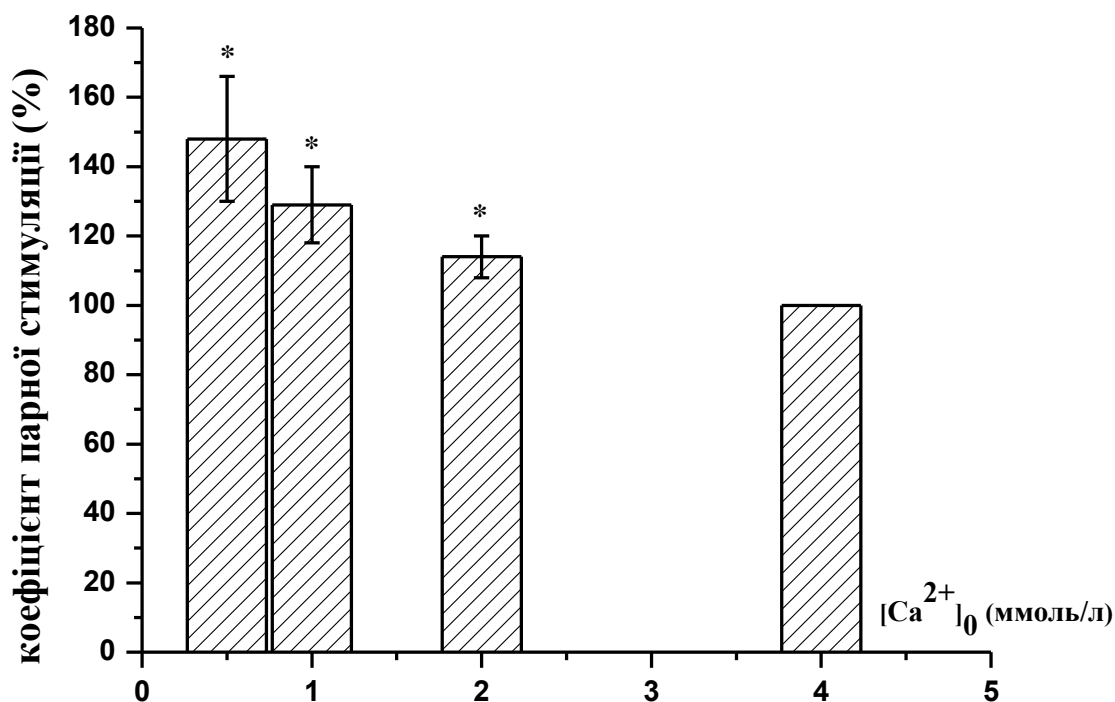


Рис. 3.29. Нормовані значення коефіцієнта парної стимуляції при різній зовнішньоклітинній концентрації кальцію. * $P < 0,05$.

При понижений концентрації кальцію (1 ммоль/л та 0,5 ммоль/л) значення КПС було більшим ніж при 2 ммоль/л, тобто депресія була понижена, а полегшення було підсилено. Отримані результати наведено в таблиці (Таблиця 3.2).

Отже, концентрація кальцію, що знаходиться у зовнішньоклітинному просторі відіграє значну роль у регуляції кальційзалежної пластичності гальмівної синаптичної передачі.

Таблиця 3.2

Порівняння усереднених відносних коефіцієнтів парної стимуляції при різній зовнішньоклітинній концентрації кальцію.

$[Ca^{2+}]_0$	Відносний коефіцієнт парної стимуляції (%), n=8
(n = 8)	
2 ммоль/л	114 ± 6*
1 ммоль/л	129 ± 11*
0,5 ммоль/л	148 ± 18*

П р и м і т к а. Значення коефіцієнта парної стимуляції при $[Ca^{2+}]_0 = 4$ ммоль/л прийнято за 100 %. Наведено середні значення у дослідженні групі ± середньоквадратична похибка середнього. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Представлена робота присвячена вивченню механізмів регуляції короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа. Низка сучасних досліджень присвячена вивченню властивостей пластичності ГАМК-ергічної нейропередачі в гіпокампі. В основному дослідження проводяться в експериментах *in vivo* або *in vitro* на зрізах [83, 84, 135]. Здатність нейронів у культурах відтворювати функціональні синаптичні зв'язки, які характерні для них *in vivo*, дозволяє використовувати культури нейронів в якості адекватних об'єктів дослідження. Для детального вивчення властивостей ГАМК-ергічних синапсів та ефектів різних фармакологічних агентів на нейропередачу зручно використовувати локальну зовнішньоклітинну стимуляцію пресинаптичного аксона та реєстрацію парних викликаних ГАМК-ергічних постсинаптичних відповідей на сомі .

4.1 Пресинаптичні механізми регулюють вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні синаптичної передачі

Вважають, що короткочасна синаптична пластичність є результатом численних клітинних механізмів, що можуть включати як і пресинаптичні так і постсинаптичні події. Найбільш поширеним пресинаптичним механізмом вважають зменшення кількості вивільненого нейромедіатора, що може відображати спустошення пулу готових до вивільнення везикул [230, 237]. Крім того, зміна ефективності синаптичної передачі може бути наслідком зміни кількості іонів кальцію, що надходять у пресинаптичну терміналь, інактивації кальцієвих каналів [57] і активації метаботропних ауторецепторів в пресинаптичній терміналі [202]. Постсинаптичний механізм, який може

впливати на ефективність синаптичної передачі – це десенситизація лігандкерованих рецепторів постсинаптичного нейрона [137, 237]. Проте дослідження, що були проведені на культивованих нейронах гіпокампа показали, що при короткотривалій парній аплікації екзогенного ГАМК роль постсинаптичного механізму в явищі депресії є мінімальною і що депресія переважно не залежить від пресинаптичних метаботропних рецепторів [87, 223].

В нашій роботі на культивованих нейронах гіпокампа щурів ми вимірювали зміни амплітуди парних вГПСС за допомогою методики фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та позаклітинної локальної електричної стимуляції аксона пресинаптичного нейрона щоб з'ясувати локалізацію механізмів які призводять до короткотривалої пластичності синаптичної передачі. Згідно з аналізом коефіцієнта варіації (CV) вГПСС та коефіцієнта парної стимуляції було показано, що короткотривала депресія та полегшення, що ми спостерігали, зумовлені тільки пресинаптичними механізмами. Це також було підтверджено розрахунками CV: при депресії синаптичної передачі CV другої відповіді у парі більше за CV першої на 57 %, а при полегшенні - менше на 27 %.

