

КОРОТКОЧАСНА ПЛАСТИЧНІСТЬ ГЛУТАМАТ- ТА ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ МІЖ КОКУЛЬТИВОВАНИМИ ГАНГЛІОЗНИМИ КЛІТИНАМИ СІТКІВКИ ТА НЕЙРОНАМИ *SUPERIOR COLLICULUS*

Надійшла 21.11.13

Ми досліджували зміни ефективності синаптичної передачі через глутамат- та ГАМК-ергічні синаптичні зв'язки між кокультивованими гангліозними клітинами сітківки (ГКС) та нейронами *superior colliculus* (SC) при парній стимуляції ГКС як одну з форм короткочасної синаптичної пластичності. Одночасно реєстрували трансмембранні струми та потенціали в синаптично зв'язаних парах згаданих нейронів з використанням методики парного петч-клемпу в конфігурації «ціла клітина». Викликана генерація парних потенціалів дії (ПД) у пресинаптичних ГКС призводила до депресії глутаматергічної синаптичної передачі після другого ПД, опосередкованої активацією виключно НМДА- або неНМДА-рецептор-каналних комплексів на постсинаптичній мембрані нейронів SC. У разі ГАМК-ергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецептор-каналних комплексів, аналогічна парна стимуляція призводила до полегшення синаптичної дії на нейрон SC після другого ПД, генерованого ГКС. Використання базового та повного квантового аналізів дозволило виявити вірогідне зменшення ($P < 0.05$) біноміального параметра n при депресії НМДА-опосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) і вірогідне зменшення як квантового параметра q , так і біноміальних параметрів n і p при депресії неНМДА-опосередкованих вПСС. Іншими словами, в першому випадку оцінка вказує на можливу пресинаптичну локалізацію механізмів депресії в результаті зменшення числа вивільнених синаптичних везикул, що вміщують трансмітер, тоді як у другому можливі не тільки пре-, але й постсинаптичні механізми (зменшення числа вивільнених синаптичних везикул та десенситизація постсинаптичних рецепторів). Оцінка нормованих змін квантових та біноміальних параметрів при полегшенні ГАМК_A-опосередкованих вПСС свідчить про вірогідне збільшення ($P < 0.05$) пресинаптичних факторів n і p і, відповідно, квантового вмісту m . Таким чином ефект полегшення може зумовлюватися процесами в пресинаптичній терміналі (збільшенням кількості синаптичних везикул).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гангліозні клітини сітківки, нейрони *superior colliculus*, кокультура, викликані постсинаптичні струми (вПСС), депресія та полегшення при парній стимуляції.

ВСТУП

Короткочасні зміни ефективності синаптичної передачі, тобто короткотривала синаптична пластичність (КТП), відіграють істотну роль у процесах передачі та обробки інформації в нейронних мережах [1]. Для дослідження однієї з форм такої пластичності використовують парну стимуляцію си-

наптичних входів; у даних умовах може спостерігатись або полегшення, або депресія синаптичної передачі після другого потенціалу дії (ПД) у пресинаптичній клітині. Прояви КТП істотно варіюють залежно від типу синапсів та інтервалу між тест-стимулами [2, 3]. Інтерпретація механізмів короткочасної депресії в основному базується на особливостях функціонування пресинаптичної терміналі, однак беруться до уваги й певні постсинаптичні механізми. Так, вказана депресія може бути зумовлена виснаженням пулу готових до вивільнення синаптичних везикул [4], активним пригніченням процесу вивільнення трансмітера з пресинаптичної терміналі [5], десенситизацією

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

² Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ (Україна).

Ел. пошта: doomanya@mail.ru (Г. В. Думанська).

