

Думанська Ганна Валентинівна

УДК 57.085.23+612.843+612.826.5

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

Спеціальність 03.00.02 – Біофізика

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

акад. НАН України, д.б.н., професор

Веселовський Микола Сергійович

2
ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП.....	7
1.1. Структура та функції сітківки та <i>colliculus superior</i>	13
1.1.1. Будова і функції сітківки.....	13
1.1.2. Класифікації та роль гангліозних клітин сітківки в механізмах обробки та передачі зорової інформації	18
1.1.3. Аксони гангліозних клітин в структурі зорового нерва та зорових шляхів	20
1.1.4. Структура та зорова функція <i>colliculus superior</i>	22
1.1.5. Шарова структура і проекції <i>colliculus superior</i>	23
1.2. Нейропередача в проекціях сітківки в <i>CS</i>	25
1.3. Пошкоджуючий вплив гіпоксії	28
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	32
2.1. Обґрунтування вибору напряму дослідження	32
2.2. Кокультивування клітин сітківки та нейронів <i>CS</i>	33
2.2.1. Камера для кокультивування опорнозалежних клітин....	33
2.2.2. Приготування первинної кокультури клітин сітківки та нейронів <i>CS</i>	34
2.3. Метод «петч-клемп» в конфігурації «ціла клітина»	38
2.4. Методика парної реєстрації.....	39
2.5. Контроль якості фіксації потенціалу на мембранах нейронів	42

2.6.	Квантовий аналіз постсинаптичних струмів	42
2.7.	Протоколи індукції короткочасної пластичності при парній стимуляції в синапсах ГКС та нейронів <i>CS</i>	43
2.8.	Методи базового та повного квантового аналізу	45
2.9.	Модель короткочасної гіпоксії <i>in vitro</i>	46
2.10.	Полярографічний метод аналізу	46
2.11.	Метод швидкої локальної суперфузії	48
2.12.	Обробка та аналіз результатів	49
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....		51
3.1.	Морфологічні та електрофізіологічні характеристики кокультивованих ГКС та нейронів <i>CS</i>	51
3.2.	Синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	55
3.2.1.	Глутататергічна синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	55
3.2.2.	ГАМК-ергічна синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	59
3.3.	Квантове вивільнення нейротрансмітерів в синапсах проєкцій ГКС в <i>CS</i> за умов кокультури	60
3.3.1.	Параметри квантового вивільнення глутамата в синапсах між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	61
3.3.2.	Параметри квантового вивільнення ГАМК в синапсах між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	65

3.4.	Короткочасна пластичність синаптичної передачі між ГКС та нейронами <i>CS</i> при парній стимуляції	68
3.4.1.	Короткочасна пластичність глутаматергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i> при парній стимуляції	69
3.4.2.	Короткочасна пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i> при парній стимуляції	73
3.5.	Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	76
3.5.1.	Індукована гіпоксією зміна ефективності глутаматергічної НМДА-рецепторопосередкованої передачі між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	77
3.5.2.	Індукована гіпоксією зміна ефективності глутаматергічної АМПА-рецепторопосередкованої передачі між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	82
3.5.3.	Індукована гіпоксією зміна ефективності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	87
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....		90
4.1.	Кокультура дисоційованих клітин сітківки та нейронів <i>CS</i> як адекватна функціональна модель для вивчення нейропередачі на рівні проєкцій сітківки в підкорковий зоровий центр	90
4.2.	Основні типи нейропередачі в синапсах кокультивованих ГКС та нейронів <i>CS</i>	91

4.3.	Квантовий характер вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах між ГКС та нейронами <i>CS</i> в кокультурі	94
4.4.	Короткочасна синаптична пластичність в синапсах між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i> при парній стимуляції..	96
4.5.	Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між кокультивованими ГКС та нейронами <i>CS</i>	98
РОЗДІЛ 5. ВИСНОВКИ.....		104

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

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

ВСТУП

Зір — складний багатоступінчатий сенсорний процес, який починається з проекції зображень на сітківку ока, яка сприймає та трансформує світлові сигнали в послідовності нервових імпульсів. Вихідними нейронами сітківки є гангліозні клітини (ГКС). Їхні аксони формують зоровий тракт і забезпечують передачу візуальних аферентних сигналів у субкортикальні зорові центри головного мозку. *Colliculus superior* (CS, верхні горбки пластинки покрівлі) є первинним субкортикальним центром зорового аналізатора. Проекції ГКС в верхні шари CS утворюють перші реле у шляхах передачі та обробки аферентних зорових сигналів [155, 194, 135, 27, 144].

Дослідження властивостей нейропередачі між ГКС та нейронами CS традиційно проводилися або *in vivo* [195, 173], або *in vitro* на парасагітальних переживаючих зрізах CS [35, 170, 237]. У таких експериментах реєстрували викликані постсинаптичні струми в нейронах CS у відповідь на тотальну електричну стимуляцію *stratum opticum* — оптичного шару CS, який включає в себе велику кількість різноманітних вхідних проекцій, зокрема і аферентних входів зорового тракту. Принципові недоліки попередніх методик досліджень синаптичних ефектів полягали у відсутності можливості ідентифікації конкретного пресинаптичного входу волокна та контролю виникнення в ньому потенціалу дії. У зв'язку з цим виникло питання розробки більш адекватного в даному аспекті об'єкту.

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

синаптичного зв'язку на окремих добре візуалізованих та ідентифікованих парах нейронів.

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

Гіпоксія є не тільки патологічним процесом, що лежить в основі багатьох захворювань чи супроводжує їх, вона індукує розвиток фізіологічної адаптації до певних навколишніх умов або фізичних навантажень [165, 48, 85, 82, 47, 119, 20, 46, 15]. Висока чутливість нейронів центральної нервової системи (ЦНС) до дефіциту кисню є загальновідомою. Навіть короткочасне припинення постачання кисню до тканин головного мозку може призвести до його необоротних пошкоджень. Питоме споживання кисню різними тканинами головного мозку дуже сильно варіює. Цей параметр у тканин сітківки та субкортикальних зорових центрів на порядок вище відповідних показників інших відділів ЦНС [245].

Ключові моменти гіпоксичного ураження саме проекцій сітківки в *CS* досліджені відносно детально на рівні структурних порушень та судинних реакцій за допомогою методів магнітно-резонансної томографії [44, 220, 24]. Разом з тим ефекти та механізми гіпоксичного впливу на передачу через окремі відповідні з'єднання дотепер досліджені не були. Саме тому визначення властивостей нейропередачі в синапсах між ГКС та нейронами *CS* при гіпоксії є важливим для розуміння механізмів гіпоксичних ушкоджень даної ланки зорової системи та створення необхідної теоретичної основи для пошуку нових терапевтичних підходів в корекції індукованих гіпоксією патологічних станів зорового аналізатора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Роботу виконано в рамках наукових проектів Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України «Клітинні механізми реалізації функціональних особливостей нейронів центральної та периферичної нервових систем ссавців»

(державний реєстраційний номер № 0113U007274) і «Функціональна геноміка міжнейронної взаємодії та субнейронних процесів за нормальних та патологічних умов» (державний реєстраційний номер № 0112U001476).

Мета і задачі дослідження

Метою нашої роботи було встановлення характеристик нейропередачі в синапсах аферентних проекцій сітківки в *colliculus superior* в нормі та за умов моделювання гіпоксії. Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

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

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

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

Методи дослідження

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

Наукова новизна одержаних результатів

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

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

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

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

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

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів

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

Особистий внесок здобувача

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

Апробація результатів дисертації

Загальні положення роботи доповідались на наступних наукових конференціях: V Конгрес Українського товариства нейронаук (6–10 червня 2011р., Київ, Україна); V з'їзд Українського біофізичного товариства (22–25 червня 2011 р., Луцьк, Україна); Всеукраїнська конференція молодих вчених “Фізіологія від молекули до організму” (20–21 жовтня 2011 р., Київ, Україна); 8th FENS Forum of Neuroscience (14–18 липня 2012 р., Барселона, Іспанія); II International symposium “Molecular mechanisms of synaptic transmission regulation” in memory of V. Skok (6–9 жовтня 2012 р., Київ, Україна); II Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body” (8–9 жовтня 2012 р., Київ, Україна); Российско-Украинский семинар «Современные экспериментальные подходы для поиска и характеристики новых нейротропных фармакологически активных веществ» (23–25 вересня 2012 р., Москва, РФ); VI Конгрес Українського товариства нейронаук (4–8 червня 2014р., Київ, Україна); XIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (21–23 травня, 2015, Київ, Україна).

Публікації

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

Структура та обсяг дисертації

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

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

1.1. Структура та функції сітківки та *colliculus superior*

1.1.1. Будова і функції сітківки

Зір забезпечує визначення світла, кольору, форми, величини, руху, віддаленості предметів та об'єктів в навколишньому просторі. Цей складний багатоступінчатий процес починається з проекції зображення на сітківку ока – периферичного відділу зорової системи. Сітківка відіграє провідну роль в складному процесі отримання, обробки та аналізу візуальних образів. Вона сприймає та трансформує світлові сигнали в послідовності нервових імпульсів і передає їх по зоровому тракту в відповідні субкортикальні зорові центри головного мозку, які в свою чергу передають сигнали у вищі відділи головного мозку, де формується зоровий образ.

На основі ембріологічних даних сітківка являє собою похідне зорового бокала. Це дає основу розглядати її як істинну мозкову тканину, висунуту на периферію, так як зоровий бокал є лише послідовною стадією розвитку первісного зорового пухиря, простого мішкоподібного випинання головного кінця нервової трубки на ранній стадії ембріогенезу [251, 243].

Сітківка – тонка, майже прозора, внутрішня світлочутлива оболонка очного яблука. В сітківці розрізняють велику, зорову частину та меншу, сліпу частину [62, 251, 43, 243]. Зорова частина сітківки вистеляє дно очного яблука від виходу зорового нерва до межі зубчатої лінії. За розвитком і будовою у зоровій частині сітківки виділяють шари: внутрішній, нервовий шар – розвивається із внутрішньої частини очного келиха і складається з нервових клітин; зовнішній, пігментний шар – розвивається з зовнішньої частини очного келиха і побудований з пігментних клітин. Нервові клітини сітківки можна розділити на три групи:

світлосприймаючі фоторецепторні клітини (палочки, колбочки, фоточутливі гангліозні клітини), які перетворюють світло на нервові імпульси; проміжні (біполярні, горизонтальні та амакринові клітини), передають нервові збудження в межах сітківки; вихідні – гангліозні клітини сітківки (ГКС) – інтегрують сигнали від фоторецепторів та проміжних клітин. Аксони ГКС формують зоровий нерв, який передає інтегрований в сітківці сигнал в субкортикальні зорові центри.

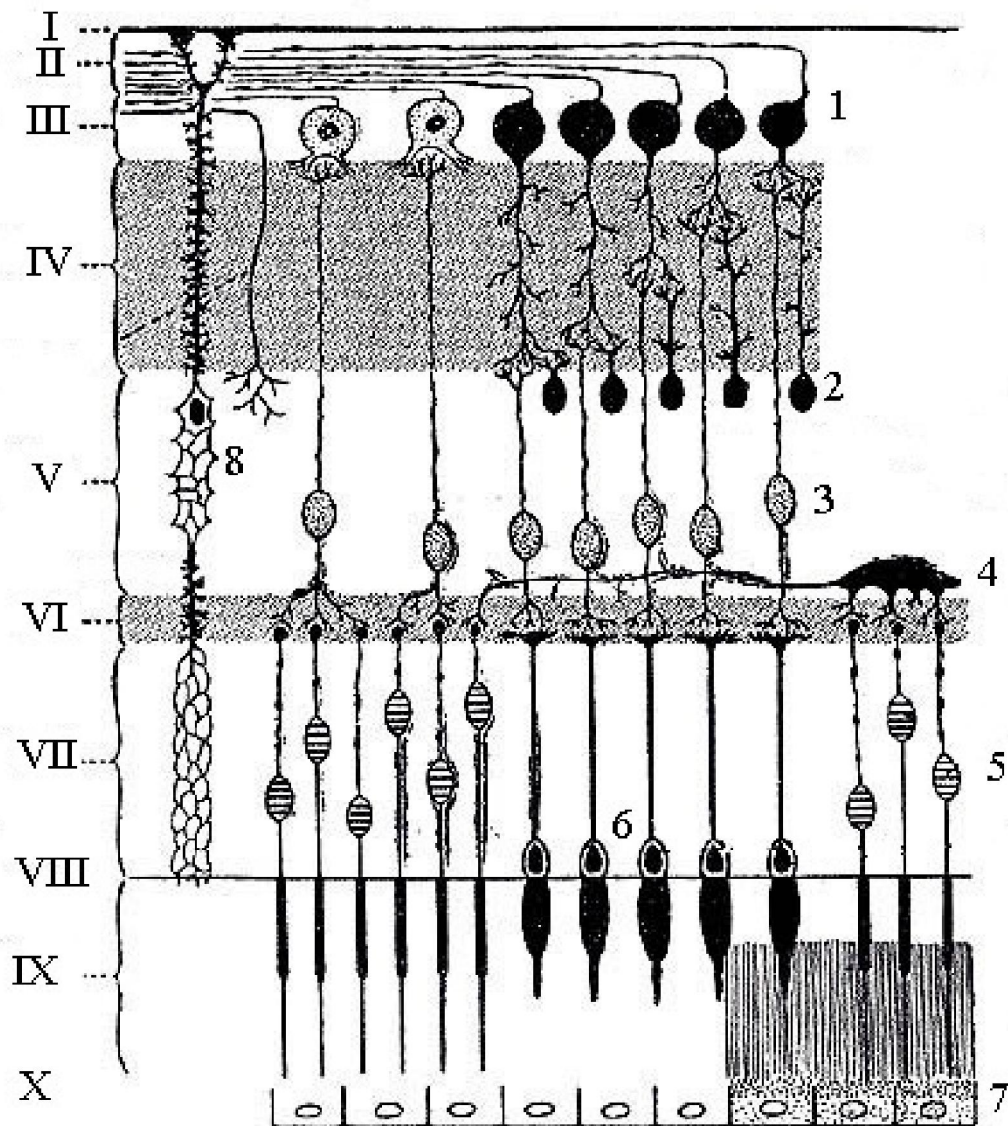


Рис. 1.1. Будова сітківки ссавців.

I – внутрішня погранична мембрана, II – шар оптичних волокон, III – шар гангліозних клітин, VI – внутрішній плексиформний шар, V – внутрішній ядерний шар, VI – зовнішній плексиформний шар, VII – зовнішній ядерний шар, VIII – зовнішня погранична мембрана, IX – шар

паличок та ковбочок, X – шар пігментного епітелію. 1 – гангліозні клітини, 2 – амакринові клітини, 3 – біполярні клітини, 4 – горизонтальна клітина, 5 – палочки, 6 – ковбочки, 7 – клітини пігментного епітелію, 8 – гліальна клітина Мюллера.

Нервовий шар являє собою радіальнорозміщенні вищеописані нейрони, що з'єднуються між собою за допомогою синапсів. Зорова частина сітківки морфологічно складається з наступних десяти шарів, які були описані ще в роботах іспанського лікаря та гістолога С. Рамон-і-Кахаля (Сітківка ока хребетних, 1894 р.) (рис. 1.1.; Сітківка ока хребетних, в напрямку проходження світла, від скловидного тіла до хоріоїдеї, 1894 р.) [62]:

I – внутрішня погранична мембрана – утворена базальною і плазматичною мембраною клітин Мюллера. Мембрана утворює захисний бар'єр, відокремлюючи шар гангліозних клітин від склуватого тіла.

II – шар оптичних волокон – складається з немієлінізованих аксонів ГКС, які тільки після виходу з очного яблука покриваються мієліновою оболонкою.

III – шар гангліозних клітин – містить тіла ГКС.

IV – внутрішній плексіформний шар – утворений скупченням аксонних закінчень біполярних клітин та дендритів амакринових та гангліонних клітин сітківки. Передача аферентної інформації відбувається від біполярних до гангліозних клітин, а амакринові клітини відповідають за її модуляцію.

V – внутрішній ядерний шар – містить тіла біполярних, амакринових, горизонтальних і мюллеровських клітин.

VI – зовнішній плексіформний шар – представлений синапсами між фоторецепторами і біполярними та горизонтальними клітинами. Зв'язки між фоторецепторами і біполярними клітинами забезпечують передачу зорової сигналізації, яка модулюється роботою горизонтальних клітин.

VII – зовнішній ядерний шар – містить тіла фоторецепторних клітин.

VIII – зовнішня погранична мембрана – утворена товстими плоскими адгезивними контактами між фоторецепторами і зовнішніми відростками клітин

Мюллера, виконує функцію підтримки структури сітківки. Клітини Мюллера регулюють водний обмін, удаляють з міжклітинного простору надлишок іонів калія і нейромедіаторів [249].

IX – фотосенсорний шар – містить зовнішній та внутрішній сегменти фоторецепторних клітин. В зовнішньому сегменті реалізується процес трансформації енергії фотонів світла у рецепторний потенціал за рахунок каскаду хімічних реакцій з участю світлочутливого пігменту родопсину.

X – шар пігментного епітелію утворений одним рядом епітеліальних двох ядерних клітин, що містять гранули пігменту меланіну. Меланін – екрануючий пігмент, він поглинає світло, яке доходить до епітеліального пласту, попереджаючи його відбиття та розсіяння, тим самим сприяє чіткості зорового сприйняття. Клітини пігментного епітелію виконують функції поглинання світла, фагоцитозу відпрацьованих дисків зовнішніх сегментів фоторецепторів у процесі ресинтезу родопсину, трофіки, приймають участь у циркуляції вітаміну А та підтримує зовнішній гематоретинального бар'єру.

Фотохімічні реакції в рецепторі приводять до збудження біполярних, а потім гангліозних клітин, від яких нервові імпульси направляються в головний мозок. Фоторецептори – це високо спеціалізовані клітини, що перетворюють світлові подразнення в нервові збудження. Фоторецепція починається в зовнішніх сегментах, де на дисках розташовані молекули зорового пігменту (у паличках – родопсин, у колбочках – йодопсин). Під дією світла відбувається ряд дуже швидких перетворень і знебарвлення зорового пігменту. Палички й колбочки різняться за своїми функціями. Палички мають більш високу чутливість, чим колбочки, і є органами сутінкового зору, які сприймають монохромне зображення. Колбочки являють собою органи денного зору і забезпечують кольоровий зір. У людини існують три види колбочок, які сприймають червоний, зелений і синьо-фіолетовий колір. Комбінації збуджень цих приймачів різних кольорів дають відчуття всієї гами кольірних відтінків. Рівномірне збудження всіх трьох видів колбочок викликає відчуття білого кольору [43].

У темряві фоторецептори сітківки деполяризовані і їхні закінчення постійно виділяють глутамат в синаптичну щілину лентовидного синапсу[201, 218, 223]. Крім того в темряві в зовнішніх сегментах фоторецепторів протікає постійний “темновий” струм, в результаті чого мембранний потенціал складає порядку –40 мВ. Гіперполяризація паличок та колбочок під дією світла (фототрансдукція) забезпечується послідовністю фотохімічних та біоелектричних процесів, які відбуваються в зовнішніх сегментах фоторецепторів. Фоторецептори сітківки синаптично зв’язані з біполярними нейронами (прямий шлях) та горизонтальними клітинами (непрямий шлях). Дія світла гіперполяризує мембрану фоторецептора і тим самим зменшує вивільнення медіатора (глутамата), що призводить до зміни потенціалу мембрани біполярного нейрона. Від нього локальний градуальний сигнал передається далі на ГКС. Передача сигналу як з фоторецептора на біполярний нейрон, так і від нього на ГКС відбувається безімпульсним шляхом. Розповсюдження такого локального градуального сигналу залежить виключно від пасивних властивостей фоторецепторів та біполярних нейронів. Гангліозні клітини сітківки у відповідь на локальний сигнал генерують потенціали дії (ПД). Взагалі в сітківці лише ГКС та амакрінові клітини здатні генерувати ПД.

В середньому на 130 млн фоторецепторів приходить 1,2 млн ГКС. Конвергенція нервових імпульсів у сітківці забезпечується певним типом зв’язків її нейронів і характерна для всіх відділів її зорової частини, за винятком центральної ямки.

У задньому відділі дна очного яблука на сітківці виділяють дві ділянки: диск зорового нерва та жовту пляму. Диск зорового нерва є місцем початку зорового нерва і функціонально є сліпою плямою, там немає нейросенсорних клітин. Жовта пляма — область сітківки, стоншену до лише нейросенсорних клітин – центральна ямочка, а в окремій її частині лише до колбочок – менша ямочка. Роздільна здатність сітківки найвища в центральній ямочці, так як кожна з розташованих тут колбочок передає сигнал на окрему ГКС, тобто складає окреме рецептивне поле [62, 251, 43].

Сліпа частина сітківки побудована значно простіше порівняно з зоровою її частиною. Вона не містить нейронів і представлена лише пластом епітеліальних клітин. Сліпа частина разом з пігментним епітелієм вкриває війкове тіло та райдужку і поділяється відповідно на війкову та райдужну частини сітківки [201].

1.1.2. Класифікації та роль гангліозних клітин сітківки в механізмах обробки та передачі зорової інформації

Гангліозні клітини сітківки – це вихідні нейрони сітківки, які передають зорову інформацію до вищих мозкових центрів у вигляді імпульсації [42]. За роки досліджень ГКС були класифіковані за їхніми різноманітними морфологічними характеристиками. Існує певний розподіл ГКС за морфологічними характеристиками, такими як діаметр соми, форма та розмір дендритного дерева, арборизація їхніх відростків [154, 204, 95, 114].

Окремим класом розглядають фоточутливі ГКС, які містять меланопсин – фоточутливий пігмент. На відміну від паличок та ковбочок, світлочутливі ГКС не приймають безпосередньої участі у формуванні оптичних зображень. Натомість виявлено, що вони відіграють провідну роль в процесах синхронізації циркадних ритмів, регулюванні реакцій зіниці та в багатьох процесах адаптації до зміни інтенсивності фонового освітлення [133, 39, 164].

Розділяють ГКС на типи за характером імпульсації (фазні, тонічні) [206, 230, 41, 208, 61, 189], а також за змінами характеру збудливості протягом розвитку [206, 230, 189]. Так, на ГКС цілої сітківки щурів *in vitro* було показано, що відповіді нейронів на тривалі деполяризуючі поштовхи струму залежали від віку тварин та поділялися на групи: генерація одиничного спайку (вік тварин 7–8 днів), швидка адаптація (вік тварин від 21 до 24 днів) та високочастотна генерація ПД протягом тривалості всього стимулу (вік тварин 25–27 днів). Дану класифікацію часто застосовують для ідентифікації ГКС в культурі клітин

сітківки [61]. Формування фазної та тонічної активності ГКС протягом розвитку опосередковується відповідним перерозподілом специфічних клітинних властивостей натрієвої, кальцієвої та калієвої провідностей [198, 185, 229, 121, 84]. Функціонально, тонічна активність ГКС, як кінцевих нейронів, зрілої зорової системи, опосередковує сприйняття одночасно великої кількості синаптичних входів.

Техніка освітлення певних зон сітківки призвела до появи концепції «рецептивного поля», яка в свою чергу – до класифікації ГКС за характером відповіді на світловий подразник: ON-, OFF- та ON/OFF-реакція [105, 21, 127, 151, 214]. Термін «рецептивне поле» вперше був введений Шеррінгтоном в контексті рефлексів і пізніше був перенесений на зорову систему Хартлайном. Рецептивне поле (РП) нейрона зорової системи – це зона сітківки, при попаданні світла на яку може змінитися активність даного нейрона. Діаметр РП ГКС в центрі сітківки значно менше ніж на периферії. Рецептивні поля ГКС мають круглу форму і концентричну будову: круглий збудливий центр та кільцеву тормозну периферичну зону (РП з ON-центром) або навпаки (РП з OFF-центром). У випадку РП з ON-центром світло викликає максимальний ефект, якщо світлова пляма повністю заповнює центр (просторова сумація), в той час коли для ефекту максимального пригнічення світло має покрити всю кільцеву область периферії. Рецептивні поля з OFF-центром будуть реагувати протилежним чином, пригнічення відбудеться при освітленні центру. Одночасне збудження близькорозташованих ГКС призводить до взаємного гальмування [105, 21, 151]. В основі даного ефекту лежить латеральне гальмування. Рецептивні поля сусідніх ГКС частково перекриваються, тому одні й ті самі рецептори приймають участь в генерації відповідей декількох нейронів. Завдяки круглій формі РП ГКС поточно описують зображення на сітківці, яке представлене мозаїкою зі збуджених нейронів. Дана концепція РП є ключем у розумінні сигналів не тільки на рівні сітківки, а й далі в підкоркових та коркових зорових центрах.

1.1.3. Аксони гангліозних клітин в структурі зорового нерва та зорових шляхів

Зоровий нерв (ЗН) – друга пара черепних нервів, початкова частина провідних шляхів зорового аналізатора. Разом з іншими відділами зоровий нерв забезпечує передачу нервових імпульсів викликаних світловою стимуляцією від рецептивного апарату зорового аналізатору – сітківки, до зорового центру в корі потиличної долі мозку. Зоровий нерв утворений аксонами ГКС, що виходять через решітчасту пластинку білкової оболонки, залишають очне яблуко і, сполучившись між собою в міцний пучок, утворюють округлий товстий нерв. Анатомічно розрізняють чотири частини ЗН: внутрішньоочну, очноямкову, каналъну та внутрішньочерепну. Внутрішньоочна частина є найкоротшою частиною нерва і розміщена в очному яблуці. В свою чергу внутрішньоочна частина по розміщенню відносно решітчастої пластинки білкової оболонки ока, поділяється ще на три частини: перед-, внутрішньо- та запластинкову частини. Очноямкова частина проходить у товщі жирового тіла очної ямки. Канальна частина ЗН проходить через кістковий зоровий канал. Внутрішньочерепна частина проходить в порожнині черепа від зорового каналу до зорового перехрестя [243, 239].

У порожнині черепа ЗН сполучаються та утворюють зорове перехрестя (хіазма). Перехрестя волокон ЗН в хіазмі є неповним. Волокна від зовнішньої частини сітківки не перехрещуються і входять до складу зорових шляхів того самого боку. Волокна від внутрішньої частини сітківки перехрещуються в хіазмі, переходять на протилежний бік та входять до складу зорового шляху протилежного боку. Коли людина дивиться прямо перед собою, всі предмети, що не перебувають на середній вертикалі, попадають на рецептивні поля клітин носової половини сітківки одного ока й скроневої половини сітківки іншого ока. Таким чином, кожна точка зовнішнього простору проектується на відповідні точки обох сітківки. Подальші відображення всієї сукупності таких точок у зоровій системі називаються ретинотопічними проекціями поля зору [228, 2].

Ретинотопічна організація характерна для всієї структури зорової системи [14, 199]. За рахунок часткового перехресту зорових нервів у хіазмі імпульси сприймаються відповідними ділянками обох сітківки і надходять в одну півкулю головного мозку. Цим забезпечується бінокулярність зору, тобто створення спільного для обох очей поля зору. За винятком крайньої периферії носової частини сітківки, де поле зору монокулярне.

Назад від перехрестя відходять два тяжі – зорові шляхи, в яких більшість перехрещених нервових волокон розміщені вентролатерально. А неперехрещених – дорсолатерально.

Кожний зоровий шлях поділяється на два корінці:

- бічний корінець, який закінчується в сірій речовині бічного колінчатого тіла;
- присередній корінець, який закінчується в сірому шарі *colliculus superior* (верхніх горбків пластинки покрівлі середнього мозку) [59, 68].

Частина волокон бічного корінця відводить коллатералі до подушки таламуса. У результаті такого розгалуження створюються паралельні шляхи від ГКС до первинних субкортикальних зорових центрів. При цьому гілки зберігають свою ретинотопічну специфіку, тобто приходять у пункти, які у сукупності утворюють впорядковану проекцію сітківки. Подушка таламуса, ядра латерального колінчатого тіла й *CS* – це первинні субкортикальні зорові центри.

Формування зорового образу представляє собою складний процес сприйняття, інтеграції, передачі та обробки сенсорного сигналу. Важливим механізмом в формуванні зорового образу є передача нервовими волокнами зорового тракту інтегрованого в сітківці сигналу в підкоркові зорові центри. Проекції сітківки в верхні шари *CS* відображають перший рівень передачі та обробки сенсорних сигналів [195, 156, 145].

1.1.4. Структура та зорова функція *colliculus superior*

Colliculus superior є субкортикальним зоровим рефлекторним центром. Анатомічно представлений верхніми горбками покрівлі середнього мозку, що мають вид півсфер. Від *CS* у латеральному напрямку відходять стовщення у вигляді валиків – ручки горбків. Ручка верхнього горбка (*brachium colliculi cranialis superiores*) розташовується позаду від таламуса і направляється до латерального колінчатого тіла.

Від спинного мозку до покрівлі середнього мозку йде спинноталамічний шлях, а вниз від покрівлі – тектоспинальний і тектобульбарний провідні шляхи, які забезпечують двосторонній зв'язок зорових і слухових підкоркових центрів з руховими центрами довгастого й спинного мозку.

Нейрони *CS*, що одержують сигнали від сітківки, посилають свої аксони до великого ядра в таламусі – подушка таламуса. Поряд з первинними зоровими сигналами нейрони *CS* одержують інформацію про положення голови, а також перероблену зорову інформацію, що вертається по петлі зворотного зв'язку від нейронів первинної зорової кори. На цій підставі припускають, що горбки є первинними центрами інтегрування інформації, що використовується нами для просторової орієнтації в мінливому світі.

В цілому вважається, що основна функція *CS* полягає в організації реакції насторожування та так званих старт-рефлексів – безпосередніх реакцій, які орієнтовані на обумовлені точки в персональному егоцентричному просторі, координати якого задаються положенням тіла. Активація середнього мозку в цих випадках призводить до підвищення тону м'язів, збільшення частоти серцевих скорочень, відбувається підготовка до уникнення або оборонної реакції. Кожен з шарів *CS* містить топологічну карту навколишнього простору в ретинотопічних координатах, і активація нейронів у точці такої карти викликає відповідну реакцію, спрямовану на відповідну точку простору.

Для приматів *CS* вивчалось переважно у зв'язку з його роллю в управлінні рухами очей. Візуальне збудження від сітківки, або «команда» від неокортексу,

створює на картах *CS* певну «зону активності», яка, при достатній її інтенсивності, викликає саккадний рух очей. Але навіть у приматів *CS* також бере участь у рухах загального цілеспрямованого повороту голови і протягування рук [122], а також у зрушенні уваги, що не пов'язане ні з яким видимим рухом [106]. У інших тварин *CS* бере участь в широкому спектрі рухових реакцій, включаючи поворот всього тіла у щурів, риб або птахів; вистрілювання язиком в сторону здобичі у жаб; цілеспрямована атака змій і т. д. Для деяких видів нессавців, включаючи рибу і птахів, *CS* є однією з найбільших компонентів їх мозку. У ссавців, особливо у приматів, масивна експансія церебральної кори мозку залишила *CS* значно меншу частку в загальному обсязі мозку [152]. Але навіть у них він залишається важливою частиною з функціями первинної інтеграції інформації, що забезпечує рухи очей [129].

Структурно *CS* складається з декількох шарів, число яких відрізняється у різних видів тварин. При цьому верхні шари пов'язані з обробкою інформації від очей та інших сенсорних систем, а глибинні шари пов'язані з моторними діями, наприклад, активацією рухів очей та іншими рухами. Крім цього є ще й середні шари, що містять мультимодальні сенсорні клітини, які також володіють моторними властивостями.

1.1.5. Шарова структура і проекції *colliculus superior*

Внутрішня структура *CS* істотно розрізняється у хребетних різних видів. Але загалом можна вказати на чітке розділення між верхніми рівнями, які отримують проекції від візуальної системи і реагують в основному на візуальні стимули, і більш глибокими рівнями, які отримують нейронні проекції різних типів і самі проектується в різні моторні, пов'язані з ними структури мозку. Різниця між ними завжди настільки чітка і постійна, що деякі вчені пропонують їх розглядати як окремі структури мозку [52, 142].

Для ссавців виділяють сім шарів або нейронних пластинок [217]. Перші три з них називаються верхніми шарами (*superficiale colliculus superior*):

Пластинка I або *SZ* (*stratum zonale* – поверхневий шар), це дуже тонкий шар, що складається з невеликих мієлінізованих аксонів разом із залишковими і горизонтальними клітинами.

Пластинка II або *SGS* (*stratum griseum superficiale* – верхній сірий шар), містить безліч нейронів різної форми і типів.

Пластинка III або *SO* (*stratum opticum* – оптичний шар), складається в основному з аксонів, що приходять з оптичного тракту.

Далі йдуть два проміжних або середніх шари (*intermediale colliculus superior*):

Пластинка IV або *SIG* (від *stratum griseum intermediale* (проміжний сірий шар) – найтовщий шар, який складається з нейронів різного типу і розмірів. Цей рівень по товщині часто дорівнює всім іншим разом узятим, тому в ньому іноді ще виділяють верхні і нижні шари

Пластинка V або *SAI* (*stratum album intermediale* (проміжний білий шар)), складається в основному з аксонів від самих різних джерел.

Два нижніх шари:

Пластинка VI або *SGP* (*stratum griseum profundum* – нижній сірий шар) складається з щільно упакованих нейронів і аксонів між ними.

Пластинка VII або *SAP* (*stratum album profundum* – нижній білий шар) знаходиться точно над центральним сірим тілом (*periaqueductal gray*) і складається тільки з аксонів.

Верхні шари *CS* отримують імпульси в основному від ГКС, візуальних зон кори і ще двох пов'язаних з тектумом структур – претектума (*pretectum*) і парабігеміального ядра (*parabigeminal nucleus*). Проекції від сітківки охоплюють всю область верхніх шарів і є формально білатеральним (від кожного ока в обидві половинки *CS*), хоча контрлатеральні проекції (від протилежного ока) значно переважають іпсолатеральні в приблизному співвідношенні 95 % до 5 %.

Кортикальні проєкції приходять переважно від первинної візуальної кори, вторинної візуальної кори і фронтальних очних полів [52, 77, 231, 142].

Вихідні проєкції *CS* направлені в подушкоподібне ядро (*pulvinar*) і латеральну середню зону таламуса, яка в свою чергу проєктується в зони кори зв'язані з контролем рухів очей. Крім того проєкції від верхніх шарів до претектальних ядер і латерального колінчастого тіла таламуса.

В середні і нижні шари *CS* входять проєкції від різноманітних сенсорних і моторних структур мозку. Кількість проєкцій від різних зон кори до цих шарів значно варіюється для різних видів тварин [31]. Ці шари *CS* отримують проєкції від спинних ядер трійчастого нерва (*spinal trigeminal nucleus*), які передають сомато-сенсорну інформацію від обличчя, а також проєкції від гіпоталамуса (*hypothalamus*), від субталамічної невизначеної зони (*zonaincerta*), таламуса (*thalamus*), і *colliculus inferior* [233, 123, 200].

1.2. Нейропередача в проєкціях сітківки в *CS*

Електрофізіологічні та імуноцитохімічні експерименти показали наявність збуджувальних та гальмівних синаптичних контактів між ГКС та нейронами *CS* [1, 191, 94, 149, 10, 192, 146]. Проєкції ГКС в *CS* відображають перший рівень передачі та обробки сенсорних сигналів та зазнають значного залежного від активності вдосконалення незадовго від народження і до кінця третього постнатального тижня [145]. Збуджувальна нейротрансмісія опосередковується вивільненням глутамата та активацією постсинаптичних НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів.

НМДА-рецепторканалні комплекси є тетрамерами і складаються з двох NR1 та двох NR2 субодиниць. НМДА-рецепторканалні комплекси характеризуються низькою вибірковістю проникності для іонів Na^+ , K^+ и Cs^+ . Однак однією з їх найважливіших характеристик є висока проникність для іонів Ca^{2+} та наявність потеанціалзалежного блокування НМДА-рецепторканалних комплексів іонами Mg^{2+} [131, 153, 5]. Електрофізіологічні дані свідчать, що для

активації НМДА-рецепторканального комплексу необхідна активація двох незалежних сайтів зв'язування гліцину та двох незалежних сайтів зв'язування глутамата. NR1 містить в собі сайт зв'язування гліцину, NR2 — сайти зв'язування глутамата. NR1 субодиниця є обов'язковою для каналної активності, NR2 — визначає властивості каналу і є модулятивною [146,188]. Кінетика інактивації, аффіність до глутамата, проникність, чутливість до потенціалзалежного Mg^{2+} -блоку рецепторканального комплексу визначається одним з чотирьох можливих варіацій NR2 субодиниці (A, B, C, D). Так, було показано залежне від активності прискорення кінетики інактивації постсинаптичних струмів, опосередкованих активацією лише НДМА-рецепторканального комплексу, протягом формування ретинотопічних проєкцій в *CS*. Таке прискорення опосередковувалось експресією NR2A [213, 76]. При чому лише НМДА-рецепторканальні комплекси виявляються в ретинотопічних проєкціях в *CS* на ранніх етапах розвитку [118, 45, 76]. Вони відіграють вирішальну роль у процесі синаптогенезу та вдосконаленні цих синаптичних проєкцій [33, 6, 64, 182, 110, 187, 196].

АМПА-рецепторканальні комплекси утворюються тетра- та пентамерними комбінаціями GluR1-GluR4 субодиниць будь-якого складу [78, 79]. Вони характеризуються проникністю для Na^+ і K^+ і невелика група з суттєвою провідністю для Ca^{2+} [86, 158]. Серед гомомерних рецепторканальних комплексів найшвидшу кінетику інактивації мають GluR4 ($\tau = 0,9$ мс) і найповільнішу — GluR3 ($\tau = 6,1$ мс) [143]. АМПА-рецепторканальні комплекси опосередковують швидку збуджувальну нейропередачу.

З використанням методів іммуноцитохімії та електрофізіології було показано, що в синаптичних контактах між ГКС та нейронами *CS* експресуються GluR1 та GluR2/GluR3 рецептори [237, 160]. У зрілих синапсах саме активність АМПА-рецепторканальних комплексів визначає силу синаптичного зв'язку та відіграє провідну роль в передачі зорової інформації [3, 25,190].