Використовуючи біноміальний розподіл з'ясували, що в умовах нашого експерименту ймовірність вивільнення ГАМК при першому і другому стимулах є 100% і незмінною як при депресії, так і при полегшенні. Для першої відповіді у парі середнє значення квантового вмісту та число місць вивільнення везикул збігалися і, відповідно, дорівнювали 9,7 при депресії та 5 при полегшенні синаптичної передачі. Тобто, якщо початковий квантовий вміст та число місць вивільнення везикул з ГАМК маленькі, то буде спостерігатися полегшення синаптичної передачі, якщо навпаки – то депресія. 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, а полегшення – коли маленька [33]. Ймовірність вивільнення медіатора була однаковою для двох цих явищ (приблизно 100%) і значення m і N збігаються, 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. Наші результати це підтверджують: у зареєстрованих струмах коефіцієнт варіації був у межах від 0,02 до 0,20.

Для другого стимулу середнє значення квантового вмісту та число місць вивільнення везикул зменшилися на 28 і 26% порівняно з початковими значеннями при депресії та збільшилися на 14 і 11% при полегшенні відповідно. 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.

Відомості про динаміку короткотривалої синаптичної пластичності і час відновлення є ключовими в регуляції синаптичної передачі між нейронами гіпокампа. Тому 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. Максимальна депресія спостерігалась при найкоротшому міжстимульному інтервалі 20 мс. Майже повне відновлення після депресії спостерігалось при найдовшому інтервалі між стимулами 1200 мс. 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 [36, 87, 131, 234]. Динаміку відновлення після депресії описувалась експоненційною функцією з $\tau = 83,5$ мс,

що узгоджується із даними отриманими на збудливих [174] та гальмівних [101] синапсах гіпокампа. Максимальне полегшення спостерігалось при інтервалі 150 мс.

Майже повне відновлення після полегшення спостерігалось при найдовшому інтервалі між стимулами 500 мс. Динаміка відновлення після полегшення має дзвіноподібну форму. Такого ж висновку прийшли науковці, досліджуючи збудливу синаптичну передачу між нейронами гіпокампа [33, 34, 35].

Для дослідження динаміки зміни амплітуди вГПСС після попередньої активації ми стимулювали аксон пресинаптичного нейрона вже чотирма послідовними поштовхами струму, змінюючи міжстимульний інтервал. При найкоротшому інтервалі (50 мс) амплітуда струму після попереднього стимулювання знижувалась найшвидше, а при найдовшому інтервалі (200 мс) – найбільш повільно. Це можна пояснити тим, що при міжстимульних інтервалах, менших за декілька секунд, після попереднього стимулювання спустошена активна зона пресинаптичної терміналі не встигає заповнитися достатньою кількістю готовими до вивільнення везикулами, отже, амплітуда наступних вГПСС стає меншою ніж попередніх [15, 105].

З наших результатів можна зробити висновок, що короткотривала пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі, зумовлені 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.

4.2 Роль кальцієвих каналів в регуляції пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі

В роботі на гігантському синапсі calyx of Held [184] було визначено, що одна активна зона містить в середньому 42 кальцієві канали (5-218) і 5 готових до вивільнення везикул (1-10), а вивільнюється 0-5 везикул протягом 2 мс деполяризації. Велика варіація в кількості кальцієвих каналів спричиняє велику різницю в ймовірності вивільнення і кількості готових до вивільнення везикул. Підраховано, що під час одного потенціалу дії відкривається в середньому 7 каналів (1-35), що призводить до різної ймовірності вивільнення в різних активних зонах. Оскільки кількість кальцієвих каналів визначає ймовірність вивільнення готових до вивільнення везикул, саме їх кількість буде вирішальною при наступному вивільненні появи полегшення чи депресії синаптичної передачі. Регулювання щільності кальцієвих каналів в активній зоні може бути тим механізмом який регулює короткотривалу синаптичну пластичність.

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 [82]. Проте інші дослідження, проведені на цьому ж об'єкті виявили, що є інші важливіші фактори ніж абсолютні розміри синапса, які визначають ефективність синапса [19]. Ймовірність вивільнення однієї синаптичної везикули збільшується з кількістю кальцієвих каналів в активній зоні [28].

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. Було виявлено, що кальцієві канали N- , P- та Q-типу відіграють

ключову роль у керуванні процесу вивільнення ГАМК між нейронами культури гіпокампа. Наші результати узгоджуються з даними отриманими на інших об'єктах також [110, 128, 159, 201, 221, 226]. Порівнюючи усереднені вклади кожного з цих типів кальцієвих каналів, ми прийшли до висновку, що 25% кальцію, який задіяний у вивільненні ГАМК проходить саме через N-тип кальцієвих каналів. Із досліджень проведених на поодиноких ГАМК-ергічних терміналях механічно дисоційованих нейронів, відомо, що аплікація 3 мкмоль/л конотоксину зменшувала амплітуду фокально викликаного ГПСС на 33,3 % [135]. 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 [140]. Результати наших досліджень узгоджуються з даними отриманими раніше на нейронах гіпокампа, де конотоксин пригнічував синаптичну передачу в CA1 і CA2 зонах гіпокампа на 70% [83, 92].

Раніше була показана присутність ω -Aga-IVA чутливого компоненту кальцієвого струму в нейронах зрізів гіпокампа щурів [210]. 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 вклад P та Q-типу кальцієвих каналів в ГАМК-ергічну синаптичну передачу був визначений як 21% та 36% [140]. Із досліджень проведених на поодиноких ГАМК-ергічних терміналях, відомо, що аплікація 300 нмоль/л агатоксину зменшувала амплітуду фокально викликаного ГПСС на 83% [135].

Цікавим є те, що сумісне блокування цих каналів токсинами ω -Aga-IVA і ω -STx-GVIA є рівним алгебраїчній сумі усередненої дії цих двох блокаторів при їх окремому прикладанні. Таким чином, можна зробити висновок, що ці блокатори у даній концентрації селективно пригнічували чутливі до них

компоненти кальцієвого струму. Проте дуже рідко сумісне блокування N- та P/Q-типу призводило до повного пригнічення амплітуди вГПСС, що могло бути результатом того, що в тих випадках, кальцій у пресинаптичне закінчення потрапляв через інші канали, наприклад R-тип кальцієвих каналів. Кальцієвий струм через цей канал резистивний до високих концентрацій ω -конотоксину-GVIA, ω -агатоксину-IVA, тому і не міг бути заблокованим. Хоча експерименти з використанням селективного блокатора цього типу кальцієвих каналів не було зроблено, ми можемо непрямо підтвердити цю гіпотезу, 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. 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 кадмієм [135].

В даній роботі було досліджено, що високопорогові кальцієві канали здатні змінювати ефективність синаптичної передачі. В даному випадку, при аплікації селективних блокаторів, спостерігалось полегшення проведення синаптичної передачі, що було зумовлено зменшенням депресії або збільшенням полегшення при парній стимуляції. Тобто наші результати узгоджуються із даними, які свідчать, що зменшення потоку Ca^{2+} в пресинаптичну терміналь знижує депресію, зменшуючи початкове вивільнення нейромедіатора [237].