постсинаптичних рецепторів після генерації ПД, викликаного дією першого стимулу [6], зменшенням імовірності вивільнення синаптичних везикул [7], а також зменшенням числа вільних активних зон, в яких може відбутися злиття везикули з пресинаптичною плазматичною мембраною [8]. Ефект полегшення при КТП вперше описали дель Кастильо и Катц [9]; вони припустили, що даний ефект зумовлюється збільшенням імовірності вивільнення нейротрансмітера і є пов'язаним із пресинаптичними механізмами. Результати наступних досліджень показали, що підвищення ефективності синаптичної передачі в умовах парної стимуляції пресинаптичних входів дійсно може опосередковуватися збільшенням імовірності вивільнення квантів трансмітера, причому не виключається і можливість збільшення кількості сайтів вивільнення квантів [8, 10].

Феномен КТП досить чітко проявляється в синаптичних зв'язках між гангліозними клітинами сітківки (ГКС) і нейронами верхніх бугрів чотиригорбикового тіла (*superior colliculus* – SC). Раніше виконані дослідження механізмів КТП синаптичної передачі між вказаними нейронами проводилися на парасагітальних переживаючих зрізах SC [11–13]. При цьому через відсутність можливості чіткої ідентифікації пре- та постсинаптичних нейронів у даних умовах та певні обмеження у виборі електрофізіологічних методів дослідження відомості про механізми депресії та полегшення синаптичної передачі між ГКС та нейронами SC поки що залишаються досить обмеженими.

МЕТОДИКА

Кокультивацію дисоційованих клітин сітківки та нейронів SC проводили з використанням розробленої нами методики, деталі якої були описані раніше [14]. Одноденних шурят лінії Вістар декапітували; сітківку та верхні шари SC (*stratum griseum superficiale* та *stratum opticum*) виділяли та піддавали дисоціації. Суспензії нейронів обох типів із щільністю згідно з вимірами в камері Горяєва порядку 10^3 – 10^4 клітин/см² змішували та кокультивували на покривних скельцях у чашках Петрі в атмосфері повітряно-газової суміші з підвищеним вмістом двоокису вуглецю (5 ± 0.5 % CO₂) при температурі 37 ± 0.5 °C та вологості не менше 80 %.

В експеримент відбирали пари синаптично зв'язаних ГКС та нейронів SC, візуально

ідентифікованих згідно з морфологічними особливостями даних клітин. Покривне скельце з культивованими нейронами розміщували в робочій камері, заповненій стандартним зовнішньоклітинним розчином наступного складу (в мілімолях на 1 л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, NEPES – 20, глюкоза – 10 (усі реактиви фірми “Sigma”, США); pH 7.4. В експериментах з використанням стандартного розчину із зовнішньоклітинною концентрацією Mg²⁺ 2 мМ виявити викликаний постсинаптичний струм (ВПСС), опосередкований активацією виключно НМДА-рецептор-каналних комплексів при підтримуваному потенціалі –70 мВ, було неможливо. Даний ефект пояснюється потенціалзалежним блокуванням згаданих рецептор-каналних комплексів іонами Mg²⁺ [15]. У зв'язку з цим НМДА-компонент ВПСС реєстрували в безмагнієвому зовнішньоклітинному середовищі з додаванням селективного блокатора неНМДА-рецепторів D_L-APV у концентрації 20 мкМ при підтримуваному потенціалі –70 мВ.

Петч-піпетки з внутрішнім діаметром кінчика 1.0–1.5 мкм були виготовлені з боросилікатних скляних капілярів (“World Precision Instruments”, США). Внутрішньоклітинний розчин у петч-піпетках мав наступний склад (у мілімолях на 1 л): калію глюконат – 155, EGTA – 0.5, MgCl₂ – 1, NEPES – 20 (усі реактиви фірми “Sigma”, США); pH 7.4. Заповнені таким розчином петч-піпетки мали опір 5–7 МОм.