У багатьох відділах мозку активність НМДА-рецепторканальних комплексів спадає з розвитком синаптичних структур та зі зниженням здатності синаптичних контактів до структурної модифікації [22]. Недавні роботи показали, що

активність НМДА- рецепторканалних комплексів може змінювати структуру постсинаптичної щільності шляхом включення та усунення АМПА-рецепторканалних комплексів і, таким чином, модулювати силу та стабільність синаптичних контактів у процесі розвитку [193]. Включення АМПА-рецепторканалних комплексів в постсинаптичну мембрану та їх усунення шляхом інтерналізації є важливим процесом регуляції синаптичної сили, що лежить в основі механізму пам'яті та навчання. Нещодавні експерименти *in vivo* виявили, що хронічне блокування НМДА- рецепторканалних комплексів не впливає на розвиток та роботу АМПА- рецепторканалних комплексів у зрілому організмі [35].

Окрім цього серія робіт відображає наявність ГАМК-ергічної нейротрансмісії між ГКС та нейронами *CS* [191, 87, 171]. Гальмівна синаптична передача опосередковується активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів на постсинаптичній мембрані нейронів *CS* [3, 25, 190, 138, 139].

В результаті взаємодії ГАМК з ГАМК-чутливими рецепторами відкриваються хлорні канали, що призводить до гіперполяризації та гальмування постсинаптичного нейрона. Ідентифіковано чотири типи субодиниць ГАМК_A-рецепторканалних комплексів α , β , γ , δ [91, 215]. Комбінації цих субодиниць обумовлюють існування родини ізоформ рецепторів, при чому комбінація субодиниць визначає кінетику активації та інактивації, впливає на десенситизацію [8].

Зниження активності НМДА-рецепторканалних комплексів в процесі розвитку співпадає в часі з завершенням формування ретинотопічних проєкцій сітківки в *CS*, з втратою здатності синаптичних контактів до реорганізації та зі збільшенням активності ГАМК_A- рецепторканалних комплексів [117, 213, 167]. Однак досі всі складові процесу формування проєкцій сітківки в *CS* не відомі та потребують подальшого вивчення.

1.3. Пошкоджуючий вплив гіпоксії

Гіпоксія або дефіцит кисню в організмі або окремих органах чи тканинах є не тільки патологічним процесом, що лежить в основі багатьох захворювань чи супроводжує їх, але є ще і явищем фізіологічної адаптації до певних навколишніх умов чи фізичних навантажень [253, 251]. Для забезпечення нормального функціонування організму необхідне підтримання оптимального співвідношення між постачанням та споживанням кисню. Стан фізіологічної рухової та компресійної гіпоксії є прикладами адаптації за умов «дефіциту O_2 в фізіологічних умовах», коли споживання O_2 переважає над його постачанням в тканини, та «фізіологічного дефіциту O_2 », коли кисню недостатньо в повітрі, що вдихається. Гіпоксія спостерігається при порушенні балансу між надходженням, транспортом та споживанням кисню[246].

Розрізняють типи гіпоксії в залежності від причин і механізмів розвитку: гіпоксичну, дихальну, гемічну, циркуляторну, гістотоксичну та змішану [253, 246, 251].

Гіпоксична гіпоксія, розвивається при зниженні парціального тиску кисню в повітрі, що вдихається. Найбільш типовим прикладом цього типу дефіциту кисню є гірська хвороба. Прояви останньої залежать від висоти підйому над рівнем моря.

Дихальна (респіраторна) гіпоксія виникає в результаті порушення зовнішнього дихання: легеневої вентиляції, кровопостачання легень, дифузії кисню в них. Наслідком описаних порушень є зниження оксигенації артеріальної крові.

Гемічна гіпоксія, при якій знижена киснева ємність крові. Дана гіпоксія може спостерігатися при анеміях – зменшенні кількості гемоглобіну в крові або при гемічних отруєннях – зменшується вміст функціонально активного гемоглобіну.

Циркуляторна гіпоксія (застійна або ішемічна) зумовлена захворюваннями серця та кров'яних судин. Вона опосередкована, в основному, зменшенням хвилинного об'єму серця та зниженням швидкості кровотоку, тобто

сповільненням доставки кисню до тканин виникає як наслідок загальних або місцевих порушень кровообігу. При нормальному насиченні артеріальної крові киснем загальний об'єм кисню, що транспортується в тканини за одиницю часу знижено.

Гістотоксична (тканинна) гіпоксія при якій зменшується здатність тканин використовувати кисень. Причинами тканинної гіпоксії є: інактивація дихальних ферментів (цитохром оксидази під дією ціанідів, клітинних дегідрогеназ під дією ефіру, уретану, алкоголю, барбітуратів та інших речовин); порушення синтезу дихальних ферментів при дефіциті вітамінів В₁, В₂, РР, пантотенової кислоти, зменшення процесів окиснення і фосфорилування при дії розмежувальних факторів (отруєння нітратами, мікробними токсинами, тифоїдними гормонами та ін.); порушення мітохондрій іонізуючою радіацією, продуктами перекисного окиснення ліпідів, токсично діючими метаболітами при тяжких інфекціях.

Часто в організмі спостерігаються комбінації описаних видів дефіцитів кисню, що дало змогу виділити змішаний тип гіпоксії. Так, наприклад, хронічна гіпоксія часто ускладнюється тканевою недостатністю, за рахунок ураження дихальних ферментів.

Гіпоксії також розрізняють за поширеністю: місцеву і загальну гіпоксію; за швидкістю розвитку і тривалістю: блискавичну, гостру, підгостру і хронічну гіпоксію; за ступенем важкості: легку, помірну, важку і критичну (смертельну) гіпоксію.

Дія на організм фактора, що викликає гіпоксію будь-якого типу, супроводжується включенням взаємопов'язаних процесів двох категорій: одні - обумовлюють розвиток гіпоксії, інші забезпечують адаптацію організму до гіпоксії та спрямовані на підтримання нормального функціонування в даних умовах. Прояви і результат гіпоксій залежать від превалювання процесу розвитку або адаптації [251, 253, 245].

Висока чутливість нейронів ЦНС до дефіциту кисню загальновідома. Навіть короткочасне припинення постачання кисню до тканин головного мозку може

призвести до необоротних пошкоджень. Більш того питоме поглинання кисню різними тканинами головного мозку дуже сильно варіюється. Так питоме поглинання кисню тканиною сітківки та зоровими центрами на порядок вище показників інших відділів ЦНС [245]. Цей факт підтверджується тим, що при тимчасовому недостатньому надходженню кисню в мозок, в наслідок фізичного та емоційного навантаження, епілептичних припадків, відмічаються короточасні порушення зору (звуження кола зору, зміна кольоропередачі і т.д.) [159, 216, 172].

Як зазначалося раніше, гіпоксія є лідуєчим фактором в патогенезі багатьох захворювань, включаючи мозкові травми, дистрофії, інсульти. Крім того, гіпоксія опосередковує такі патології зору, як дистрофічні захворювання сітківки [202], зорового нерву [82, 47, 119, 20, 46], ретинопатії [4], глаукома [210], циркуляторна гіпоксія сітківки у недоношених дітей [7], вроджена катаракта [7]. Раніше було показано високу чутливість ГКС до гострої та короткотривалої гіпоксії [101]. Ряд авторів, в рамках досліджень ролі гіпоксії в нейродегенеративних патологіях зору та пошуку терапевтичних підходів в їх корекції, показали нейропротекторну дію різних активних речовин на ГКС за умов цілої сітківки та культури клітин при моделюванні гіпоксії *in vitro* [181, 238, 28]. Було також показано, що нейрональна дегенерація індукована гіпоксично-ішемічними ушкодженнями сітківки може опосередковуватися дією вільних радикалів [12], глутаматної ексайтотоксичністю [100], запаленням і порушенням гематоретинального бар'єру [99]. В деяких електрофізіологічних дослідженнях раніше було показано залежність частоти електричної імпульсації ГКС від ступеню дефіциту кисню [253]. В інших роботах описано можливе сповільнення процесів захвату глутамата ГКС та вивільнення захваленого глутамата з клітин Мюллера, деполяризацією цих клітин за умов дефіциту кисню [147, 205]. Обидва процеси сприяють розвитку глутаматної ексайтотоксичності та дегенерації нейронів сітківки [124, 9].

Ключові моменти гіпоксичного ураження саме проекцій сітківки в CS досліджені відносно детально на рівні структурних порушень та судинних реакцій за допомогою методів магнітно-резонансної томографії [44, 220, 24]. Разом з тим ефекти та механізми гіпоксичного впливу на нейропередачу в даних синапсах

дотепер досліджені не були. Саме тому визначення властивостей нейропередачі в синапсах між ГКС та нейронами *CS* в нормі та при гіпоксії є актуальною для розуміння механізмів гіпоксичних ушкоджень даної ланки зорової системи.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Обґрунтування вибору напряму дослідження

Попередні дослідження синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS проводилися або *in vivo* [195, 27, 145, 173] або *in vitro* на парасагітальних переживаючих зрізах CS [35, 117, 170, 237]. При цьому викликані постсинаптичні струми реєструвалися в “наосліп” вибраних клітинах CS у відповідь на електричну стимуляцію *stratum opticum*, оптичного пласту CS, який складається з великої кількості різних входних проекцій в тому числі і аферентних входів зорового тракту. Принципові недоліки вказаних попередніх досліджень синаптичних ефектів полягали у відсутності можливості ідентифікації конкретного пресинаптичного входу волокна та контролю виникнення в ньому потенціалу дії. У зв'язку з цим виникло питання розробки більш адекватного в даному аспекті об'єкту.

Методи культури клітин отримали широке використання в фармакологічних та електрофізіологічних дослідженнях. Перш за все це пов'язано з тим, що вивчення механізмів функціонування біологічних систем на ізольованих культурах клітин, дозволяє досліднику провести широку гамму повноцінних статистично підтверджених досліджень. Культура клітин називається первинною, якщо вона отримана в результаті ферментативної та/або механічної дисоціації тканини або органа, вирощена *in vitro* до початку субкультивування – першого пересіву. Вважається, що нейрони первинної культури розвиваються у генетично детермінованому напрямку властивому цим клітинам *in vivo*. Зберігають свої функціональні властивості та відтворюють функціонально-специфічні синаптичні зв'язки за умов *in vitro* [111].

Нейрони CS та ГКС відносяться до опорнозалежних клітин, тобто клітин, життєдіяльність яких можлива лише за умови прикріплення до субстрату – основи, на якій клітини можуть осісти та розпластатися. В моделі кокультури нейрони різних популяцій просторово розділяються на початковому етапі. В такій

системі, виходячи з умов посадки культур, значно полегшується ідентифікація клітин та стає можливим простежити проекції ГКС на CS.

Кокультура дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS, являє собою зручну та адекватну модель *in vitro* для вивчення властивостей синаптичної передачі аферентних входів сітківки в підкорковий зоровий центр та дає можливість працювати з окремими, добре ідентифікованими синаптично зв'язаними парами нейронів, які зберігають свої функціональні властивості.

2.2. Кокультування клітин сітківки та нейронів CS

Кокультування дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS щурів лінії Вістар (одна доба після народження) проводилося згідно з розробленою нами методикою. В моделі кокультури нейрони різних популяцій просторово розділені шляхом їхнього розміщення і осідання в суміжних компартментах спеціально виготовлених камер для кокультування.

2.2.1. Камера для кокультування опорнозалежних клітин

В процесі виконання роботи нами був розроблений та запропонований пристрій для кокультування (суміжного культивування) клітин (рис 2.1) [250].

Схема пристрою полягає в тому, що одна зі сторін силіконового кільця діаметром 16 мм та висотою 10 мм має гладку поверхню для герметичної фіксації з основою (покривним скельцем), а скляна перегородка товщиною від 0,13 до 0,17 мм, встановлена перпендикулярно до основи, поділяє камеру на два компартмента. Покривне скельце (основу) попередньо покривали поліорнітином ("Sigma", США) для поліпшення адгезії клітин. Утворену камеру з двома компартментами розміщували в чашці Петрі діаметром 35 мм для подальшого використання. Після експонування необхідного та достатнього для прикріплення

опорнозалежних клітин до основи камера з перегородкою знімалася. Далі протягом кокультивування аксони ГКС, долаючи межу розподілу, проростати в напрямку нейронів *CS* та формували синаптичні контакти, встановлюючи специфічні природні зв'язки.

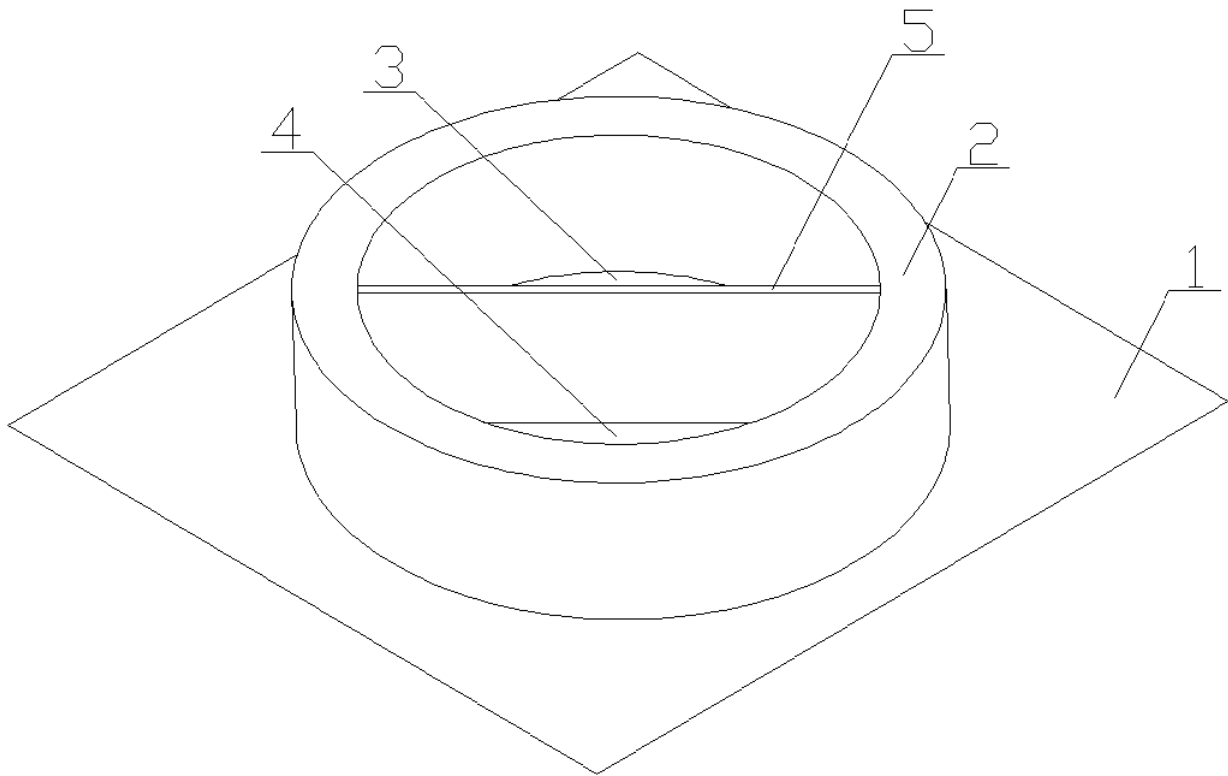


Рис. 2.1. Камера для суміжного культивування нейронів різних видів

1 – покривне скельце, 2 – силіконове кільце, 3, 4 – компартменти культуральної камери, утворені посередництвом скляної перегородки – 5.

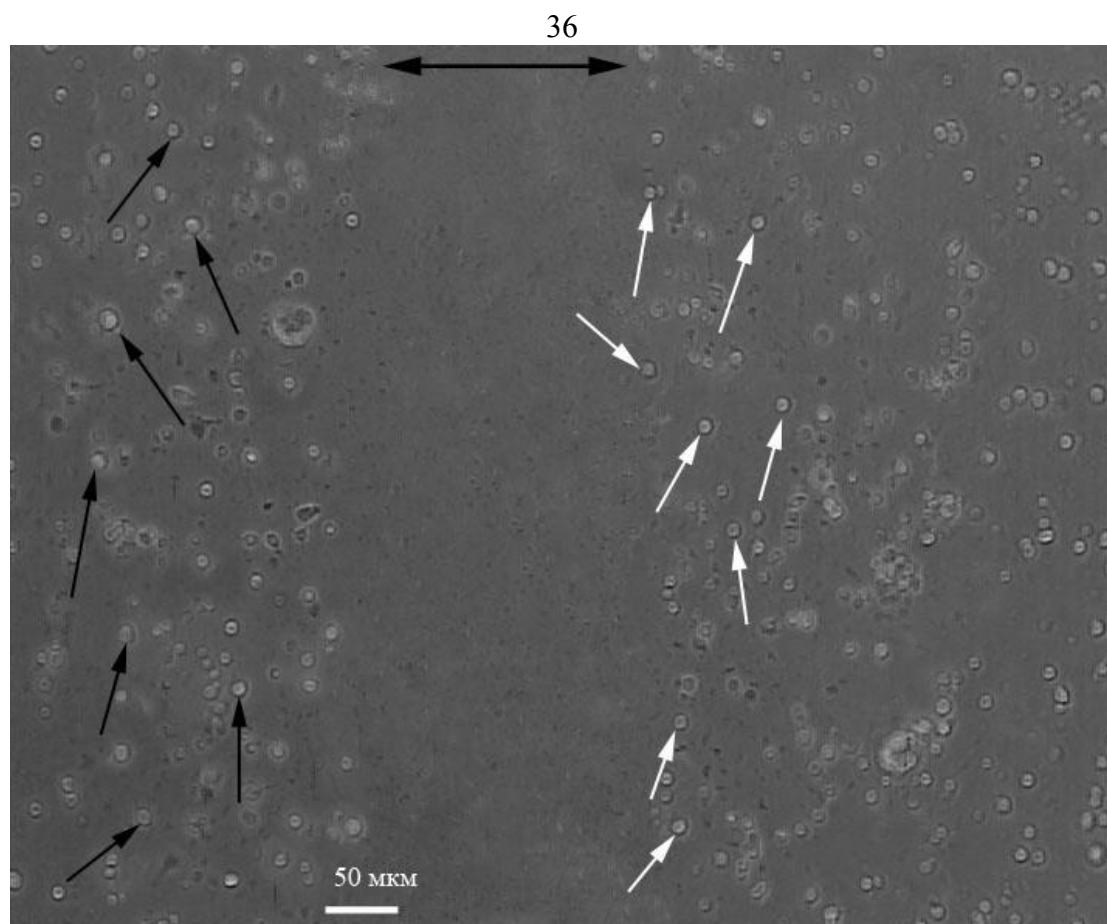
2.2.2. Приготування первинної кокультури клітин сітківки та нейронів *CS*

В дослідженнях використовували білих щурів лінії Вістар віком одна доба після народження, обох статей. Очне яблуко та *CS* брали від однієї тварини та занурювали в мінімальне середовище Ігла з буфером Нерес, до якого додавали 25 од/мл бензилпеніциліну та 25 мг/мл стрептоміцину сульфату (реактиви фірми “Sigma”, США). Після видалення рогівки, кришталика та склоподібного тіла

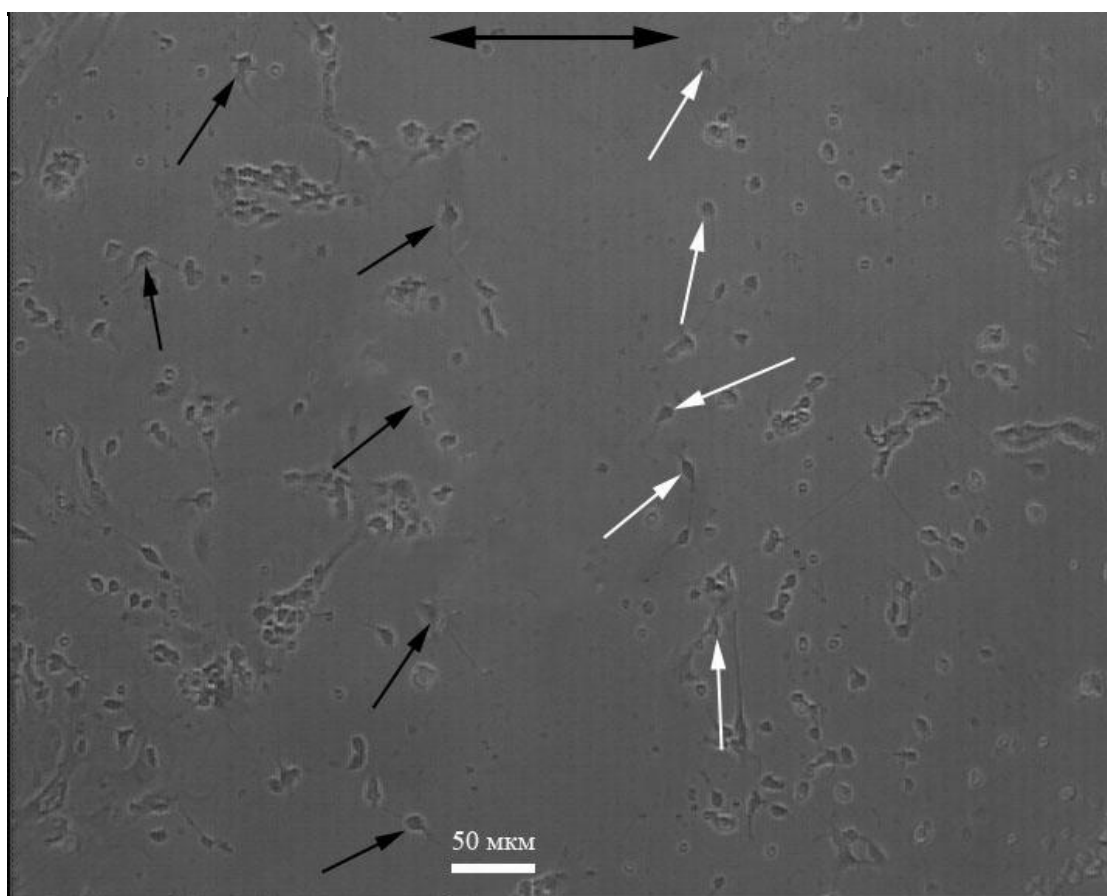
сітківку відокремлювали від хоріоїдної оболонки та розділяли на фрагменти. Ферментативна обробка сітківки трипсином (Trypsin type XI “Sigma”, США) тривала 8 хв при температурі 37 °C. CS очищали від судинної плівки, відділяли поверхневий шар (*superficial CS*) та розділяли на фрагменти. Ферментативна обробка CS трипсином тривала 10 хв при температурі 37 °C. Після ферментації тканини сітківки та CS декілька разів промивали середовищем для культивування: мінімальне середовище Ігла з додаванням 26 мМ натрію бікарбонату NaHCO_3 , 1,25 % розчину інсуліну, 25 од/мл бензилпеніциліну, 25 мг/мл стрептоміцину сульфату (реактиви фірми “Sigma”, США) та 10 % кінської сироватки (“Gibco”, США). Клітини сітківки та CS механічно розділяли за допомогою багаторазового пропускання через пастерівські піпетки різного діаметру. Щільність суспензій дисоційованих клітин і сітківки, і CS складала 2×10^4 клітин/см². Отримані суспензії клітин розміщали в окремі компартменти виготовлених камер для кокультивування на скельця, попередньо оброблені полі-L-орнітином. Кокультуру інкубували в атмосфері повітряно-газової суміші з підвищеним вмістом двоокису вуглецю (5 % CO_2), при температурі 37 °C та вологості не менше 80 % протягом 1 години. За цей час клітини обох популяцій прикріплялися до основи у відповідному компартменті (рис. 2.2. А). Після чого камери знімали (обережно відокремлювали силіконове кільце від покривного скельця) і додавали 2 мл середовища для культивування. В процесі кокультивування аксони ГКС мали можливість долати межу розподілу та формувати синаптичні контакти з нейронами CS (рис. 2.2. Б, В, Г).

Пригнічення проліферації гліальних клітин, які присутні в кокультурі проводили на третю добу культивування. Для цього в середовище додавали цитозин- β -D-арабіно-фуранозиду (ARAC; “Sigma”, США) в концентрації 7 мкМ. Режим обробки культури ARAC підбирався таким чином, щоб пригнітити проліферацію гліальних клітин на стадії, коли кількість астроцитів була достатньою для утворення гліального моношару.

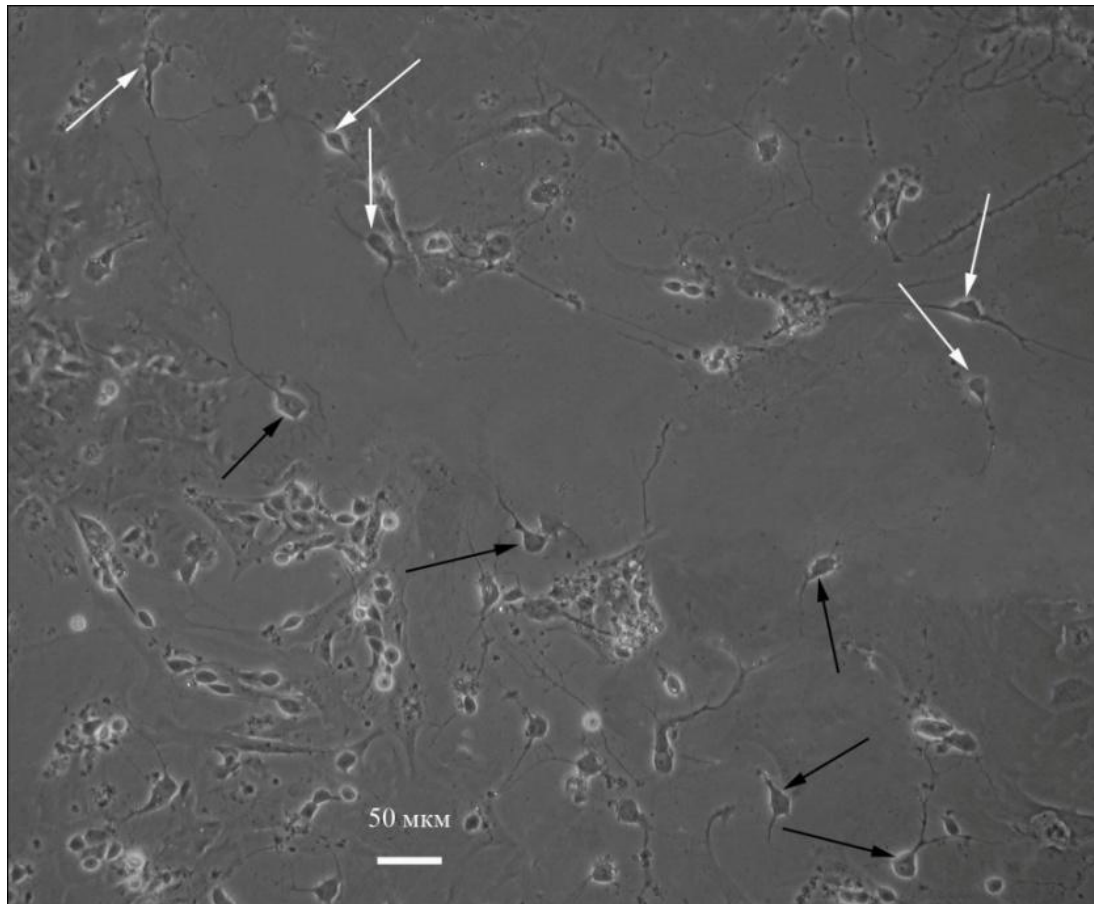
A



Б



В



Г

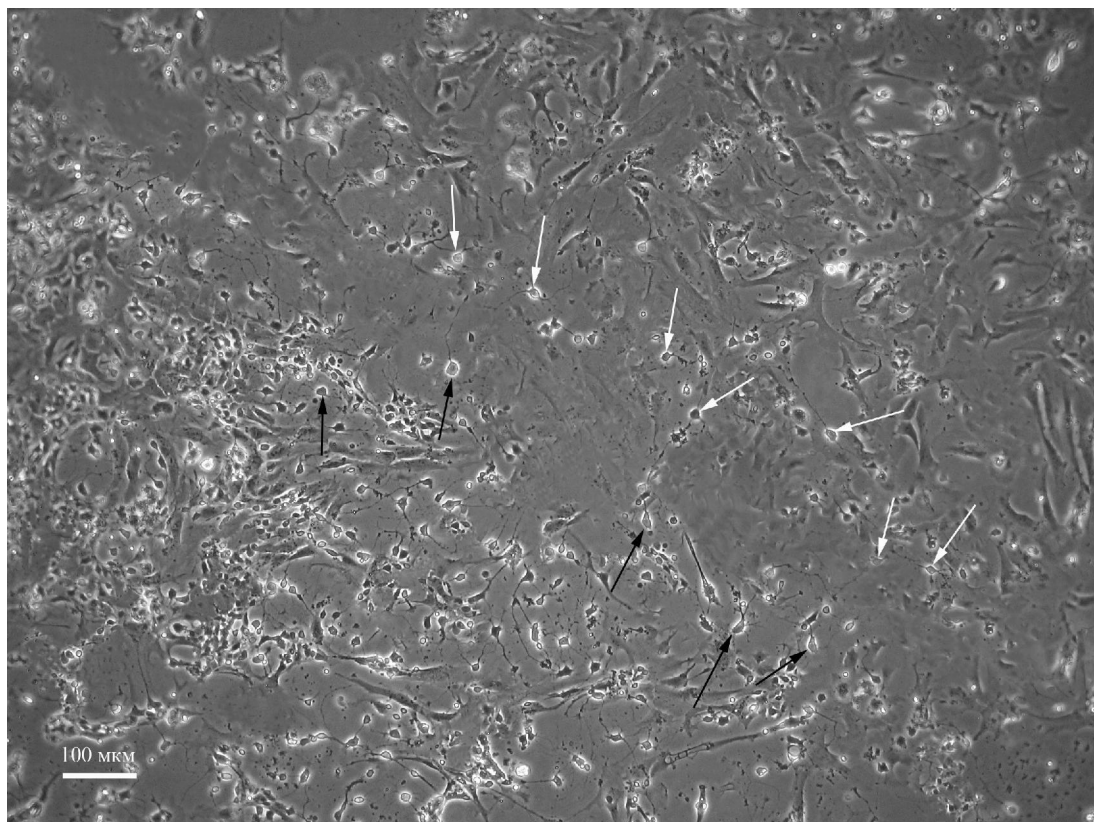


Рис. 2.2. Первинна кокультура дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS.

А – дисоційовані клітини сітківки (ліворуч) та нейрони CS (праворуч) через 1 годину після посадки; Б – нейрони на 3 добу кокультивування; В – 9 добу кокультивування; Г – на 16 добу кокультивування. Чорними стрілками вказані ГКС, білими – нейрони CS; двостороння стрілка вказує на межу розподілу клітин різних популяцій.

Повну заміну середовища для культивування – на четверту добу з послідуною частковою заміною кожні 5 діб.

Стерилізацію середовищ забезпечували за допомогою фільтрації через мембрани з діаметром пор 0,22 мкм.

2.3. Метод «петч-клемп» в конфігурації «ціла клітина»

Електрофізіологічна ідентифікація ГКС та реєстрація постсинаптичних струмів (ПСС) синаптично зв'язаних пар проводилась з використанням методу петч-клемп в конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації струму або потенціалу. Вперше методика реєстрації макроскопічних струмів через іонні канали всієї клітини була запропонована Неєром і Сакманом [66, 150, 254]. Фіксація струму/потенціалу підтримується за рахунок подачі різниці потенціалів на два хлор-срібні електроди, один з яких індиферентний електрод, занурений в зовнішньоклітинний розчин робочої камери, інший – у внутрішньоклітинний розчин скляної мікропіпетки, що контактує з клітиною. Після досягнення щільного гігаомного контакту між мікропіпеткою та мембраною клітини, ініціюється прорив ділянки контактної мембрани і внутрішньоклітинне середовище поступово замінюється вмістом мікропіпетки. Таким чином даний метод дозволяє контролювати внутрішньоклітинний іонний склад.

2.4. Методика парної реєстрації

В експеримент відбирали пари синаптично зв'язаних ГКС і нейронів *CS*, які візуально ідентифікували за морфологічними особливостями цих популяцій клітин, простежуючи проекції пресинаптичних аксонів. Гангліозні клітини сітківки ідентифікували за встановленими морфологічними та електрофізичними параметрами: 1) діаметр соми нейрона [63, 113]; та 2) здатність підтримувати специфічну електричну активність у відповідь на деполяризуючий поштовх струму [43, 113]. Діаметр соми нейрона визначали, як середнє арифметичне максимальних діаметрів соми за двома перпендикулярними осями.

Покривне скельце з кокультивованими нейронами розміщали в робочій камері, заповненій стандартним зовнішньоклітинним розчином такого складу (мМ): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 20, глюкоза – 10 (всі реактиви фірми “Sigma”, США); pH 7,4. Постсинаптичний струм, опосередкований активацією тільки НМДА-рецепторканалних комплексів, при підтримуваному потенціалі – 70 мВ з використанням стандартного розчину неможливо було виявити. Цей ефект пояснюється потеанціалзалежним блокуванням НМДА- рецепторканалних комплексів іонами Mg²⁺ [153, 131]. НМДА-рецепторопосередковані викликані та спонтанні постсинаптичні струми (вПСС та сПСС, відповідно) реєстрували в безмагнієвому зовнішньоклітинному середовищі при – 70 мВ. Мініатюрні постсинаптичні струми (мПСС) різної ергічності реєстрували в номінально безкальцієвому розчині з додаванням 1 мкмоль/л тетродотоксина, при наявності блокаторів НМДА- або АМПА-ергічної нейропередачі DL-APV (20 мкмоль/л) або DNQX (20 мкмоль/л) відповідно.

А

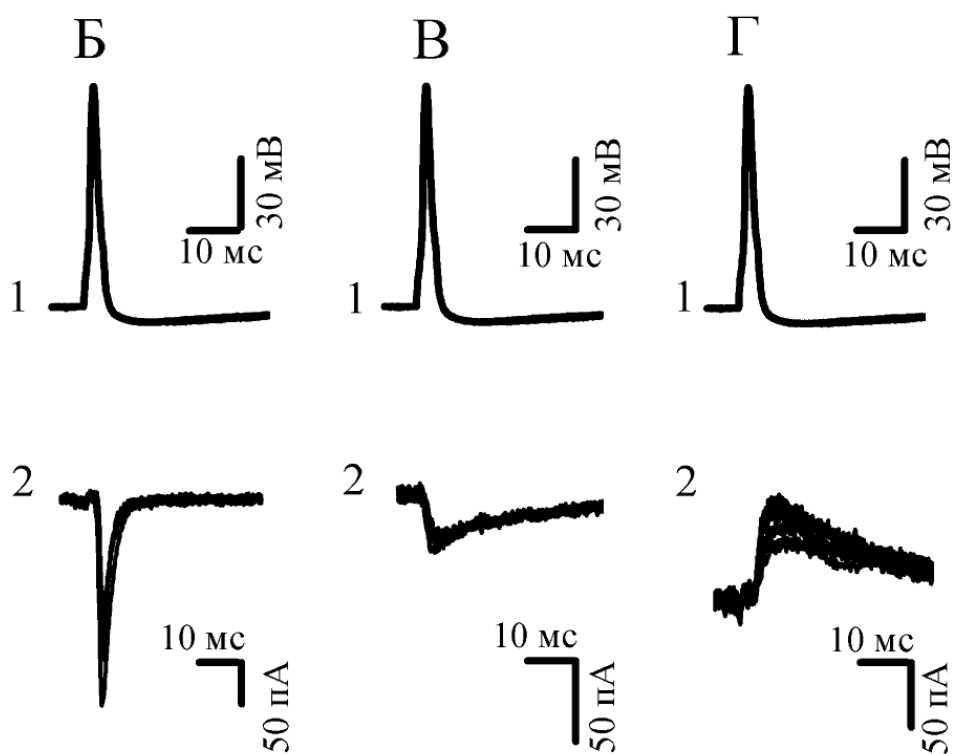
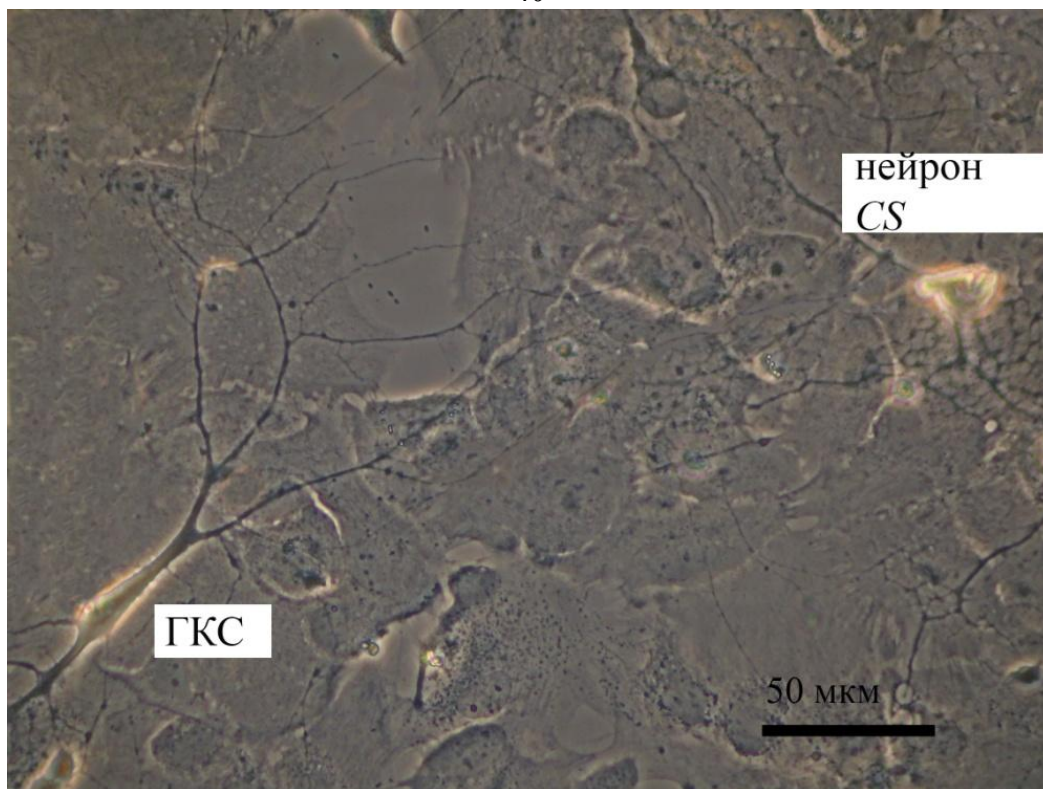


Рис. 2.3. Парна реєстрація в синаптично зв'язаних парах ГКС та нейронів *CS*.