Було досліджено, що при блокуванні P/Q-типу та N-типу кальцієвих каналів коефіцієнт парної стимуляції збільшився майже однаково (на 9 ± 4 % і 11 ± 2 % відповідно). При почерговому блокуванні P/Q- та N-типів кальцієвих каналів коефіцієнт парної стимуляції збільшується на 23 ± 7 % порівняно із

контролем, що в межах похибки і є алгебраїчною сумою при окремому блокуванні цих каналів. При аплікації 5 мкмоль/л кадмію коефіцієнт парної стимуляції збільшився на $22 \pm 11\%$. 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.

За допомогою наших результатів було підтверджено, що ГАМК-ергічні синапси нейронів гіпокампа мають неоднорідний розподіл різних типів кальцієвих каналів. Відповідно, внесок кожного типу кальцієвих каналів у синаптичну передачу на різних синапсах є різним. Досліджено, що сумісний опосередкований внесок P/Q- та N-типів кальцієвих каналів у ГАМК-ергічних синапсах гіпокампа становить приблизно від 50% до 96% відносно загального. На фоні такого різноманітності розподілу саме цих каналів їх, відмінна модуляція може бути шляхом для тонкої регуляції синаптичної передачі у відповідності до потреб просторово рознесених синапсів.

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.

4.3 Роль ендоплазматичного ретикулула в регуляції короткотривалої ГАМК-ергічної пластичності синаптичної передачі

Загальновідомо, що ендоплазматичний ретикулум присутній в пресинаптичній терміналі нейронів гіпокампа [49, 182].

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 [68, 71, 116, 163, 217]. Також може змінювати частоту мініатюрних гальмівних та збудливих струмів та частоту спонтанної активності синапсів гіпокампа [48, 175, 185]. Проте роль кальцієвого депо, а саме ендоплазматичного ретикулума, в регуляції короткотривалої пластичності досі є суперечною.

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 синаптичного струму, отже і значення коефіцієнта парної стимуляції в межах похибки не змінювалось порівняно з контрольним. Це ставить під сумнів можливість «затриманого підсилення» кальцієвого сигналу ендоплазматичним ретикуломом в досліджуваних ГАМК-ергічних синаптичних з'єднаннях. Хоча в роботі, проведеній на пірамідальних нейронах гіпокампа у зрізі, досліджуючи кальцієвий транз'єнт на аксонах та пресинаптичних терміналях, автори дійшли висновку, що кальцій, що вивільнюється з внутрішньоклітинного депо задіяний у процесі формування полегшення при парній стимуляції [48]. Напротивагу, детальне дослідження полегшення при парній стимуляції на збудливих синапсах гіпокампа і мозочка, не знайшло підтвердження, що ендоплазматичний ретикулум бере участь у цьому феномені [27].

Проте наші результати доводять, що 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 [63]. 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 транз'єнт. Такий же результат був отриманий на дендритних шипиках нейронів гіпокампа [49].

4.4 Роль зовнішньоклітинного кальцію в регуляції короткочасної ГАМК-ергічної пластичності синаптичної передачі

Результати, отримані в цій роботі, підтверджують те, що існує нелінійна залежність між амплітудою ВГПСС і зовнішньоклітинною концентрацією кальцію, що обумовлена залученням декількох іонів Ca^{2+} у вивільнення нейромедіатора (кооперативність іонів Ca^{2+}). Вперше така нелінійна залежність була описана Доджем и Рахамімовим на нервово-м'язовому з'єднанні жаби. За результатами цих експериментів зробили припущення про особливий кількісний зв'язок між кальцієм та вивільненням медіатора, що для вивільнення одного кванту медіатора необхідна кооперативна дія чотирьох іонів кальцію. Відповідно до моделі, що описує роль іонів кальцію в синаптичній передачі, показникове співвідношення між зовнішньоклітинною концентрацією кальцію і амплітудою постсинаптичного струму є оцінкою кількості “закритих” місць злиття та екзоцитозу синаптичних везикул в активних зонах пресинаптичної плазматичної мембрани. Таким чином, дотримуючись цієї моделі, в сумі кількість “закритих” місць злиття і “відкритих” має дорівнювати чотирьом. Тобто, іони кальцію можуть зв'язуватися аж із чотирма рецепторами в активній

зоні, що в подальшому призведе до “відкриття” місць злиття синаптичних везикул [193].

Було показано, що сила пластичності регулюється зовнішньоклітинною концентрацією кальцію. При підвищеній концентрації кальцію (4 ммоль/л) значення КПС було меншим ніж у контролі (2 ммоль/л), тобто депресія була посилена, а полегшення було зменшено. При пониженій концентрації кальцію (1 і 0,5 ммоль/л) значення КПС було більшим ніж у контролі, тобто депресія була понижена, а полегшення було підсилено. Такі результати узгоджуються із даними, отриманими з досліджень, проведених на культивованих нейронах гіпокампа, використовуючи метод парної реєстрації в конфігурації «ціла клітина» [87].

РОЗДІЛ 5

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 депресія та полегшення, що ми спостерігали, обумовлені тільки 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 ретикулула не задіяна в регуляції короткотривалої пластичності швидкої синаптичної передачі.

РОЗДІЛ 6

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abbott LF, Varela JA, Sen K, Nelson SB. Synaptic depression and cortical gain control. *Science*. 1997;275:220–4.
2. Adams ME, Myers RA, Imperial JS, Olivera BM. Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry*. 1993;32:12566–70.
3. Alger BE, Teyler TJ. Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Res*. 1976;110:463–80.
4. Alger BE. Gating of GABAergic inhibition in hippocampal pyramidal cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;627:249–63.
5. Auger C, Marty A. Quantal currents at single-site central synapses. *J. Physiol*. 2000;526(1):3–11.
6. Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ. Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. *J Physiol*. 1985;367:163–81.
7. Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ. Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu Rev Neurosci*. 1987;10:633–93.
8. Baker KD, Edwards TM, Rickard NS. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2013; 37:1211–39.
9. Bardo S, Cavazzini MG, Emptage N. The role of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} store in the plasticity of central neurons. *Trends Pharmacol. Sci*. 2006;2: 78–84.
10. Bean BP. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:6388–92.
11. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol*. 1985;86:1–30.
12. Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:367–384.