В усіх експериментах концентрації іонів Cl[–] у зовнішньо- та внутрішньоклітинному розчинах становили 151–144 та 2.0 мМ відповідно. При даних концентраціях і підтримуваному потенціалі –70 мВ хлорні ВПСС через ГАМК_A-рецептор-каналні комплекси були гіперполяризуючими щодо мембрани нейронів і, відповідно, мали вихідний напрямок. Струми через канали іонотропних глутаматних рецепторів мали вхідний напрямок і були деполаризуючими. Таким чином, під час реєстрації ставало можливим досить легко візуально розрізнити збуджуючі та гальмівні ВПСС, що полегшувало аналіз експериментальних даних.

Реєстрували трансмембранні струми та потенціали в синаптично зв'язаних парах ГКС та нейронів SC з використанням парного петч-клемпу в конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації струму/напруги в пре- та постсинаптичній клітинах. Це дозволяло одночасно контролювати виникнення ПД у сомі ГКС та реєструвати ВПСС у сомі нейрона SC. Пресинаптичний нейрон (ГКС) утримували в ре-

жимі фіксації струму. Для дослідження феномену КТП використовували протоколи парної стимуляції. Пари ПД викликали прикладанням коротких деполяризуючих поштовхів струму тривалістю 5 мс та амплітудою 100–300 пА, розділених інтервалами 20, 50, 100, 200, 500 та 2000 мс. Пари поштовхів струму прикладали з частотою 0.5 c^{-1} . Постсинаптичний нейрон (SC) утримували в режимі фіксації потенціалу на рівні -70 мВ та реєстрували вПСС, викликані діями пар пресинаптичних ПД, що надходили до цієї клітини. Точне вимірювання амплітуди другого вПСС у парі при малих міжстимульних інтервалах утруднювалося тому, що даний вПСС накладався на фазу спаду першого вПСС (рис. 2, А). Контроль якості фіксації потенціалу протягом експерименту здійснювали за допомогою моніторингу варіацій значень амплітуди струму витoku ($I_{\text{внт}}$) та сталої часу емнісного струму ($\tau_{\text{емн}}$), що реєструвався в разі прикладання короткого (10 мс) гіперполяризуючого прямокутного стимулу невеликої амплітуди (-10 мВ). Отримані дані аналізували лише в тому разі, якщо варіації значень $\tau_{\text{емн}}$ та $I_{\text{внт}}$ не перевищували 20 %. Експерименти проводили при температурі $20\text{--}24 \text{ }^\circ\text{C}$. За даних умов синаптична затримка вПСС складала $2.1\text{--}5.1 \text{ мс}$. Такі величини синаптичної затримки при вказаному температурному режимі дозволяли визначати згадані вПСС як моносинаптичні [16].

Аналізували пари монофазних вПСС, які виникали у відповідь на генерацію пари ПД у пресинаптичному нейроні SC. Як чисельну характеристику зміни ефективності синаптичної передачі розраховували коефіцієнт парної стимуляції (КПС) – відношення амплітуд двох послідовних вПСС, розділених певним проміжком часу: $\text{КПС} = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\%$, де A_1 та A_2 – амплітуди першого та другого вПСС відповідно. Якщо КПС $< 100 \%$, то спостерігається ефект депресії, а коли КПС $> 100 \%$ – ефект полегшення.

Раніше нами було показано, що в синапсах між кокультивованими ГКС та нейронами SC імовірність вивільнення медіатора є досить високою. Тому для вивчення природи ефектів КТП ми проводили квантовий аналіз, використовуючи біноміальну статистику [17]. Основними параметрами базової квантової теорії вивільнення нейромедіатора є q – величина кванта (амплітуда постсинаптичного струму, який опосередковується вивільненням нейротрансмітера з однієї синаптичної везикули та m – середній квантовий вміст (середня кількість вивільнених синаптичних везикул):

$$m = n \cdot p, \quad (1)$$

де n та p – біноміальні параметри; n – це середня кількість сайтів вивільнення трансмітера, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного такого сайта [18]. При цьому n та p зумовлюються факторами виключно пресинаптичної природи, а q – як пре-, так і постсинаптичними факторами. Середня амплітуда вПСС у серії реєстрацій представлена як