А - Мікрофотографія синаптично зв'язаної пари ГКС та нейрона *CS* на 27 добу культивування. Б, В, Г - приклади типових АМПА-, НМДА- та

ГАМК_A-рецепторопосередкованих постсинаптичних струмів (2) нейронів CS у відповідь на генерацію потенціалу дії (1) в ГКС відповідно.

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

В усіх експериментах концентрації іонів хлору для зовнішньо- та внутрішньоклітинного розчинів становили 151–144 та 2 ммоль/л відповідно. За цих концентрацій при підтримуваному потенціалі хлорні ПСС через канали ГАМК_A-рецепторканальних комплексів мали вихідний напрямок та гіперполяризували мембрану нейронів, а струми через канали іонотропних глутаматних рецепторів – вхідний напрямок і деполяризували. Таким чином, під час реєстрації ставало можливим візуально розрізняти збуджувальні та гальмівні постсинаптичні струми, що значно полегшувало аналіз експериментальних результатів.

Відводили трансмембранні струми та потенціали у парах ГКС і нейронів CS методом парного «петч-клемпу» у конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації потенціалу/струму одночасно на пре- та постсинаптичній клітині. Пресинаптичну клітину – ГКС – утримували в режимі фіксації струму. ПД викликали деполяризуючими поштовхами струму тривалістю 3–5 мс, амплітудою 100–300 пА з частотою 0,5 Гц. Постсинаптичний нейрон CS утримували в режимі фіксації потенціалу на рівні – 70 мВ та реєстрували вПСС у відповідь на кожний пресинаптичний ПД. Метод парного «петч-клемп» дає змогу одночасно контролювати виникнення ПД на сомі ГКС і реєструвати ПСС на сомі нейрона CS. Експерименти проводили при 19–24 °C.

2.5. Контроль якості фіксації потенціалу на мембранах нейронів

Контроль якості фіксації потенціалу протягом експерименту здійснювали за допомогою моніторингу варіацій значень амплітуди струму витоку ($I_{\text{вит}}$) та сталої часу ємнісного струму ($\tau_{\text{ємн}}$) у відповідь на короткий (10 мс) гіперполяризуючий прямокутний стимул невеликої амплітуди (-10 мВ). Протягом експерименту амплітуда $I_{\text{вит}}$ визначається як базова лінія струму відносно нульового значення і є показником ефективності ізоляції у ланцюзі «петч-піпетка – клітина». У досліджуваних нейронах значення $I_{\text{вит}}$ не перевищувало -100 пА.

Стала часу ємнісного струму є функцією двох важливих параметрів: $\tau_{\text{ємн}} = R_{\text{посл}} \cdot C_m$, де $R_{\text{посл}} = R_{\text{пінет}} + R_{\text{доступ}}$ – послідовний опір відображає опір доступу при постійності опору піпетки; C_m – ємність клітини, є показником функціонального стану нейрону.

Отримані результати аналізували лише в тому разі, якщо варіації значень $\tau_{\text{ємн}}$ та $I_{\text{вит}}$ не перевищували 20 %.

2.6. Квантовий аналіз постсинаптичних струмів

Основними параметрами базової квантової теорії вивільнення нейромедіатора [40, 97, 174] є: q – величина кванту (амплітуда ПСС у відповідь на вивільнення одного кванту трансмітера), p – середня ймовірність вивільнення нейромедіатора, n – середня кількість сайтів вивільнення, m – середній квантовий вміст (середня кількість квантів медіатора, що вивільняються) визначали наступними двома методами.

Ми застосували два незалежних методи базового квантового аналізу: метод «мініатюр» і гістограмний метод [225]. Перший метод, який часто називають «прямим методом», базується на припущенні про те, що амплітуда мініатюрного

ПСС ідентична постсинаптичній відповіді на одиничну квантову подію: $A_{\min} \equiv q$.

Середній квантовий вміст розраховується за формулою:

$$m = \frac{A}{q} \quad (1)$$

де A – середня амплітуда вПСС. 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 постсинаптичній відповіді на одиничну квантову подію. У синапсах ЦНС імовірність вивільнення медіатора досить висока, тому для адекватного квантового аналізу ми використовували просту біноміальну статистику. Ймовірність спостереження певної кількості квантових одиниць (x) в одній реєстрації ППС є постійною:

$$P(x) = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x (1-p)^{n-x} \quad (2)$$

Згідно з простою біноміальною моделлю середній квантовий вміст розраховується за формулою:

$$m = n \cdot p \quad (3)$$

Критерієм придатності біноміальної статистики для аналізу експериментальних результатів є відповідність значень квантового вмісту, розрахованих за допомогою першого та другого методів.

2.7. Протоколи індукції короткочасної пластичності при парній стимуляції в синапсах ГКС та нейронів CS

Для дослідження короткочасної пластичності використовували протоколи парної стимуляції. Пари ПД викликали в пресинаптичній ГКС короткими деполяризуючими поштовхами струму тривалістю 3–5 мс та амплітудою 100–300 пА з міжстимульними інтервалами 20, 50, 100, 200, 500 та 2000 мс. Пари

стимулів струму прикладали з частотою 0.5 с^{-1} . Постсинаптичний нейрон *CS* утримували в режимі фіксації потенціалу на рівні -70 мВ та реєстрували вПСС у відповідь на пари пресинаптичних ПД. Вимірювання амплітуд пар вПСС при стимуляції з короткими міжстимульними інтервалами було ускладнено, так як другий вПСС накладався на фазу спаду першого вПСС. Тому амплітуди пар вПСС при малих міжстимульних інтервалах вимірювали наступним чином (рис. 2.4.).

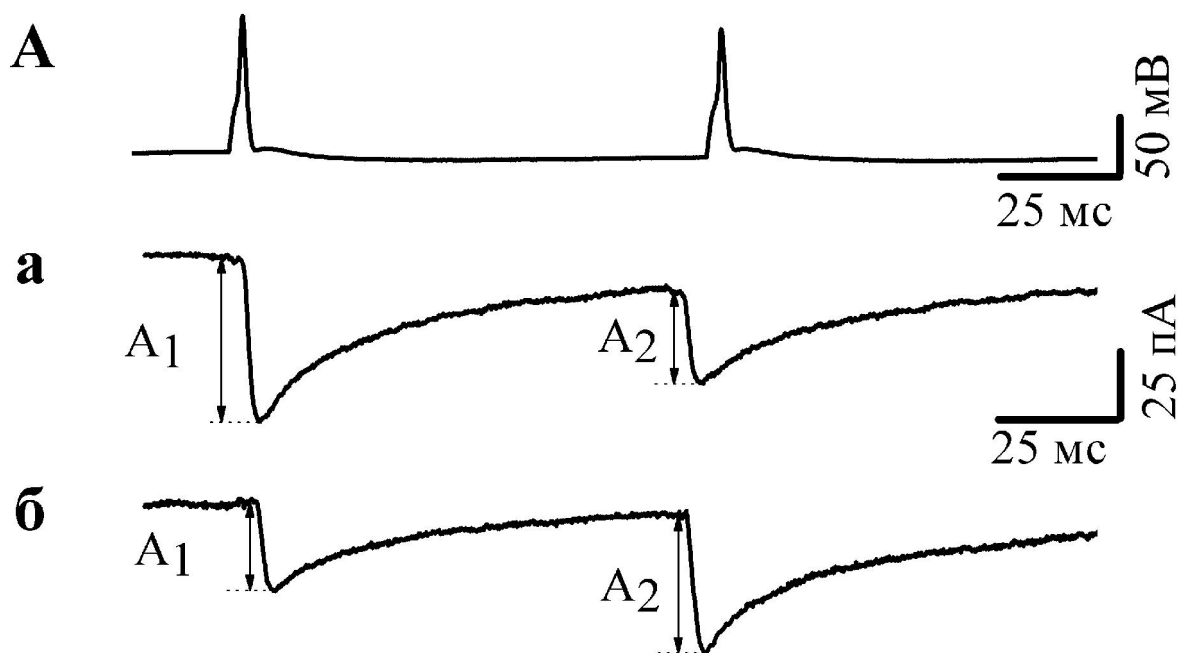


Рис. 2.4. Приклади вимірювання амплітуд викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) при парній пресинаптичній стимуляції з коротким міжстимульним інтервалом.

А — запис пари викликаних потенціалів дії (ПД) на пресинаптичній ГКС з міжстимульним інтервалом 100 мс. **а, б** — записи вПСС на нейроні *CS* при значенні підтримуваного потенціалу -70 мВ . A_1, A_2 — амплітуди вПСС на перший та другий стимули відповідно.

2.8. Методи базового та повного квантового аналізу

Аналізували пари монофазних вПСС, які виникали у відповідь на генерацію пари ПД в пресинаптичному нейроні *CS*. Коефіцієнт парної стимуляції (*КПС*) використовували для чисельної характеристики зміни ефективності синаптичної передачі. *КПС* є нормованим відношенням амплітуд двох послідовних вПСС, розділених невеликим проміжком часу. $KPC = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\%$, де A_1 та A_2 – амплітуда першого та другого вПСС відповідно. У випадку, коли $KPC < 100\%$, можна говорити про ефект депресії, а коли $KPC > 100\%$ – про ефект полегшення.

Для оцінки квантових та біноміальних параметрів ми використовували методи базового та повного квантового аналізу [224]. Відповідно до базової біноміальної моделі ймовірність вивільнення нейромедіатора в досліджуваних синапсах розраховується за наступним рівнянням:

$$p = 1 - \frac{E \cdot CV^2}{q \cdot (1 + CV_q^2)} \quad (4)$$

де CV та CV_q – коефіцієнт варіації амплітуд вПСС та одиничних квантових подій q відповідно.

В основі даних методів лежить певна модель – ідеалізація, в якій ми ототожнюємо кількість активних зон з кількістю сайтів вивільнення і припускаємо, що варіація ймовірності вивільнення мізерна. Перший метод базується на припущенні того, що відоме значення максимальної амплітуди вПСС і для біноміального розподілення представляється: $A_{\text{макс}} = n \cdot q$. Тоді з урахуванням (1) та (3):

$$p = \frac{A}{A_{\text{макс}}} \quad (5)$$

Дане припущення є вірним при нульовому стандартному відхиленні шуму ($S_{\text{ш}}=0$) та при великих значеннях p та кількості реєстрацій (N). Квантовий вміст оцінюється наступним чином:

$$m = \frac{(1-p)}{CV^2}, \quad (6)$$

Параметри n і q оцінюються за допомогою (3) та (1) відповідно. Другий метод базується на тому, що за умов реального експерименту стандартне відхилення струму не є нульовим і кількість реєстрацій обмежена, тому для оцінки параметра p використовують *trial-to-error* метод:

$$p = \frac{A}{\left\{ A_{mp} - 0.3 \cdot S_{uu} \cdot \ln \left[\frac{2N \cdot A}{(A_{mp} - S_{uu})} \right] \right\}}, \quad (7)$$

Де A_{mp} – середнє значення трьох максимальних величин амплітуди вПСС. Параметри m , n , та q оцінюються за допомогою (6), (3) та (1) відповідно.

2.9. Модель короткочасної гіпоксії *in vitro*

В перебігу електрофізіологічного експерименту використовували загальноприйнятну модель гіпоксії *in vitro* – короткочасну (до 5 хв) аплікацію гіпоксичного розчину. Гіпоксичні розчини (0,19 мг/л O₂) готували безпосередньо перед експериментом шляхом барботування робочого зовнішньоклітинного розчину азотом протягом 20 хв. Наявність 20 мМ Нерес в робочих розчинах була достатньою для забезпечення сталого рівня рН в контролі, протягом гіпоксії та реоксигенації.

2.10. Полярографічний метод аналізу

Концентрацію кисню у зовнішньоклітинному розчині вимірювали полярографічним методом за допомогою платинового мікроелектрода [247]. Полярографічний метод заснований на можливості електрохімічного відновлення або окислення іонів чи нейтральних молекул на поверхні електрода. Кожен вид іонів чи нейтральних молекул відновлюється або окислюється при своєму визначеному потенціалі. При електрохімічній реакції відбуваються три процеси:

1. Постачання з об'єму розчину реагентів, що вступають в реакцію на електроді.

Механізм постачання може бути дифузійним, електродифузійним та конвекційним. Якщо в реакції беруть участь реагенти, що складаються з

нейтральних молекул (O_2) то електроди фузія не відбувається. Конвекція пов'язана з перемішуванням розчину.

2. Власне електрохімічне перетворення реагентів.
3. Відвід продуктів реакції від поверхні електрода.

Швидкість електрохімічної реакції залежить від потенціалу на електроді, концентрації реагентів та пропорційна струму, що тече через електроди. При збільшенні потенціалу на електроді, концентрація реагенту на його поверхні прямує до нуля, а величина струму до свого максимального значення. Таким чином існує пропорційна залежність між граничним струмом дифузії та концентрацією речовини, що визначається.

Чутливість методу полярографічного аналізу визначається величиною граничного струму дифузії і залежить від механізму підходу реагентів до поверхні електрода. При вимірюванні концентрації кисню в розчині електродифузія відсутня, бо молекули кисню електронеутральні. А при перемішуванні розчину починає працювати конвекційний механізм підходу реагентів, що збільшує величину граничного струму дифузії. Таким чином можливе підвищення чутливості методу (за умови постійної швидкості перемішування).

Полярографічні індикаторні мікроелектроди виготовляли з заготовок для «петч-піпеток» в кінчики яких була впаяна платинова проволока діаметром біля 20 мкм і довжиною відкритої ділянки біля 30–40 мкм. До індикаторного електрода прикладали від'ємний потенціал -60 мВ і вимірювали граничний струм дифузії. Перед використанням електрод калібрували по двом точкам вимірюючи граничний струм дифузії в розчинах з відомою концентрацією. Для отримання нульової точки використовували насичений розчин сульфідна натрія (8 мМ), що видаляє з розчину вільний кисень. В якості другої точки приймали граничний струм дифузії, виміряний в розчині, що заходився в рівновазі з повітрям (об'ємний вміст кисню в повітрі 21% або $6,7$ мг/л в розчині при $T=37^{\circ}C$).

2.11. Метод швидкої локальної суперфузії

Аплікацію розчинів на синаптично зв'язану пару ГКС та нейрона *CS* проводили за допомогою методу швидкої локальної суперфузії зі швидкостями, достатніми для дослідження ліганд керованих іонних каналів [220].

Дана система являє собою дві скляні піпетки з діаметрами 20–40 мкм, причому діаметр відсмоктуючої піпетки дещо більший за діаметр аплікуючої (рис. 2.5.). Всередині аплікуючої піпетки знаходяться дві трубки, одна яка подає інша відводить розчин, що дає можливість постійно видаляти розчин з мертвої зони всередині піпетки. Трубка, яка подає, з'єднана з ємкостями заповненими робочими розчинами. До трубки, що відводить приєднаний клапан, який дозволяє швидко перемикає тиски (з більшого $-P_2$ на менший $-P_3$ і навпаки). Робота клапана дозволяє швидко і локально аплікувати необхідний розчин на пару нейронів.

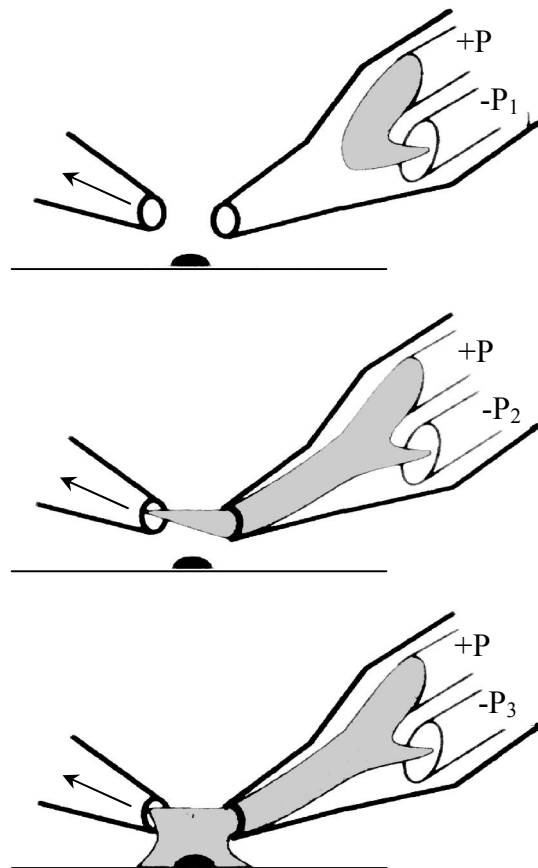


Рис. 2.5. Система швидкої локальної суперфузії речовин. $+P$ – позитивний тиск, $-P_1$, $-P_2$, $-P_3$ – три різних рівня негативного тиску; 1 –

настройка аплікації, 2 – аплікація на клітину відключена, 3 – аплікація на клітину включена.

Зліва розташована відсмоктуюча піпетка, яка забезпечує відтік розчину, що аплікується з камери.

У першому стані, при настройці аплікації, розчин з аплікуючої трубки, що подає, попадає напряду в трубку, що відводить. В другому стані, коли аплікація відключена, після спрацювання клапану і зміні негативного тиску з $-P_1$ на $-P_2$, розчин витікає з аплікуючої піпетки і потрапляє у відсмоктуючу. В третьому випадку, коли аплікація включена, негативний тиск P_3 , гідростатичний позитивний тиск розчину та негативний тиск відсмоктуючої піпетки підібрані таким чином, що розчин з аплікуючої піпетки покриває лише обрану округлу зону.

Піпетки розміщали на відстані 25–50 мкм вище досліджуваної пари нейронів і розчин, який аплікували повністю омивав пару нейронів. Відстань між піпетками складала 300–550 мкм.

Дослідження впливу гіпоксії на викликані, сПСС та мПСС проводили за наступним протоколом: на досліджувану пару нейронів аплікували зовнішньоклітинний розчин протягом 5 хв (контроль), після чого цей розчин заміняли відповідним гіпоксичним розчином (5 хв, гіпоксія), з наступною повторною подачею контрольного зовнішньоклітинного розчину (5 хв, реоксигенація).

2.12. Обробка та аналіз результатів

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

Нормальність розподілу даних перевіряли за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Кількісні результати представлені як середні \pm стандартна похибка середнього.

Для статистичної достовірності різниць міжгрупових середніх значень використовували t - тест Ст'юдента. Оцінку достовірності відмінностей між двома функціями проводили за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Автоматичний пошук сПСС та мПСС реалізували в програмному пакеті Clampfit 9.0 ("Axon Instruments", США) за допомогою функції Event detection – Threshold search. Попіг детекції вибирали за правилом « 2σ ». Рівень достовірності міжгрупових різниць на рисунках позначено наступним чином: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

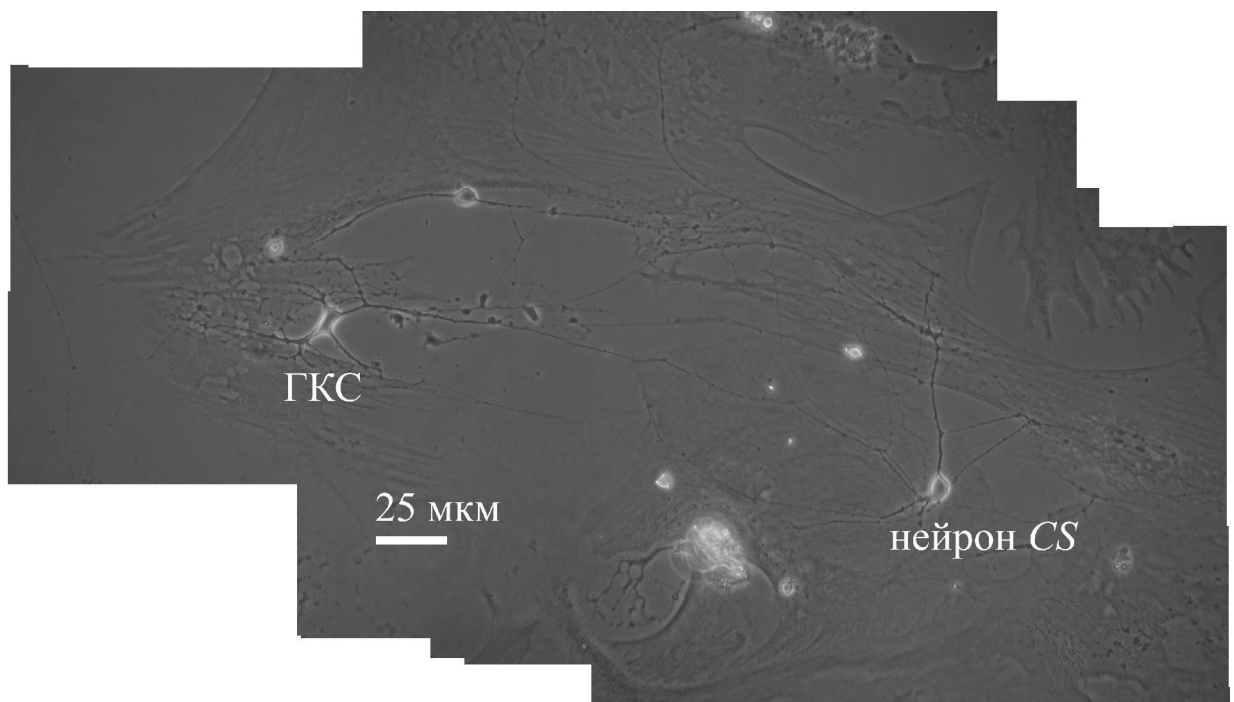
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Морфологічні та електрофізіологічні характеристики кокультивованих ГКС та нейронів *CS*

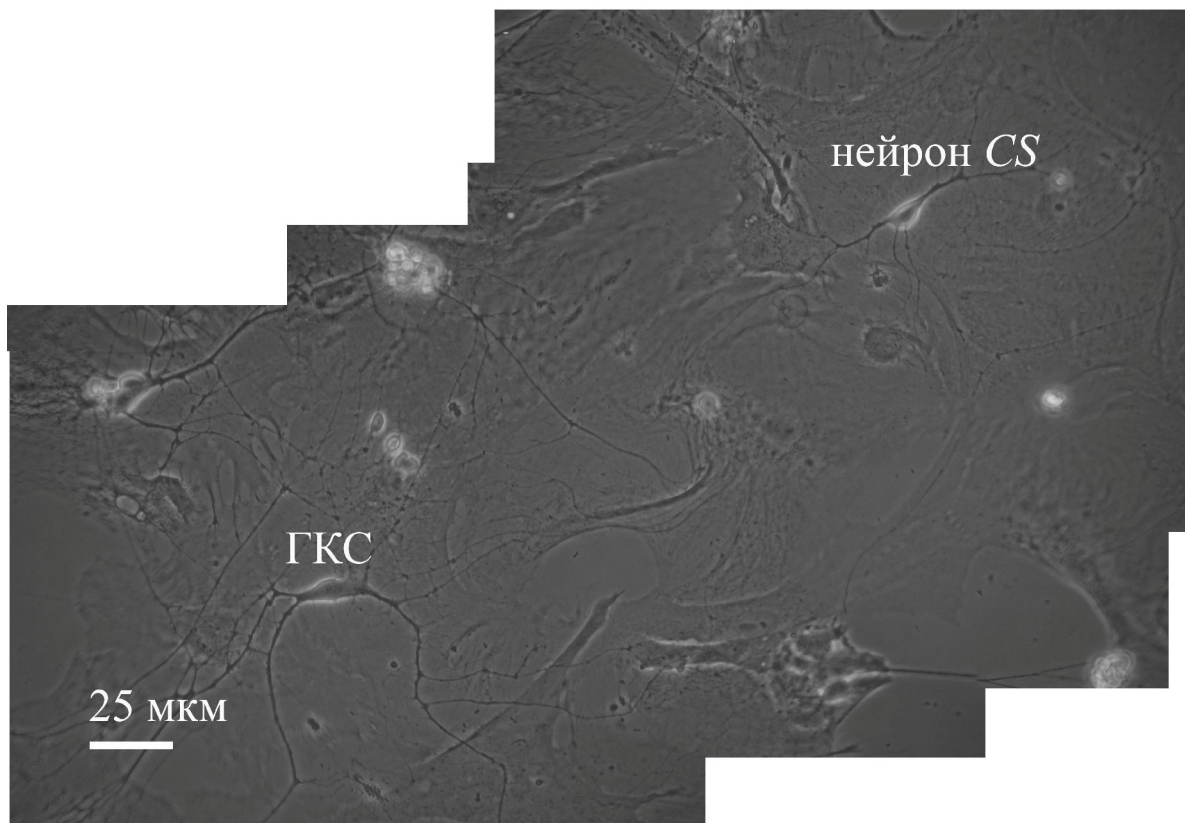
За умов кокультивування ГКС та нейрони *CS* розвивалися відповідно до своїх фенотипічних характеристик та формували синаптичні контакти як з клітинами власної, так і з нейронами іншої популяції (рис. 3.1.). Наявність спонтанної високоамплітудної електричної активності культивованих ГКС та нейронів *CS* свідчила про життєздатність клітин та їх електричну збудливість. Мембранний потенціал нейронів обох типів варіював від -50 до -70 мВ.

Візуально ГКС ідентифікували в культурі клітин сітківки за діаметром соми порядку 20–25 мкм. У наших експериментах ГКС являла собою пресинаптичну клітину. Вхідний опір ($0,2 - 0,6$ Гом, $n = 51$) та клітинна ємність ($23 - 50$ пФ, $n = 51$) незначно варіювали в досліджуваних ГКС.

А



Б



В

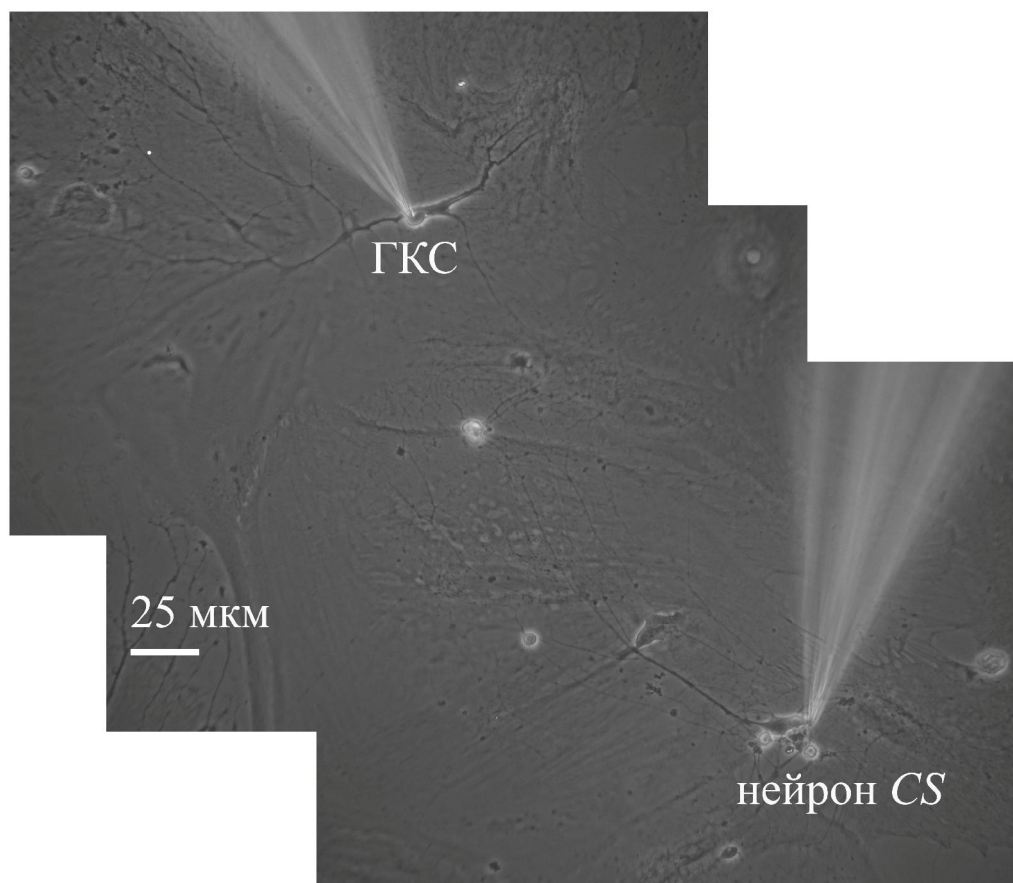


Рис. 3.1. Мікрофотографії синаптично зв'язаних кокультивованих пар ГКС та нейронів CS.

А, Б, В – мікрофотографії пар ГКС та нейрону CS на 16-ту, 24-ту та 29-ту добу кокультивування відповідно.

В залежності від періоду культивування ГКС можна було розділити на три групи за характером відповідей на тривалі деполяризуючі поштовхи струму. Перша група ГКС характеризувалась генерацією одиничного ПД протягом всього стимулу, клітини бралися в експеримент протягом перших двох тижнів культивування (рис. 3.2. А). Друга – швидкою адаптивністю, генерація ПД в таких ГКС (до 20 діб культивування) закінчувалась раніше тривалості деполяризуючого стимулу (рис. 3.2. Б). Третя група ГКС характеризувалась високочастотною генерацією ПД протягом усього стимулу (рис. 3.2. В), клітини брали в експеримент починаючи з трьох тижнів *in vitro*. Наявність відповідної електричної активності у відповідь на тривалі деполяризуючі поштовхи струму була необхідним та достатнім критерієм ідентифікації ГКС в культурі клітин сітківки [206, 63, 113].

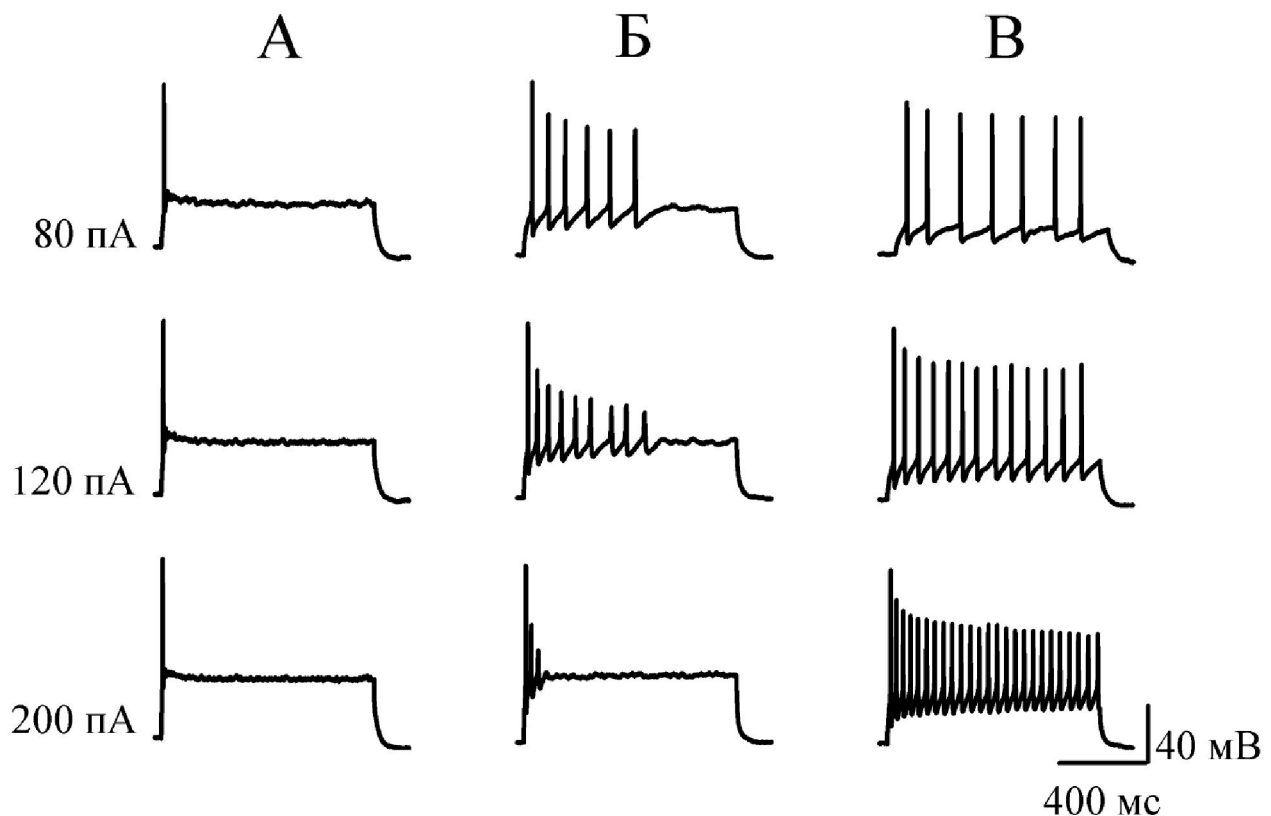


Рис. 3.2. Викликана електрична активність культивованих ГКС у відповідь на тривалий деполяризуючий поштовх струму.

А – генерація одиничного потенціалу дії (ПД). **Б** – швидка адаптація.
В – високочастотна генерація ПД.

Нейрони *CS* в кокультурі характеризувались меншим діаметром соми, порядку 15 мкм, і в наших експериментах представляли постсинаптичні клітини. Вхідний опір ($0,56 \pm 0,09$ Гом, діапазон 0,4–0,7 Гом, $n=53$) та клітинна ємність $30,12 \pm 1,5$ пФ, діапазон 20–45 пФ, $n=53$) незначно варіювали в досліджуваних нейронах *CS*. Нейрони *CS* рівно ймовірно відповідали на тривалі деполяризуючі поштовхи струму або гамаритмічною активністю (рис. 3.3. А), або регулярною генерацією ПД (рис. 3.3. Б) протягом всього стимулу.

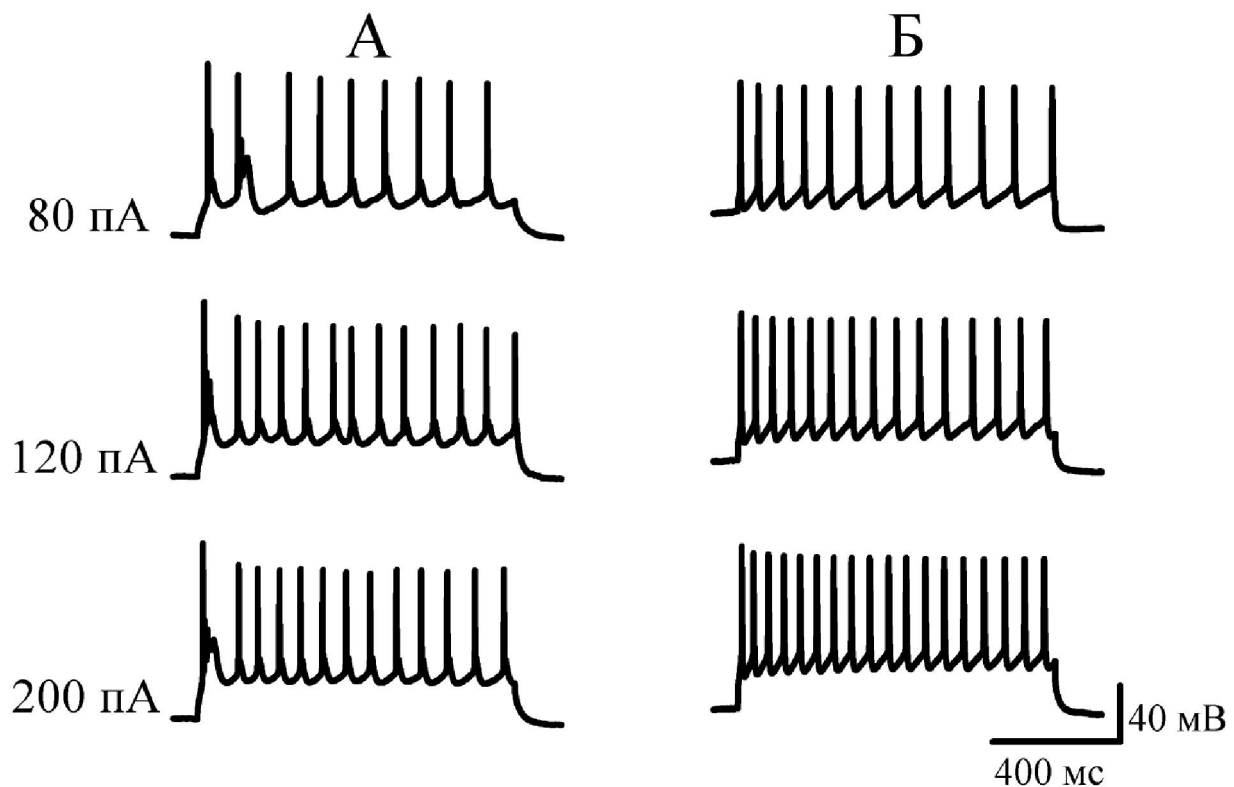


Рис. 3.3. Викликана електрична активність культивованих нейронів *CS* у відповідь на тривалий деполяризуючий поштовх струму.

А – гамма ритмічна активність. **Б** – регулярна генерація потенціалів дії.

Описані характери викликаної електричної активності ГКС та нейронів *CS* є типовими для цих клітин [116, 206, 63, 113].

3.2. Синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами *CS*

Морфологічні та електрофізіологічні відмінності обох популяції клітин та візуалізація проєкцій аксонів ГКС на нейрони *CS* забезпечили можливість проведення електрофізіологічних експериментів для дослідження характеристик синаптичного зв'язку. Нами було досліджено 196 пар нейронів методом парної реєстрації. У 145 парах на нейронах *CS* реєстрували викликані збуджувальні постсинаптичні струми (вЗПСС) АМПА- ($n=67$) та НМДА-рецепторопосередковані ($n=78$) у відповідь на пресинаптичну генерацію ПД поодинокими ГКС, а у 51 парах – викликані гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС).

Викликані ПСС мали синаптичну затримку в діапазоні 2–5 мс. Такі значення синаптичної затримки та температурний режим протягом експерименту, дали змогу визначити ці вПСС як моносинаптичні [92, 178].