13. Bechem M, Hoffmann H. The molecular mode of action of the Ca agonist (-) BAY K 8644 on the cardiac Ca channel. *Pflügers Arch.* 1993;424:343–53.
14. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7: 419–29.
15. Biro A, Holderith N, Nusser Z. Release probability dependent scaling of the postsynaptic responses at single hippocampal GABAergic synapses. *J Neurosci.* 2006; 26:12487–96.
16. Boland LM, Morrill JA, Bean BP. omega-Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J Neurosci.* 1994;14:5011–27.
17. Bormann J. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* 1988; 11: 112–116.
18. Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:16–19.
19. Branco T, Marra V, Staras K. Examining size-strength relationships at hippocampal synapses using an ultrastructural measurement of synaptic release probability. *J Struct Biol.* 2010;172(2):203–10.
20. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron.* 2002;35:625–41.
21. Burke SP, Adams ME, Taylor CP. Inhibition of endogenous glutamate release from hippocampal tissue by Ca²⁺ channel toxins. *Eur J Pharmacol.* 1993;238:383–6.
22. Burrell BD, Sahley CL. Multiple forms of long-term potentiation and long-term depression converge on a single interneuron in the leech CNS. *J Neurosci.* 2004; 24:4011–19.
23. Cammack JN, Rakhilin SV, Schwartz EA. A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry. *Neuron.* 1994;13:949–60.
24. Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J.* 1984;46:413–18.

25. Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*. 1984;310:501–2.
26. Carbone E, Lux HD. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol*. 1987;386:547–70.
27. Carter AG, Vogt KE, Foster KA, Regehr WG. Assessing the role of calcium-induced calcium release in short-term presynaptic plasticity at excitatory central synapses. *J. Neurosci*. 2002;22:21–8
28. Catterall WA, Leal K, Nanou E. Calcium channels and short-term synaptic plasticity. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10742–9.
29. Choi SY, Morales B, Lee HK, Kirkwood A. Absence of long-term depression in the visual cortex of glutamic Acid decarboxylase-65 knock-out mice. *J Neurosci*. 2002; 22: 5271–6.
30. Curtis DR, Felix D, McLellan H. GABA and hippocampal inhibition. *Br J Pharmacol*. 1970;40:881–3.
31. Davies CH, Davies SN, Collingridge GL. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J Physiol*. 1990;424:513–31.
32. Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL. GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature*. 1991;349:609–11.
33. Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol*. 1996; 491(1):163–76.
34. Debanne D, Gahwiler BH, Thompson SM. Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol*. 1998;507(1):237–47.
35. Debanne D, Gahwiler BH, Thompson SM. Heterogeneity of synaptic plasticity at unitary CA3-CA1 and CA3-CA3 connections in rat hippocampal slice cultures. *J Neurosci*. 1999;19:10664–71.

36. Deisz RA, Prince DA. Frequency-dependent depression of inhibition in guinea-pig neocortex in vitro by GABAB receptor feed-back on GABA release. *J Physiol.* 1989;412:513–41.
37. Del CJ, Katz B. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J Physiol.* 1954;124:574–85.
38. Delfs JR, Dichter MA. Effects of somatostatin on mammalian cortical neurons in culture: physiological actions and unusual dose response characteristics. *J Neurosci.* 1983;3:1176–88.
39. Dietrich D, Kirschstein T, Kukley M et al. Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels. *Neuron.* 2003;39:483–96.
40. Dobrunz LE, Stevens CF. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron.* 1997;18:995–1008.
41. Dolphin AC, Scott RH. Calcium channel currents and their inhibition by (-)-baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides. *J Physiol.* 1987;386:1–17.
42. Dolphin AC. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G-proteins. *Exp Physiol.* 1995;80:1–36.
43. Dooley DJ, Lupp A, Hertting G. Inhibition of central neurotransmitter release by omega-conotoxin GVIA, a peptide modulator of the N-type voltage-sensitive calcium channel. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987;336:467–70.
44. Doze VA, Cohen GA, Madison DV. Calcium channel involvement in GABAB receptor-mediated inhibition of GABA release in area CA1 of the rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 1995;74:43–53.
45. Droogmans G, Callewaert G. Ca²⁺-channel current and its modification by the dihydropyridine agonist BAY k 8644 in isolated smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 1986;406:259–65.
46. Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Identification of calcium channels that control neurosecretion. *Science.* 1994;266:828–31.

47. Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 1995;18:89–98.
48. Empage NJ, Reid CA, Fine A. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron.* 2001;29:197–208.
49. Emptage, N. et al. Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron.* 1999; 22:115–24.
50. Engel D, Schmitz D, Gloveli T, Frahm C, Heinemann U, Draguhn A. Laminar difference in GABA uptake and GAT-1 expression in rat CA1. *J Physiol.* 1998; 512(3):643–9.
51. Fagg GE, Foster AC. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience.* 1983;9:701–19.
52. Fatt P, Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.* 1952;117:109–128.
53. Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 1985;359:431–46.
54. Fedulova SA, Vasilyev DV, Veselovsky NS. Voltage-operated potassium currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons: ontogenetic aspects. *Neuroscience.* 1998;85:497–508.
55. Fedulova SA, Vasilyev DV, Veselovsky NS. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience.* 1999;92:1217–30.
56. Fisher SA, Fischer TM, Carew TJ. Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement. *Trends Neurosci.* 1997;20:170–7.
57. Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Cuttle MF, Takahashi T. Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron.* 1998;20:797–807.

58. Foster AC, Fagg GE. Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res.* 1984;319:103–164.
59. Foster AC, Fagg GE. Acidic amino acid receptor nomenclature: time for change. *Trends Neurosci* 1988;11:17–8.
60. Freund TF, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 1996; 6:347–470.
61. Fykse EM, Fonnum F. Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem Res.* 1996;21:1053–60.
62. Gahwiler BH, Brown DA. GABAB-receptor-activated K⁺ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:1558–62.
63. Galante M., Marty A. Presynaptic ryanodine-sensitive calcium stores contribute to evoked neurotransmitter release at the basket cell-Purkinje cell synapse. *J. Neurosci.* 2003;23(35):11229–34.
64. Gasparini S, Kasyanov AM, Pietrobon D, Voronin LL, Cherubini E. Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 2001;21:8715–21.
65. Geer JJ, Dooley DJ, Adams ME. K(+)-stimulated ⁴⁵Ca²⁺ flux into rat neocortical mini-slices is blocked by omega-Aga-IVA and the dual Na⁺/Ca²⁺ channel blockers lidoflazine and flunarizine. *Neurosci Lett.* 1993;158:97–100.
66. Geppert M, Goda Y, Hammer RE et al. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell.* 1994;79:717–27.
67. Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science.* 1993;259:780–5.
68. Grigoryan G, Korkotian E, and Segal M. Selective facilitation of LTP in the ventral hippocampus by calcium stores. *Hippocampus.* 2012; 22:1635–44.
69. Hagiwara S, Takahashi K. Resting and spike potentials of skeletal muscle fibres of salt-water elasmobranch and teleost fish. *J Physiol.* 1967;190:499–518.