$$E = m \cdot q. \quad (2)$$

У нашій роботі для оцінки вищезазначених параметрів ми використовували базовий та повний квантовий аналізи [19]. У рамках такого аналізу кількість активних зон ототожнювалася з кількістю сайтів вивільнення. Робиться припущення, що варіація ймовірності вивільнення є мізерною. Перший із згаданих методів аналізу базується на припущенні, що значення максимальної амплітуди вПСС є відомим і для біноміального розподілення воно представлено як $A_{\text{макс}} = n \cdot q$. Тоді з урахуванням рівнянь (1) та (2)

$$p = \frac{A}{A_{\text{макс}}}. \quad (3)$$

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

$$m = \frac{(1-p)}{CV^2}, \quad (4)$$

де CV – коефіцієнт варіації амплітуди вПСС. Параметри n і q оцінюються за допомогою рівнянь (1) та (2) відповідно. Другий метод базується на тому, що в умовах реального експерименту стандартне відхилення струму не є нульовим і кількість реєстрацій обмежена; тому для оцінки параметра p використовують trial-to-error-метод:

$$p = \frac{A}{\left\{ A_{\text{тр}} - 0.3 \cdot S_{\text{ш}} \cdot \ln \left[\frac{2N \cdot A}{(A_{\text{тр}} - S_{\text{ш}})} \right] \right\}}, \quad (5)$$

де $A_{\text{тр}}$ – середнє значення трьох максимальних величин амплітуди вПСС. Параметри m , n , та q оці-

нюються за допомогою рівнянь (4), (1) та (2) відповідно.

Наступний метод з визначенням коефіцієнта варіації базується на порівнянні амплітуд та коефіцієнтів варіації першого та другого вПСС за допо-

могою графіка залежності $\left(\frac{CV_2}{CV_1}\right)^{-2}$ від $\frac{A_2}{A_1}$ [20].

Величина CV^{-2} , як це видно з рівнянь (1) та (4), є функцією параметрів n і p . Останні, в свою чергу визначаються виключно пресинаптичними факторами, тоді як амплітуда вПСС зумовлюється як пре-, так і постсинаптичними складовими (2). Враховуючи припущення, використані в описаній раніше моделі, та формули базового та повного квантового аналізів, діагональ на відповідному графіку відділяє ефекти, пов'язані зі зміною квантового вмісту, від ефектів, пов'язаних зі зміною як квантового вмісту, так і величини кванта. Таким чином, в умо-

вах полегшення синаптичної передачі, коли $\frac{A_2}{A_1} > 1$, ефекти, пов'язані зі зміною пресинаптичних факторів, відображаються графічно над діагоналлю, тоді як ефекти, пов'язані зі зміною не тільки пре-, але й постсинаптичних факторів, – під діагоналлю. При депресії, коли $\frac{A_2}{A_1} < 1$, ситуація є зворотною.

Обробку та візуалізацію даних виконували за допомогою програмного пакета „Clamfit 9.0” (“Axon Instruments”, США), „Excel 2007” (“Microsoft Corporation”, США) та „Origin 8.5 Pro” (“OriginLab Corporation”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було досліджено 23 синаптично зв'язані пари ГКС та нейронів SC; дослідження відбувалося в інтервалі від 16 до 28 діб кокультування. Викликана генерація пар ПД у пресинаптичних ГКС зумовлювала депресію глутаматергічної синаптичної передачі, опосередкованої повторною активацією виключно НМДА- або неНМДА-рецептор-каналних комплексів на постсинаптичній мембрані нейронів SC (вісім та дев'ять пар досліджених клітин відповідно) (рис. 1, А, Б). У той же час парна стимуляція пресинаптичної клітини призводила до полегшення ГАМК-ергічної синаптичної передачі після другого ПД, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецептор-каналних комплексів (шість пар) (Б). Інтервал між парами стимулів, як вже згадувалося, складав 2 с, що було достатньо для пов-

ного відновлення характеристик першого вПСС у парі (1–6).