3.2.1. Глутататергічна синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами *CS*

В експеримент відбирали синаптично зв'язані пари ГКС та нейронів *CS* в період від 11 до 35 діб кокультивування. Моносинаптичні вЗПСС реєстрували в нейронах *CS* при підтримуваному потенціалі -70 мВ. Синаптична затримка вЗПСС дорівнювала $3,8 \pm 0,9$ мс ($n=41$). В експериментах з використанням стандартного зовнішньоклітинного розчину, що містив 2 мМ Mg^{2+} , відведені вЗПСС характеризувалися швидкою кінетикою наростання та швидкою кінетикою спаду. Час наростання вЗПСС, розрахований за висхідною частиною кривої струму від 10 до 90 % пікової амплітуди, становив $1,7 \pm 0,5$ мс ($n = 38$); спад струму в найкращий спосіб апроксимувався однією експонентою з середньою постійною часу $\tau = 3,6 \pm 0,6$ ($n=38$). Кінетичні характеристики отриманих нами

вЗПСС відповідали описаним раніше даним, отриманим на інших об'єктах при дослідженні глутаматергічної синаптичної передачі [73, 179]. Значення амплітуд вЗПСС лінійно залежали від підтримуваних потенціалів на мембранах нейронів *CS* з потенціалом реверсії $0,5 \pm 1,4$ мВ (рис. 3.4. А). Тривалість часового ходу та кінетика спаду вЗПСС нейронів *CS* взятих в експеримент протягом перших трьох тижнів культивування достовірно змінювалась починаючи зі значення підтримуваного потенціалу – 30 мВ (рис. 3.4. Б, б). В той час коли тривалість часового ходу та кінетика спаду вЗПСС нейронів *CS* взятих в експеримент починаючи з третього тижня не виявляли достовірних змін (рис. 3.4. В, в).

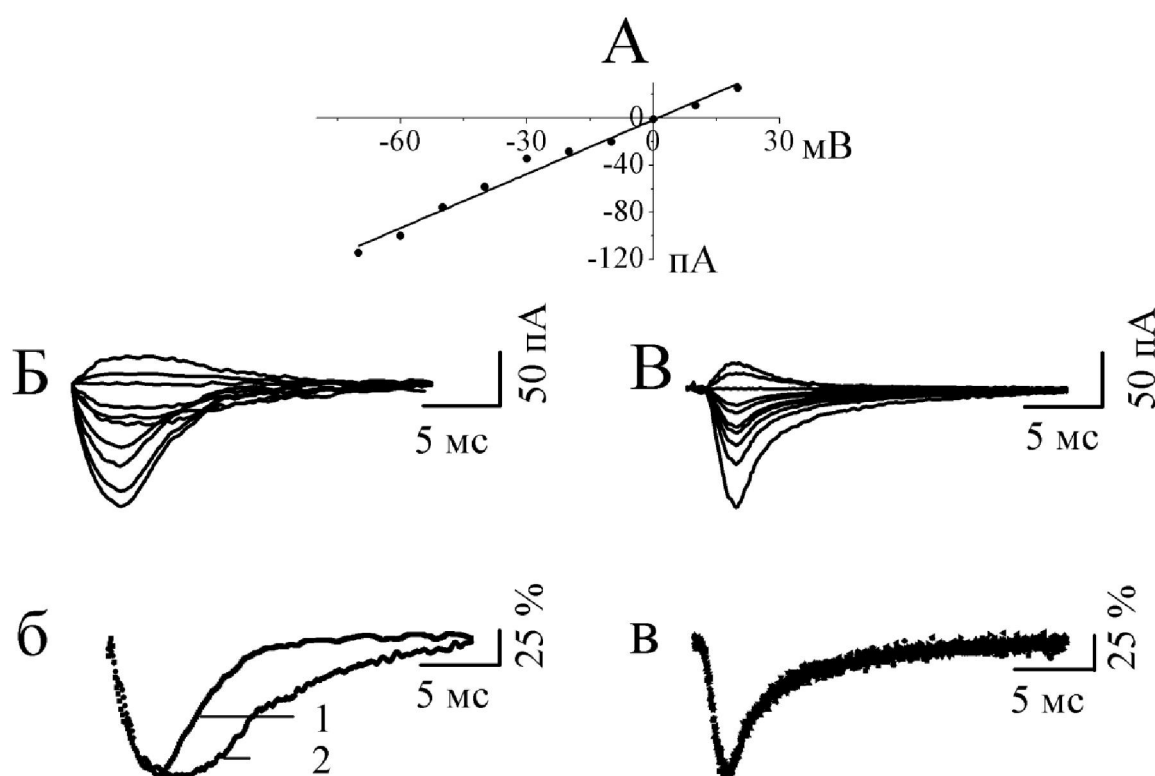


Рис. 3.4. Кінетичні характеристики викликаних збуджувальних постсинаптичних струмів (вЗПСС), відведених від нейронів *CS* у відповідь на генерації потенціалів дії пресинаптичними ГКС у зовнішньоклітинному розчині з концентрацією Mg^{2+} 2 мМ.

А – приклад вольт-амперної характеристики вЗПСС, реєстрації якого наведені в В. Б – записи вЗПСС нейронів *CS*, взятих в експеримент протягом перших трьох тижнів кокультивування, при значенні підтримуваного

потенціалу, що змінювався від -70 до $+20$ мВ з інкрементом 10 мВ. б – нормовані вЗПСС нейронів *CS* наведені в Б за різних підтримуваних потенціалів; 1, 2 – при значенні підтримуваного потенціалу -40 мВ та -30 мВ відповідно. В – записи вЗПСС нейронів *CS*, взятих в експеримент починаючи з третього тижня культивування, при значенні підтримуваного потенціалу, що змінювався від -70 до $+20$ мВ з інкрементом 10 мВ. в – нормовані вЗПСС наведені в В.

Аплікація селективного блокатора НМДА- рецепторканалних комплексів D_L -APV у концентрації 20 мкМ не викликала зменшення амплітуд вЗПСС і не впливала на кінетику спаду при підтримуваному потенціалі -70 мВ. Аплікація блокатора АМПА- рецепторканалних комплексів DNQX у концентрації 20 мкМ повністю блокувала вЗПСС (рис. 3.5. А).

В досліджених нейронах *CS* з використанням безмагнієвого зовнішньоклітинного розчину при підтримуваному потенціалі -70 мВ моносинаптичні вЗПСС можна було розділити на два типи. Одні вЗПСС характеризувалися більш повільним двоекспоненційним спадом ($\tau_1=3,3\pm0,4$ мс, $\tau_2=45,3\pm6,2$ мс, $n=26$), а час наростання в середньому становив $4,4\pm0,5$ мс. Аплікація DNQX у концентрації 20 мкМ давала змогу виділити НМДА-компонент інтегрального вЗПСС з середньою амплітудою струму $A=-40,3\pm2,5$ мВ та часом до піку $t=4,6\pm0,4$ мс ($n=45$). Спад у найкращий спосіб апроксимувався однією експонентою зі сталою часу $\tau=49,2\pm3,3$ мс ($n=45$). Присутність 20 мкМ D_L -APV повністю блокувала цей компонент вЗПСС (рис. 3.5. Б). У парах ГКС та нейронів *CS* взятих в експеримент протягом перших трьох тижнів культивування з використанням безмагнієвого позаклітинного розчину вЗПСС переважно були опосередковані активацією лише НМДА-рецепторканалних комплексів. Такі струми повністю блокувалися в присутності D_L -APV в концентрації 20 мкМ (рис. 3.5. В).

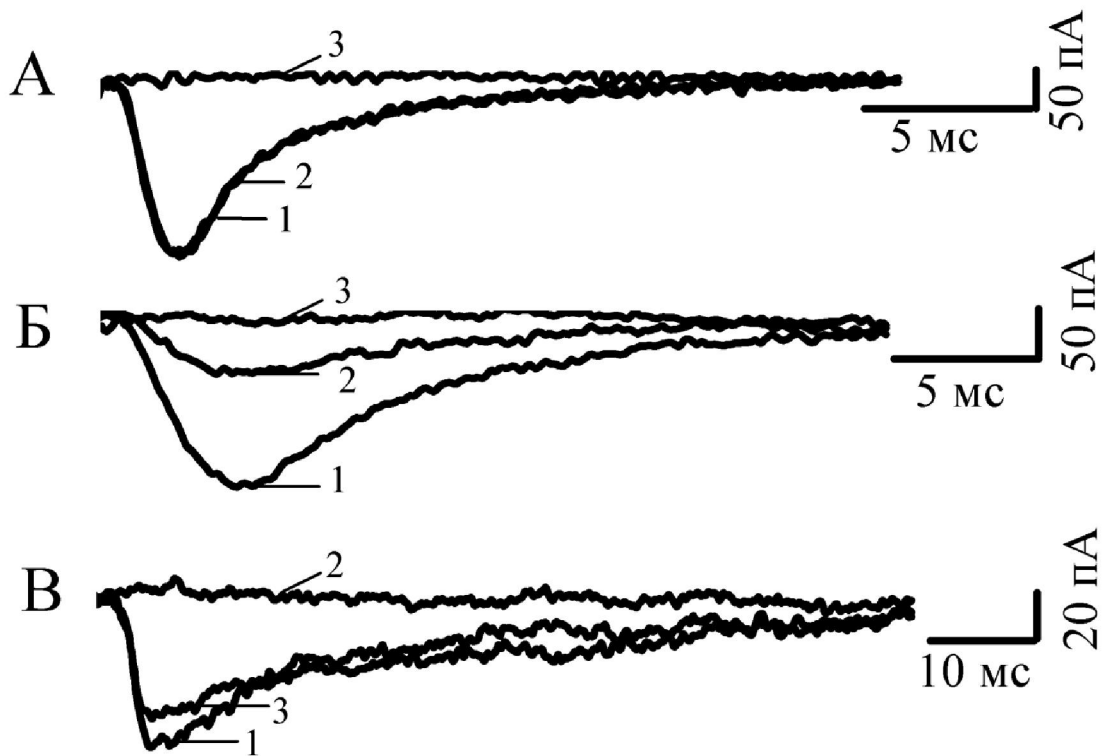


Рис. 3.5. Фармакологічні властивості викликаних збуджувальних постсинаптичних струмів (вЗПСС), відведених від нейронів *CS* у відповідь на генерацію потенціалів дії пресинаптичними ГКС.

А – дія блокаторів глутаматергічної синаптичної передачі на вЗПСС, реєстрованих при зовнішньоклітинній концентрації Mg^{+2} 2 мМ та підтримуваному потенціалі – 70 мВ: 1 – в контролі, 2 – при аплікації 20 мкМ D_L -APV, 3 – при аплікації 20 мкМ DNQX. Б – дія блокаторів глутаматергічної синаптичної передачі на вЗПСС реєстрованих в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині; 1 – в контролі, 2 – при аплікації 20 мкМ DNQX, 3 – при аплікації 20 мкМ. D_L -APV. В – дія блокатора НМДА- рецепторканалних комплексів на вЗПСС реєстрованих в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині: 1 – в контролі, 2 – при аплікації 20 мкМ D_L -APV, 3 – після відмиву блокатора.

3.2.2. ГАМК-ергічна синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами *CS*

Приблизно у 25 % досліджених синаптично зв'язаних парах ГКС та нейронів *CS* пресинаптична генерація ПД призводила до реєстрації вГПСС. Синаптична затримка варіювала від 2 до 5 мс, розподіл її величин достовірно не відрізнявся від нормального розподілу (тест Шапіро-Уїлка, $p < 0,001$). Середнє значення синаптичної затримки становило $3,3 \pm 0,8$ мс ($n = 28$).

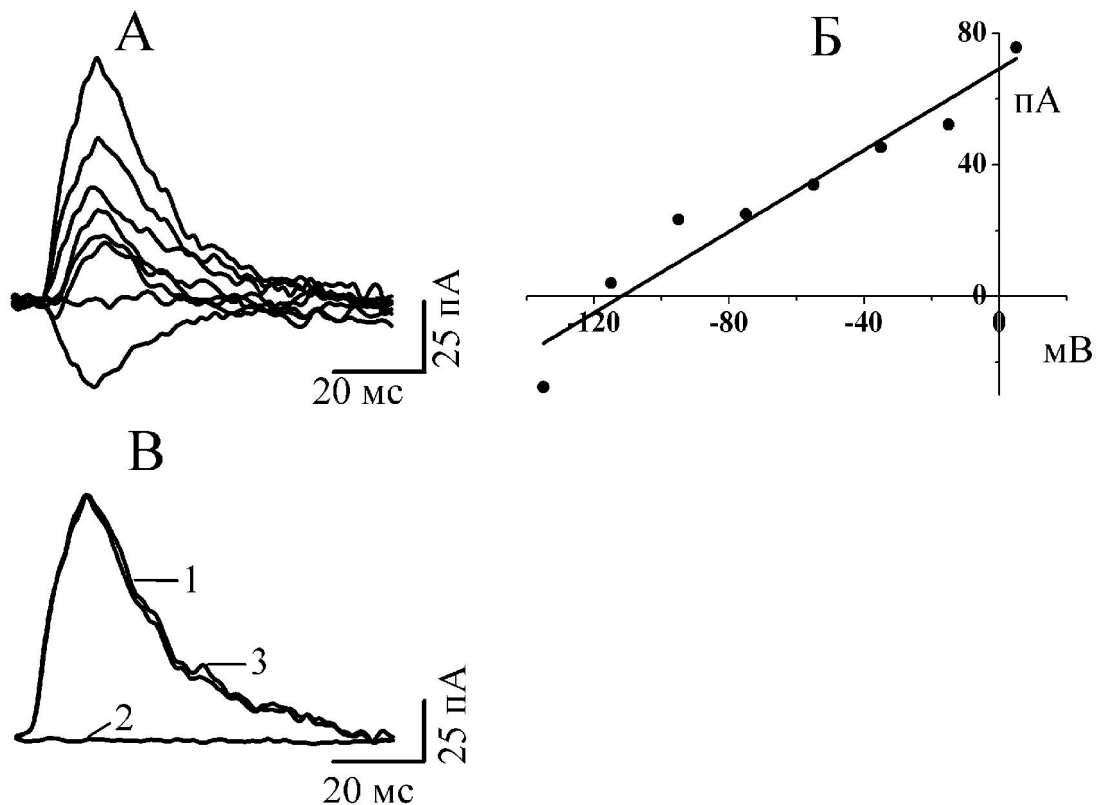


Рис. 3.6. Кінетичні та фармакологічні властивості викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) зареєстрованих на неронах *CS* у відповідь на генерацію потенціалів дії пресинаптичними ГКС.

А – вГПСС при значенні підтримуваного потенціалу, що змінювався від -135 до $+5$ мВ з інкрементом 20 мВ. Б – приклад вольт-амперної характеристики вГПСС. В – дія блокатора гальмівної передачі на вГПСС; 1

– в контролі, 2 – при аплікації 10 мкМ бікулініну метиодиду, 3 – після відмиву блокатора.

Час наростання вГПСС в середньому становив $4,3 \pm 0,7$ мс ($n=30$), та одноекспоненційний спад із сталою часу $\tau = 48,3 \pm 5,7$ мс ($n=30$). Часовий хід, кінетика наростання та спаду вГПСС не виявляли змін в залежності від значення підтримуваного потенціалу (рис. 3.6. А). Амплітуди вГПСС мали лінійну залежність від підтримуваного потенціалу (рис. 3.6. Б). При цьому потенціал реверсії отриманий експериментально складав: $V_{\text{рев}} = -111,9 \pm 9,1$ мВ і достовірно не відрізнявся від рівноважного потенціалу для іонів Cl^- , розрахованого за рівнянням Нернста для даних зовнішньо- та внутрішньоклітинних концентрацій іонів Cl^- : $V_{\text{рівCl}^-} = -109$ мВ. Струм повністю блокувався при аплікації блокатора гальмівної передачі бікуліну метиодиду в концентрації 10 мкМ (рис. 3.6. В). Відносно швидка кінетика наростання та спаду вГПСС та їхня чутливість до бікуліну дали змогу ідентифікувати ці вГПСС, як ГАМК_A-рецепторопосередковані хлорні струми [17, 107].

3.3. Квантове вивільнення нейротрансмітерів в синапсах проєкцій ГКС в CS за умов кокультури

Досліджували квантове вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах між ГКС та нейронами CS починаючи з 11-ї доби кокультування. Експерименти проводили з використанням як безмагнієвого, так і стандартного позаклітинного розчину (Mg^{2+} 2 мМ) при температурі 20–24°C.

3.3.1. Параметри квантового вивільнення глутамата в синапсах між кокультивованими ГКС та нейронами CS

Збуджувальна синаптична передача була опосередкована пресинаптичним вивільненням глутамата з наступною активацією НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів на постсинаптичній мембрані нейрону CS.

НМДА-рецепторопосередковані викликані, спонтанні та мініатюрні вПСС реєстрували у відповідних безмагнієвих позаклітинних розчинах з додаванням 10 мкМ DNQX при підтримуваному потенціалі -70 мВ. Додавання D_L -APV (20 мкМ) призводило до повної блокади даних струмів протягом всього періоду аплікації блокатора. Ці струми мали повільну кінетику наростання та спаду (час наростання $4,6 \pm 0,6$ мс; $\tau_{\text{спаду}} = 45,2 \pm 2,9$ мс, $n = 23$).

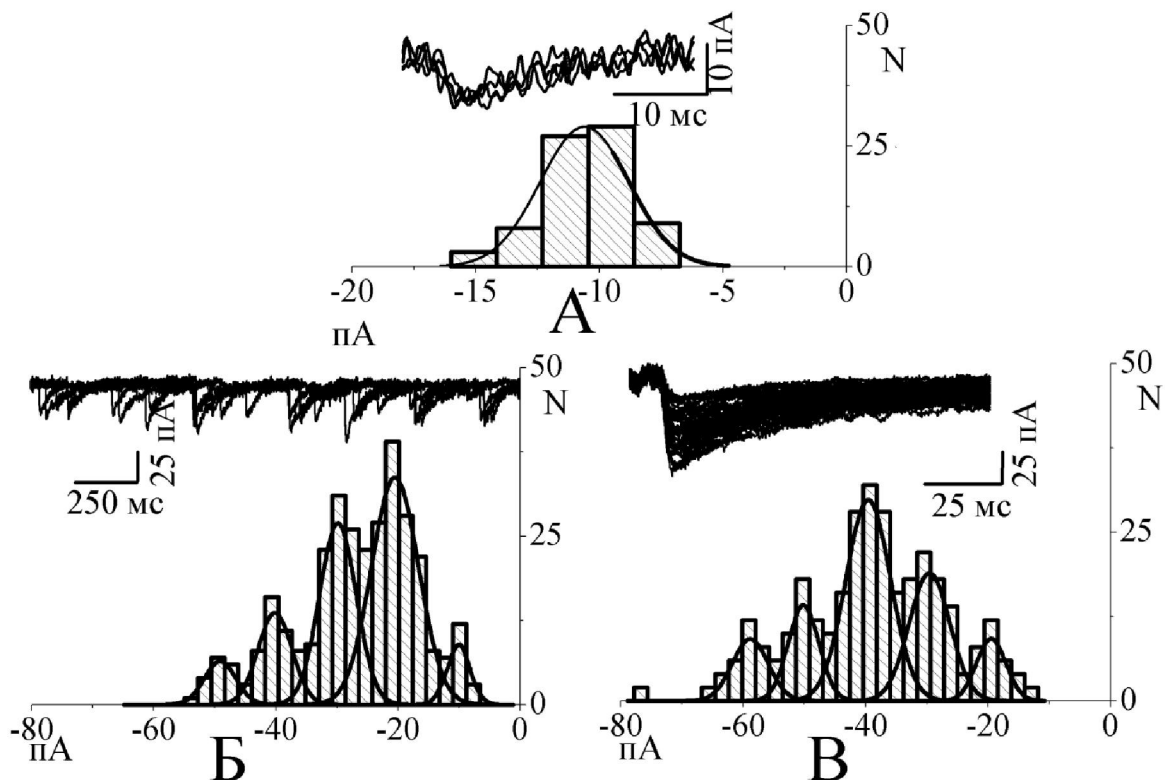


Рис. 3.7. Квантове вивільнення глутамата в синапсах між ГКС та нейронами CS.

А, Б, В – репрезентативні гістограми та апроксимації НМДА-рецепторопосередкованих глутаматергічних мініатюрних (мПСС), спонтанних

(сПСС) та викликаних (вПСС) постсинаптичних струмів, відповідно. По осі абсцис на А, Б та В – амплітуда мПСС, сПСС та вПСС, по осі ординат – число відповідних подій (N). Нагорі наведені записи відповідних струмів.

Розподіли амплітуд НМДА-рецепторопосередкованих мПСС, були унімодальними з модою в $A_{\min} = -10,1 \pm 1,8$ пА ($n = 12$; рис. 3.7. А). Амплітуда мПСС є корелятом реакції відповідних постсинаптичних рецепторів на вивільнення одного кванта глутамата. Гістограми амплітуд сПСС були полімодальними (рис. 3.7. Б). Значення середньої відстані між модами не відрізнялися від величини першої моди і дорівнювали в середньому $-9,9 \pm 1,3$ пА ($n = 16$).

Амплітудні гістограми вПСС були полімодальними з декількома (2—5) чітко вираженими рівновіддаленими модами (рис. 3.7. В). Відстань між модами в середньому становила $-10,0 \pm 1,4$ пА ($n = 20$) при -70 мВ. Використовуючи *t*-тест Ст'юдента, ми виявили, що значення квантової події, визначене двома незалежними методами, достовірно ($p < 0,001$) не розрізнялися.

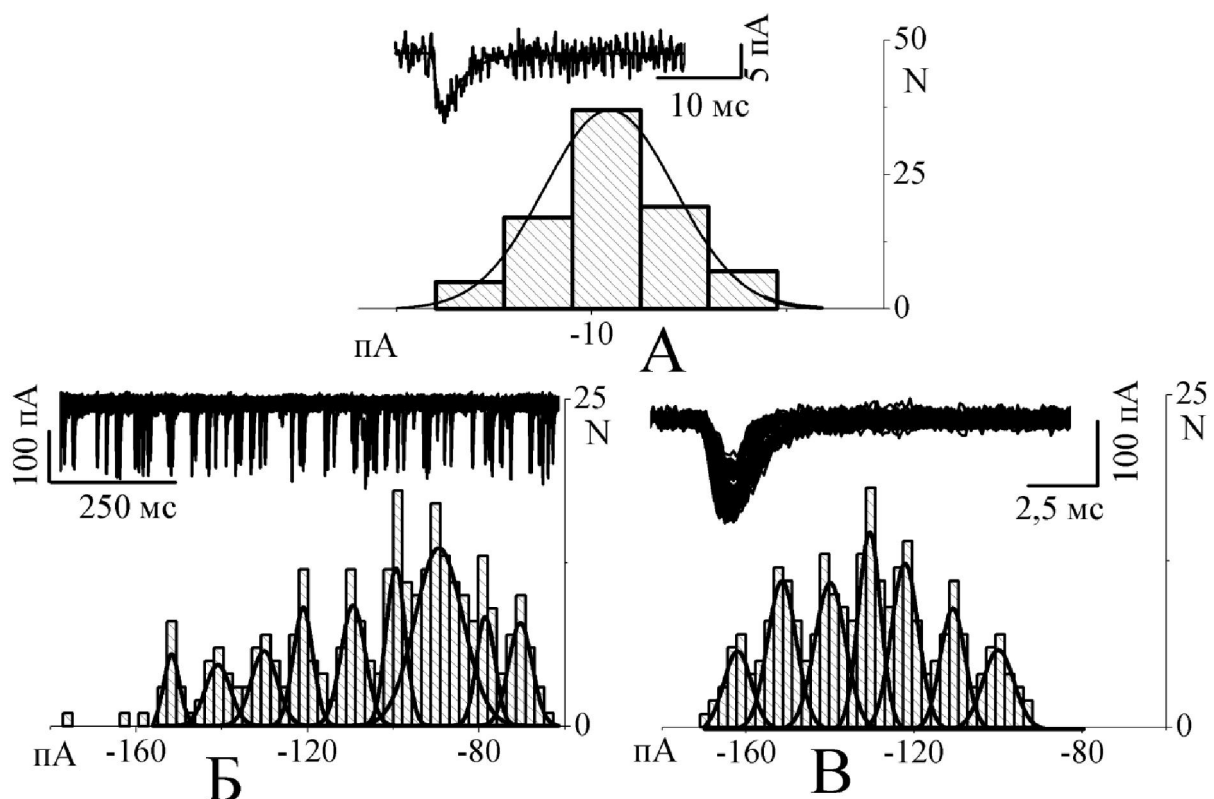


Рис. 3.8. Квантове вивільнення глутамата в синапсах між ГКС та нейронами CS.

А, Б, В – репрезентативні гістограми та апроксимації АМПА-рецепторопосередкованих глутаматергічних мініатюрних (мПСС), спонтанних (сПСС) та викликаних (вПСС) постсинаптичних струмів, відповідно. По осі абсцис на А, Б та В – амплітуда мПСС, сПСС та вПСС, по осі ординат – число відповідних подій (N). Нагорі наведені записи відповідних струмів.

АМПА-рецепторопосередковані ПСС реєстрували при підтримуваному потенціалі -70 мВ в стандартному зовнішньоклітинному розчині, що містив 2 мМ Ca^{2+} та 2 мМ Mg^{2+} , з додаванням 20 мкМ $\text{D}_L\text{-APV}$.

Середня амплітуда мПСС АМПА-рецепторопосередкованих ПСС становила $A_{\min} = -9,9 \pm 1,7$ пА ($n=13$; рис. 3.8. А), а відстань між модами в амплітудних розподілах сПСС і вПСС була $-10,2 \pm 1,1$ пА ($n=18$) та $-10,3 \pm 1,8$ пА ($n=17$) відповідно (див. рис. 3.8. Б, В). Використовуючи t -тест Ст'юдента, ми виявили, що середні амплітуди НМДА- та АМПА-рецепторопосередкованих ПСС на вивільнення одного кванта глутамата, розраховані за допомогою незалежних методів, достовірно ($p < 0,001$) не відрізнялись.

Кількість синаптичних подій, що відповідає вивільненню певної кількості квантів, визначали як кількість подій в діапазоні амплітуд, охоплених описаною кривою розподілу Гауса. Зіставлення експериментально визначених кількостей НМДА- та АМПА-рецепторопосередкованих синаптичних подій з величинами, отриманими при описанні результатів (рис. 3.7. В; 3.8. В) простим біноміальним законом представлено на рис 3.9. А, Б відповідно.

За умов пресинаптичної генерації ПД не спостерігалось вивільнення одиничного кванта нейромедіатора. Таким чином амплітуда вПСС у збуджувальних синапсах нейронів *CS* зумовлюється одночасним вивільненням, щонайменше від 2 до 35 квантів нейромедіатора у всіх загалом сайтах вивільнення однієї або декількох пресинаптичних терміналей ГКС.

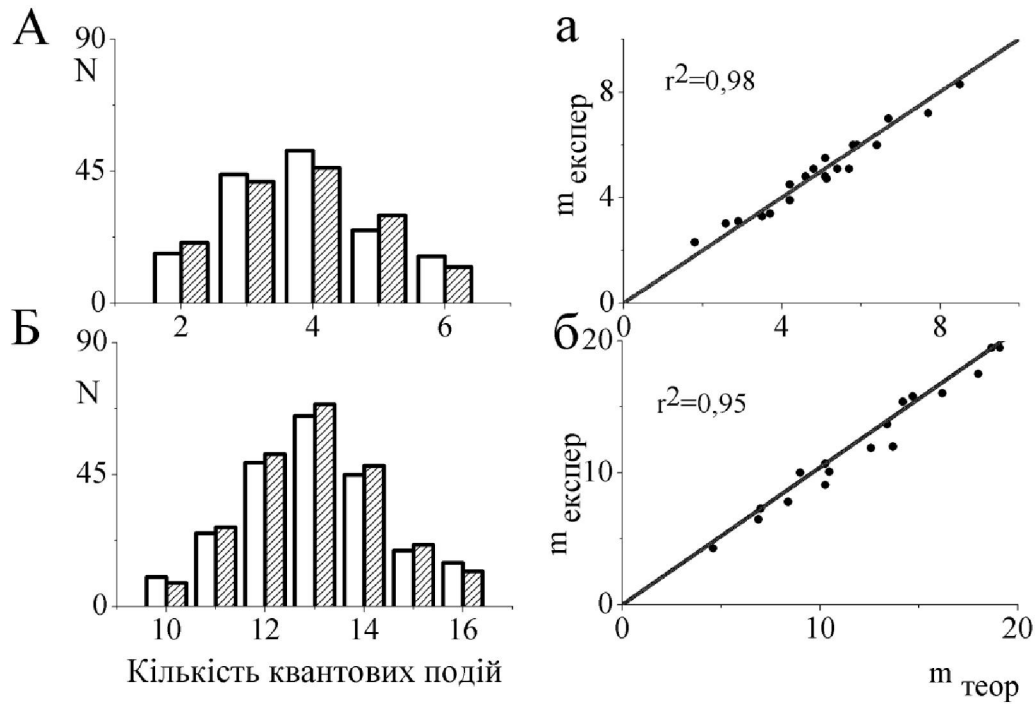


Рис. 3.9. Описання ймовірності вивільнення глутамата у синапсах кокультивованих ГКС і нейронів CS біноміальною статистикою.

А та Б – гістограми кількості одночасно вивільнених квантів, побудовані на основі гістограм, представлених на рис. 3.7. В та 3.8. В відповідно. Білі стовпчики відповідають експериментальним результатам, заштриховані – значенням, апроксимації біноміальним розподілом. а, б – графіки лінійної залежності значень квантового вмісту $m_{\text{експер}}$ та $m_{\text{теор}}$ для НМДА та АМПА-рецепторопосередкованої синаптичної передачі, відповідно, де $m_{\text{експер}}$ – середній квантовий вміст, розрахований за допомогою методу «мініатюр», $m_{\text{теор}}$ – середній квантовий вміст, розрахований за допомогою гістограмного методу.

Квантовий вміст m для досліджуваних пар ГКС і нейронів CS був розрахований незалежно за допомогою методу «мініатюр» та гістограмного, які були описані вище. Графічно представлена залежність отриманих значень для НМДА- та АМПА-рецепторопосередкованих ПСС добре апроксимувалася лінійною функцією з нахилом 45° та коефіцієнтом кореляції 0,98 і 0,95 відповідно (рис. 3.9. а, б). Висока ступінь кореляції підтверджує придатність початкового

припущення відносно значення квантової події та біноміального закону розподілу для опису експериментальних результатів.

3.3.2. Параметри квантового вивільнення ГАМК в синапсах між кокультивованими ГКС та нейронами CS

Гальмівна синаптична передача була асоційована з пресинаптичним вивільненням ГАМК та активацією постсинаптичних ГАМК_A-рецепторканалних комплексів (51 пара нейронів). ГАМК_A-рецепторопосередковані ВПСС та сПСС реєстрували в фізіологічному позаклітинному середовищі при -70 мВ. Додавання бікукуліну метіодиду в концентрації 10 мкМ призводило до повної блокади даних струмів протягом всього періоду аплікації блокатора. ВПСС, сПСС та мПСС мали повільну кінетику наростання та спаду (час наростання $4,3 \pm 0,9$ мс; $\tau_{\text{спаду}} = 49,0 \pm 3,5$ мс).

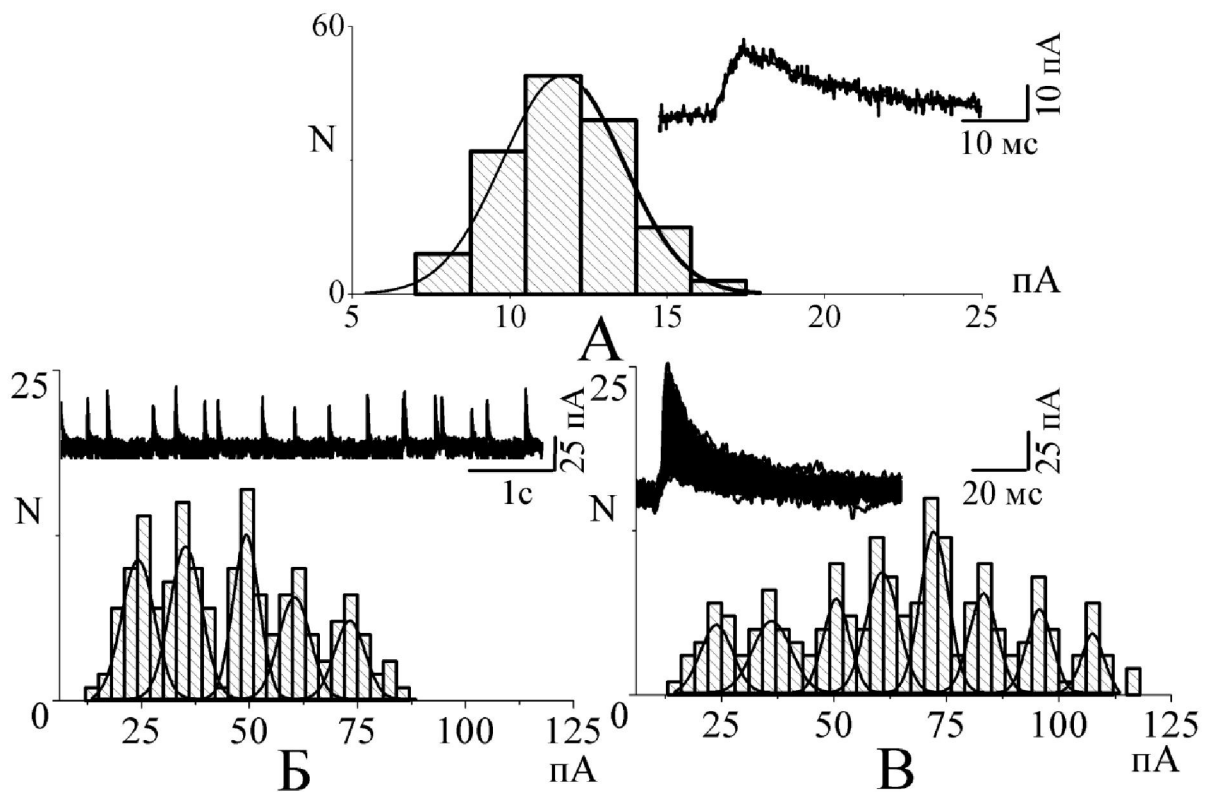


Рис. 3.10. Квантове вивільнення ГАМК в синапсах між ГКС та нейронами CS.

А, Б, В – репрезентативні гістограми та апроксимації ГАМК_A-рецепторопосередкованих мініатюрних (мПСС), спонтанних (сПСС) та викликаних (вПСС) постсинаптичних струмів, відповідно. По осі абсцис на А, Б та В – амплітуда мПСС, сПСС та вПСС, по осі ординат – число відповідних подій (N). Нагорі наведені записи відповідних струмів.

Розподіли амплітуд ГАМК_A-рецепторопосередкованих мПСС, були унімодальними з модою в $A_{\min}=11,7\pm 1,7$ пА ($n=11$; рис. 3.10. А). Ця величина середньої амплітуди мПСС відображає постсинаптичний ефект на вивільнення одного кванта ГАМК. Гістограми амплітуд ГАМК_A-рецепторопосередкованих сПСС були полімодальними та характеризувалися наявністю 3–6 мод (див. рис. 3.10. Б). Відстань між модами відображає амплітуду ПСС, тобто реакції постсинаптичних ГАМК_A-рецепторканалних комплексів, на вивільнення одного кванта ГАМК. В усіх отриманих розподілах сПСС та вПСС відстань між модами була $11,4\pm 1,8$ пА ($n=15$) та $11,8\pm 1,7$ пА ($n=14$), відповідно. Амплітудні гістограми вПСС були також полімодальними з чітко вираженими рівновіддаленими піками (див. рис. 3.10. В). Кількість явних мод в полімодальних розподілах варіювалася від 3 до 16 для різних нейронів CS.

Використовуючи *t*-тест Ст'юдента, ми виявили, що середні амплітуди ГАМК_A-рецепторопосередкованих ПСС на вивільнення одного кванту відповідного медіатора, розраховані за допомогою незалежних методів, достовірно ($p < 0,001$) не розрізнялися.

Значення кожної окремої квантової події були описані розподілом Гауса. Кількість синаптичних подій, що відповідає вивільненню будь-якої певної кількості квантів, визначали як кількість подій в діапазоні амплітуд, охоплених описаною кривою розподілу Гауса. Зіставлення експериментально визначених кількостей синаптичних подій з величинами, отриманими при описанні результатів простим біноміальним законом представлено на (рис 3.11. А). Квантовий вміст m для досліджуваних пар ГКС і нейронів CS розраховували незалежно за допомогою методу «мініатюр» та гістограмного, які були описані вище. Графічно

представлена залежність отриманих значень для ГАМК_A-рецепторопосередкованих ПСС добре апроксимувалася лінійною функцією з нахилом 45° та коефіцієнтом кореляції 0,98 (див. рис. 3.11. а). Висока ступінь кореляції підтверджує придатність початкового припущення про значення квантової події та біноміального закону розподілу для опису експериментальних результатів.

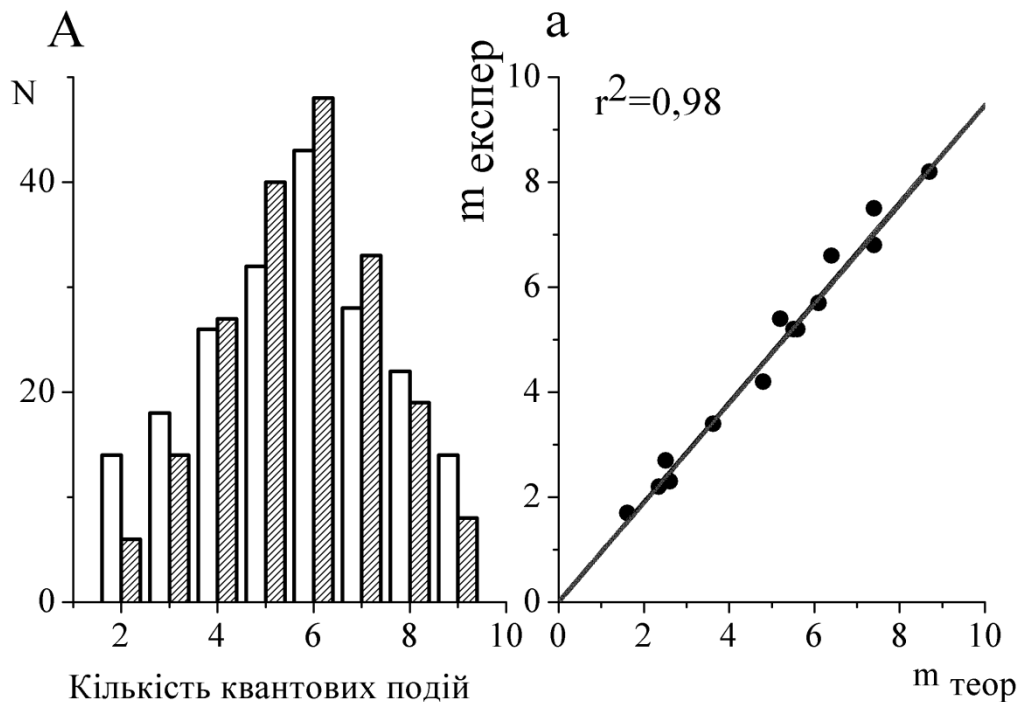


Рис. 3.11. Описання ймовірності вивільнення ГАМК у синапсах кокультивованих ГКС і нейронів CS біноміальною статистикою.