70. Hamilton BR, Smith DO. Calcium currents in rat motor nerve terminals. *Brain Res.* 1992;584:123–31.
71. Harvey J and Collingridge GL. Thapsigargin blocks the induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 1992;139:197–200
72. Hayashi T, Yamasaki S, Nauenburg S, Binz T, Niemann H. Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro. *EMBO J.* 1995; 14:2317–25.
73. Henkart M, Landis DM, Reese TS. Similarity of junctions between plasma membranes and endoplasmic reticulum in muscle and neurons. *J. Cell Biol.* 1976;70(2):338–47.
74. Henze DA, McMahan DB, Harris KM, Barrionuevo G. Giant miniature EPSCs at the hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cell synapse are monoquantal. *J. Neurophysiol.* 2002;87(1):15–29.
75. Hess P. Calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Neurosci.* 1990;13: 337–56.
76. Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol.* 1910; 40.
77. Hill DR, Bowery NG, Hudson AL. Inhibition of GABAB receptor binding by guanyl nucleotides. *J Neurochem.* 1984;42:652–7.
78. Hirata K, Ohno-Shosaku T, Sawada S, Yamamoto C. Baclofen inhibits GABAergic transmission after treatment with type-specific calcium channel blockers in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 1995;187:205–8.
79. Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Tsien RW. Dominant role of N-type Ca²⁺ channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science.* 1988;239:57–61.
80. Holliday J, Adams RJ, Sejnowski TJ, Spitzer NC. Calcium-induced release of calcium regulates differentiation of cultured spinal neurons. *Neuron.* 1991;7(5):787–96.

81. Holt EH, Broadus AE, Brines ML. Parathyroid hormone-related peptide is produced by cultured cerebellar granule cells in response to L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel flux via a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase pathway. *J Biol Chem.* 1996;271:28105-11.
82. Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rózsa B, Kulik A, Watanabe M, Nusser Z. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat. Neurosci.* 2012; 15:988–97.
83. Horne AL, Kemp JA. The effect of omega-conotoxin GVIA on synaptic transmission within the nucleus accumbens and hippocampus of the rat in vitro. *Br J Pharmacol.* 1991;103:1733–9.
84. Horne AL, Kemp JA. The effect of omega-conotoxin GVIA on field potentials in the hippocampus and nucleus accumbens in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 635: 421–3.
85. Inchauspe CG, Martini FJ, Forsythe ID, Uchitel OD. Functional compensation of P/Q by N-type channels blocks short-term plasticity at the calyx of held presynaptic terminal. *J Neurosci.* 2004; 24:10379–83.
86. Iwasaki S, Takahashi T. Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol.* 1998;509(2): 419–23.
87. Jensen K, Lambert JD, Jensen MS. Activity-dependent depression of GABAergic IPSCs in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 1999;82: 42–9.
88. Jensen K, Jensen MS, Lambert JD. Role of presynaptic L-type Ca²⁺ channels in GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 1999; 81:1225–30.
89. Jensen K, Jensen MS, Lambert JD. Post-tetanic potentiation of GABAergic IPSCs in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol.* 1999; 519(1): 71–84.
90. Jensen K, Mody I. L-type Ca²⁺ channel-mediated short-term plasticity of GABAergic synapses. *Nat Neurosci.* 2001;4:975–6.

91. Kahle JS, Cotman CW. L-2-amino-4-phosphonobutanoic acid and 1S,3R-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid reduce paired-pulse depression recorded from medial perforant path in the dentate gyrus of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;266:207–15.
92. Kamiya H, Zucker RS. Residual Ca^{2+} and short-term synaptic plasticity. *Nature.* 1994;371:603–606.
93. Kano M. Calcium-induced long-lasting potentiation of GABAergic currents in cerebellar Purkinje cells. *Jpn J Physiol.* 1994; 44(2):131–6.
94. Kano M, Garaschuk O, Verkhratsky A, Konnerth A. Ryanodine receptor-mediated intracellular calcium release in rat cerebellar Purkinje neurones. *J. Physiol.* 1995;487(1):1–16.
95. Katz B, Miledi R. The effect of calcium on acetylcholine from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1965;161:496–503.
96. Katz B, Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol.* 1968;195:481–92.
97. Katz B, Miledi R. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol.* 1970;207:789–801.
98. Kavanaugh MP, Arriza JL, North RA, Amara SG. Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 1992;267:22007–9.
99. Korn H, Faber DS, Burnod Y, Triller A. Regulation of efficacy at central synapses. *J Neurosci.* 1984;4:125–30.
100. Korn H, Sur C, Charpier S. The one-vesicle hypothesis and multivesicular release. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1994;29:301–322.
101. Kraushaar U, Jonas P. Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *J Neurosci.* 2000;20(15): 5594–607.
102. Kriebel ME, Keller B, Fox G.Q. The secretory pore array hypothesis of transmitter. *Cell Biol. Int.* 2000;24:839–48.

103. Kuno M. Mechanism of facilitation and depression of the excitatory synaptic potential in spinal motoneurons. *J Physiol.* 1964;175:100–12.
104. Lando L, Zucker RS. Ca^{2+} cooperativity in neurosecretion measured using photolabile Ca^{2+} chelators. *J Neurophysiol.* 1994; 72: 825–30.
105. Lawrence JJ, Grinspan ZM, McBain CJ. Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus. *J Physiol (Lond).* 2004;554:175–93.
106. Lee KS, Tsien RW. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature.* 1983;302: 790–4.
107. Lester HA. Transmitter release by presynaptic impulses in the squid stellate ganglion. *Nature.* 1970;227:493–6.
108. Liu L, Wong TP, Pozza MF et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science.* 2004;304: 1021–4.
109. Llinas R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 1689–93.
110. Luebke JI, Dunlap K, Turner TJ. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron.* 1993;11:895–902.
111. Luebke JI, Dunlap K. Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Arch.* 1994;428:499–507.
112. Lundy PM, Frew R, Hamilton MG. Failure of adenosine analogues to affect N-type voltage sensitive Ca^{2+} channels in chicken brain synaptosomes. *Biochem Pharmacol.* 1990;40:651–4.

113. Lytton, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266:17067–71.
114. Macdonald RL, Olsen RW. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:569–602.
115. Mallart A, Martin AR. The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol.* 1968;196:593–604.
116. Martin ED, and Buno W. Caffeine-mediated presynaptic long term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 2003; 89:3029–38.
117. Marty S, Berninger B, Carroll P, Thoenen H. GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron.* 1996;16:565–70.
118. McCarren M, Alger BE. Use-dependent depression of IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Neurophysiol.* 1985;53:557–71.
119. McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH et al. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:4327–31.
120. McCleskey EW. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:304–312.
121. McGraw CF, Somlyo AV, Blaustein MP. Localization of calcium in presynaptic nerve terminals. An ultrastructural and electron microprobe analysis. *J. Cell Biol.* 1980;85(2):228–241.
122. Mehta AK, Ticku MK. An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;29:196–217.
123. Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science.* 1987;235:46–52.
124. Miller RJ. Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release. *FASEB J.* 1990;4:3291–3299.