У деяких синаптично зв'язаних парах нейронів під час реєстрації при пресинаптичній парній стимуляції ми спостерігали дуже слабе полегшення або також слабку депресію синаптичної передачі (рис. 2, А, Б). В умовах депресії синаптичної передачі незалежно від інтервалу між стимулами дисперсія амплітуд відповідей на дію першого стимулу була значно більшою, ніж дисперсія амплітуд другої відповіді (Б). Використовуючи t -тест рівності/нерівності середніх у разі нерівних дисперсій, ми виявили, що при рівні вірогідності $P = 0.05$ середні амплітуди вПСС, виниклих у відповідь на дію першого та другого стимулів у кожній із серій реєстрацій, вірогідно розрізнялися. Іншими словами, феномени депресії або полегшення не можна було пояснити простою флуктуацією квантованої амплітуди вПСС.

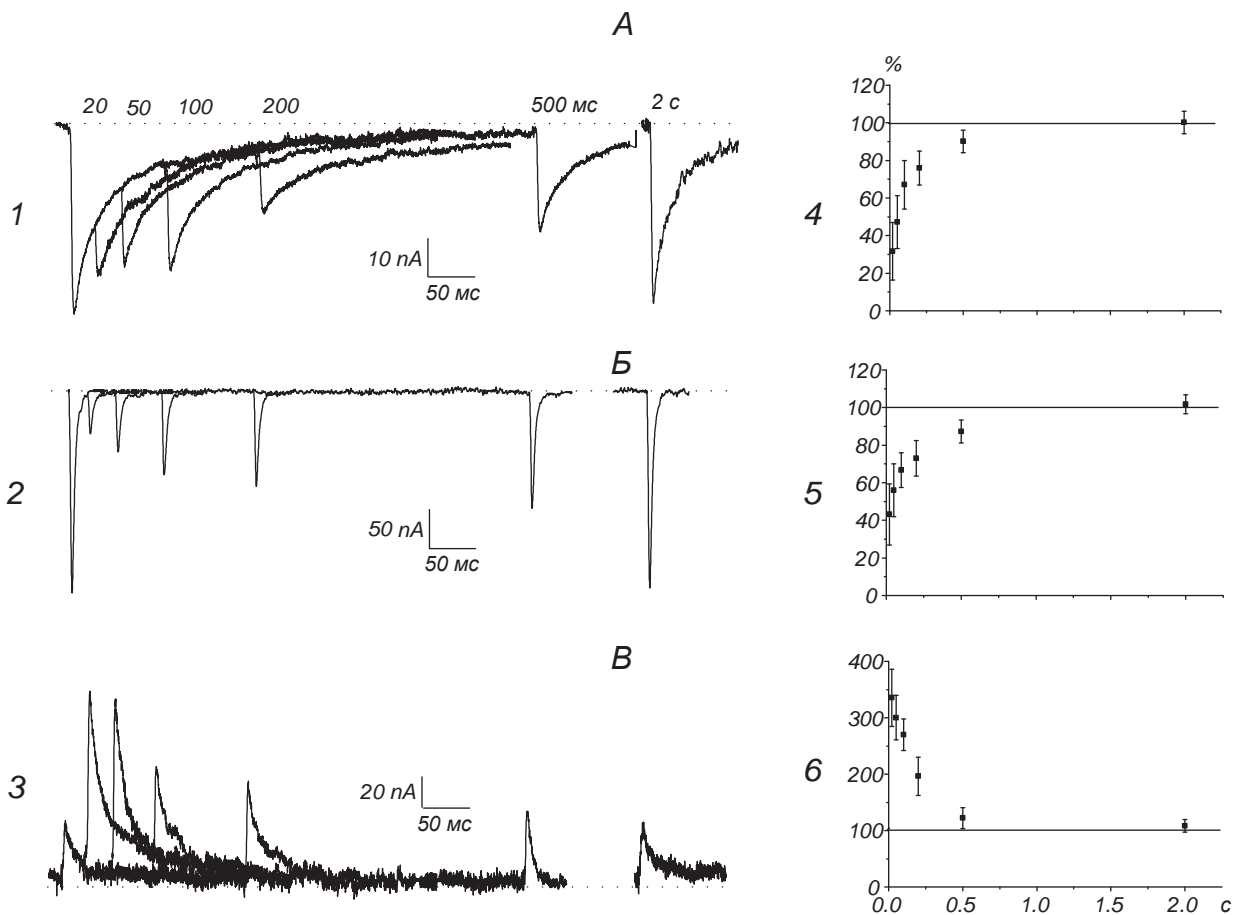
Відповіді синаптично зв'язаних пар нейронів, в яких спостерігалася депресія другого вПСС, були нами проаналізовані щодо наявності кореляції між амплітудами першого та другого синаптичних струмів. Нахил лінії регресії був від'ємним для всіх пар нейронів, але рівні кореляції були дуже низькими. Незважаючи на відсутність істотного зв'язку між амплітудами першого та другого вПСС, ми виявили певну зворотну нелінійну залежність КПС від амплітуди першого вПСС (дані не ілюструються). Наявність зворотної кореляції, а також нерівність дисперсій амплітуд відповідей на дію першого та другого стимулів, як правило, інтерпретуються як результат вичерпання пула готових до вивільнення синаптичних везикул. Проте досить сумнівно, що поодинокій стимул може істотно зменшити кількість готових до вивільнення везикул у пресинаптичному елементі. Численні електронні мікрофотографії свідчать про те, що терміналь одного аксона ГКС на нейроні SC може утворювати до восьми синаптичних контактів і в кожному з них налічується порядку двох десятків готових до негайного вивільнення везикул та близько сотні синаптичних везикул у терміналі загалом [21–23]. У наших умовах кокультування результати парної петч-клемп-реєстрації вказують на те, що ПСС у постсинаптичному нейроні, виниклі у відповідь на дію окремого ПД у пресинаптичній клітині опосередковуються в середньому одночасним вивільненням від двох до 24 квантів глутамату [17]. Тому можливість того, що в основі депресії глутаматергічної синаптичної передачі між кокультутованими ГКС та нейронами