А – гістограма кількості одночасно вивільнених квантів, побудований на основі гістограми, представленої на рис. 3.10. в. Білі стовпчики відповідають експериментальним результатам, заштриховані – значенням, апроксимації біноміальним розподілом. **а** – графік лінійної кореляції значень квантового вмісту $m_{\text{експер}}$ та $m_{\text{теор}}$ для ГАМК_A-рецепторопосередкованої синаптичної передачі, де $m_{\text{експер}}$ – середній квантовий вміст, розрахований за допомогою методу «мініатюр», $m_{\text{теор}}$ – середній квантовий вміст, розрахований за допомогою гістограмного методу

3.4. Короткочасна пластичність синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS при парній стимуляції

Ми досліджували феномен короткочасної синаптичної пластичності в глутамат- та ГАМК-ергічних синаптичних контактах між ГКС та нейронами CS, що спостерігався за умов періодичної парної стимуляції пресинаптичного нейрона. В деяких досліджуваних парах нейронів під час реєстрації основного ефекту – короткотривалої депресії/потенціації, спостерігався невеликий процент протилежного ефекту – короткотривалої потенціації/депресії (рис. 3.12. А, Б). Використовуючи *t*-тест Ст'юдента, ми виявили, що середні амплітуди вПСС на перший та на другий стимули в кожній з серій реєстрацій достовірно ($p < 0,01$) розрізнялися. Тобто ефекти депресії та полегшення не можна пояснити простою флуктуацією квантованої амплітуди вПСС.

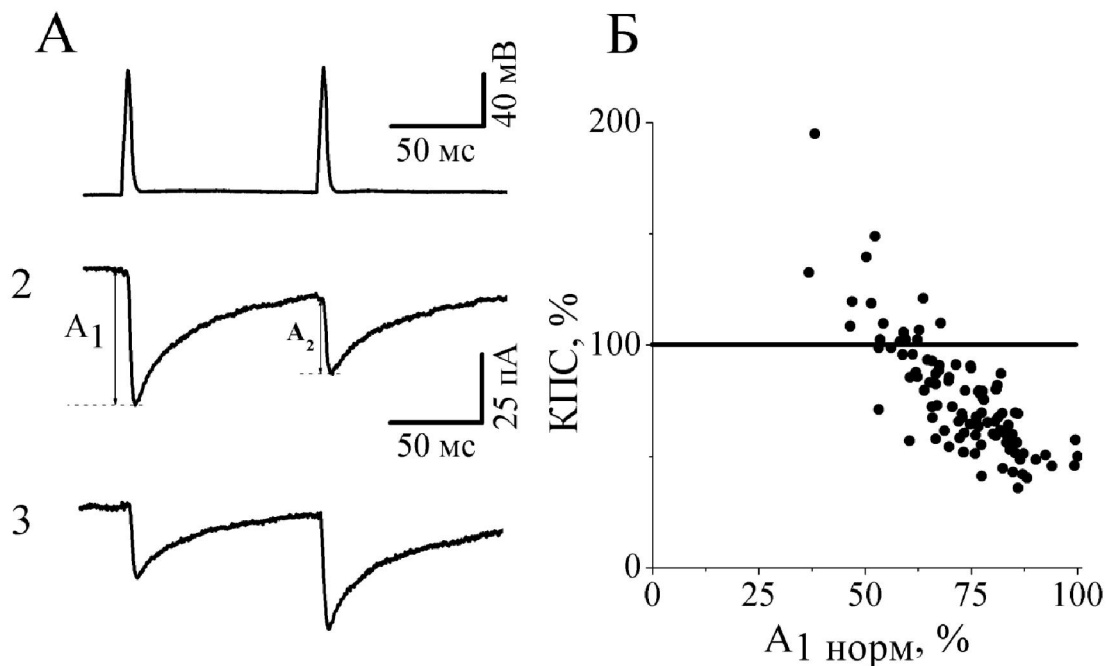


Рис. 3.12. Короткочасна депресія викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) з наявним невеликим процентом полегшення.

А – приклад записів трансмембранних струмів та потенціалів у синаптично зв'язаній парі ГКС та нейронів CS. 1 – запис пари викликаних потенціалів дії (ПД) на пресинаптичній ГКС з міжстимульним інтервалом

100 мс. 2 та 3 – реєстрації короткотривалої депресії (основний ефект) та полегшення (протилежний ефект) вПСС, відповідно. Б – графік залежності коефіцієнта парної стимуляції (*КПС*) від нормованої амплітуди вПСС на перший стимул для синаптично зв'язаної пари клітин, репрезентативні записи струмів якої ілюстровано в А, де $KPC = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\%$, де A_1 та A_2 – амплітуда першого та другого вПСС відповідно.

3.4.1. Короткочасна пластичність глутаматергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами *CS* при парній стимуляції

Для дослідження ефектів короткочасної пластичності глутаматергічної синаптичної передачі ми використовували парну стимуляцію з інтервалами 20, 50, 100, 200 та 500 мс між ПД в парі. Викликана генерація пар ПД в пресинаптичних ГКС призводила до короткочасної депресії глутаматергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією виключно НМДА- або АМПА-рецепторканалних комплексів на постсинаптичній мембрані нейронів *CS* (рис. 3.13. А, Б). Повне відновлення характеристик першого вПСС у парі спостерігалось при інтервалі між парами стимулів 2 с (рис. 3.13. а, б).

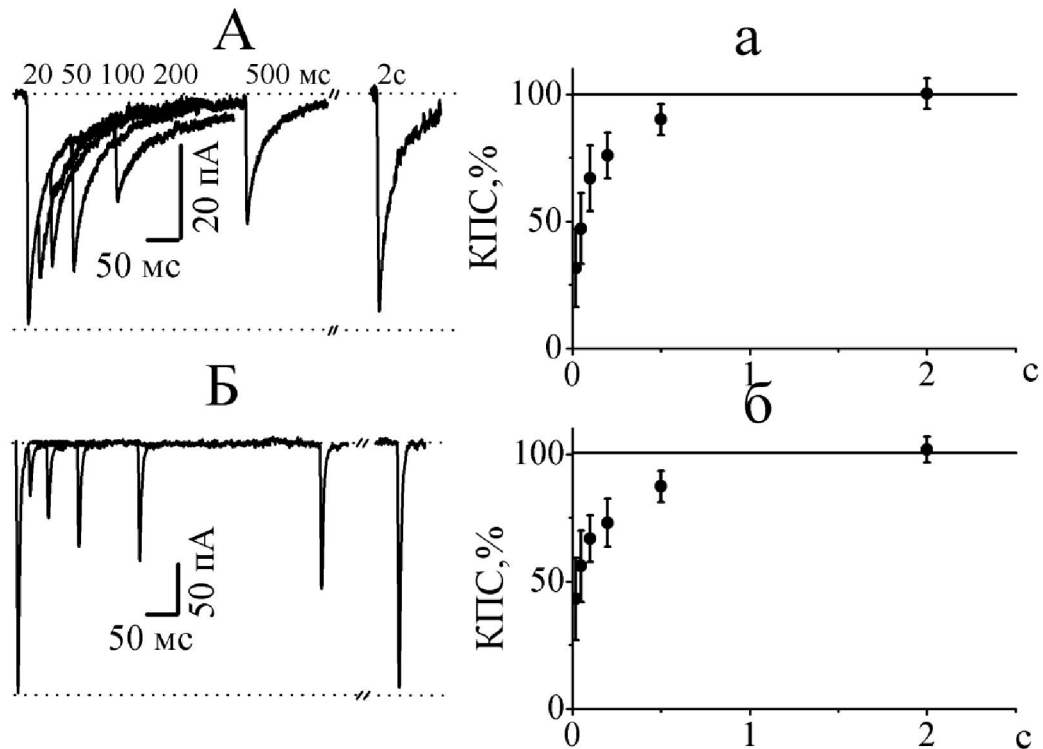


Рис. 3.13. Короткочасна депресія глутаматергічної синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS за умов парної стимуляції.

А та Б – приклади записів НМДА- та АМПА-рецепторопосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) при заданих міжстимульних інтервалах, відповідно. а та б – графік залежності коефіцієнту парної стимуляції (*КПС*) від величини міжстимульного інтервалу, як чисельної характеристики змін ефективності синаптичної передачі, опосередкованої активацією виключно НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів відповідно. $KPS = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\%$, де A_1 та A_2 – амплітуда першого та другого вПСС відповідно.

Відповіді синаптично зв'язаних пар нейронів, в яких спостерігалася короткотривала депресія, були нами проаналізовані щодо наявності зворотної кореляції між амплітудами першого та другого вПСС. Нахил лінії регресії був довільним, а кореляція мізерною у всіх досліджуваних парах нейронів. Недивлячись на відсутність безпосереднього зв'язку між амплітудами першого та другого вПСС, ми виявили певну зворотну нелінійну залежність коефіцієнту

парної стимуляції (КПС, $KPC = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\%$) від амплітуди першого вПСС (приклад якої зображено на рис. 3.12. Б). Суть даної залежності полягала в тому, що короткочасна депресія спостерігалась коли амплітуда ПСС на перший стимул була великою, а короткочасна потенціація – коли амплітуда ПСС на перший стимул була малою.

Для оцінки вкладу можливих пре- та постсинаптичних механізмів, що лежать в основі ефектів депресії, ми використовували методи базового та повного квантового аналізу. Ми оцінили величину кванту q та ймовірність вивільнення p та кількість сайтів вивільнення n для вПСС на перший та другий стимул при всіх міжстимульних інтервалах. Як було описано раніше, період між парами ПД складав 2 с, чого було достатньо для повного відновлення вПСС на перший стимул, тому квантові та біноміальні параметри розраховані для перших вПСС вважалися контрольними. Контрольні параметри оцінені для кожної окремої синаптично зв'язаної пари достовірно не відрізнялися ($p < 0,001$). Для визначення пре- або постсинаптичної природи короткочасної пластичності глутаматергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами CS ми аналізували середні нормовані зміни параметрів q , p , n та КПС. Середні нормовані зміни були розраховані наступним чином: $\left(\frac{\bar{X} \cdot 100\%}{\bar{X}_{\text{контр}}} - 100\% \right)$, де \bar{X} – середня величина параметра (n , p , q або КПС), оціненого для вПСС на другий стимул; $\bar{X}_{\text{контр}}$ – середня величина параметра (n , p , q або КПС), оціненого для вПСС на перший стимул. Короткочасна депресія НМДА-рецепторопосередкованих вПСС спостерігалася поряд з достовірним зменшенням кількості сайтів вивільнення n у порівнянні з контролем (на 42, 38, 19 та 13 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс, відповідно, рис. 3.14. А). Рівні достовірності міжгрупових різниць вказані на рисунку.

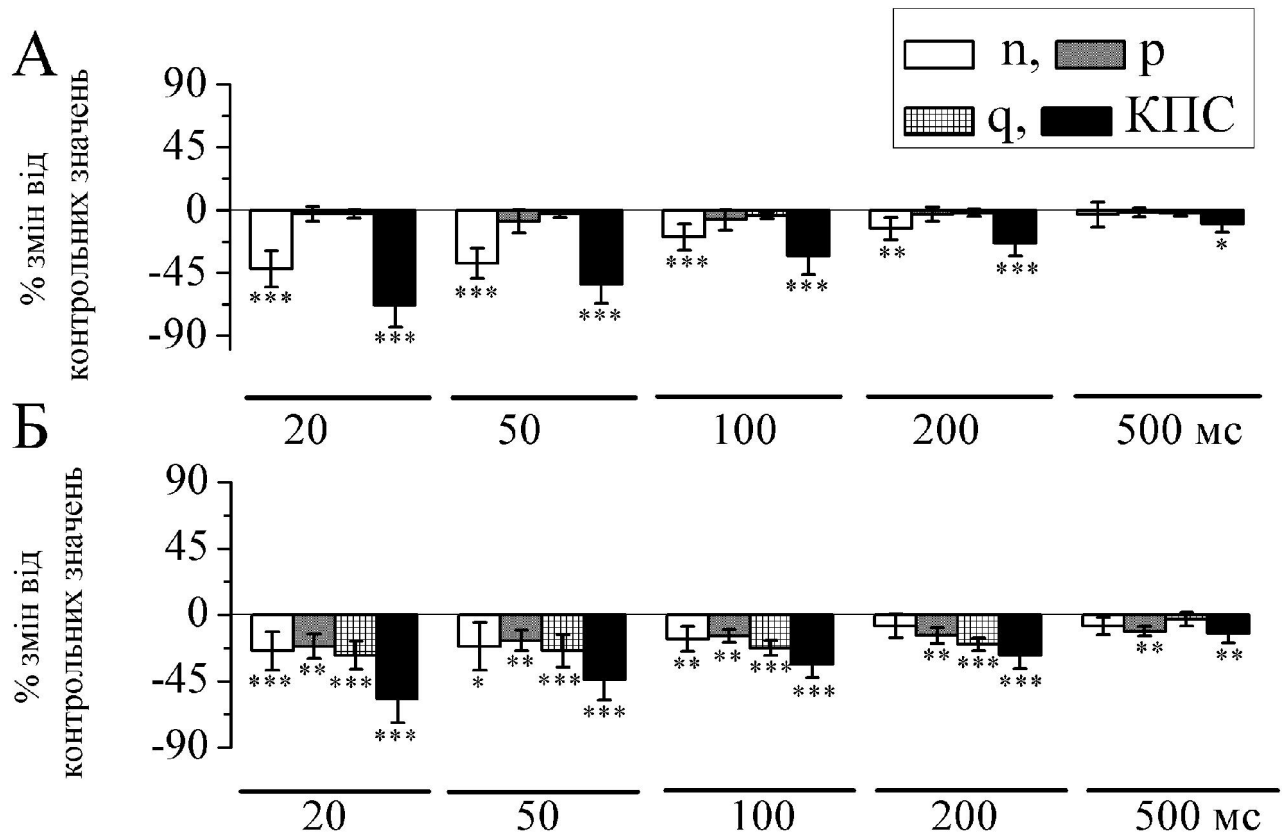


Рис. 3.14. Діаграми нормовані змін квантових та біноміальних параметрів.

А та Б – графічні зображення середніх нормованих змін величин n , p , q та коефіцієнта парної стимуляції (КПС) щодо контрольних значень при різних міжстимульних інтервалах. Середні нормовані зміни були розраховані наступним чином:

$\left(\frac{\bar{X} \cdot 100\%}{\bar{X}_{\text{контр}}} - 100\% \right)$, де \bar{X} – середня величина параметра (n , p , q або КПС), оціненого для вПСС на другий стимул;

$\bar{X}_{\text{контр}}$ – середня величина параметра (n , p , q або КПС), оціненого для вПСС на перший стимул. q – величина кванту; n та p – біноміальні параметри: n – середня кількість сайтів вивільнення, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного сайту вивільнення. Рівень достовірності між-групових різниць позначено наступним чином: * $P < 0,05$;

** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Короткочасна депресія АМПА-рецепторопосередкованих вПСС була пов'язана з достовірним зменшенням величини кванту q на 27, 24, 22 та 20 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс, відповідно. Ймовірність вивільнення

p зменшувалась на 21, 17, 14, 13 та 11 % при між стимульних інтервалах 20, 50, 100, 200 та 500 мс, відповідно; а кількість сайтів вивільнення n зменшувалась на 24, 21 та 16 % при міжстимульних інтервалах 20, 50 та 100 мс, відповідно (рис. 3.14. Б). Тобто, в даному випадку депресія може обумовлюватись не тільки особливостями роботи пресинаптичної терміналі (зниження пресинаптичних факторів n , p із відповідним зменшенням квантового вмісту m), а і можливими постсинаптичними механізмами (десенситизацією постсинаптичних рецепторів). Рівні достовірності міжгрупових різниць вказані на рисунку.

Максимальну депресію спостерігали при мінімальних міжстимульних інтервалах.

3.4.2. Короткочасна пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами CS при парній стимуляції

Викликана генерація пар ПД в пресинаптичних ГКС призводила до короткотривалого полегшення ГАМК-ергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів (рис. 3.15. А, а).

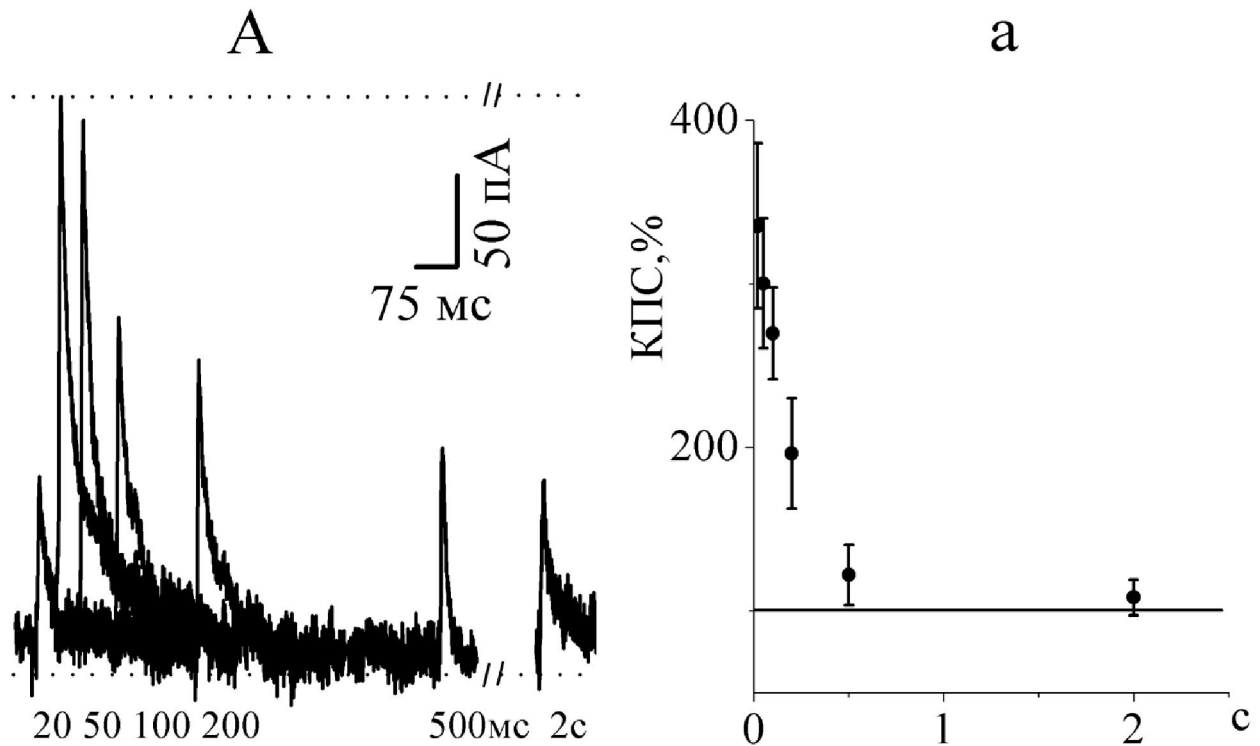


Рис. 3.15. Короткочасна потенціяція ГАМК-ергічної синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS за умов парної стимуляції.

А – приклади записів ГАМК_A-рецепторопосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) при заданих міжстимульних інтервалах відповідно. **а** – графік залежності коефіцієнту парної стимуляції (*КПС*) від міжстимульного інтервалу для чисельної характеристики змін ефективності синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецепторканальних комплексів. $KПС = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\%$, де A_1 та A_2 – амплітуда першого та другого вПСС відповідно.

Для оцінки вкладу можливих пре- та постсинаптичних механізмів, що лежать в основі даного ефекту короткотривалої потенціяції ми використовували методи базового та повного квантового аналізу, які дали можливість оцінити величину кванту q , ймовірність вивільнення трансмітера p та кількість сайтів вивільнення n вПСС на перший та другий стимул при всіх міжстимульних інтервалах. Для визначення пре- або постсинаптичної природи короткочасної

пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами *CS* ми аналізували середні нормовані зміни параметрів q , p , n та $KПС$. Короткочасна потенціація ГАМК-ергічної нейропередачі між ГКС та нейронами *CS* була пов'язана з достовірним збільшенням ймовірності вивільнення p на 45, 41, 26, 19 та 11 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100, 200 та 500 мс, відповідно. Кількість сайтів вивільнення n збільшувалась на 55, 43, 37 та 22 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс, відповідно. Отже, в основі полегшення ГАМК_A-рецепторопосередкованих вПСС лежать пресинаптичні механізми (збільшення пресинаптичних факторів n , p і відповідно збільшення квантового вмісту m). Максимальні достовірні зміни параметрів p та n спостерігалися при мінімальних міжстимульних інтервалах.

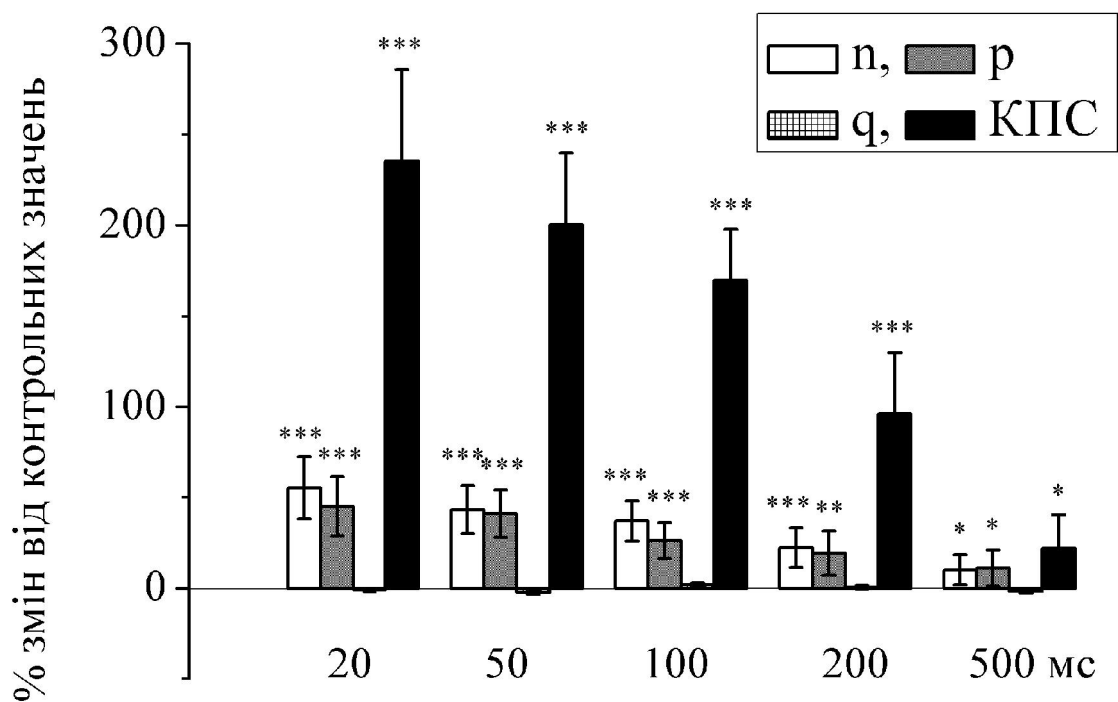


Рис. 3.16. Діаграми нормованих змін квантових та біноміальних параметрів. Графічні зображення середніх нормованих змін величин n , p , q та коефіцієнта парної стимуляції ($KПС$) відносно контрольних значень при різних міжстимульних інтервалах. Середні нормовані зміни були розраховані наступним

чином: $\left(\frac{\bar{X} \cdot 100\%}{\bar{X}_{\text{контр}}} - 100\% \right)$, де \bar{X} – середня величина параметра (n , p , q або $KПС$), оціненого для ВПСС на другий стимул; $\bar{X}_{\text{контр}}$ – середня величина параметра (n , p , q або $KПС$), оціненого для ВПСС на перший стимул. q – величина кванту; n та p – біноміальні параметри: n – середня кількість сайтів вивільнення, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного сайту вивільнення. Рівень достовірності між-групових різниць позначено наступним чином: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.5. Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між кокультивованими ГКС та нейронами CS

Ми дослідили зміну ефективності синаптичної передачі в парі ГКС – нейрон CS, опосередковану дефіцитом кисню. В перебігу електрофізіологічного експерименту ми використовували загальноприйняту модель гіпоксії *in vitro* – нетривалу (до 5 хв) аплікацію гіпоксичного розчину. Гіпоксичні розчини (0,19 мг/л O₂) готували безпосередньо перед експериментом шляхом барботування робочого зовнішньоклітинного розчину азотом протягом 20 хв. Аплікацію проводили за допомогою методу швидкої локальної суперфузії. Реєстрували трансмембранні струми та потенціали у окремих синаптично зв'язаних парах нейронів за допомогою методу парного петч-клемпу в конфігурації «ціла клітина». Достовірних змін потенціалу спокою досліджуваних пар клітин протягом гіпоксії та реоксигенації щодо контролю не спостерігалось.

3.5.1. Індукована гіпоксією зміна ефективності глутаматергічної НМДА-рецепторопосередкованої передачі між кокультивованими ГКС та нейронами *CS*

Нетривала аплікація (до 3 хв включно) гіпоксичного розчину призводила до короткочасної потенціації НМДА-рецепторопосередкованої синаптичної передачі між ГКС та нейронами *CS* (рис. 3.17. А, Б, В, Г). Залежність тривалості потенціації від часу аплікації достатньо добре описувалась лінійною залежністю. Надалі ми обрали 5 хвилинну аплікацію для стандартизації протоколів експериментів.

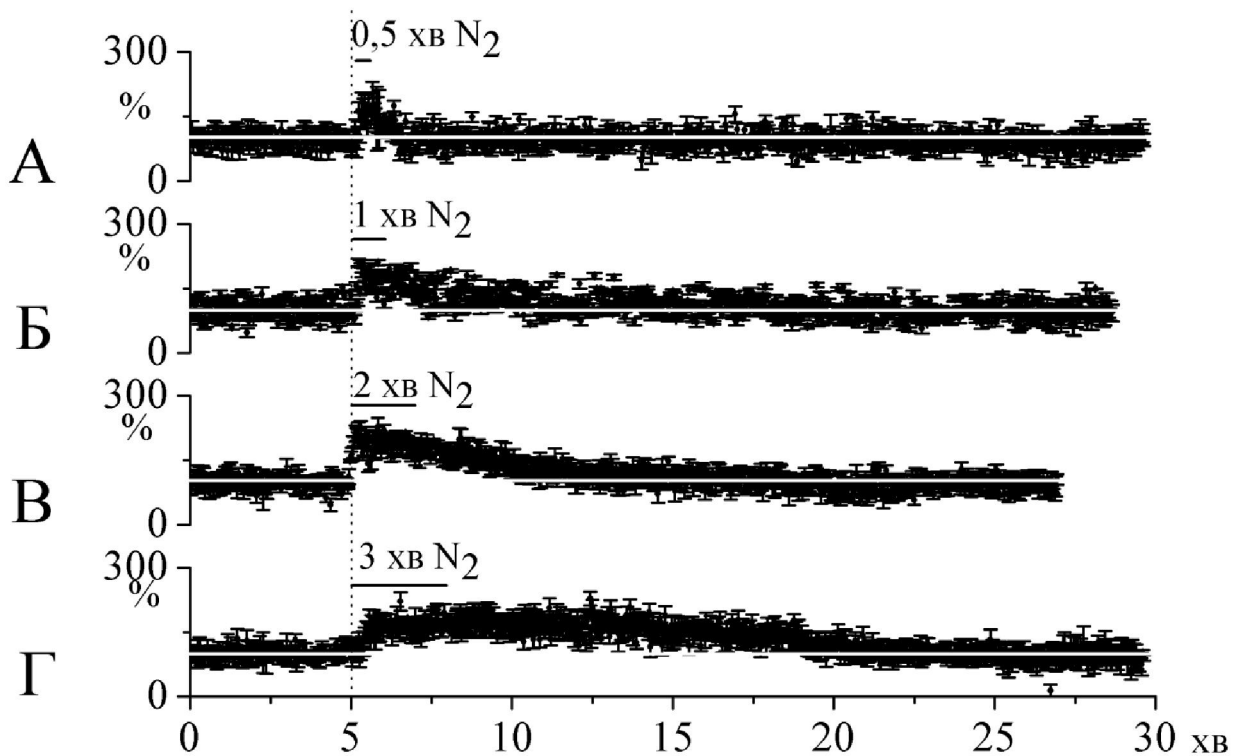


Рис.3.17. Короткочасна потенціація НМДА-рецепторопосередкованої передачі у відповідь на нетривалу аплікацію гіпоксичного розчину.

А, Б, В, Г – динаміка нормованих амплітуд НМДА-рецепторопосередкованих викликаних постсинаптичних струмів в

безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині до, під час та після аплікації гіпоксичного розчину.

Аплікація гіпоксичного розчину протягом 5 хв призводила до довготривалої потенціації (ДТП) НМДА-рецепторопосередкованих вПСС (рис. 3.18. А). Амплітуди цих вПСС були достовірно ($p < 0,01$) збільшені щодо контрольних значень на $61 \pm 7 \%$ протягом періоду гіпоксії та на $29 \pm 6 \%$ протягом періоду реоксигенації. Описаний ефект було зареєстровано у безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині з додаванням блокатора АМПА-рецепторканалних комплексів DNQX (20 мкМ). Значення часу наростання та сталої часу спаду цього вПСС становили $t = 4,3 \pm 0,3$ та $\tau = 47,2 \pm 5,4$ мс ($n = 18$), відповідно. Даний струм повністю блокувався в присутності 20 мкМ D_L-APV. Тобто описана синаптична передача опосередковувалась виключно НМДА-рецепторканалним комплексом.

Ми дослідили гіпоксичний вплив на НМДА-рецепторопосередковану синаптичну передачу у стандартному зовнішньоклітинному розчині з додаванням 20 мкМ DNQX ($n = 6$). Наявність Mg^{2+} не давала можливості зареєструвати дані струми при підтримуваному потенціалі – 70 мВ в контролі. Тому постсинаптичний нейрон CS деполяризували до – 40 або – 30 мВ для підтвердження наявності функціонального синапсу у візуально ідентифікованій парі ГКС — нейрон CS. Після цього постсинаптичний нейрон утримували в нормальних фізіологічних умовах (при – 70 мВ). Локальна аплікація безкисневого розчину на досліджувану пару призводила до появи НМДА-рецепторопосередкованого вПСС у нейроні CS, при чому струм знову зникав у період реоксигенації (рис 3.18. Б, Б'). Можливість реєстрації НМДА-рецепторопосередкованих вПСС під час гіпоксії ймовірно з'являлась в результаті ослаблення потенціал-залежного магнієвого блоку, який за фізіологічних умов є одним з відомих механізмів нейропротекторної дії.

Ми проаналізували мініатюрні ($n = 6$) та спонтанні ($n = 6$) НМДА-рецепторопосередковані збуджувальні постсинаптичні струми в контрольних умовах та при дефіциті кисню. Як видно з (рис. 3.19. А) гіпоксія індукує збільшення частоти виникнення НМДА-рецепторопосередкованих сПСС, яка

залишається підвищеною протягом періоду реоксигенації. Кількісний аналіз частотних змін зображений на графіку кумулятивної ймовірності (рис. 3.19. а). Аналогічне збільшення частоти відносно контролю спостерігалось при реєстрації мПСС протягом гіпоксії (рис. 3.19. б).

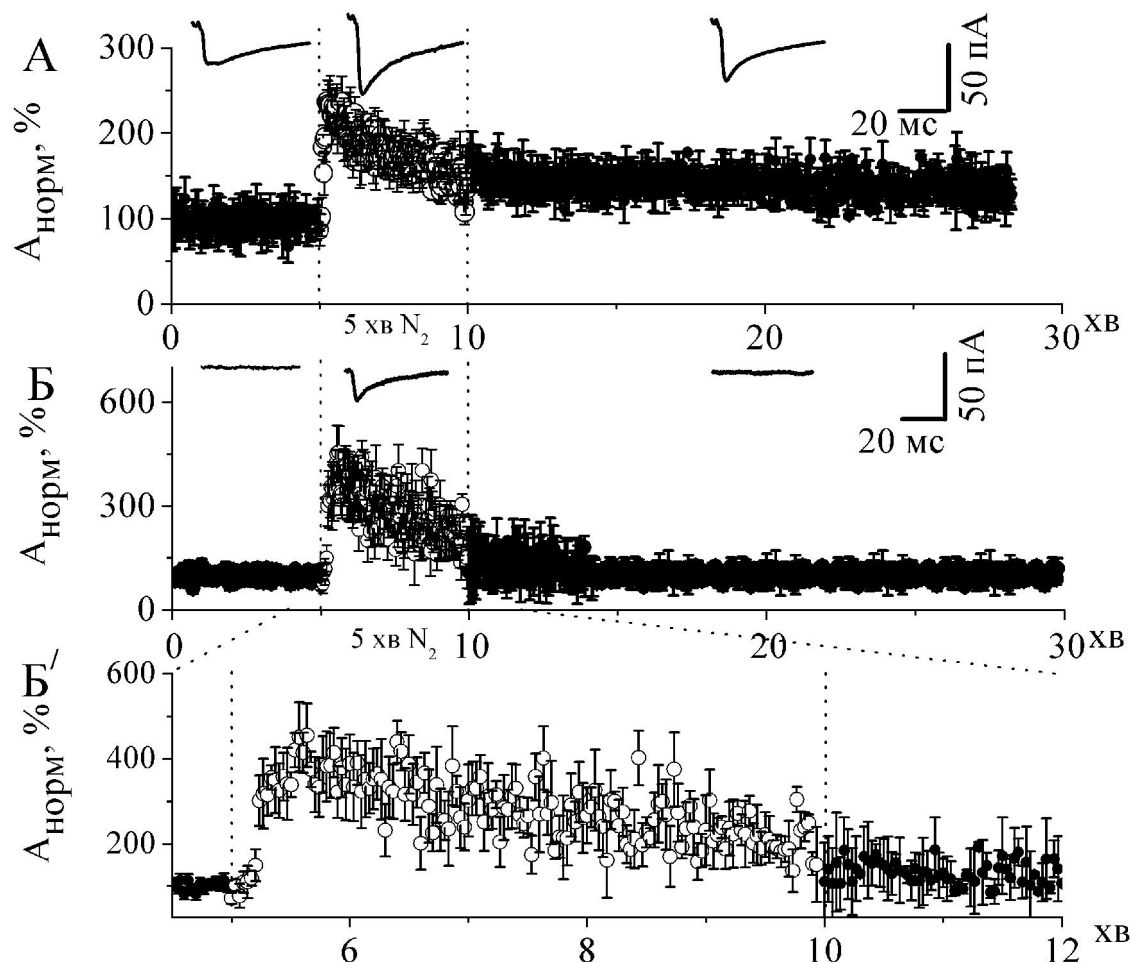


Рис. 3.18. Вплив довготривалої (до 5 хв) аплікації гіпоксичного розчину на НМДА-рецепторопосередковані викликані постсинаптичні струми (вПСС).

А, Б – динаміка нормованих амплітуд вПСС до, під час та після аплікації гіпоксичного розчину в безмагнієвому та стандартному (2 mM Mg^{+2}) зовнішньоклітинних розчинах, відповідно. Нагорі А і Б представлені репрезентативні записи вПСС у відповідному періоді. Б' - збільшене зображення частини графіку Б.

Порівняльний аналіз НМДА-рецепторопосередкованих мПСС виявив достовірну появу другого піку в гістограмі амплітуд в гіпоксичних умовах

(рис. 3.19. 1, 2). Тобто за умов низької ймовірності вивільнення нейротрансмітера протягом періоду гіпоксії спостерігалися як одно- так і двохквантове вивільнення синаптичних везикул.

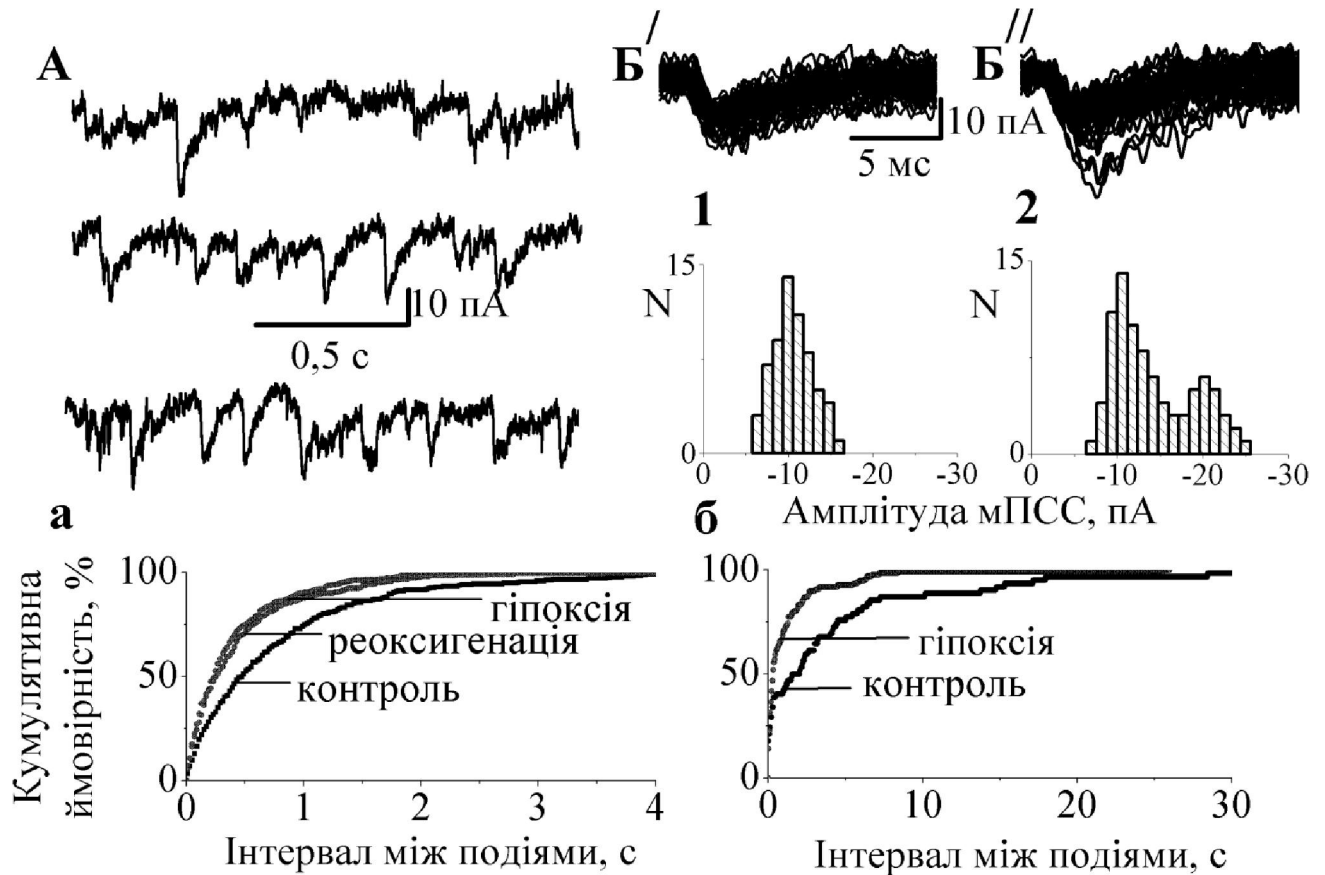


Рис. 3.19. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на НМДА-рецепторопосередковані спонтанні та мініатюрні постсинаптичні струми (сПСС та мПСС).