125. Mintz IM, Adams ME, Bean BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*. 1992;9:95.
126. Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA. *Nature*. 1992;355:827–9.
127. Mintz IM, Bean BP. Block of calcium channels in rat neurons by synthetic ω -Aga-IVA. *Neuropharmacology*. 1993; 32:1161–9.
128. Mintz IM, Sabatini BL, Regehr WG. Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 1995; 15: 675–88.
129. Miyazaki K, Ishizuka T, Yawo H. Synapse-to-synapse variation of calcium channel subtype contributions in large mossy fiber terminals of mouse hippocampus. *Neuroscience*. 2005;136:1003–14.
130. Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H, Catterall WA. Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca^{2+} channels. *Neuron*. 1996;17:781–8.
131. Mott DD, Xie CW, Wilson WA, Swartzwelder HS, Lewis DV. GABAB autoreceptors mediate activity-dependent disinhibition and enhance signal transmission in the dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 1993;69:674–91.
132. Morishita W, Sastry BR. Postsynaptic mechanisms underlying long-term depression of GABAergic transmission in neurons of the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 1996; 76: 59–68.
133. Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*. 1998;8:608–19.
134. Mott DD, Xie CW, Wilson WA, Swartzwelder HS, Lewis DV. GABAB autoreceptors mediate activity-dependent disinhibition and enhance signal transmission in the dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 1993;69:674–91.
135. Murakami N, Ishibashi H, Katsurabayashi S, Akaike N. Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 2002;951:121–9.

136. Nathan T, Lambert JD. Depression of the fast IPSP underlies paired-pulse facilitation in area CA1 of the rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 1991;66:1704–1715.
137. Neher E. Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron.* 1998;20:389–99.
138. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 1985;316:440–3.
139. Ohno-Shosaku T, Sawada S, Yamamoto C. ATP-sensitive K⁺ channel activators suppress the GABAergic inhibitory transmission by acting on both presynaptic and postsynaptic sites in rat cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 1993; 159:139–42.
140. Ohno-Shosaku T, Hirata K, Sawada S, Yamamoto C. Contributions of multiple calcium channel types to GABAergic transmission in rat cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 1994;181:145–8.
141. Ohno-Shosaku T, Sawada S, Hirata K, Yamamoto C. A comparison between potencies of external calcium, strontium and barium to support GABAergic synaptic transmission in rat cultured hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 1994; 20:223–229.
142. Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:823–67.
143. Orita S, Sasaki T, Takai Y. Doc2 alpha as modulator of Ca(2+)-dependent exocytosis. *Methods Enzymol.* 2001;329:83–90.
144. Otis TS, Mody I. Differential activation of GABAA and GABAB receptors by spontaneously released transmitter. *J Neurophysiol.* 1992; 67:227–35.
145. Pan B, Zucker RS. A general model of synaptic transmission and short-term plasticity. *Neuron.* 2009;62:539–54.
146. Parra P, Gulyas AI, Miles R. How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron.* 1998; 20:983–93.

147. Peterson BZ, Catterall WA. Calcium binding in the pore of L-type calcium channels modulates high affinity dihydropyridine binding. *J Biol Chem.* 1995; 270:18201–4.
148. Plummer MR, Logothetis DE, Hess P. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron.* 1989;2:1453–63.
149. Pocock JM, Venema VJ, Adams ME. Omega-agatoxins differentially block calcium channels in locust, chick and rat synaptosomes. *Neurochem Int.* 1992;20: 263–70.
150. Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH, Thompson SM. Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron.* 1997;18:463–72.
151. Rahamimoff R, Dodge FA, Jr. Regulation of transmitter release at the neuromuscular synapse: the cooperative hypothesis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1969;27:219.
152. Rahamimoff R, Erulkar SD, Lev-Tov A, Meiri H. Intracellular and extracellular calcium ions in transmitter release at the neuromuscular synapse. *Ann N Y Acad Sci.* 1978;307:583–98.
153. Rammes G, Eder M, Dodt HU, Kochs E, Zieglgansberger W. Long-term depression in the basolateral amygdala of the mouse involves the activation of interneurons. *Neuroscience.* 2001;107:85–97.
154. Rasmussen H., Barrett P.Q. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol Rev.* 1984;64(3):938–84.
155. Regan L.J., Sah D.W., Bean B.P. Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron* 1991;6:269–80.
156. Regan LJ. Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J Neurosci* 1991;11:2259–69.

157. Regehr WG, Mintz IM. Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses. *Neuron* 1994;12: 605–13.
158. Reichardt LF, Kelly RB. A molecular description of nerve terminal function. *Annu Rev Biochem* 1983;52:871–924.
159. Reid CA, Clements JD, Bekkers JM. Nonuniform distribution of Ca²⁺ channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures. *J Neurosci.* 1997;17:2738–45.
160. Reid CA, Bekkers JM, Clements JD. Presynaptic Ca²⁺ channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci* 2003;26:683–7.
161. Reuter H. Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca(2+)-channel blockers. *Neuron* 1995;14: 773–9.
162. Reyes A, Lujan R, Rozov A, Burnashev N, Somogyi P, Sakmann B. Target-cell-specific facilitation and depression in neocortical circuits. *Nat Neurosci.* 1998; 1: 279–85.
163. Reyes, M. and Stanton, P.K. Induction of hippocampal longterm depression requires release of Ca²⁺ from separate presynaptic and postsynaptic intracellular stores. *J. Neurosci.* 1996; 16:5951–60.
164. Reynolds IJ, Wagner JA, Snyder SH, Thayer SA, Olivera BM, Miller RJ. Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by omega-conotoxin fraction GVIA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83:8804–07.
165. Regehr WG, Stevens CF. Physiology of synaptic transmission and short-term plasticity. Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje. *Synapses.* 2001: 135–76.
166. Ropert N, Miles R, Korn H. Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurones of rat. *J. Physiol.* 1990; 428:707–22.