SC лежить ефект виснаження пула готових до вивільнення синаптичних везикул, виглядає малоюмовірною.

Для оцінки внеску можливих пре- та постсинаптичних механізмів, що лежать в основі феноменів депресії та полегшення, ми використовували визначення коефіцієнта варіації. Згідно з описаним вище підходом усі точки на графіку залежності $\left(\frac{CV_2}{CV_1}\right)^{-2}$ від $\frac{A_2}{A_1}$ для НМДА-опосередкованих вПСС були локалізовані в ділянці, яка відповідає змінам пресинаптичних параметрів при депресії (рис. 3, А). У той же час для неНМДА-опосередкованих вПСС відповідні точки знаходилися в ділянці, що від-

повідає комплексу змін і пре- і постсинаптичних параметрів синаптичної дії в разі депресії (Б). На графіку залежності $\left(\frac{CV_2}{CV_1}\right)^{-2}$ від $\frac{A_2}{A_1}$ для ГАМК_A-опосередкованих струмів усі точки потрапили в ділянку змін виключно пресинаптичних параметрів в умовах полегшення (В).

Використовуючи базовий та повний квантовий аналізи, ми отримали оцінки квантового параметра q та біноміальних параметрів p та n для вПСС, викликаних пред'явленнями першого та другого стимулів, при всіх міжстимульних інтервалах. Як було згадано раніше, інтервал між парами ПД складав 2.0 с. Цього було достатньо для повного віднов-



Р и с. 1. Депресія та полегшення збуджувальних та гальмівних викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) при парній пресинаптичній стимуляції.