А – записи сПСС в контролі, протягом періодів гіпоксії та реоксигенації. **а** – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними подіями в контролі при гіпоксії та протягом реоксигенації. **Б', Б''** – записи мПСС в контролі та протягом гіпоксії. **1, 2** – гістограми амплітуд мПСС в контролі та при гіпоксії, відповідно. **б** – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між мініатюрними подіями в контролі та при гіпоксії.

Для виявлення локусу індукованих гіпоксією змін ми оцінили біноміальні параметри та коефіцієнт варіації НМДА-рецепторопосередкованих вПСС в контролі, при гіпоксії та протягом реоксигенації. Контрольні параметри оцінені

для кожної окремої синаптично зв'язаної пари в сукупності достовірно не відрізнялися ($p < 0,001$).

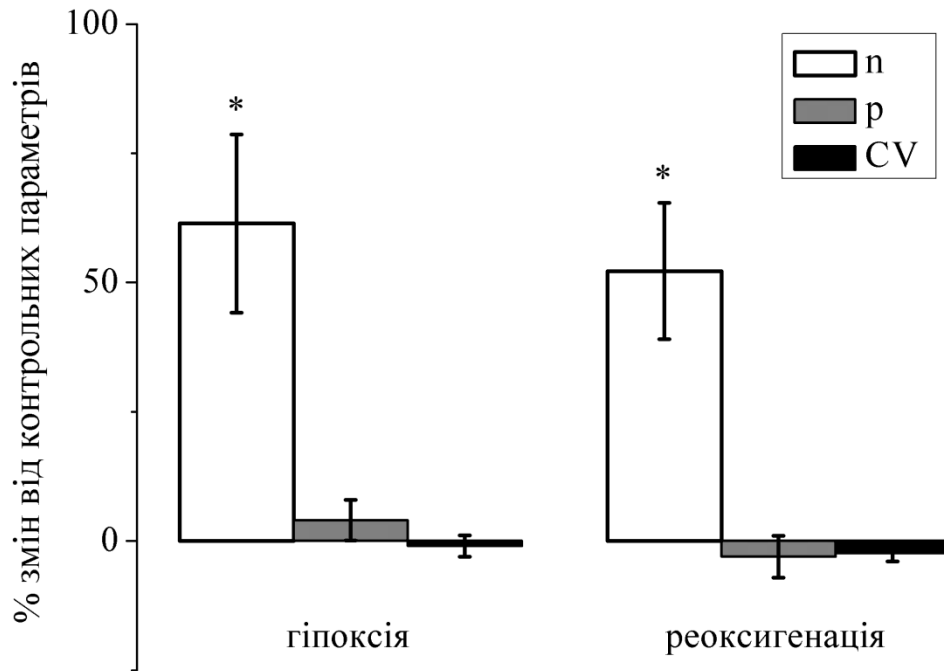


Рис. 3.20. Діаграма нормованих змін біноміальних та статистичних параметрів. Діаграма середніх нормованих змін величин n , p , та коефіцієнта варіації (CV) щодо контрольних значень при гіпоксії та реоксигенації. n та p – біноміальні параметри: n – середня кількість сайтів вивільнення, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного сайту вивільнення. Середні нормовані зміни були розраховані наступним чином: $\left(\frac{\bar{X} \cdot 100\%}{\bar{X}_{\text{контр}}} - 100\% \right)$, де \bar{X} – середня величина параметра (n , p або CV), оціненого для вПСС протягом гіпоксії та реоксигенації; $\bar{X}_{\text{контр}}$ – середня величина параметра (n , p або CV), оціненого для вПСС в контролі. Рівень достовірності між-групових різниць позначено наступним чином: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$.**

Оцінка біноміальних параметрів та коефіцієнту варіації НМДА-рецепторопосередкованих вПСС показала, що ДТП спостерігалася поряд з достовірним збільшенням ($p < 0,001$) кількості сайтів вивільнення n у порівнянні з контролем на 56 та 50 % в періоді гіпоксії та реоксигенації, відповідно (рис. 3.20. А). Достовірних змін у значеннях p та CV при гіпоксії та реоксигенації у порівнянні з

контролем не виявлялося. Тобто в реалізацію ДТП НМДА-рецепторопосередкованої синаптичної передачі між ГКС та нейронами *CS* залучаються пресинаптичні механізми, незалежні від ймовірності вивільнення нейротрансмітера, і пов'язані зі збільшенням кількості сайтів вивільнення.

3.5.2. Індукована гіпоксією зміна ефективності глутаматергічної АМПА-рецепторопосередкованої передачі між кокультивованими ГКС та нейронами *CS*

Аплікація гіпоксичного розчину пригнічувала глутаматергічну синаптичну передачу, опосередковану активацією АМПА-рецепторканальних комплексів (рис. 3.21.). Амплітудні показники таких вПСС достовірно ($p < 0,01$) зменшувались (на $62 \pm 6\%$, $n = 20$) у порівнянні з показниками контролю лише протягом періоду гіпоксії.

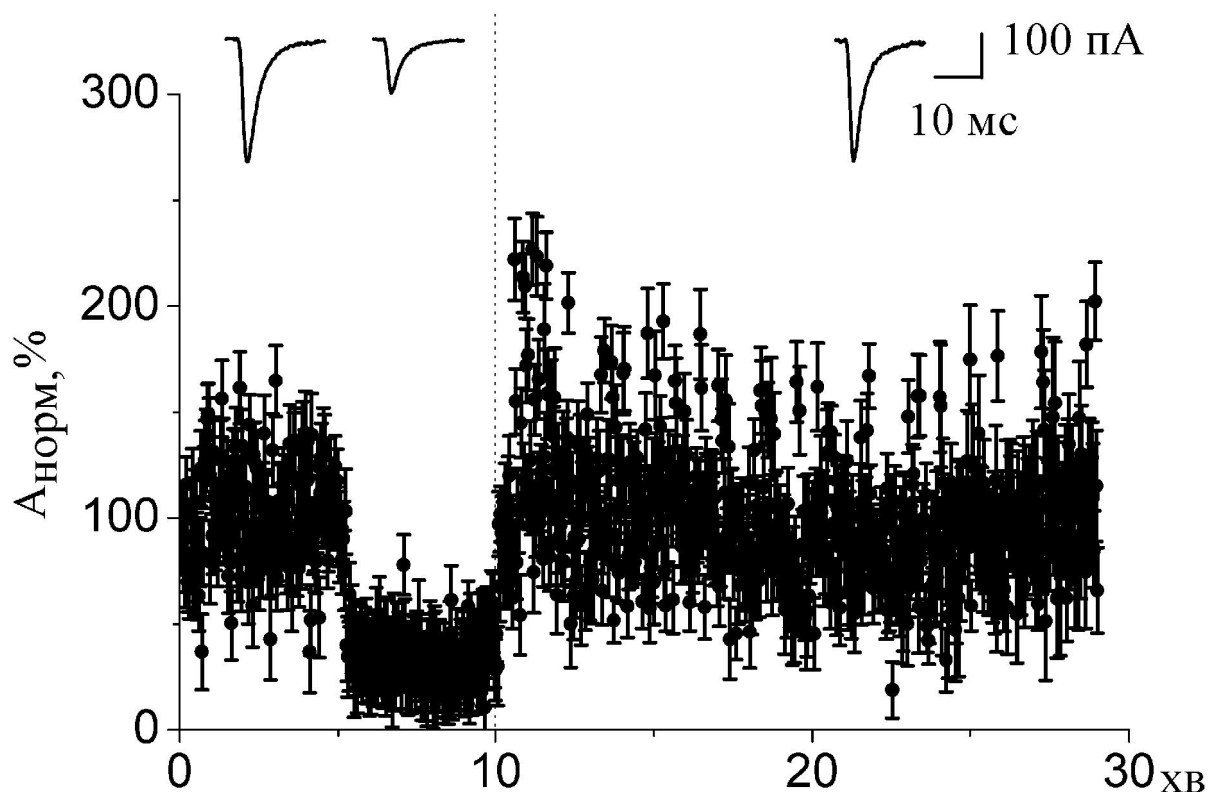


Рис. 3.21. Пригнічення АМПА-рецепторопосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) протягом аплікації гіпоксичного розчину.

Динаміка нормованих амплітуд вПСС в стандартному зовнішньоклітинному розчині в присутності 20 мкМ D_L -APV до, під час та після аплікації гіпоксичного розчину. Нагорі показані репрезентативні записи вПСС у межах відповідного періоду.

Дослідження впливу дефіциту кисню на АМПА-рецепторопосередковані сПСС ($n=6$) виявили зменшення частоти реєстрації (рис. 3.22. А, а). Аналогічно зменшувалась частота мПСС (рис. 3.22. б). Аналіз амплітуд мПСС ($n=5$) не виявив достовірних змін протягом періоду дефіциту кисню (рис. 3.22. Б', Б'', 1, 2). Дані експерименти проводили у відповідному зовнішньоклітинному розчині з додаванням 20 мкМ D_L -APV.

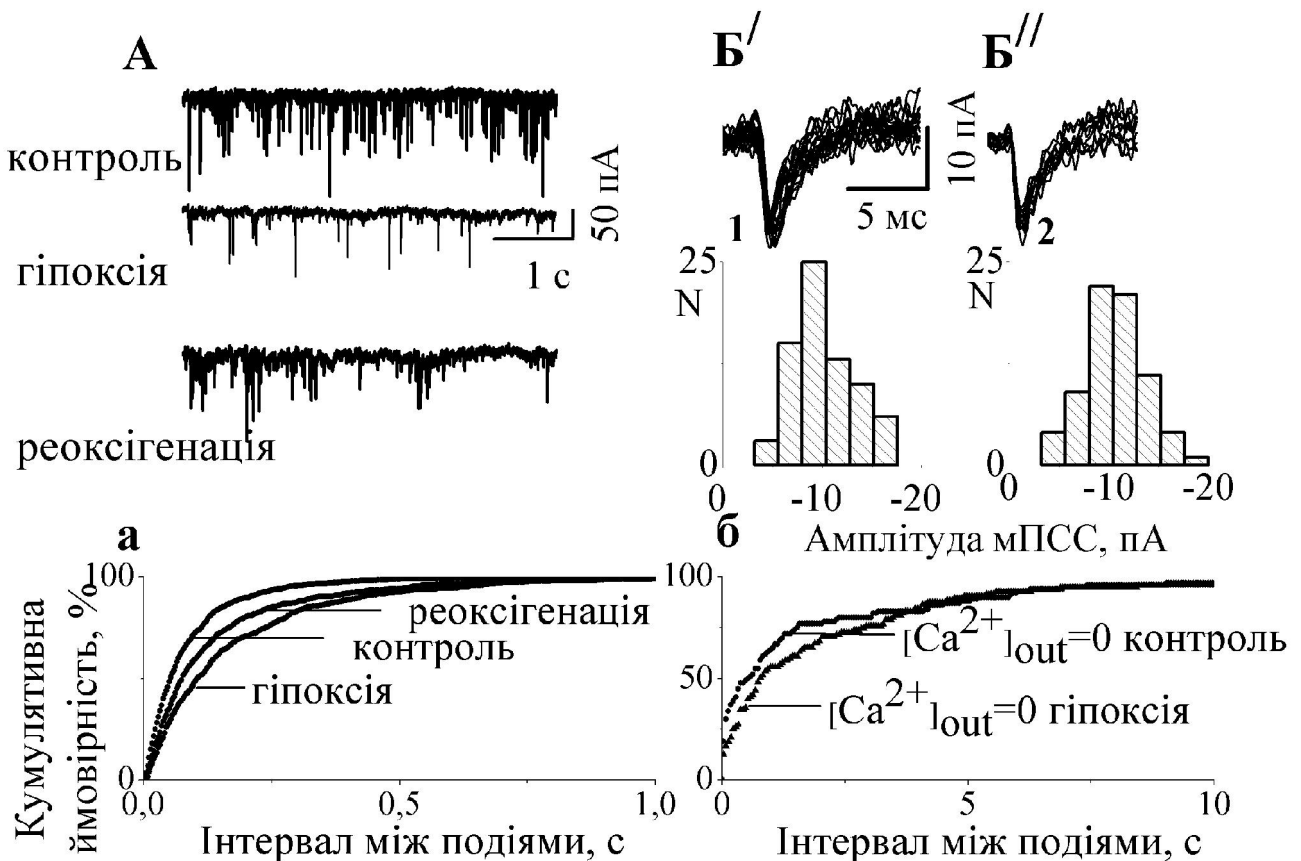


Рис. 3.22. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на АМПА-рецепторопосередковані спонтанні (сПСС) та мініатюрні (мПСС) постсинаптичні струми.

А - записи сПСС в контролі, протягом періодів гіпоксії та реоксигенації. **а** – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між сПСС в контролі, протягом гіпоксії та реоксигенації. **Б', Б''** - записи мПСС в контролі та протягом гіпоксії. **1, 2** – гістограми амплітуд мПСС в контролі та при гіпоксії, відповідно. **б** – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між мініатюрними подіями в контролі та при гіпоксії.

Ми також проводили серію експериментів по дослідженню впливу гіпоксії на АМПА-рецепторопосередковані сПСС у стандартному зовнішньоклітинному розчині без додавання блокатора НМДА-рецепторопосередкованої передачі ($n = 6$). Аналіз часу наростання та кінетики спаду сПСС у контролі показав наявність лише АМПА-рецепторопосередкованих струмів (рис. 3.23. А). Однорідність популяції за параметрами часового ходу та кінетики спаду струмів відображено на (рис. 3.23. 1, 2). За умов аплікації гіпоксичного розчину зменшувалися амплітудні показники АМПА-рецепторопосередкованих сПСС, і з'являлися одно- та двохквантові НМДА-рецепторопосередковані ПСС. Нормовані сПСС та гістограми кінетичних характеристик чітко розрізняють два типи глутаматергічних сПСС (рис. 3.23. Б, 3, 4).

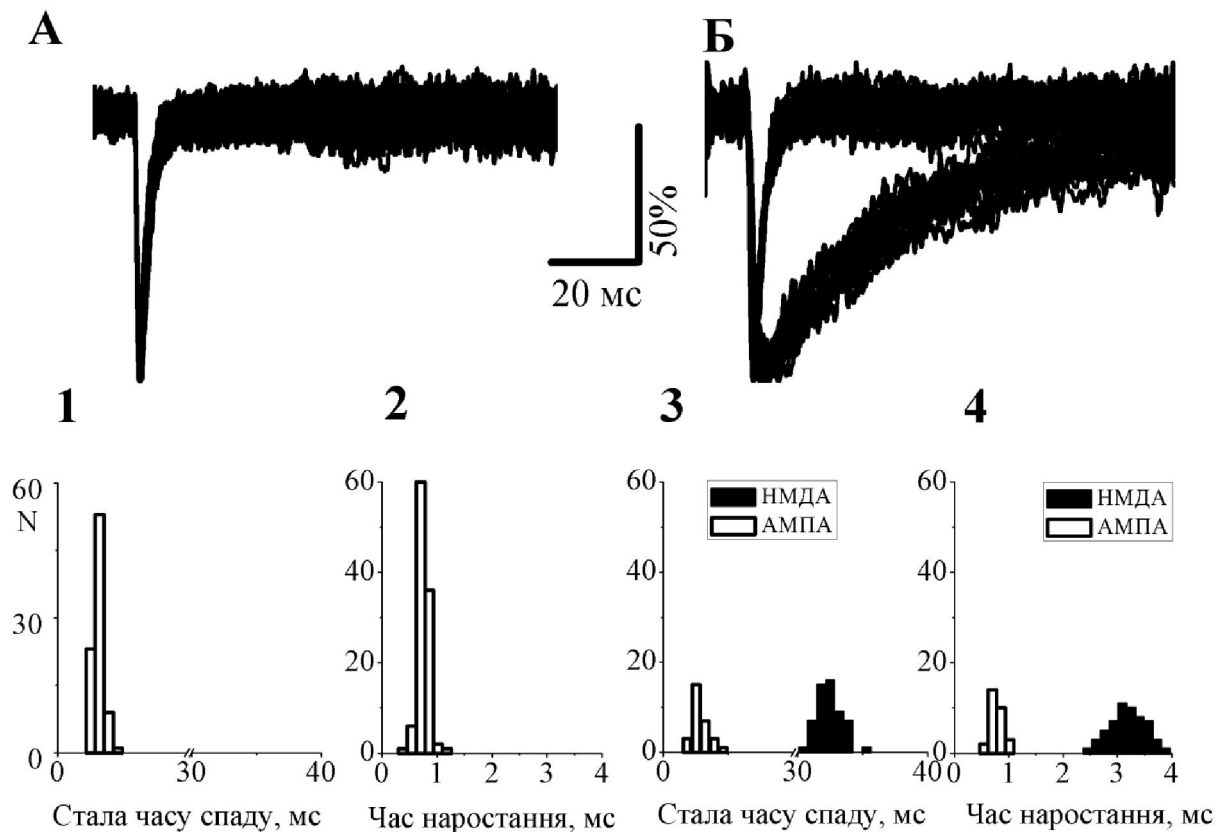


Рис. 3.23. Ефекти впливу гіпоксії на глутаматергічні спонтанні постсинаптичні струми (сПСС) зареєстровані за умов стандартного зовнішньоклітинного розчину, без додавання блокаторів НМДА-рецепторканалних комплексів.

А, Б - нормовані записи сПСС в контролі та при гіпоксії відповідно. 1, 2 – гістограми сталої часу спаду та часу наростання сПСС в контролі представлених в А. 3, 4 - гістограми сталої часу спаду та часу наростання сПСС протягом гіпоксії представлених в Б.

Для оцінки вкладу можливих пре- та постсинаптичних механізмів, що відповідають за пригнічення АМПА-рецепторопосередкованої синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS протягом аплікації гіпоксичного розчину, ми проаналізували нормовані зміни біноміальних параметрів та коефіцієнта варіації щодо контролю. Опосередковане гіпоксією пригнічення АМПА-рецепторопосередкованої передачі збігалось з достовірним ($p < 0,001$) зменшенням CV (на 47 %) протягом гіпоксії та зі збільшенням цього показника (на 87 %) протягом

реоксигенації; а також зі зменшенням ймовірності вивільнення нейромедіатора p на 24 та 13 % ($p < 0,001$) протягом періодів гіпоксії та реоксигенації відповідно. Відбувалося також зменшення кількості сайтів вивільнення n (на 55 % при $p < 0,001$) протягом гіпоксії (рис. 3.24.). При цьому, як вже зазначалося раніше, гіпоксія лише пригнічувала дану синаптичну передачу, тобто достовірних змін амплітуд вПСС у періоді реоксигенації в порівнянні з контролем не спостерігалось. Отже, аплікація гіпоксичного розчину пригнічувала АМПА-рецепторопосередковану синаптичну передачу, при чому це зрушення відбувалося за рахунок пресинаптичних механізмів.

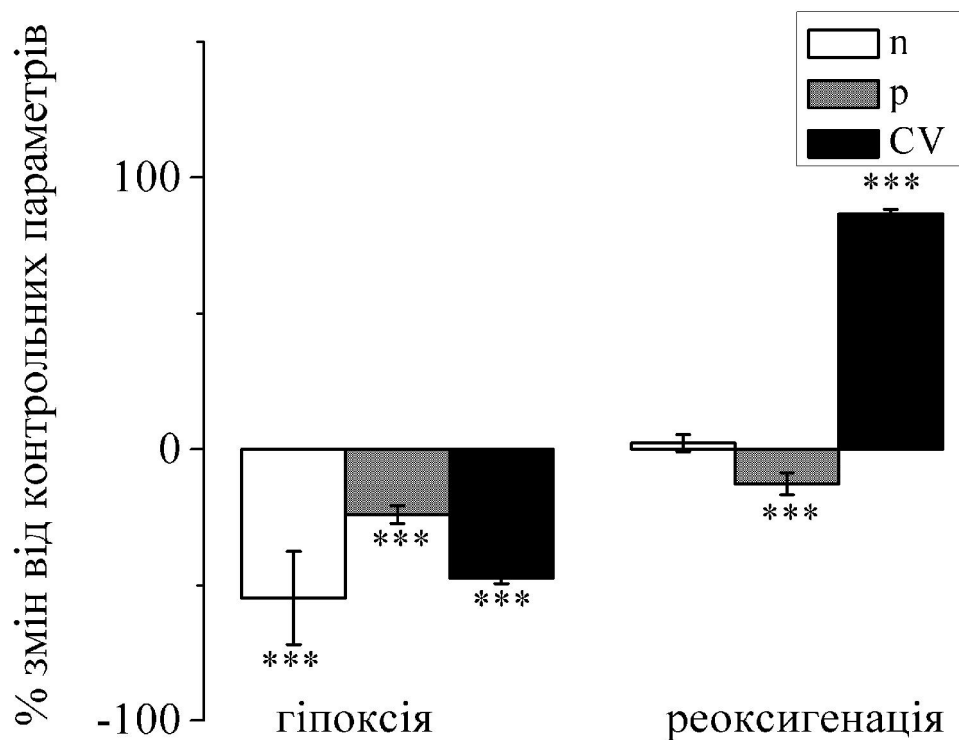


Рис. 3.24. Діаграма нормованих змін біноміальних та статистичних параметрів. Діаграма середніх нормованих змін величин n , p , та коефіцієнта варіації (CV) щодо контрольних значень при гіпоксії та реоксигенації. n та p – біноміальні параметри: n – середня кількість сайтів вивільнення, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного сайту вивільнення. Середні нормовані зміни були розраховані наступним чином: $\left(\frac{\bar{X} \cdot 100\%}{\bar{X}_{\text{контр}}} - 100\% \right)$, де \bar{X} – середня величина параметра (n , p або CV), оціненого для вПСС протягом гіпоксії та реоксигенації; $\bar{X}_{\text{контр}}$ – середня величина параметра (n , p або CV), оціненого для

вПСС в контролі. Рівень достовірності між-групових різниць на рисунках позначено наступним чином: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.5.3. Індукована гіпоксією зміна ефективності ГАМК-ергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами CS

Аплікація гіпоксичного розчину призводила до довготривалої депресії (ДТД) ГАМК-ергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів (рис. 3.25.). Достовірне ($p < 0,001$) зменшення амплітуди ГАМК_A-рецепторопосередкованих вПСС на $47 \pm 9\%$ та на $39 \pm 6\%$ спостерігалось протягом гіпоксії та реоксигенації, відповідно.

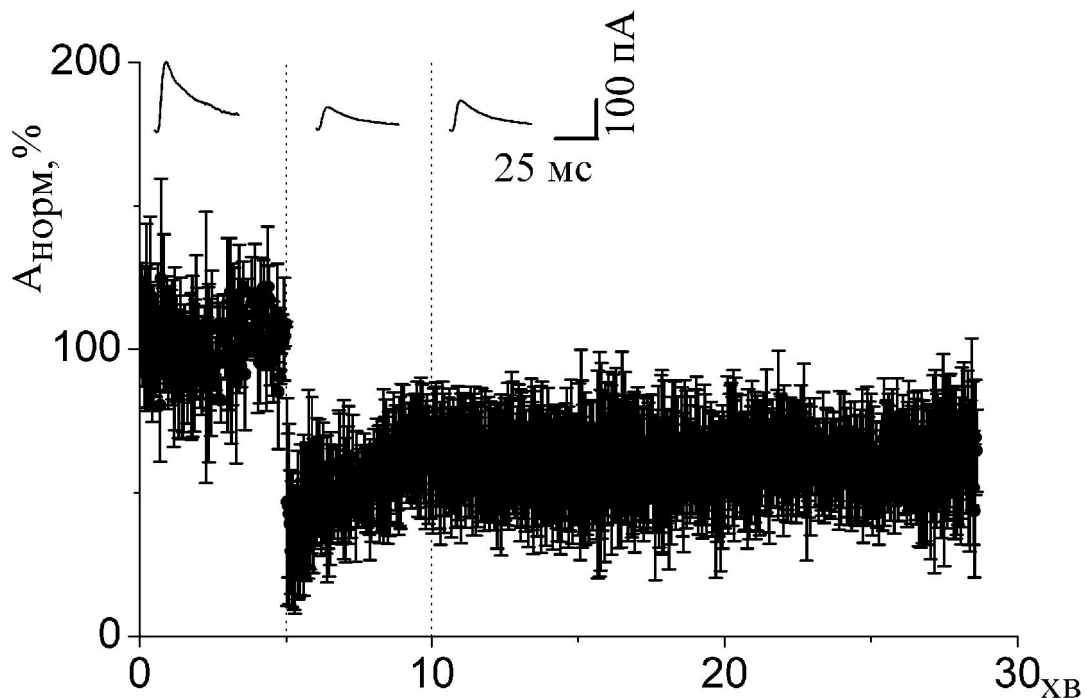


Рис. 3.25. Індукована гіпоксією довготривала депресія ГАМК_A-рецепторопосередкованої синаптичної передачі. Динаміка нормованих амплітуд викликаних постсинаптичних струмів до, протягом та після аплікації гіпоксичного розчину. Нагорі представлені репрезентативні записи вПСС у відповідному періоді.

Гіпоксія майже повністю припиняла спонтанну активність (рис. 3.26. А, а). Аналіз гістограм амплітуд мПСС вказав на достовірне ($p < 0,01$) зменшення величини кванта протягом періоду дефіциту кисню ($A_{\min} = 10,1 \pm 2,3$ пА в контролі, $A_{\min} = 6,17 \pm 1,0$ пА протягом гіпоксії, рис. 3.26. Б', Б'', 1, 2) та частоти виникнення мПСС (рис. 3.26. б).

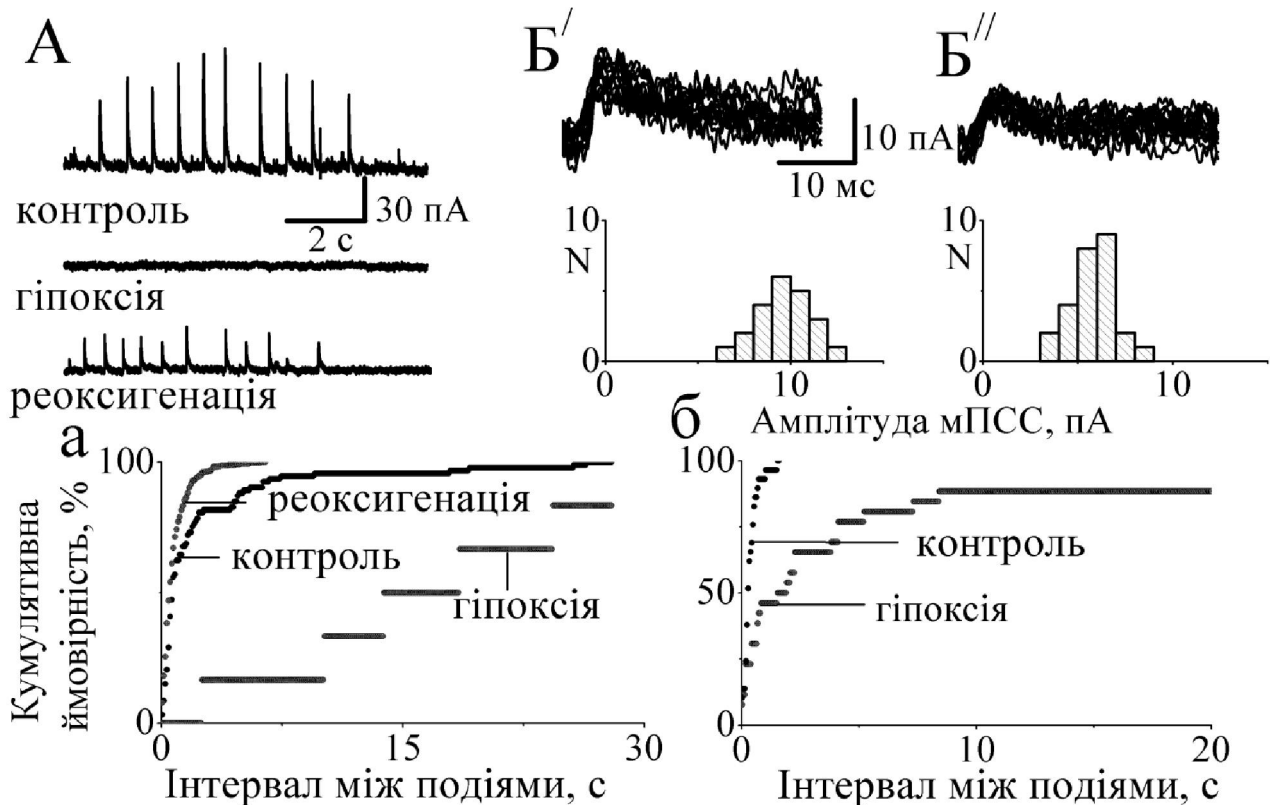


Рис. 3.26. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на ГАМК_A-рецепторопосередковані спонтанні (сПСС) та мініатюрні (мПСС) постсинаптичні струми.

А – записи сПСС в контролі, протягом гіпоксії та реоксигенації. а – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними подіями в контролі, протягом гіпоксії та реоксигенації. Б', Б'' – записи мПСС в контролі та протягом гіпоксії. 1, 2 – гістограми амплітуд мПСС в контролі та при гіпоксії відповідно. б – графік кумулятивної ймовірності інтервалів між мініатюрними подіями в контролі та при гіпоксії.

ДТД ГАМК-ергічної передачі між ГКС та нейронами CS супроводжувалась достовірним ($p < 0,001$) зменшенням кількості сайтів вивільнення n у порівнянні з

контролем (на 51 та 47 % при гіпоксії та реоксигенації відповідно, рис. 3.27.). Статистично достовірних змін у значеннях p та CV при гіпоксії та реоксигенації у порівнянні з контролем не було.

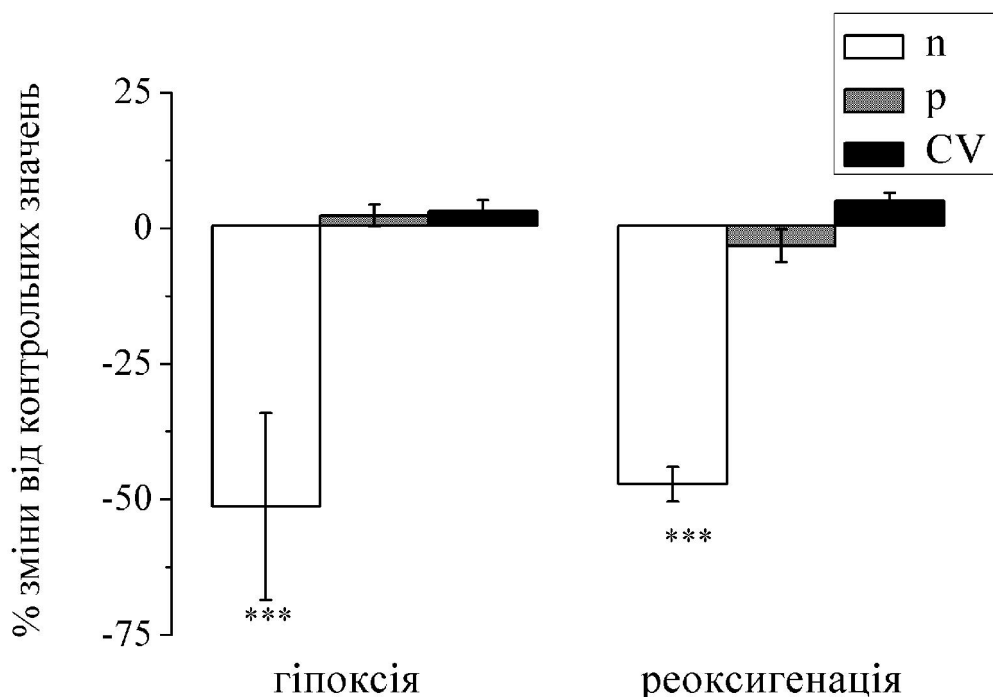


Рис. 3.27. Діаграма нормованих змін біноміальних та статистичних параметрів. Діаграма середніх нормованих змін величин n , p , та коефіцієнта варіації (CV) щодо контрольних значень при гіпоксії та реоксигенації. n та p – біноміальні параметри: n – середня кількість сайтів вивільнення, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного сайту вивільнення. Середні нормовані зміни були розраховані наступним чином: $\left(\frac{\bar{X} \cdot 100\%}{\bar{X}_{\text{контр}}} - 100\% \right)$, де \bar{X} – середня величина параметра (n , p або CV), оціненого для вПСС протягом гіпоксії та реоксигенації; $\bar{X}_{\text{контр}}$ – середня величина параметра (n , p або CV), оціненого для вПСС в контролі. Рівень достовірності між-групових різниць позначено наступним чином: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$.**

Загалом індукована гіпоксією ДТД ГАМК-ергічної передачі, вірогідно, пов'язана як зі зменшенням кількості діючих сайтів вивільнення, так і зі зменшенням чутливості постсинаптичної мембрани до нейротрансмітера.

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Кокультура дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS як адекватна функціональна модель для вивчення нейропередачі на рівні проекцій сітківки в підкорковий зоровий центр

Ряд сучасних досліджень присвячені визначенню властивостей синаптичної передачі на рівні проекцій сітківки в підкоркові зорові центри. Попередні дослідження синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS проводилися або *in vivo* [195, 27, 145, 173], або *in vitro* на пара сагітальних зрізах CS [35, 117, 170, 237]. На таких об'єктах вПСС реєструвалися в нейронах CS у відповідь на випадкову ("наосліп") електричну стимуляцію stratum opticum, оптичного пласту CS, який складається з великої кількості різноманітних вхідних проекцій в тому числі і аферентних входів зорового тракту. Принципові недоліки попередніх методик досліджень синаптичних ефектів полягали у відсутності можливості ідентифікації конкретного пресинаптичного входу волокна та контролю виникнення в ньому потенціалу дії. До всього, складність нейронної організації зорових провідних шляхів є основною причиною труднощів при детальному вивченні властивостей та механізмів синаптичної передачі. У зв'язку з цим виникло питання розробки більш адекватного в даному аспекті об'єкту. Ідея полягала у тому, щоб досліджувати нейропередачу, використовуючи сучасні методи реєстрації електричних сигналів, на окремих синаптично зв'язаних парах нейронів.

Методи культур дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS давно отримали широке використання в фармакологічних та електрофізіологічних дослідженнях [69, 208, 235, 115, 58, 209]. Здатність нейронів зберігати свої функціональні властивості та відтворювати функціонально-специфічні синаптичні контакти, що відбувається за рахунок генетично детермінованого розвитку за

умов культивування, дозволяє використовувати культури в якості адекватних моделей дослідження .

Розроблений та описаний в даній роботі метод кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів *CS* дозволяє отримати зручну та адекватну *in vitro* модель для вивчення синаптичної передачі аферентних впливів, що надходять по зоровому тракту у відповідний зоровий центр. Це дозволяє реєструвати окремі синаптичні події з точною ідентифікацією пре- та постсинаптичного нейрона і, отже, в значній мірі позбавляє відмічених вище недоліків.

Морфологічні характеристики та наявність певної специфічної електричної активності ГКС та нейронів *CS* у відповідь на тривалий деполяризуючий поштовх струму узгоджувались з результатами описаними попередніми дослідниками для даних популяцій клітин *in vivo* та *in vitro* на переживаючи зрізах та в культурах та були необхідними та достатніми критеріями для їх ідентифікації. В даній моделі морфологічні, електрофізіологічні відмінності обох популяцій клітин та візуалізація проекцій аксонів ГКС на нейрони *CS* надають можливість дослідження характеристик синаптичної передачі аферентних входів сітківки в підкорковий зоровий центр на окремих добре візуалізованих та ідентифікованих парах нейронів.

4.2. Основні типи нейропередачі в синапсах кокультивованих ГКС та нейронів *CS*.

Було досліджено синаптичну передачу на рівні аферентних входів сітківки в підкорковий зоровий центр з використанням розробленої нами *in vitro* моделі кокультивованих дисоційованих клітин сітківки та нейронів *CS* щура.

Результати проведених досліджень продемонстрували, що збуджувальна передача між ГКС та нейронами *CS* опосередковується вивільненням глутамата та активацією НМДА- та АМПА-рецепторканальних комплексів. В експериментах з використанням базового розчину з концентрацією 2 мМ зовнішньоклітинного

Mg^{+2} , виявилося неможливим виділити ні НМДА-рецепторопосередкований вПСС, ні компонент інтегрального вЗПСС при підтримуваному потенціалі – 70 мВ. Даний ефект може бути пояснений потенціалзалежним блокуванням НМДА- рецепторканалних комплексів іонами Mg^{+2} [131]. Зняття Mg^{+2} -блоку деполяризацією змінювало кінетику спаду та часовий хід вЗПСС нейронів *CS* взятих у експеримент протягом перших двох з половиною тижнів культивування при зміні підтримуваного потенціалу від – 40 мВ до – 30 мВ. Кінетика спаду та часовий хід вЗПСС нейронів *CS* взятих в експеримент починаючи з третього тижня культивування залишалися незмінними. Таким чином, можна припустити, що вклад НМДА-компоненти в інтегральний вЗПСС на ранніх етапах культивування є суттєвим, бо скасування Mg^{+2} -блоку впливало на тривалість часового ходу та кінетику спаду струму. В той час коли на етапі зрілого синаптичного зв'язку вклад НМДА-компоненти є незначним, бо скасування Mg^{+2} -блоку не вплинуло на тривалість часового ходу та кінетику спаду струму.