167. Rosato-Siri M, Grandolfo M, Ballerini L. Activity-dependent modulation of GABAergic synapses in developing rat spinal networks in vitro. *Eur J Neurosci.* 2002; 16: 2123–35.
168. Rosenbluth J. Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. *J. Cell Biol.* 1962;13(33):405–21.
169. Rosenmund C, Stevens CF. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron.* 1996;16:1197–1207.
170. Rosenthal J. Post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol.* 1969;203:121–33.
171. Rossier MF, Python CP, Burnay MM, Schlegel W, Vallotton MB, and Capponi AM. Thapsigargin inhibits voltage-activated calcium channels in adrenal glomerulosa cells. *Biochem J.* 1993;296: 309–12.
172. Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 1994; 372: 55–63.
173. Russier M, Kopysova IL, Ankri N, Ferrand N, Debanne D. GABA and glycine co-release optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons in vitro. *J Physiol.* 2002; 541:123–37.
174. Saviane C, Savtchenko LP, Raffaelli G, Voronin LL, Cherubini E. Frequency-dependent shift from paired-pulse facilitation to paired-pulse depression at unitary CA3-CA3 synapses in rat hippocampus. *J Physiol.* 2002; 544: 469–76.
175. Savic N, Sciancalepore M. Intracellular calcium stores modulate miniature GABA-mediated synaptic currents in neonatal rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 1998;10: 3379–86.
176. Scheer HW. Interactions between the presynaptically active neurotoxins alpha-latrotoxin and omega-conotoxin GVIA: studies on calcium fluxes and binding parameters in rat and chicken synaptosomes. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990; 68: 1049–54.
177. Schneggenburger R, Neher E. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature.* 2000; 406: 889–93.

178. Schneider T, Wei X, Olcese R et al. Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca²⁺ channel $\alpha 1$ subunit. *Receptors Channels*. 1994; 2: 255–70.
179. Scholz KP, Miller RJ. GABAB receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol*. 1991; 444: 669–86.
180. Scholz KP, Miller RJ. Presynaptic inhibition at excitatory hippocampal synapses: development and role of presynaptic Ca²⁺ channels. *J Neurophysiol*. 1996; 76: 39–46.
181. Schousboe A, Frandsen A, Krogsgaard-Larsen P. Pharmacological and functional characterization of excitatory amino acid mediated cytotoxicity in cerebral cortical neurons. *Cell Biol Toxicol*. 1992; 8: 93–100.
182. Sharp AH, McPherson PS, Dawson TM, Aoki C, Campbell KP, Snyder SH. Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in rat brain. *J Neurosci*. 1993;13: 3051–63.
183. Shen KZ, Zhu ZT, Munhall A, Johnson SW. Synaptic plasticity in rat subthalamic nucleus induced by high-frequency stimulation. *Synapse*. 2003;50: 314–19.
184. Sheng J, He L, Zheng H, Xue L, Luo F, Shin W, Sun T, Kuner T, Yue DT, Wu LG. Calcium-channel number critically influences synaptic strength and plasticity at the active zone. *Nat Neurosci*. 2012;15(7):998–1006.
185. Simkus CR, Stricker C. The contribution of intracellular calcium stores to mEPSCs recorded in layer II neurones of rat barrel cortex. *J. Physiol*. 2002;545: 521–35.
186. Sivilotti L, Nistri A. Complex effects of baclofen on synaptic transmission of the frog optic tectum in vitro. *Neurosci Lett*. 1988; 85: 249–54.

187. Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1989;264(30):17816–23.
188. Shmigol A, Kostyuk P, Verkhratsky A. Dual action of thapsigargin on calcium mobilization in sensory neurons: inhibition of Ca^{2+} uptake by caffeine-sensitive pools and blockade of plasmalemmal Ca^{2+} channels. *Neuroscience.* 1995; 65:1109–18.
189. Smith SJ, Augustine GJ, Charlton MP. Transmission at voltage-clamped giant synapse of the squid: evidence for cooperativity of presynaptic calcium action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 622–5.
190. Smith SJ, Augustine GJ. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci.* 1988; 11: 458–64.
191. Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci.* 1998; 19: 500–5.
192. Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* 1993; 75: 409–18.
193. Stanley EF. Decline in calcium cooperativity as the basis of facilitation at the squid giant synapse. *J Neurosci.* 1986; 6: 782–9.
194. Stanley EF, Cox C. Calcium channels in the presynaptic nerve terminal of the chick ciliary ganglion giant synapse. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 635:70–9.
195. Stanley EF, Goping G. Characterization of a calcium current in a vertebrate cholinergic presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* 1991; 11:985–93.
196. Stanley EF. Presynaptic calcium channels and the transmitter release mechanism. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 681:368–72.
197. Stanley EF. Presynaptic calcium channels and the depletion of synaptic cleft calcium ions. *J Neurophysiol.* 2000; 83:477–82.
198. Stevens CF, Wang Y. Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron.* 1995; 14:795–802.

199. Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*. 1995; 375: 645–53.
200. Suszkiw JB, O'Leary ME, Murawsky MM, Wang T. Presynaptic calcium channels in rat cortical synaptosomes: fast-kinetics of phasic calcium influx, channel inactivation, and relationship to nitrendipine receptors. *J Neurosci*. 1986; 6:1349–57.
201. Takahashi T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*. 1993; 366:156–8.
202. Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K. Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science*. 1996; 274:594–7.
203. Tanabe M, Kaneko T. Paired pulse facilitation of GABAergic IPSCs in ventral horn neurons in neonatal rat spinal cord. *Brain Res*. 1996; 716:101–6.
204. Thomson AM, Deuchars J. Temporal and spatial properties of local circuits in neocortex. *Trends Neurosci*. 1994; 17:119–26.
205. Tottene A, Moretti A, Pietrobon D. Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *J Neurosci*. 1996; 16:6353–63.
206. Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci*. 1988; 11:431–8.
207. Tsien RW, Tsien RY. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol*. 1990; 6:715–60.
208. Tsodyks MV, Markram H. The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:719–23.
209. Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:3330–3.

210. Uneyama H, Takahara A, Dohmoto H, Yoshimoto R, Inoue K, Akaike N. Blockade of N-type Ca²⁺ current by cilnidipine (FRC-8653) in acutely dissociated rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol.* 1997;122(1):37–42.
211. Usowicz MM, Sugimori M, Cherksey B. P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron.* 1992; 9:1185–99.
212. Varela JA, Sen K, Gibson J, Fost J, Abbott LF, Nelson SB. A quantitative description of short-term plasticity at excitatory synapses in layer 2/3 of rat primary visual cortex. *J Neurosci.* 1997; 17:7926–40.
213. Veselovsky NS, Engert F, Lux HD. Fast local superfusion technique. *Pflugers Arch.* 1996; 432:351–4.
214. Wang X, Treistman SN, Lemos JR. Two types of high-threshold calcium currents inhibited by ω -conotoxin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *J Physiol.* 1992; 445:181–99.
215. Wapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem.* 1950; 187:35–9.
216. Weiss JN. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 1997;11: 835–41.
217. Welsby, P., Rowan, M., and Anwyl, R. Nicotinic receptor-mediated enhancement of long term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and ryanodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 24: 3109–18.
218. Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron.* 1992; 9: 1099–115.
219. Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM et al. Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci.* 1995; 15: 6403–18.