Використання безмагнієвого зовнішньоклітинного розчину дало змогу виявити НМДА-рецепторопосередковані вПСС та виділити НМДА-компонент інтегрального вЗПСС. Відсотковий вклад НМДА-рецепторопосередкованого струму нейронів *CS* взятих у експеримент протягом двох з половиною тижнів культивування складав $48 \pm 4 \%$ від інтегрального вЗПСС. В той час коли процентний вклад НМДА-рецепторопосередкованого струму нейронів *CS* взятих в експеримент починаючи з третього тижня культивування складав $16 \pm 2 \%$ інтегрального вЗПСС.

Описаний вище перерозподіл відсоткового вкладу НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів в інтегральний глутаматергічний струм має досить конкретні та добре досліджені механізми. НМДА-рецепторканалні комплекси з'являються на ранній стадії розвитку [118, 45] і, як вважається, відіграють вирішальну роль в діє залежному структурному вдосконаленні синаптичних контактів при формуванні ретинотопічних проекцій в *CS*, латеральному колінчатому тілі, зоровій корі і т.п. [33, 64, 6, 182, 110, 187, 34]. У багатьох областях мозку активність НМДА-рецепторканалних комплексів знижується в

процесі розвитку і дозрівання синапсів, коли здатність синаптичних контактів до структурних модифікацій знижується [22, 200, 74]. Це твердження передбачає, що для структурних модифікацій синаптичних контактів необхідна висока активність НМДА-рецепторканалних комплексів. Провідна роль НМДА-рецепторканалних комплексів в розвитку синаптичних контактів імовірно визначається входом кальцію через дані рецептори [202, 203, 204]. На етапі, коли синаптичні контакти сформовані, зокрема сформовані ретинотопічні проекції, кількість кальцію, що потрапляє в постсинаптичну клітину через НМДА-рецепторканалні комплекси стає надмірною. Тож зважаючи на те, що кальцій за високих концентрацій є токсичним для нейронів [205, 206], мають існувати певні механізми контролю. Дієзалежне зниження активності НМДА-рецепторканалних комплексів в процесі розвитку є саме таким механізмом контролю [183]. Крім того переважна більшість первинних аферентних входів аксонів ГКС в CS є глутаматергічними, у той же час близько 20% проекцій гангліозних клітин на нейрони підкоркового зорового центру є ГАМК-ергічними [191, 11, 107]. Фізіологічна роль ГАМК-ергічних проекцій від ГКС до CS полягає в гетеросинаптичному контролі інтенсивності збудження і синаптичної пластичності глутаматергічної нейропередачі, зокрема в регулюванні НМДА-рецепторопосередкованої активності [1, 191, 94]. Зокрема пік активності ГАМК_A-рецепторканалних комплексів приходить саме на момент завершення структурних модифікацій ретинотопічних проекцій в CS [183, 192].

В наших експериментах вГПСС були зареєстровані на нейронах CS у відповідь на генерацію ПД пресинаптичною, використовуючи метод парного «петч-клемпу». Відносно швидкі кінетичні характеристики струмів та їхня чутливість до бікукуліну дали змогу ідентифікувати вГПСС як ГАМК_A-рецепторопосередковані хлорні струми.

Отже, описані функціональні ролі НМДА-, АМПА- та ГАМК_A-рецепторканалних комплексів узгоджуються з даними отриманими раніше іншими авторами. Представлена нами *in vitro* модель суміжно культивованих дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS адекватно відображає перший

рівень передачі та обробки зорової інформації і дає можливість детального дослідження особливостей функціонування специфічних синаптичних контактів між ГКС та нейронів *CS*.

4.3. Квантовий характер вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах між ГКС та нейронами *CS* в кокультурі

Теорія квантового вивільнення постулює, що процес вивільнення нейромедіатора складається з окремих елементарних реакцій, кожна з яких є вихід одного кванту медіатора – певної кількості молекул, які знаходяться в одній пресинаптичній везикулі [98, 97]. Флуктуація амплітуд постсинаптичних відповідей одного синаптичного входу саме відображає квантовий характер вивільнення відповідного нейротрансмітера. В наших експериментах було досліджено параметри квантового вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах кокультивованих ГКС та нейронів *CS* відповідно до базових положень квантової теорії синаптичної передачі. Попередні дослідження характеристик квантового вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах між ГКС та нейронами *CS* проводилися *in vitro* на парасагітальних зрізах *CS* [25, 94, 190, 240].

Використовуючи незалежні методи базового та повного квантового аналізу було визначено квантові параметри вивільнення глутамата та ГАМК. В аналіз відбирали ПСС, які явно мали широкий діапазон варіацій амплітуд. Отримано величини квантових подій – амплітуди НМДА-, АМПА- та ГАМК_A-рецепторопосередкованих мініатюрних постсинаптичних струмів, вони виявилися однаковими: порядку 10 пА. Дані величини, згідно теорії, відображають постсинаптичну відповідь на вивільнення вмісту однієї синаптичної везикули. Гістограми амплітуд мПСС були мономодальними, що може бути інтерпретовано, як незалежне вивільнення поодиноких синаптичних везикул в окремих сайтах вивільнення.

Ми показали, що розподіл кількості вивільнених квантів обох медіаторів відповідає біноміальному закону. Біноміальна модель є загальноприйнятою для

опису квантового вивільнення в синапсах ЦНС і відповідає високій ймовірності вивільнення медіатора [40, 174, 225, 90, 227, 168].

Нами було також показано, що синаптична передача між кокультивованими ГКС та нейронами *CS* характеризувалась наступними величинами квантового вмісту: 2–35 в глутаматергічних та 2–16 в ГАМК-ергічних контактах, що гарантує високу надійність передачі аферентних сигналів і відображає синхронність вивільнення синаптичних везикул у відповідь на проходження ПД по аксону ГКС. Припускається, що даний багатоквантовий характер вивільнення медіаторів може бути пов'язаний зі збудженням декількох терміналей пресинаптичного аксона з однією активною зоною (АЗ) або однієї терміналі з декількома зонами. Класичні роботи з аналізу даних електронної мікроскопії та тривимірної реконструкції структури синапсів ЦНС показали, що поодинокі пресинаптичні терміналі можуть мати як одну так і декілька АЗ, а також показали наявність лінійної залежності розміру АЗ від кількості синаптичних везикул, що “стикуються” з мембраною пресинаптичної терміналі [219, 177, 209]. Не виключено, що в нашому випадку, в організації синаптичного контакту могли брати участь декілька, близько розташованих, терміналей з однією АЗ у кожній з них або одна терміналь з декількома зонами. Обидва припущення узгоджуються з результатами статистичної оцінки ультраструктурних параметрів синапсів в *CS* [140, 222]. Автори робіт за результатами електронної мікроскопії, виявили наявність двох типів синаптичних терміналей в *CS*. Синапси першого типу являють собою угруповання великої кількості малих за розмірами пресинаптичних терміналей з однією АЗ. Вони спостерігаються в верхніх пластах *stratum griseum superficiale* та *stratum opticum* *CS*. Синапси другого типу характеризуються значними розмірами пресинаптичних терміналей з наявністю декількох АЗ і спостерігаються в нижніх пластах *stratum griseum superficiale* та *stratum opticum* *CS*.

Таким чином, за допомогою методу парної «петч-клемп» реєстрації, нами були досліджені характеристики квантового вивільнення глутамата та ГАМК в синапсах кокультивованих ГКС та нейронів *CS*. Показано, що ймовірність вивільнення обох медіаторів задовільно описувалась біноміальним законом

Збуджувальна та гальмівна нейропередача характеризувалась великими значеннями квантового вмісту, синхронністю та досить великою ймовірністю вивільнення певної кількості синаптичних везикул в даних кокультивованих синаптичних контактах. Вищеописані властивості імовірно забезпечують високу надійність передачі аферентних сигналів.

4.4. Короткочасна синаптична пластичність в синапсах між кокультивованими ГКС та нейронами CS при парній стимуляції

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

Дослідження механізмів короткотривалої пластичності синаптичної передачі між вказаними нейронами проводилися іншими авторами на парасагітальних переживаючих зрізах CS [149, 71, 120]. При цьому через відсутність чіткої ідентифікації пре- та постсинаптичних одиниць за даних умов та певні ліміти у виборі електрофізіологічних методів дослідження, відомості про механізми депресії та полегшення синаптичної передачі між ГКС та нейронами CS поки залишалися досить обмеженими.

У всіх синаптично зв'язаних парах нейронів, в яких спостерігався ефект депресії глутаматергічної синаптичної передачі безпосередній зв'язок між амплітудами першого та другого вПСС був відсутнім. Однак було виявлено зворотну нелінійну залежність *КПС* від амплітуди першого вПСС. Наявність

зворотної кореляції, а також нерівність дисперсій амплітуд на перший та на другий стимули, як правило, інтерпретуються вичерпанням пула готових до вивільнення синаптичних везикул. Однак сумнівно, що одиничний стимул може суттєво зменшити кількість готових до вивільнення везикул. Багаточисельні мікрофотографії свідчать, що в пресинаптичних терміналях в *CS* може бути близько двох десятків готових до негайного вивільнення везикул та близько сотні синаптичних везикул у терміналі [222, 104, 212]. Раніше нами було показано, що за умов кокультури та з використанням методу парної петч-клемп реєстрації, ПСС у відповідь на одиничний ПД опосередковуються в середньому одночасним вивільненням від двох до тридцяти п'яти квантів глутамата. Тому можливість того, що в основі депресії глутаматергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами *CS* лежить ефект виснаження пула готових до вивільнення синаптичних, везикул вважається нами малоімовірним.

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

В літературі наявні роботи в яких запропоновано гіпотезу про різні механізми короткочасної пластичності при парній стимуляції для синапсів різного розміру та ультраструктури [176, 210, 211, 212]. При достовірно однакових параметрах зміни ефективності нейропередачі, що відображається в значеннях коефіцієнту парної

стимуляції, механізми пластичності в великих та малих за розмірами синапсах розрізняються. У великому синапсі, що має значну кількість сайтів з великою ймовірністю вивільнення, депресія швидше може бути наслідком зменшення кількості сайтів вивільнення, ніж наслідком зменшення ймовірності вивільнення трансмітера в даних сайтах. Короткочасна депресія в малих за розмірами синапсах – буде наслідком зменшення ймовірності вивільнення.

Короткочасна депресія може обумовлюватись не тільки особливостями роботи пресинаптичної терміналі (зниження пресинаптичних факторів n , p із відповідним зменшенням квантового вмісту m), а і можливими постсинаптичними механізмами (десенситизацією постсинаптичних рецепторів) [234, 137]. В деяких роботах зміну величини кванту при короткочасній синаптичній пластичності асоціюють зі зміною кількості медіатора в одному кванті [50].

Ми показали, що при полегшенні ГАМК_A-рецепторопосередкованих вПСС відбувається достовірне збільшення кількості сайтів вивільнення n та ймовірності вивільнення p і відповідно квантового вмісту m . Подібні механізми, що лежать в основі ефекту полегшення описані іншими авторами [72, 88]. Таким чином ефект полегшення ГАМК_A-рецепторопосередкованих вПСС може обумовлюватись роботою пресинаптичної терміналі, в результаті збільшення кількості вивільнених синаптичних везикул.

4.5. Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між кокультивованими ГКС та нейронами CS

Синаптична пластичність, що проявляється у довго- або короткотривалих змінах ефективності синаптичної передачі, є однією з основних властивостей ЦНС. Довготривала потенціація, зумовлена збільшенням пресинаптичної імпульсної активності, як одна з форм синаптичної пластичності, в ЦНС опосередковує такі когнітивні процеси вищої нервової діяльності, як навчання та пам'ять, і є кардинальною фізіологічною властивістю нервової системи [16, 125].

Відомо також, що феномени патологічної синаптичної пластичності асоціюються з механізмами, що лежать в основі таких нейродегенеративних захворювань як епілепсія, хвороба Альцгеймера, шизофренія, інсульти, а також мозкові травми [175, 134]. В патогенезі багатьох цих захворювань лікуючим фактором є гіпоксія. Індукована гіпоксією патологічна пластичність є предметом багатьох актуальних сучасних досліджень.

В недавніх дослідженнях *in vitro* та *in vivo* було представлено гіпоксія індуковану довготривалу зміну ефективності синаптичної передачі в різних відділах гіпокампа, таламуса, смугастого тіла [37, 226, 36, 38, 53, 55, 54, 169]. В даній роботі було проведено серію експериментів для характеристики ефекту та виявлення механізмів гіпоксичного впливу на синаптичну передачу між кокультивованими ГКС та нейронами CS.

В наших експериментах для вивчення гіпоксичного впливу на НМДА-рецепторопосередковану нейропередачу, постсинаптичні відповіді реєстрували при підтримуваному потенціалі -70 мВ в безмагнієвому або стандартному (2 mM Mg^{2+}) зовнішньоклітинному розчині в присутності блокатора АМПА-рецепторканалних комплексів (DNQX 20 мкМ). Аплікація гіпоксичного розчину призводила до збільшення амплітуди НМДА-рецепторопосередкованого вПСС в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині під час гіпоксії та протягом періоду реоксигенації. Слід зазначити, що залежність тривалості потенціації НМДА-рецепторопосередкованої нейропередачі від часу аплікації ($0,5\text{--}3$ хв) гіпоксичного розчину була лінійною. Довготривала (від 30 до 60 хв) потенціація НМДА-рецепторопосередкованої нейропередачі розвивалась при тривалостях аплікації порядку 5 хв. Подібне збільшення НМДА-рецепторопосередкованої активності спостерігалось іншими авторами при *in vivo* гіпоксично-ішемічних ушкодженнях гіпокампа [37, 81]. Підсилення активності цих рецепторканалних комплексів опосередковує збільшення входу іонів Ca^{2+} всередину клітини і як наслідок її загибель. Серія робіт виявляє зменшення ішемічних ушкоджень прикладенням антагоністів НМДА-рецепторканалних комплексів [57, 214]. Також показано, що

прикладання антагоністів НМДА-рецепторканалних комплексів пригнічує ішемія опосередкований вхід іонів кальцію всередину клітини [215].

Ми виявили, що вплив дефіциту кисню на НМДА-рецепторопосередковані сПСС та мПСС призводить до збільшення частоти їх виникнення та появу другої моди в гістограмі амплітуд мПСС (розмір кванта залишався незмінним). Мініатюрні струми реєстрували в номінально безкальцієвому розчині в присутності ТТХ (1 мкМ). У таких умовах ймовірність вивільнення трансмітера є фіксованою і мінімально можливою. Тому в межах прийнятої нами моделі появу другої моди можна пояснити ймовірним збільшенням кількості сайтів вивільнення n .

Проведений нами аналіз квантових та біноміальних параметрів також вказує на збільшення загальної кількості сайтів вивільнення n . Раніше було досліджено структурні модифікації синапсів протягом гіпоксичного ушкодження та через певний час після нього [93, 163]. Автори робіт, використовуючи короточасну (2—10 хв) киснево-глюкозну депривацію, як модель ішемії *in vitro*, досліджували структурні зміни синаптичних контактів в огранотиповій культурі гіпокампа за допомогою двохфотонної конфокальної мікроскопії. Вони показали, що стійкі структурні зміни (збільшення розмірів постсинаптичних шипиків та розмірів пресинаптичних бутонів) починаються одразу після початку киснево-глюкозної деривації. При збільшенні тривалості ішемії *in vitro* (> 10 хв) автори спостерігали протилежні ефекти – втрату синаптичних контактів.

Відомо, що НМДА-рецепторканалні комплекси потенціалзалежно блокуються іонами Mg^{2+} [131], тому, аналогічні попереднім нашим експериментами в безмагнієвому розчині, ми провели серію досліджень впливу гіпоксії на НМДА-рецепторопосередковану передачу в стандартному зовнішньоклітинному розчині (Mg^{2+} 2 мМ) в присутності блокатора АМПА-передачі (DNQX 20 мкМ) при підтримуваному потенціалі – 70 мВ. За таких умов протягом аплікації гіпоксичного розчину ми спостерігали появу НМДА-рецепторопосередкованого вПСС, що імовірно відбувалось за рахунок послаблення магнієвого блоку цих рецепторканалних комплексів. Реєстрація спонтанної активності постсинаптичного нейрону CS в стандартному зовнішньоклітинному

розчині без додавання блокаторів глутаматергічної передачі також виявила появу НМДА-рецепторопосередкованих сПСС за підтримуваного потенціалу -70 мВ протягом періоду гіпоксії.

Індуковане гіпоксією ослаблення магнієвого блоку було описано деякими авторами в зрізах гіпокампа, при гіпоксії *in vivo* та *in vitro* гіпоксії [81]. Подібне ослаблення за нормальних електрофізіологічних умов до сих пір не має чітко визнаного механізму. Було показано, що активація протеїнкінази С призводить до ослаблення Mg^{2+} блоку [83,166]. Раніше було показано наявність протеїнкіназ в пресинаптичних терміналях проекцій сітківки в латеральному колінчатому тілі [19] та в CS [186]. Участь залежної від активності активації пресинаптичної протеїнкінази С в розвитку довготривалої пластичності синаптичної передачі була показана в багатьох синапсах ЦНС [220, 13]. Вважається імовірним, що короткочасна гіпоксія призводить до активації протеїнкінази С, дія якої опосередковує ефект ослаблення і модулює довготривалу потенціацію НМДА-рецепторопосередкованої передачі. Підтримує це припущення той факт, що аплікація інгібіторів протеїнкінази С зумовлює нейропротекторний ефект при ішемічному пошкодженні нейронів [216, 65].

Отже, враховуючи все вищесказане, аплікація гіпоксичного розчину (5 хв) призводила до довготривалої потенціації НМДА-рецепторопосередкованої нейропередачі, що реалізується за рахунок ослаблення магнієвого блоку даних рецепторів та ймовірного збільшення загальної кількості сайтів вивільнення в активних синапсах.

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

пригнічення АМПА-рецепторопосередкованої передачі між ГКС та нейронами *CS*. В деяких дослідженнях було показано, що ослаблення ефективності синаптичної передачі при короткотривалій гіпоксії пов'язане з пресинаптичною дисфункцією і асоційоване зі зменшенням ймовірності вивільнення синаптичних везикул p та кількості сайтів вивільнення n [30,56].

Цікавим є той факт, що індукована гіпоксією довготривала потенціація НМДА-рецепторопосередкованої передачі і тимчасове пригнічення АМПА-рецепторопосередкованої глутаматергічної синаптичної передачі відбувалися за рахунок пресинаптичних механізмів. Така різноспрямованість дії гіпоксії на глутаматергічну синаптичну передачу в даних синапсах може пояснюватися наявністю блокатора D_L -APV в концентрації 20 мкМ при реєстрації АМПА-рецепторопосередкованих подій. Цей блокатор впливає як на пре- так і на постсинаптичні НМДА-рецепторканальні комплекси. Модуляційний вплив пресинаптичних рецепторів на параметри вивільнення трансмітера є загальновідомим і був показаний зокрема для вивільнення глутамата в гіпокампі [128], в смугастому тілі [18], в зоровій корі [197]. Наявність пресинаптичних НМДА-рецепторканальних комплексів була встановлена в синаптичних контактах між ГКС та нейронами *CS* [112]. НМДА-рецепторопосередкований вхід кальцію в пресинаптичну терміналь може впливати на параметри квантового вивільнення декількома шляхами. По-перше, вхід кальцію через пресинаптичні НМДА-рецепторканальні комплекси деполяризує пресинаптичну мембрану, і кальцій починає входити в терміналь через потенціалзалежні кальцієві канали [23]. По-друге, кальційзалежні протеїнкінази можуть модулювати параметри вивільнення трансмітера [203], що є необхідними умовами для НМДА-рецепторопосередкованої довготривалої потенціації.

Аплікація гіпоксичного розчину призводила до ДТД ГАМК-ергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецепторканальних комплексів. Ми виявили суттєве зменшення частоти виникнення сПСС і мПСС та величини кванта при дефіциті кисню. Ймовірніше за все, зменшення величини кванта пов'язане зі зниженням чутливості рецепторів постсинаптичної мембрани, так як досить сумнівно, що за використаних тривалостей періоду гіпоксії при реєстрації

мПСС можливі зміни пресинаптичного характеру (такі, як зміна розміру везикули та/або концентрації трансмітера в кожній везикулі). До того ж багаточисельні мікрофотографії свідчать, що в терміналі одного аксона ГКС на нейроні *CS* може бути до восьми синаптичних контактів і в кожному з яких близько двох десятків готових до негайного вивільнення везикул та близько сотні синаптичних везикул в терміналі [104, 222]. Загалом, в основі ефекту індукованої гіпоксією ДТД ГАМК-ергічної синаптичної передачі лежить комплекс змін, як пресинаптичних (незалежних від ймовірності вивільнення), так і постсинаптичних (зумовлених зменшенням чутливості рецепторів постсинаптичної мембрани).

Нами описано різноспрямованість довготривалих ефектів збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі між ГКС та нейронами *CS* опосередкованих дефіцитом кисню. В багатьох дослідженнях нейродегенеративних захворювань ГАМК-ергічна синаптична передача розглядається як така, що має певну нейропротекторну дію за рахунок контролю збудження та синаптичної пластичності глутаматергічної передачі [236, 148]. Індукована гіпоксією ДТД ГАМК-ергічної передачі посилює патологічну дію ДТП НМДА-рецепторопосередкованої нейропередачі в синапсах між ГКС та нейронами *CS* та імовірно є додатковим механізмом пошкоджуючої дії гіпоксії на передачу зорової інформації від сітківки в ЦНС.

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

РОЗДІЛ 5. ВИСНОВКИ

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

1. Вперше розроблено метод кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS. Збуджувальна передача між ГКС та нейронами CS опосередковується вивільненням глутамата та активацією НМДА- та АМПА-рецепторканалних комплексів. Гальмівна синаптична передача відбувається завдяки вивільненню ГАМК та активації ГАМК_A-рецепторканалних комплексів. Ймовірність вивільнення обох нейротрансмітерів задовільно описується біноміальним законом.
2. В умовах парної стимуляції відбувається короткочасна депресія глутаматергічної передачі та потенціація ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Ці процеси реалізуються переважно за рахунок пресинаптичних механізмів.
3. Вперше виявлено індуковану гіпоксією довготривалу потенціацію НМДА-рецепторопосередкованої передачі в синаптично зв'язаній парі ГКС — нейрон CS. Цей феномен пов'язаний з ослабленням магнієвого блоку даних рецепторів та ймовірним збільшенням загальної кількості сайтів вивільнення в активних синапсах.
4. Вперше показано індуковане гіпоксією пригнічення АМПА-рецепторопосередкованої синаптичної передачі, що реалізується за рахунок пресинаптичних механізмів.
5. Вперше охарактеризовано індуковану гіпоксією довготривалу депресію ГАМК-ергічної нейропередачі між ГКС та нейронами CS. Така модуляція імовірно пов'язана як зі зменшенням кількості діючих сайтів вивільнення, так і зі зменшенням чутливості постсинаптичної мембрани до трансмітера

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Aamodt S.M. Chronic NMDA exposure accelerates development of GABAergic inhibition in the colliculus superior / S. M. Aamodt, J. Shi, M. T. Colonnese, W. Veras, M. Constantine-Paton // J. Neurophysiol. –2000. – №83. — P.1580-1591.
2. Adams D. L. A precise retinotopic map of primate striate cortex generated from the representation of angioscotomas / D. L. Adams, J. C. Horton // J. Neurosci. – 2003. – № 23(9). – P.3771-3789.
3. Aizenman C. D. Enhanced visual activity in vivo forms nascent synapses in the developing retinotectal projection / C. D. Aizenman, H. T. Cline // J. Neurophysiol. – 2007. – №97. – P.2949-2957.
4. Arden G.B. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy / G. B. Arden, S. Sivaprasad // Curr. Diabetes. Rev. – 2011. –№7(5). – P. 291-304.
5. Ascher P. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. / P. Ascher, L. Nowak // J. Physiol. – 1988. – № 399. – P.247-66.
6. Bear M. Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist / M. Bear, A. Kleinschmidt, Q. Gu, W. Singer // J. Neurosci. – 1990. – № 10. – P. 909–924.
7. Beare N. A. V. Perfusion abnormalities in children with cerebral malaria and malarial retinopathy / N. A. V. Beare, S. P. Harding, M. E. Molyneux // J. Infect. Dis. – 2009. – №199(2). – P. 263-271.
8. Bianchi M.T. Structural determinants of fast desensitization and desensitization-deactivation coupling in GABA_A receptors. / M. T. Bianchi, K. F. Haas, R. L. Macdonald // J. Neurosci. – 2001. – № 21. – P. 1127–1136.
9. Billups B. Modulation of non-vesicular glutamate release by pH / B. Billups, D. Attwell // Nature. – 1996. – № 379. – P. 171–174.
10. Binns K. E. Different roles for GABA_A and GABA_B receptors in visual processing in the rat colliculus superior / K. E. Binns, T. E. Salt // J. Physiol. – 1997. – No.504(3). – P.629–639.

11. Binns K. E. The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the colliculus superior / K. E. Binns // *Progress in Neurobiology*. – 1999. – № 59. – P. 129–159.
12. Block F. Effects of antioxidants on ischemic retinal dysfunction / F. Block, M. Schwarz // *Exp. Eye Res.* – 1997. – № 64. – P.559–64.
13. Bragr D. H. Activity-dependent activation of presynaptic protein kinase C mediated post-tetanic potentiation / D. H. Bragr, X. Cai, S. M. Thompson // *Nat. Neurosci.* – 2003. – № 6(6). – P. 551-2.
14. Bridge H. Mapping the visual brain: how and why / H. Bridge // *Eye*. – 2011. – №25. – P. 291–296.
15. Brodsky M. C. Perinatal cortical and subcortical visual loss: mechanism of injury and associated ophthalmologic signs / M. C. Brodsky, K. J. Fray, C. M. Glasier // *Ophthalmology*. – 2003. – № 109. – P. 85–94.
16. Brown T. H. Long-term synaptic potentiation / T. H. Brown, P. F. Chapman, E. W. Kairiss, C. L. Keenan // *Science*. – 1988. – № 242. – P. 724-728.
17. Browne S. H. Kinetic and pharmacological properties of GABA_A receptors in single thalamic neurons and GABA_A subunit expression / S. H. Browne, J. Kang, G. Akk et al. // *J. Neurophysiol.* – 2001. – № 86. – P. 2312–2322.
18. Bustos G. Regulation of excitatory amino acid release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum: in vivo microdialysis studies / G. Bustos, J. Abarca, M. I. Gysling, C. W. Bradberry, R. H. Roth. // *Brain Res.* – 1992. – № 585(1–2). – P. 105–15.
19. Calkins D. J. Morphological identification of ganglion cells expressing the alpha subunit of type II calmodulin-dependent protein kinase in the macaque retina / D. J. Calkins, R. M. Sappington, S. H. Hendry // *J. Copm. Neurol.* – 2005. – № 481(2). – P. 194–209.
20. Callahan E. C. Critical period for the marked loss of retinal X-cells following visual cortex damage in cats / E. C. Callahan, L. Tong, P. D. Spear // *Brain Res.* – 1984. – № 323. – P. 302–306.

21. Carcieri S.M. Classification of retinal ganglion cells: a statistical approach / S. M. Carcieri, A. L. Jacobson, S. Nirenberg // J. Neurophys. – 2003. – № 90. – P. 1704–1713.
22. Carmignoto G. Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex / G. Carmignoto, S. Visini // Science. – 1992. – № 258. – P. 1007-1011.
23. Catterall W. A. Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release / W. A. Catterall // Cell Calcium. – 1998. – № 24(5-6). – P. 307-23.
24. Chan K.C. Long-term effects of neonatal hypoxia-ischemia on structural and physiological integrity of the eye and visual pathway by multimodal MRI / K. C. Chan, S. Kancherla, S-J. Fan, E. X. Wu // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2015. – № 56. – P. 1–9.
25. Chandrasekaran A. R. Developmental homeostasis of mouse retinocollicular synapses / A. R. Chandrasekaran, R. D. Shah, M. C. Crair // J. Neurosci. – 2007. – №27(7). – P.1746-1755.
26. Chandrasekaran H. R. Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the colliculus superior of the mouse / H. R. Chandrasekaran, D. T. Plas, E. Gonzales, and M. C. Crair // J. Neurosci. – 2005. – №25. – P. 6929-6938.
27. Chandrasekaran H. R. Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the colliculus superior of the mouse / H. R. Chandrasekaran, D. T. Plas, E. Gonzales, M. C. Crair // J. Neurosci. – 2005. – № 25. – P. 6929-6938.
28. Chen Y. N. Hypoxia-induced retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of beta-adrenergic antagonists / Y. N. Chen, H. Yamada, W. Mao et al. // Brain Res. – 2007. – № 1148. – P.28-37.
29. Choi D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system / D. W. Choi // Neuron. – 1988. – № 1. – P. 623–634.

30. Choi S. Decrease probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses / S. Choi, D. M. Lovinger // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – № 94. – P. 2665-2670.
31. Clemo H. R. Topographic organization of somatosensory corticotectal influences in cat / H. R. Clemo, B. E. Stein // *J. Neurophysiol.* – 1984. – №51(5). –P.843–858.
32. Cline H. T. Glutamate-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured frog tectal cells mediated by direct activation of NMDA receptor channels / H. T. Cline, R. W. Tsien // *Neuron.* – 1991. – № 6. – P. 259–267.
33. Cline H. T. NMDA receptor antagonist desegregates eye-specific stripes / H. T. Cline, E. Debski, M. Constantine-Paton // *Proc. Nat. Acad. Scie. USA.* – 1987. – № 84. – P. 4342–4345.
34. Cline H. T. NMDA receptor antagonists disrupt the retinotectal topographic map / H. T. Cline, M. Constantine-Paton // *Neuron.* – 1989. – № 3. – P. 413–426.
35. Colonnese M. T. Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation NMDA currents, but does not affect AMPA/kainite currents / M. T. Colonnese, J. Shi, M. Constantine-Paton // *J. Neurophysiol.* – 2003. –№ 89. – P. 57–68.
36. Corcoran A. A role for prolyl hydroxylase domain proteins in hippocampal synaptic plasticity hippocampus / A. Corcoran, R. Kunze, S. C. Harney, G. Breier, H. H. Marti, J. J. O'Connor // *Hippocampus.* – 2013. – № 23(10). – P. 861-872.
37. Crepel V. A selective LTP of NMDA receptor-mediated currents induced by anoxia in CA1 hippocampal neurons / V. Crepel, C. Hammond, P. Chinestra, D. Diabira, Y. Ben-Ari // *J. Neurophysiol.* – 1993. – № 70. – P. 2045–2055.
38. Crepel V. Intracellular injection of a Ca²⁺ chelator prevents generation of anoxic LTP / V. Crepel, Y. Ben-Ari // *J. Neurophysiol.* – 1996. – № 75. P. 770–779.
39. Cui Q. The injury resistant ability of melanopsin-expressing intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. / Q. Cui, C. Ren, P. J. Sollars, G. E. Pickard, K.-F. So // *Neurosci.* – 2015. – №284. – P.845-853.
40. Del Castillo J. Quantal components of the end plate potential / J. del Castillo, B. J. Katz // *Physiol.* – 1954. – № 124. – P. 560–573.

41. DeVries S. H. Correlated firing in rabbit retinal ganglion cells / S. H. deVries // J. Neurophysiol. – 1999. – № 81(2). – P. 908–20.
42. Dowling J. E. Organization of retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. I. Synaptic structure / J. E. Dowling, F. S. Werblin // J. Neurophysiol. – 1969 - № 32 (3). – P. 315-338.
43. Dowling J. E. The Retina: an Approachable Part of the Brain / J. E. Dowling // Belknap Press Harvard Univ. Press, Cambridge, 1987. – P. 20–50.
44. Duong T. Q. Magnetic resonance imaging of the retina: from mice to men / T. Q. Duong // Magnetic Resonance in Medicine. – 2014. – № 71. – P. 1526–1530.
45. Durand G. M. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus / G. M. Durand, Y. Kovalchuk, A. Konnerth // Nature. – 1996. – № 381. – P. 71-75.
46. Dutton G. M. The association of binocular lower visual field impairment, impaired simultaneous perception, disordered visual guided motion, and inaccurate saccades in children with cerebral visual dysfunction – a retrospective observational study / G. M. Dutton, A. Saaed, B. Fahad // Eye. – 2004. – № 18. – P. 27–34.
47. Dutton G. N. Visual problems as a result of brain damage in children / G. N. Dutton, E. C. A. McKillop, A. Saidkasimova // Br. J. Ophthalmol. – 2006. – № 90. – P. 932–933.
48. Eken P. Hemorrhagic- ischemic lesions of the neonatal brain: Correlation between cerebral visual impairment, neurodevelopmental outcomes, and MIR in infancy / P. Eken, L. S. de Vries, Y. van der Graaf, L. C. Meiners, O. van Nieuwenhuizen // Dev. Med. Child. Neurol. – 1995. – № 37. – P. 41–55.
49. Fields R. D. Calcium, network activity, and the role of the NMDA channels in synaptic plasticity in vitro / R. D. Fields, C. Yu, P. G. Nelson // J. Neurosci. – 1991. – № 11. – P. 134–146.
50. Fleidervish A. Paired pulse facilitation of IPSCs in slices of immature and mature mouse somatosensory neocortex / A. Fleidervish and M. J. Gutnick // J. Neurophysiol. – 1995. – № 73(6). – P. 2591–2596.

51. Fox K. The location and function of NMDA receptors in cat and kitten visual cortex / K. Fox, H. Sato, N. Daw // J. Neurosci. – 1989. – № 9. – P. 2443–2454.
52. Freeman B. Direct and undirect visual inputs to superficial layers of cat colliculus superior: a current source-density analysis of electrically evoked potentials / B. Freeman, W. Singer // J. Neurophysiol. – 1983. – №49(5). – P. 1075–91.
53. Gao T. M. In vivo intracellular demonstration of an ischemia-induced postsynaptic potential from CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus / T. M. Gao, Z. C. Xu // Neuroscience. – 1996. – № 75. – P. 665–669.
54. Gao T. M. Prolonged enhancement and depression of synaptic transmission in CA1 pyramidal neurons induced by transient forebrain ischemia in vivo / T. M. Gao, W. A. Pulsinelli, Z. C. Xu // Neuroscience. – 1998. – № 87. – P. 371–383.
55. Gao T. M. Transient neurophysiological changes in CA3 neurons and dentate granule cells after severe forebrain ischemia in vivo / T. M. Gao, E. M. Howar, Z. C. Xu // J. Neurophysiol. – 1998. – № 80. – P. 2860–2869.
56. Geiman S. Heterogeneous release probability and activity-dependent short-term synaptic depression / S. Geiman // Commun. Integr. Biol. – 2011. – № 4(5). – P. 603–605.
57. Gill R. MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the postischemic period / R. Gill, A. C. Foste, G. N. Woodruff // Neuroscience. – 1988. – № 25. – P. 847–855.
58. Gleason E. Synaptic transmission between pairs of retinal amacrine cells in culture / E. Gleason, S. Borges, M. Wilson // J. Neurosci. – 1993. – № 13(6). – P. 2359–2370.
59. Godfrey K. B. A multi-component model of the developing retinocollicular pathway incorporating axonal and synaptic growth / K. B. Godfrey, S. J. eglen, N. V. Swindale // Plos. Comput. Biol. – 2009. – №5(12). – P.1-22.
60. Gogate P. Severe visual impairment and blindness in infant: causes and opportunities for control / Gagate P., Gilbert C., Zin A. // Middle. East. Afr. J. Ophthalmol. – 2011. – № 18(2). – P. 109-114.

61. Gouras P. Antidromic responses of orthodromically identified ganglion cells in monkey retina / P. Gouras // J. Physiol. – 1969. – № 204. – P. 407–419.
62. Gray H. Anatomy of the Human Body / H. Gray // Philadelphia: Lea & Febiger. 1918. – P. 2000.
63. Guenther E. In vitro identification of retinal ganglion cells in culture without the need of dye labeling / E. Guenther, S. Schmid, R. Grantyn and E. Zrenner // J. Neurosci. Methods. – 1993. – № 51. – P. 177–181.
64. Hahm J.-O. Disruption of retinogeniculate afferent segregation by antagonists to NMDA receptors / J.-O. Hahm, R. B. Langdon, and M. Sur // Nature. – 1991. – № 351. – P. 568–570.
65. Hajimohammadreza I. A specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II provides neuroprotection against NMDA- and hypoxia/ hypoglycemia-induced cell death / I. Hajimohammadreza, A. W. Prober, L. L. Coughenour, S. A. Borosky, F. W. Marcoux, P. A. Boxer, K. W. Wang // J. Neurosci. – 1995. – № 15(5). – P. 4093–4101.
66. Hamill O. P. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher et al. // Pflugers Arch. – 1981. – No. 391. – P. 85–100.
67. Hanse E. Paire pulse plasticity at the single release site level an experimental and computation study / E. Hanse and B. Gustasson // J. Neurosci. – 2001. – № 21(21). – P. 8362–8369.
68. Harting J. K. Organization of retinocollicular pathways in the cat / J. K. Harting, R. W. Guillery // J. Comp. Neurology. – 1976. – № 166(2). – P. 133–144.
69. Hayashida Y. Dissociation of retinal ganglion cells without enzymes / Y. Hayashida, G. J. Partida, A. T. Ishida // J. Neurosci. Methods. – 2004. – № 137(1). – P. 25–35.
70. Henneberger C. Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse colliculus superior / C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe, R. Grantyn // J. Neurophysiol. – No. 88. – 2002. – P. 595–603.

71. Henneberger C. Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse colliculus superior / C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe, R. Grantyn // *J. Neurophysiol.* – 2002. – № 88. – P. 595–603.
72. Hess G. Quantal analysis of paired-pulse facilitation in quinea pig hippocampal slices / G. Hess, U. Kuhnt, L. L. Voronin // *Neurosci. Letters.* – № 77. – P. 187–192.
73. Hestrin S. Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices / S. Hestrin, R. A. Nicoll, D. J. Perkel, P. Sah // *J. Physiol.* – 1990. – № 422. – P. 203–225.
74. Hestrin S. Developmental regulation of NMDA receptormediated synaptic currents at a central synapse / S. Hestrin // *Nature.* – 1992. – № 357. – P. 686–689.
75. Hidaka S. Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells / S. Hidaka, Y. Akahori, Y. Kurosawa // *J. Neurosci.* – 2004. – № 24(46). – P. 10553–10567.
76. Hofer M. Regulation of NMDA receptor mRNA during visual map formation after receptor blockade / M. Hofer, G. T. Prusky, M. Constantine-Paton // *J. Neurochem.* – 1994. – № 62(6). – P. 2300–7.
77. Hollander H. Corticotectal terminals in the in the colliculus superior of the rabbit: A light- and electron microscopic analysis using horseradish peroxidase (HRP)-tetramethylbenzidine (TMB) / H. Hollander, K. Schonitzer // *J. Compar. Neurology.* – 1983. – № 219(1). – P. 81–87.
78. Hollmann M. Cloned glutamate receptors / M. Hollmann, S. Heinemann // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1994. – № 17:31–108. – P. 31–108.
79. Hollmann M. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family / M. Hollmann, A. O'Shea-Greenfield, S. W. Rogers, S. Heinemann // *Nature.* – 1989. – V 342. – P. 643–648.
80. Hoonegger P. In *Hormonally Defined Media* / P. Hoonegger, B. Gunter, G. Fischer, R. J. Wieser // Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo. – 1983. – P. 203.
81. Hori N. Functional and morphological changes induced by transient in vivo ischemia / N. Hori, D. O. Carpenter // *Exp. Neurol.* – 1994. – № 129. – P. 279–289.

82. Hoyt C. S. Visual function in the brain-damaged child / C. S. Hoyt // *Eye*. – 2003. – № 17. – P. 369–384.
83. Hsu K. S. Protein kinase C inhibitors block generation of anoxia-induced long-term potentiation / K. S. Hsu, C. C. Huang // *Neuroreport*. – 1998. – № 9. – P. 3525–3529.
84. Huang S. J. Activation and inactivation properties of voltage-gated calcium currents in developing cat retinal ganglion cells / S. J. Huang, D. W. Robinson // *Neuroscience* – 1998. – № 85 (1). – P. 239–247.
85. Huo R, Burden S, Hoyt CS, Good WV. Chronic cortical visual impairment in children: etiology, prognosis, and associated neurological deficits. *Br J Ophthalmol* 1999;**83**:670–675.
86. Iino M. Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones / M. Iino M., S. Ozawa, K. Tsuzuki // *J. Physiol.* – 1990. – № 424. – P. 151–165.
87. Isa T. The visio-motor pathway in the local circuit of the rat colliculus superior / T. Isa, T. Endo, Y. Saito // *J. Neurosci.* – 1998. – № 18(20). – P. 8496–8504.
88. Jiang L. Paired-pulse modulation at individual GABAergic synapses in rat hippocampus / L. Jiang, S. Sun, M. Nedergaard, J. Kang // *J. Physiol.* – № 523(2). – P. 425–439.
89. Jiang X.-Y. Use-dependent decline paired-pulse facilitation at aplysia sensory neuron synapse suggests a distinct vesicle pool or release mechanism / X.-Y. Jiang and T. Abrams // *J. Neurosci.* – 1998. – № 18(24). – P. 10310–10319.
90. Johnson E. W. The binomial nature of transmitter release at the crayfish neuromuscular junction / E. W. Johnson, A. Wernig // *J. Physiol.* – 1971. – № 218(3). – P. 757–67.
91. Johnston G. A. GABA_A receptor pharmacology / G. A. Johnston // *Pharmacol. Ther.* – 1996. – № 69(3). – P. 173–98.
92. Jonas P. Corelease of two fast neurotransmitters at central synapse / P. Jonas, J. Bischofberger, J. Sandkuhler // *Science*. – 1998. – № 281(5375). – P. 419–424.

93. Jourdain P. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia / P. Jourdain, I. Nikonenko, S. Alberi, D. Muller // *J. Neurosci.* – 2002. – № 22. – P. 3108–3116.
94. Juttner R. Early onset of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the visual layers of the rodent colliculus superior / R. Juttner, C. Henneberger, R. Grantyn, T. Rothe // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2001. – № 19. – P. 255–261.
95. Kaplan E. The primate retina contains two types of ganglion cells, with high and low contrast sensitivity / E. Kaplan, R. M. Shapley // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – № 83. – P. 2755–2757.
96. Kass I. S. The N-methyl-D-aspartate antagonists aminophosphonovaleric acid and MK-801 reduced anoxic damage to dentate granule and CA1 pyramidal cells in the rat hippocampal slice / I. S. Kass, G. Chambes, J. E. Cottrell // *Exp. Neurol.* – № 103. – P. 116–122.
97. Katz B. Quantal mechanism of neural transmitter release / B. Katz // *Science.* – 1971. – № 173. – P. 123–126.
98. Katz B. The Release of Neural Transmitter Substances / B. Katz // Liverpool: Liverpool University Press. – 1969. – 70 p.
99. Kaur C. Blood-retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect of melatonin administration / C. Kaur, V. Sivakumar, Z. Yong et al. // *J. Pathol.* – 2007. – № 212. – P. 429–39.
100. Kaur C. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina / C. Kaur, V. Sivakumar, W. S. // *Foult. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – № 47. – P. 1126–41.
101. Kergoat H. RGC sensitivity to mild systemic hypoxia / H. Kergoat, M. E. Hérard, M. Lemay // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – № 47. – P. 5423–7.
102. King A. J. The colliculus superior. / A. J. King // *Current Biology.* – 2004. – № 14(9). – P. 335–338.
103. Kolb H. How retina works / H. Kolb // Sigma Xi. The Scientific Research Society. – 2003. – P. 28–35.

104. Kucukdereli H. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC / H. Kucukdereli, N. J. Allen, A. T. Lee, et al. // PNAS. – 2011. – № 108 (32). – P. 440–449.
105. Kuffler S. W. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina / S. W. Kuffler // J. Neurophysiol. – 1953. – № 16(1). – P. 37–68.
106. Kustov A. Shared neural control of attentional shifts and eye movements / A. Kustov, D. Robinson // Nature. – 1996. – № 384(6604). – P. 74–77.
107. Lee P. H. Excitatory and inhibitory circuitry in the superficial gray layer of the colliculus superior / P. H. Lee, M. Schmidt, and W. C. Hall // J. Neurosci. – 2001. – № 20(21). – P. 8145–8153.
108. Leenders A. G. M. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: Implications for presynaptic plasticity / A.G. M. Leenders, Z. H. Sheng // Pharmacol. Ther. – 2005. – № 105(1). – P. 69–84.
109. Leon S. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve / S. Leon, Y. Yin, J. Nguyen, N. Irwin, L. I. Benowitz // J. Neurosci. – 2000. – № 20(12). – P. 4615–4626.
110. Lewin G. R. NMDA receptors and NMDA-dependent tuning of the receptor fields of spinal cord neurons / G. R. Lewin, E. McIntosh, S. B. McMahon // Nature. – 1994. – № 369. – P. 482–485.
111. Li Y. Axon regeneration in goldfish and rat retinal ganglion cells: differential responsiveness to carbohydrates and cAMP / Y. Li, N. Irwin, Y. Yin, M. Lanser, L. I. Benowitz // J. Neurosci. – 2003. – № 23(21). – P. 7830–7838.
112. Lien C. C. Visual stimuli-induced LTD of GABAergic synapses mediated by presynaptic NMDA receptors / C. C. Lien, Y. Mu, M. Vargas-Caballero, M.-M. Poo // Nat. Neurosci. – 2006. – № 9. – P. 372–380.
113. Lilley S. The rat retinal ganglion cell in culture: An accessible CNS neurone / S. Lilley, J. Robbins // J. Pharm. Toxicol. Methods. – 2004. – № 51. – P. 209–220.
114. Lin B. Retinal Ganglion cell type, size, and spacing can be specified independent of homotypic dendritic contacts / B. Lin, S. W. Wang, H. Masland // Neuron. – 2004. – № 43. – P. 475–485.

115. Lipton S. A. Voltage-dependent conductances of solitary ganglion cells dissociated from the rat retina / S. A. Lipton, D. L. Tauck // J. Physiol. – 1987. – № 385. – P. 361–391.
116. Lo F.-S. Physiological Properties of Neurons in the Optic Layer of the Rat's Colliculus superior / F.-S. Lo, R. J. Cork, R. J. Mize // J. Neurophys. – 1998. – № 80. – P. 331–343.
117. Lo F.-S. Synaptic regulation of L-type Ca^{2+} channel activity and long-term depression during refinement of the retinocollicular pathway in developing rodent colliculus superior / F.-S. Lo, R. R. Mize // J. Neurosci. – 2000. – № 20. – P. RC58.
118. LoTurco J. J. Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neurocortical development / J. J. LoTurco, M. G. Blanton, and A. R. Kriegstein // J. Neurosci. – 1991. – № 11. – P. 792–799.
119. Lowery R. S. Cryptic visual impairment in children / R. S. Lowery, D. Atkinson, S. R. Lambert // Br. J. Ophthalmol. – 2006. – № 90. – P. 960–963.
120. Lu W. Eye opening rapidly induces synaptic potentiation and refinement / W. Lu, M. Constantine-Paton // Neuron. – 2004. – № 43. – P. 237–249.
121. Lukasiewicz P. A slowly inactivating potassium current truncates spike activity in ganglion cells of the tiger salamander retina / P. Lukasiewicz, F. Werblin // J. Neurosci. – 1988. – № 8 (12). – P. 4470–4481.
122. Lunenburger, L. A possible role of the colliculus superior in eye-hand coordination / L. Lunenburger, R. Kleiser, V. Stuphorn, L. E. Miller, K. P. Hoffmann // Prog. Brain. Res. – 2001. – № 134. – P. 109–25.
123. Ma T. P. Intermediate and deep layers of the macaque colliculus superior: a goldi study / T. P. Ma, H.-W. Cheng, J. A. Czech and J. A. Rafols // J. Comp. Neurol. – 1990. – № 295(1). – P. 92–110.
124. Maguire G. Transport-mediated release of endogenous glutamate in the vertebrate retina / G. Maguire, H. Simko, R. N. Weinreb et al. // Pflugers Arch. – 1998. – № 436. – P. 481–484.

125. Malenka R. C. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission / R. C. Malenka, J. A. Kauer, R. C. Zucker, R. A. Nicoll // *Science*. – 1988. – № 242. – P. 81–84.

126. Mallart A. The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog / A. Mallart and A. R. Martin // *J. Physiol.* – 1968. – № 196(3). – P. 593–604.

127. Margolls D. J. Different mechanisms generate maintained activity in on and off retinal ganglion cells / D. J. Margolls and P. B. Detwiler // *J. Neurosci.* – 2007. – № 27(2). – P. 5994–6005.

128. Martin D. Autoreceptor regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA1 area / D. Martin, G. A. Bustos, M. A. Bowe, S. D. Bray, J. V. Nadler // *J. Neurochem.* – 1991. – № 56. – P. 1647–55.

129. Maximino C. Evolutionary changes in the complexity of the tectum of nontetrapods: a cladistic approach / C. Maximino // *PLOS One*. – 2008. – №3 (10). – P. 1–7.

130. Mayer M. L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons / M. L. Mayer, G. L. Westbrook // *J. Physiol.* – 1987. – № 394. – P. 501–527.

131. Mayer M. L. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons / M. L. Mayer, G. L. Westbrook, P. B. Guthrie // *Nature*. – 1984. – № 309. – P. 261–263.

132. McDonald J. W. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development / J. W. McDonald, M. V. Johnston // *Brain. Res. Rev.* – 1990. – № 15. – P. 41–70.

133. McDougal D. H. The influence of intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells on the spectral sensitivity and response dynamics of the human pupillary light reflex / D. H. McDougal, P. D. Gamlin // *Vision. Research*. – 2010. – № 50. – P. 72–87.

134. McEachern J. C. The plasticity-pathology continuum: Defining a role for the LTP phenomenon / J. C. McEachern and C. A. Shaw // *J. Neurosci.* – 1999. – № 58(1). – P. 42–61.

135. McLaughlin T. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development / T. McLaughlin, C. L. Torborg, M. B. Feller, and D. D. O'Leary // *Neuron*. – 2003. – № 40. – P. 1147–1160.

136. McLaughlin T. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development / T. McLaughlin, C. L. Torborg, M. B. Feller, D. D. O'Leary // *Neuron*. – 2003. – № 40. – P. 1147–1160.

137. Meyer C. Estimation of quantal size and number of functional active zones at the calyx of held synapse by nonstationary EPSC variance / C. Meyer, E. Neher, and R. Schneggenburger, // *J. Neurosci.* – 2001. – № 21(20). – P. 7889-7900.

138. Mize R. R. Progress in brain research / R. R. Mize, F. T. Banfro, C. A. Scheiner // Chapter 22 Pre- and postnatal expression of amino acid neurotransmitters, calcium binding proteins, and nitric oxide synthase in the developing colliculus superior. – 1996. – № 108. – P. 313–332.

139. Mize R. R. The NMDAR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is localized at postsynaptic sites opposite both retinal and cortical terminals in the cat colliculus superior / R. R. Mize, G. D. Butler // *Visual Neurosci.* – 2000. – № 17(1). – P. 41–53.

140. Mize R. R. Variations in the retinal synapses of the cat colliculus superior revealed using quantitative electron microscope autoradiography / R. R. Mize // *Brain Research*. – 1983. – № 269. – P. 211–221.

141. Morgan J. Nitric oxide mediates excitotoxic and anoxic damage in rat retinal ganglion cells cocultured with astroglia / J. Morgan, J. Caprioli, Y. Koseki // *Arch. Ophthalmol.* – 1999. – № 117. – P. 1524–1529.

142. Morita N. Development of a neural circuit in the colliculus superior: analysis of the propagation of neuronal excitation from intermediate to superficial layers / N. Morita, R. P. Hasegawa, K. Murase, H. Ikeda // *Neuroreport*. – 2014. – № 25(4). – P. 242–7.

143. Mosbacher J. A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors / J. Mosbacher, R. Schoepfer, H. Monyer, N. Burnashev, P. H. Seeburg, J. P. Ruppersberg // *Science*. – 1994. – № 266. – P. 1059–1062.

144. Mrsic-Flogel D. T. Altered map of visual space in the colliculus superior of mice lacking early retinal waves / D. T. Mrsic-Flogel, S. B. Hofer, C. Creutzfeldt, I. Cloëz-Tayarani, J.-P. Changeux, T. Bonhoeffer, and M. Hübener // J. Neurosci. – 2005. – № 25. – P. 6921-6928.

145. Mrsic-Flogel D. T. Altered map of visual space in the colliculus superior of mice lacking early retinal waves / D. T. Mrsic-Flogel, S. B. Hofer, C. Creutzfeldt, I. Cloëz-Tayarani, J.-P. Changeux, T. Bonhoeffer, and M. Hübener // J. Neurosci. – 2005. – № 25. – P. 6921–6928.

146. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function / S. Nakanishi // Science. – 1992. – № 258. – P. 597–603.

147. Napper G. A. Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions / G. A. Napper, M. J. Pianta, M. Kalloniatis // Vis. Neurosci. – 1999. – № 16. – P. 149–158.

148. Nava-Mesa M. O. GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stage Alzheimer's disease / M. O. Nava-Mesa, L. Jimenez-Diaz, J. Yajeya et al. // Front Cell Neurosci. – 2014. – № 8. – P. 1-19.

149. Neale S. A. Modulation of GABAergic inhibition in the rat colliculus superior by a presynaptic group II metabotropic glutamate receptor / S. A. Neale, T. E. Salt // J. Physiol. – 2006. – № 577(2). – P. 659–669.

150. Neher E. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres / E. Neher, B. Sakmann // Nature. – № 260. – 1976. – P. 799–802.

151. Newman E. A. Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina / E. A. Newman, K. R. Zahs // J. Neurosci. – 1998. – № 18(11). – P. 4022–4028.

152. Northcutt R. G. Understanding vertebrate brain evolution / R. G. Northcutt // Integr. Comp. Biol. – 2002. – № 42(4). – P. 743–6.

153. Nowak L. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones / L. Nowak, P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet, A. Prochiantz // Nature. – 1984. – № 307. – P. 462–465.

154. O'Brein B. J. Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells / B. J. O'Brein, T. Isayama, R. Richardson, D. M. Berson // *J. Physiol.* – 2002. – № 538(3). – P. 787–802.
155. O'Leary D. D. Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cells death / D. D. O'Leary, J. W. Fawcett, W. M. Cowan // *J. Neurosci.* – 1986. – № 6. – P. 3692–3705.
156. O'Leary D. D. Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cells death / D. D. O'Leary, J. W. Fawcett, and W. M. Cowan // *J. Neurosci.* – 1986. – № 6. – P. 3692–3705.
157. Otori Y. Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells / Y. Otori, J.-Y. Wei, C. J. Barnstable // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1998. – № 39(6). — P. 972–981.
158. Ozawa S. Two distinct types of AMPA responses in cultured rat hippocampal neurons / S. Ozawa, M. Iino // *Neurosci. Lett.* – 1993. – № 155. – P. 187–190.
159. Pallais J.C. Fainting, swooning and syncope / J.C. Pallais, S.C. Schlozman, A. Puig, J. J. Purcell, T. A. Stem // *Prim. Care Companion CNS Disord.* – 2011. – № 13(4). – P. 11f01187.
160. Park W. M. Ionotropic glutamate receptor GluR2/3-immunoreactive neurons in the cat, rabbit, and hamster superficial colliculus superior / W. M. Park, M. J. Kim, C. J. Jeon // *Neurosci. Res.* – 2004. – № 49(2). – P. 139–55.
161. Pavlidis P. Presynaptic protein kinase activity supports long-term potentiation at synapses between individual hippocampal neurons / P. Pavlidis, J. Montgomery, D. V. Madison // *J. Neurosci.* – 2000. – № 20(12). –P. 4497–4505.
162. Perouansky M. Separation of quisqualate and kainite-selective glutamate receptors in cultured neuron from the rat colliculus superior / M. Perouansky, R. Grantyn // *J. Neurosci.* – 1989. – № 9(1). – P. 70–80.
163. Piccini A. Transient oxygen-glucose deprivation induces rapid morphological changes in rat hippocampal dendrites / A. Piccini, R. Malinow // *Neuropharmacology.* – 2001. – № 41. – P. 724 –729.

164. Pickard G. E. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells / G. E. Pickard, P. J. Sollars // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2012. – № 162. – P. 59–90.
165. Pike M. G. Patterns of visual impairment associated with lesions of the preterm infant brain / M. G. Pike, G. Holmstrom, L. S. de Vries // *Dev. Med. Child Neurol.* – 1994. – № 36. – P. 849–862.
166. Pohorecki R. Ischemic brain injury in vitro: Protective effects of NMDA receptor antagonists and calmidazolium / R. Pohorecki, G. L. Becker, P. J. Reilly, D. F. Landers // *Braun Res.* – 1990. – № 528. – P. 133–137.
167. Potthecary C. A. Changes in glutamate receptor function in synaptic input to the superficial colliculus superior (CS) with aging and in retinal degeneration in the Royal College of Surgeons (RCS) rat / C. A. Potthecary, H. Thompson, T. E. Salt // *Neurobiol. Aging.* – 2005. – № 26(6). – P. 965–972.
168. Powis D.A. Neurotransmitter release and its modulation: biochemical mechanisms, physiological function and clinical relevance / A. D. Powis, S. J. Bunn // *The probability of neurotransmitter release in the CNS.* – 1995. – №9. – C.51–52.
169. Pulsinelli W.A. Brierly J.B., Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* 11(1982) 491-498.
170. R. D. Shah, and M. C. Crair, “Mechanisms of response homeostasis during retinocollicular map formation,” *J. Physiol.*, **586**, №18, 4363-4369 (2008).
171. Ramoa S. Enhanced activation of the NMDA receptor responses at the immature retinogeniculate synapse / S. Ramoa, D. A. McCormick // *J. Neurosci.* – 1994. – № 14(4). – P. 2098–2105.
172. Ray A. Driving after epilepsy surgery: effects of visual field defects and epilepsy control / Ray A., Pathak-Ray V., Walters R., Hatfield R. // *Br. J. Neurosurg.* – 2002. – №16(5). – P. 456-60.
173. Razak K. A. NMDA receptor blockade in the colliculus superior increases receptive field size without altering velocity and size tuning / K. A. Razak, L. Huang, S. L. Pallas // *J. Neurophysiol.* – 2003. – № 90. – P. 110-119.
174. Redman, S. Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system / S. Redman // *Physiol. Rev.* – 1990. – № 70. – P. 165–198.

175. Rison R. A. Long-term potentiation and N-methyl-D-aspartate receptors: foundations of memory and neurologic disease / R. A. Rison, P. K. Stanton // Mol. Brain Res. – 1995. – № 25. – P. 209–216.
176. Royer S. Switching off and on of synaptic sites at *Aplysia* sensorimotor synapses / S. Royer, R. L. Coulson, M. Klein // J. Neurosci. – 2000. – № 20. – P. 626–38.
177. Rusakov D. A. Statistical estimation of the membrane area and numbers of active sites at presynaptic terminals / D. A. Rusakov // Neurophysiology. – 1990. – № 22(1). – P. 29–36.
178. Sabatini B. L. Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain / B. L. Sabatini, W. G. Regehr // Nature. – 1996. – № 384(14). – P. 170–172.
179. Sah P. Properties of excitatory postsynaptic currents recorded in vitro from rat hippocampal interneurons / P. Sah, S. Hestrin, R. A. Nicoll // J. Physiol. – 1990. – № 430. – P. 605–616.
180. Salinska E. Blockade of N-methyl-d-aspartate-sensitive excitatory amino acid receptors with 2-amino-5-phosphonovalerate reduces ischemia-evoked calcium redistribution in rabbit hippocampus / E. Salinska, R. Pluta, M. Puka, J. W. Lazarewicz // Exp.Neurol. – 1991. – № 112. – P. 89–94.
181. Sankarathi B. Evaluation of sirtuin role in neuroprotection of retinal ganglion cells in hypoxia / B. Sankarathi, R. F. Lee, V. C. Kakarla // IOVS. – 2012. – № 53(7). – P. 4315-4322.
182. Schalagar B. Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex / B. Schalagar, K. Fox, and D. O’Leary // Nature. – 1993. – № 364. – P. 623-626.
183. Scheetz A. J. Chronic NMDA receptor antagonism during retinotopic map formation depresses CaM kinase II differentiation in rat colliculus superior / A. J. Scheetz, G. Prusky, M. Constantine-Paton // Eur. J. Neurosci. – 1996. – № 8. – P. 1322–1328.
184. Schikorski T. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses / T. Schikorski, C. F. J. Stevens // J. Neurosci. – 1997. – № 17(15). – P. 5858–5867.

185. Schmid S. Voltage-activated calcium currents in rat retinal ganglion cells in situ: changes during prenatal and postnatal development / S. Schmid, E. Guenther // J. Neurosci. – 1999. – № 19(9). – P. 3486–3494.
186. Schmidt J. T. Presynaptic protein kinase C controls maturation and branch dynamics of developing retinotectal arbors: possible role in activity-driven sharpening / J. T. Schmidt, M. R. Fleming, B. Leu // J. Neurobiol. – 2004. – № 58(3). – P. 328–40.
187. Schupp J. NMDA-receptor antagonists disrupt the formation of the auditory space map in the mammalian colliculus superior / J. Schupp, A. King, A. Smith, and I. Thompson // J. Neurosci. – 1995. – № 15. – P. 1516–1531.
188. Seeburg P. H. The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels / P. H. Seeburg // Trends Neurosci. – 1993. – № 16. – P. 359–365.
189. Sernagor E. Development of retinal ganglion cell structure and function / E. Sernagor, S. J. Eglon, R. O. L. Wong // Prog. Retin. Eye. Res. – № 20(2). – 2001. – P. 139–74.
190. Shah R. D. Retinocollicular synapse maturation and plasticity are regulated by correlated retina waves / R. D. Shah, M. C. Crair // J. Neurosci. – 2008. – №28(1). – P. 292–303.
191. Shi J. Temporal correlation between functional and molecular changes in NMDA receptors and GABA neurotransmission in the colliculus superior / J. Shi, M. S. Aamont, M. Constantine-Paton // J. Neurosci. – 1997. – № 17(16). – P. 6264–6276.
192. Shi J. Temporal correlations between functional and molecular changes in NMDA receptors and GABA neurotransmission in the colliculus superior / J. Shi, S. M. Aamodt, M. Constantine-Paton // J. Neurosci. – 1997. – № 17. – P. 6264–6276.
193. Shi S. H. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation / S. H. Shi, Y. Hayashi, R. S. Petralia, et al. // Science. – 1999. – № 284. – P. 1811–1816.
194. Simon D. K. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection / D. K. Simon, and D. D. O’Leary // J. Neurosci. – 1992. – № 12. – P. 1212–1232.

195. Simon D. K. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection / D. K. Simon, and D. D. O'Leary // *J. Neurosci.* – 1992. – №12. – P.1212–1232.
196. Simon D. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map / D. Simon, G. Prusky, D. O'Leary, M. Constantine-Paton // *J. Neurophysiol.* – 1992. – № 70. – P. 781-802.
197. Sjöstrom P. J. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors / P. J. Sjöstrom, G. G. Turrigiano, S. B. Nelson // *Neuron.* – 2003. – № 39. – P. 641.
198. Skaliora I. Prenatal development of excitability in cat retinal ganglion cells: action potentials and sodium currents / I. Skaliora, R. P. Scobey, L. M. Chalupa // *J. Neurosci.* – 1993. – № 13 (1). – P. 313–323.
199. Slotnick S. D. Large-scale cortical displacement of a human retinotopic map / S. D. Slotnick, L. R. Moo, G. Krauss, J. H. Jr // *Brain Imaging.* – 2002. – №13(1). – P.41–46.
200. Sparks D. L. The neurobiology of saccadic eye movements / D. L. Sparks, R. Hartwich-Young // *The deep layers of the colliculus superior.* – 1989. – №5. – P. 213–255.
201. Sterling P. Retina in synaptic organization of the brain. Oxford University Press: New York, 1997. – Chapter 6.
202. Stone J. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia / Stone J., Alon T., Pe'er J., Gnessin H., Chan-Ling T., Keshet E. // *J. Neurosci.* – 1995. – № 15(7). – P. 4738–4747.
203. Strack S. Mechanism and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor / S. Strack, R. B. McNeill, R. J. Colbran // *J. Biol. Chem.* – 2000. – № 275(31). – P. 23798–806.
204. Sun W. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells / W. Sun, N. Li, S. He // *J. Comp. Neurol.* – 2002. – № 451. – P. 115–126.

205. Szatkowski M. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake / M. Szatkowski, B. Barbour, D. Attwell // *Nature*. – 1990. – № 348. – P. 443–446.
206. Tabata T. Heterogeneous intrinsic firing properties of vertebrate retinal ganglion cells / T. Tabata, M. Kano // *J. Neurophysiol.* – 2002. – № 87. – P. 30–41.
207. Takibara Y. Dynamic imaging of axonal transport in living retinal ganglion cell in vitro / Y. Takibara, M. Inatani, H. Hayashi et al. // *IOVS*. – 2011. – № 52(6). – P. 3039–3045.
208. Taschenberger H. Several types of Ca^{2+} channels mediate glutamatergic synaptic responses to activation of single Thy-1-Immunolabeled rat retinal ganglion neurons / H. Taschenberger, R. Grantyn // *J. Neurosci.* – 1995. – № 15(3). – P. 2240–2254.
209. Tashenberger H.R. Ca^{2+} -permeable P2X receptor channels in cultured rat retinal ganglion cells / H. Tashenberger, R. Jüttner, R. Grantyn // *J. Neurosci.* – 1999. – № 19(9). – P. 3353–3366.
210. Tezel G. Hypoxia-inducible factor 1 α in the glaucomatous retina and optic nerve head / Tezel G., Wax M.B. // *Arch. Ophthalmol.* – 2004. – № 122(9). – P. 1348–1356.
211. Tian N. Visual experience and maturation of retinal synaptic pathways / N. Tian // *Vision Res.* – 2004. – № 44(28). – P. 3307–16.
212. Tigges M. Ultrastructural changes in the superficial layers of the colliculus superior in *Galago crassicaudatus* (primates) after eye enucleation / M. Tigges, J. Tigges, G. L. Luttrell, C. M. Frazier // *Z. Zelforsch.* – 1973. – № 140. – P. 291–307.
213. Townsend M. Retina-driven dephosphorylation of the NR2A subunit correlates with faster NMDA receptor kinetics at developing retinocollicular synapses / M. Townsend, Y. Liu, M. Constantine-Paton // *J. Neurosci.* – 2004. – № 24(49). – P. 11098–11107.
214. Uchiyama H. ON-OFF retinal ganglion cells temporally encode OFF/ON sequence / H. Uchiyama, K. Goto, H. Matsunobu // *Neural networks*. – 2001. – № 14. – P. 611–615.

215. Vafa B. Heritable mutations in the glycine, GABA_A, and nicotinic acetylcholine receptors provide new insights into the ligand-gated ion channel receptor superfamily / B. Vafa, P. R. Schofield // *Int. Rev. Neurobiol.* – 1998. – № 42. – P.285–332.

216. Valli G. Transitory and permanent visual field defects induced by occipital lobe seizures / G. Valli, S. Zago, A. Cappellari, A. Bersano // *Ital. J. Neurol. Sci.* – 1999. – № 20(5). – P. 321–5.

217. Vanegas H. Comparative Neurology of the Optic Tectum / H. Vanegas // New York, London: Plenum Press, 1984. – P. 687–773. .

218. Vardi N. Neurochemistry of the mammalian cone synaptic complex / N. Vardi, K. Morigiwa, T. L. Wang, Y. J. Shi, P. Sterling // *Vision Res.* – 1998. – № 38. – P.1359–1369.

219. Veselovsky N. S. Biophysics of a single synapse / N. S. Veselovsky, S. A. Fedulova, P. G. Kostyuk. – Kiev: Naukova Dumka, 2004. – P. 7-14.

220. Veselovsky N. S. Fast local superfusion technique / N. S. Veselovsky, F. Engert, H. D. Lux // *Pflugers Arch.* – 1996. – № 432(2). – P.351–4.

221. Vidal-Sanz M. Axonal regeneration and synapse formation in the colliculus superior by retinal ganglion cells in the adult rat / M. Vidal-Sanz, G. M. Bray, M. P. Villegas-Perez, S. Thanos, A. J. Aguayo // *J. Neurosci.* – 1987. – № 7(9). – P.2894–2909.

222. Vidal-Sanz M. Regenerated synapses persist in the colliculus superior after the regrowth of retinal ganglion cell axons / M. Vidal-Sanz, G. M. Bray, A. J. Aguayo // *J. of Neurocytol.* – 1991. – № 20. – P. 940–952.

223. von Gersdorff H. Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released / H. von Gersdorff, E. Vardi, G. Matthews, P. Sterling // *Neuron.* – 1996. – № 16. – P. 1221–1227.

224. Voronin L. L. Commentary on the quantal analysis of hippocampal long-term potentiation and related phenomena of synaptic plasticity / L. L. Voronin // *Neurosci.* – 1993. – № 56(2). – P. 275–304.

225. Voronin L. L. Quantal analysis of the hippocampal long-term potentiation / L. L. Voronin // *Rev. Neurosci.* – 1994. – № 5. – P. 141–170.

226. Wall A. M. Effects of prolyl-hydroxylase inhibition and chronic intermittent hypoxia on synaptic transmission and plasticity in the rat CA1 and dentate gyrus / A. M. Wall, A. Corcoran, K. D. O'Halloran // *Neurobiology of disease*. – 2014. – № 62. – P. 8–17.
227. Walmsley B. The probabilistic nature of synaptic transmission at a mammalian excitatory central synapse / B. Walmsley, F. R. Edwards, D. J. Tracey // *J. Neurosci.* – 1987. – № 7(4). – P. 1037–1046.
228. Wandell B. A. Imaging retinotopic map in the human brain / B. A. Wandell, J. Winawer // *Vision Research*. – 2011. – №51. – P. 718–737.
229. Wang G. Y. Calcium-activated potassium conductances in retinal ganglion cells of the ferret / G. Y. Wang, D. W. Robinson, L. M. Chalupa // *J. Neurophysiol.* – 1998. – № 79 (1). – P. 151–158.
230. Wang G.-Y. Functional development of intrinsic properties in ganglion cells of the mammalian retina / G.-Y. Wang, G.-M. Ratto, S. Bisti, L. M. Chalupa // *J. Neurophysiol.* – 1997. – № 78(6). – P. 2895–2903.
231. Warton S. S. Synaptogenesis in the SGS of the rat colliculus superior / S. S. Warton, R. McCart // *Synapse*. – 1989. – №3(2). – P.136-48.
232. Webrwein E. Acetylcholine protection of adult pig retinal ganglion cells from glutamate-induced excitotoxicity / E. Webrwein, S. A. Thompson, S. F. Coulibaly, D. M. Linn, C. L. Linn // *IOVS*. – No. 45(5). – 2004. – P. 1531-1543.
233. Wiberq M. Somatosensory projection to the mesencephalon: an anatomical study in the monkey / M. Wiberq, J. Westman, A. Blomqvist // *J. Comp. Neurol.* – 1987. – №264(1). – P. 92-117.
234. Wu L.G. The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression / L. G. Wu, J. G. G. Borst // *Neron*. – № 23. – P. 821–832.
235. Xin H. A novel organotypic culture model of the postnatal mouse retina allows the study of glutamate-mediated excitotoxicity / H. Xin, J.-A. S. Yannazzo, R. S. Duncan, E. V. Gregg, M. Singh, P. A. Koulen // *J. Neurosci. Methods*. – 2007. – № 159. – P. 35-42.

236. Xu C. Cannabinoids are neuroprotective against HIV-1 TAT and occlude the TAT-induced decrease in GABAergic neurotransmission in prefrontal cortex slices / C. Xu, D. J. Hermes, K. Mackie et al. // The FASEB Journal. – 2016. – № 30(1). – P. 316-31.

237. Xue L. PZD protein mediated activity-dependent LTP/LTD developmental switch at rat retinocollicular synapse / L. Xue, F. Zhang, X. Chen, J. Lin, J. Shi // J. Physiol. Cell Physiol. – 2010. – № 298. – P. 1572–1582.

238. Yamagishi R. Neuroprotective effect of astaxanthin against rat retinal ganglion cell death under various stresses that induce apoptosis and necrosis / R. Yamagishi, M. Aihara // Molecular Vision. – 2014. – № 20. – P.1796-1805.

239. Zhang C.-L. Nicotinic acetylcholine receptors in mouse and rat optic nerves / C.-L. Zhang, Y. Verbny, S.A. Malek, P.K. Stys, S.Y. Chiu // J. Neurophysiol. – No.91. – 2004. – P.1025-1035.

240. Zhao J.-P. Long-term potentiation in the juvenile colliculus superior requires simultaneous activation of NMDA receptors and L-type Ca^{2+} channels and reflects addition of newly functional synapses / J.-P. Zhao, M. A. Phillis, M. Constantine-Paton // J. Neurosci. – 2006. – № 26(49). – P. 12647-12655.

241. Zhou I. Y. Functional MRI of postnatal visual development in normal and hypoxic-ischemic-injured superior colliculi / I. Y. Zhou, E. X. Wu, M. M. Cheung et al. // Neuroimage. – 2010. – № 49(3). – P. 2013-2020.

242. Alder V. A. Effect of hypoxia on the maintained firing rate of retinal ganglion cells / V. A. Alder, I. J. Constable // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1981. – № 21(3). – P.450-6.

243. Анатомія людини / [Головацький А. С., Черкасов В. Г., Сапін М. Р., Парахін А. І.]. – Вінниця: Нова Книга, 2009. – 372-386, 389-392 с. – Т. 2.

244. Архангельский В.Н. История офтальмологии. Анатомия и физиология зрения. Оптическая система глаза и рефракция / Архангельский В.Н. – М: Медгиз, 1962. – 519 с. – Кн. 1.

245. Березовский В. А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека / Березовский В. А., К.: Наукова думка, 1975. – 116-155, 225-255 с.

246. Березовский В. А. Природная и инструментальная оротерапия / Березовский В. А., Донецк: Заславский А. Ю., 2012. – 69-93, 93-111, 11-126 с.
247. Дамаскин Б.Б. Основы теоретической электрохимии / Б.Б. Дамаскин, О.А. Петрий. – М.: Высшая школа, 1978. – 113-128, 179-184 с.
248. Зуева М. В. Созревание и пластичность зрительной системы: нейрогенез, синаптогенез и миелиногенез Сообщение 2. Зрительная кора и зрительная лучистость / М.В. Зуева // Вестн. Офтальм. 4. – 2012. – С. 70-74.
249. Зуева М. В. Структурно-функциональная организация клеток Мюллера: роль в развитии и патологии сетчатки. Обзор Клиническая физиология зрения / М. В. Зуева, И. В. Цапенко. – М.: МБН, 2006. – 128-191 с.
250. Пат. 26863 Україна, МПК C12N 5/02. Пристрій для спільного культивування нейронів різних відділів головного та спинного мозку / Думанська Г.В., Веселовський М.С.; заявник і патентовласник НТУУ “КПІ” – заявл. 25.02.2007; опубл. 10.10.2007, Бюл. №16.
251. Патологическая физиология. Учебник для медицинских вузов / [Адо А. Д., Адо М. А., Пыцкий В. И. и др.] – Москва: Триада-Х, 2000. – 278-290 с.
252. Патологическая физиология. Учебник для студентов медицинских вузов / [Зайко Н. Н., Быця Ю. В., Атаман А. В и др.] – К.: “ЛОГОС”, 1996. – 343-354 с.
253. Патологічна фізіологія. Підручник для фармакологічних навчальних закладів і фармацевтичних факультетів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації / [Березнякова А. І., Кузнецова В. М., Філімонова Н. І та інші] – Харків: “Золоті сторінки”, 2003. – 262-270 с.
- Пристрій для спільного культивування нейронів різних відділів головного та спинного мозку / Г. В. Думанська, М. С. Веселовський; заявник та власник НТУУ “Київський політехнічний інститут”. – № u 2007 05654; заявл. 22.05.2007; опубл. 10.10.2007, Бюл. № 16.
254. Сакман Б. Регистрация одиночных каналов / Б. Сакман, Э. Неер. – М: Мир, 1987. – 448 с.
255. Свіридов О.І. Анатомія людини / Свіридов О.І. – Київ: Вища школа, 2001. – 374-386 с.

256. Сидоренко Е.И. Офтальмология / Сидоренко Е.И., Гундорова Р. А., Гусева М. Р. – Гэотар: Медицина, 2007. – 408 с.

257. Шмидт Р. Физиология человека / Шмидт Р., Тевс Г. – М: Мир, 2005. – 235-255. – Т 1.