220. Westrum LE, Gray EG. New observations on the substructure of the active zone of brain synapses and motor endplates. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 1986;1254(229):29–38.
221. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 1994;264:107–11.
222. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Changes in action potential duration alter reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca²⁺ channels in rat hippocampus. *J Neurosci.* 1996;16:2226–37.
223. Wilcox KS, Dichter MA. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABAB autoreceptor activation. *J Neurosci.* 1994;14:1775–88.
224. Williams ME, Marubio LM, Deal CR et al. Structure and functional characterization of neuronal α_1E calcium channel subtypes. *J Biol Chem.* 1994; 269:22347–57.
225. Worden MK, Bykhovskaia M, Hackett JT. Facilitation at the lobster neuromuscular junction: a stimulus-dependent mobilization model. *J Neurophysiol.* 1997;78:417–28.
226. Wu LG, Saggau P. Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J Neurosci.* 1994;14:5613–22.
227. Wu LG, Saggau P. Presynaptic calcium is increased during normal synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci.* 1994;14:645–54.
228. Wu LG, Saggau P. Block of multiple presynaptic calcium channel types by omega-conotoxin-MVIIIC at hippocampal CA3 to CA1 synapses. *J Neurophysiol.* 1995;73:1965–72.
229. Wu LG, Borst JG, Sakmann B. R-type Ca²⁺ currents evoke transmitter release at a rat central synapse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:4720–5.

230. Wu LG, Borst JG. The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron*. 1999;23:821–32.
231. Xu J, Wu LG. The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. *Neuron*. 2005; 46:633–45.
232. Xu J, He L, Wu LG. Role of Ca(2+) channels in short-term synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17:352–9.
233. Yamamoto C, Sawada S, Ohno-Shosaku T. Suppression of hippocampal synaptic transmission by the spider toxin omega-agatoxin-IV-A. *Brain Res*. 1994; 634:349–52.
234. Yoon KW, Rothman SM. The modulation of rat hippocampal synaptic conductances by baclofen and gamma-aminobutyric acid. *J Physiol*. 1991;442: 377–90.
235. Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT et al. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*. 1993;32:1075–88.
236. Zucker RS, Fogelson AL. Relationship between transmitter release and presynaptic calcium influx when calcium enters through discrete channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:3032–6.
237. Zucker RS. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1989;12:13-31.
238. Zucker RS. Calcium and transmitter release at nerve terminals. *Biochem Soc Trans*. 1993;21:395–401.
239. Zucker RS. Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9:305–13.
240. Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:355–405.
241. Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*. 1999;399: 159–62.

242. Веселовский НС, Федулова СА, Костюк ПГ. Биофизика одиночного синапса. Киев, Наукова думка, 204.
243. Ісаєва ОВ, Федулова СА, Веселовський МС. Потенціал-залежні кальцієві канали в культивованих нейронах гіпокампу щурів. Нейрофізіологія. 1998; 30:361–5.
244. Куффлер С, Николс Д. От нейрона к мозгу. М.:Мир, 1979.
245. Колесник ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткочасній депресії та полегшенні синаптичної передачі. Фізіол.журн. 2016;5(62):12-18
246. Колесник ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Частотна модуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Фізіол.журн. 2017;4(63):10-16
247. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Вплив тапсигаргіну на гальмівну синаптичну передачу в культурі нейронів гіпокампа щура. Нейрофізіологія. 2007;4/5(39):374-76.
248. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Участь N-типу потенціалкерованих кальцієвих каналів в регуляції пластичності гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. Фізіол.журн. 2009; 4(55):17-23.
249. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Кальційзалежна регуляція депресії гальмівної синаптичної передачі блокатором N-типу кальцієвих каналів у культурі нейронів гіпокампа. Фізіол.журн. 2010;1(56):118-26.
250. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Неоднорідний розподіл і внесок P- та P/Q-типів кальцієвих каналів у короткочасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. Фізіол.журн. 2010;6(56):3-11.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні наукові результати дисертації:

1. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Вплив тапсигаргіну на гальмівну синаптичну передачу в культурі нейронів гіпокампа щура. *Нейрофізіологія*. 2007;4/5(39):374-76. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*.
2. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Участь N-типу потенціалкерованих кальцієвих каналів в регуляції пластичності гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. *Фізіол.журн*. 2009; 4(55):17-23. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*.
3. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Кальційзалежна регуляція депресії гальмівної синаптичної передачі блокатором N-типу кальцієвих каналів у культурі нейронів гіпокампа. *Фізіол.журн*. 2010;1(56):118-26. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*.
4. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Неоднорідний розподіл і внесок P- та P/Q-типів кальцієвих каналів у короткочасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. *Фізіол.журн*. 2010;6(56):3-11. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*.

5. Колесник ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткочасній депресії та полегшенні синаптичної передачі. *Фізіол.журн.* 2016;5(62):12-18. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*
6. Колесник ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Частотна модуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі. *Фізіол.журн.* 2017; № 4(63):10-16. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

Апробація матеріалів дисертації:

9. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Дослідження короткочасної пластичності гальмівної синаптичної передачі за допомогою парної стимуляції аксонів в культурі нейронів гіпокампа щура. Збірник тез 2-го З'їзду Українського Товариства Клітинної Біології. Київ. 2007:183. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
10. Mizerna OP, Fedulova SA, Veselovsky NS. Dependence of inhibitory synaptic transmission efficiency on various extracellular calcium concentrations. School Program of European Synapse Summer School. Bordeaux, France. 2008. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
11. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Кальційзалежна регуляція депресії при парній стимуляції ω -конотоксином–GVIA. Матеріали ІХ Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих науковців “Біологічні дослідження молодих учених в Україні”. Київ. 2009: 66 с. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
12. Mizerna OP, Fedulova SA, Veselovsky NS. Effect of omega-conotoxin- GVIA on calcium-dependent paired pulse depression in cultured hippocampal neurons,

Symposium “Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling”. Program & Abstract book. 2009: 25. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

13. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Регуляція пластичності ГАМКергічних вГПСС, що зумовлена попередньою активністю синапса в культурі нейронів гіпокампа щура, V Конгрес Українського Товариства Нейронаук. Програма. Київ. 2011:95. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

14. Мізерна ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Розподіл і вклад P/Q-типу кальцієвих каналів у короточасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. V З'їзд Українського Біофізичного Товариства: Тези доповідей. Луцьк. 2011:96. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

15. Kolesnyk OP, Fedulova SA, Veselovsky NS. Frequency-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission, Conference for young scientist. Abstract Book. 2015:148. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

16. Колесник ОП, Федулова СА, Веселовський МС. Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткотривалій депресії та полегшенні синаптичної передачі. VII конгрес Українського товариства нейронаук. Київ. 2017:89. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*