А–В – приклади записів НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованих вПСС при різних міжстимульних інтервалах (1–3 відповідно) та графіки залежності коефіцієнта парної стимуляції (КПС) від міжстимульного інтервалу як чисельної характеристики змін ефективності синаптичної передачі, опосередкованої активацією виключно НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-рецептор-каналних комплексів (4–6 відповідно).

$$\text{КПС} = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\% \text{, де } A_1 \text{ та } A_2 \text{ – амплітуди першого та другого вПСС у парі відповідно.}$$

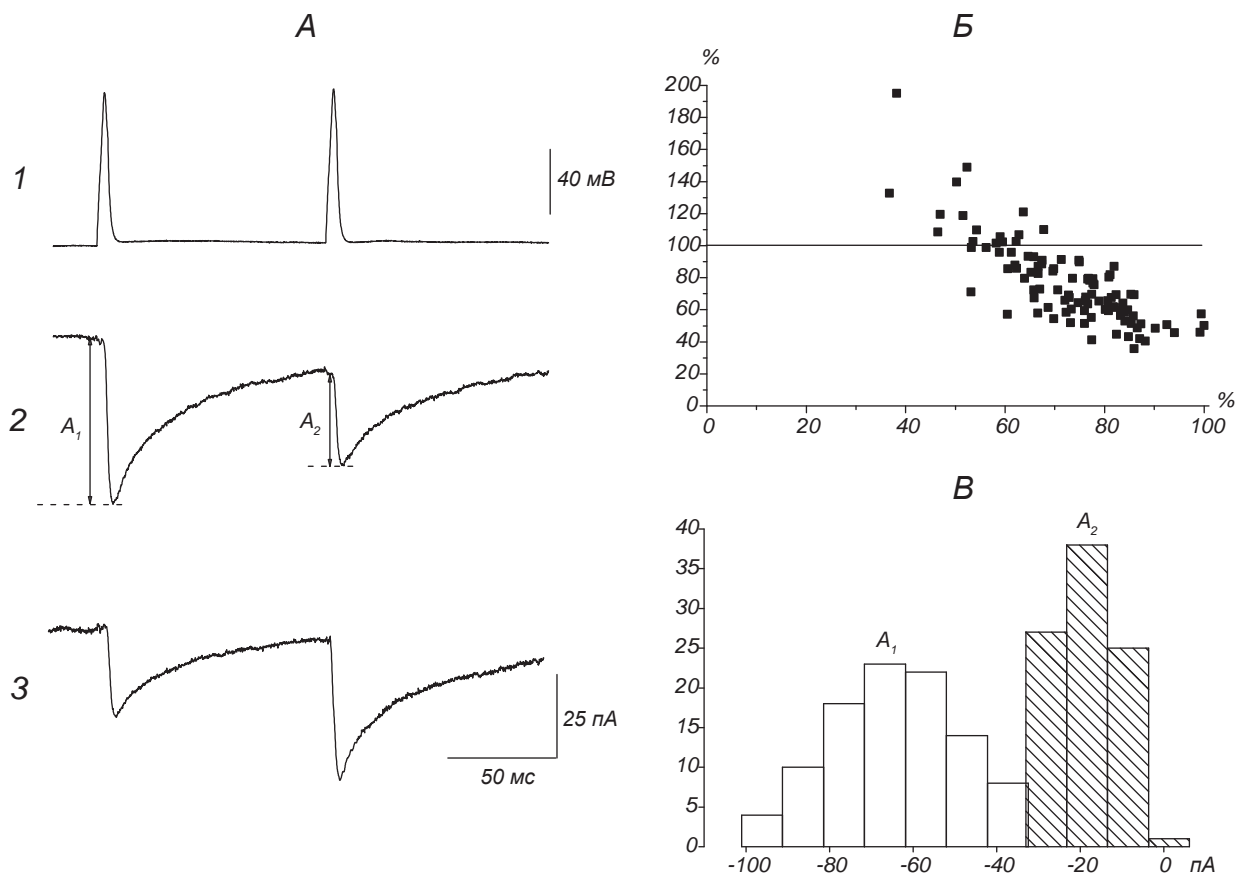


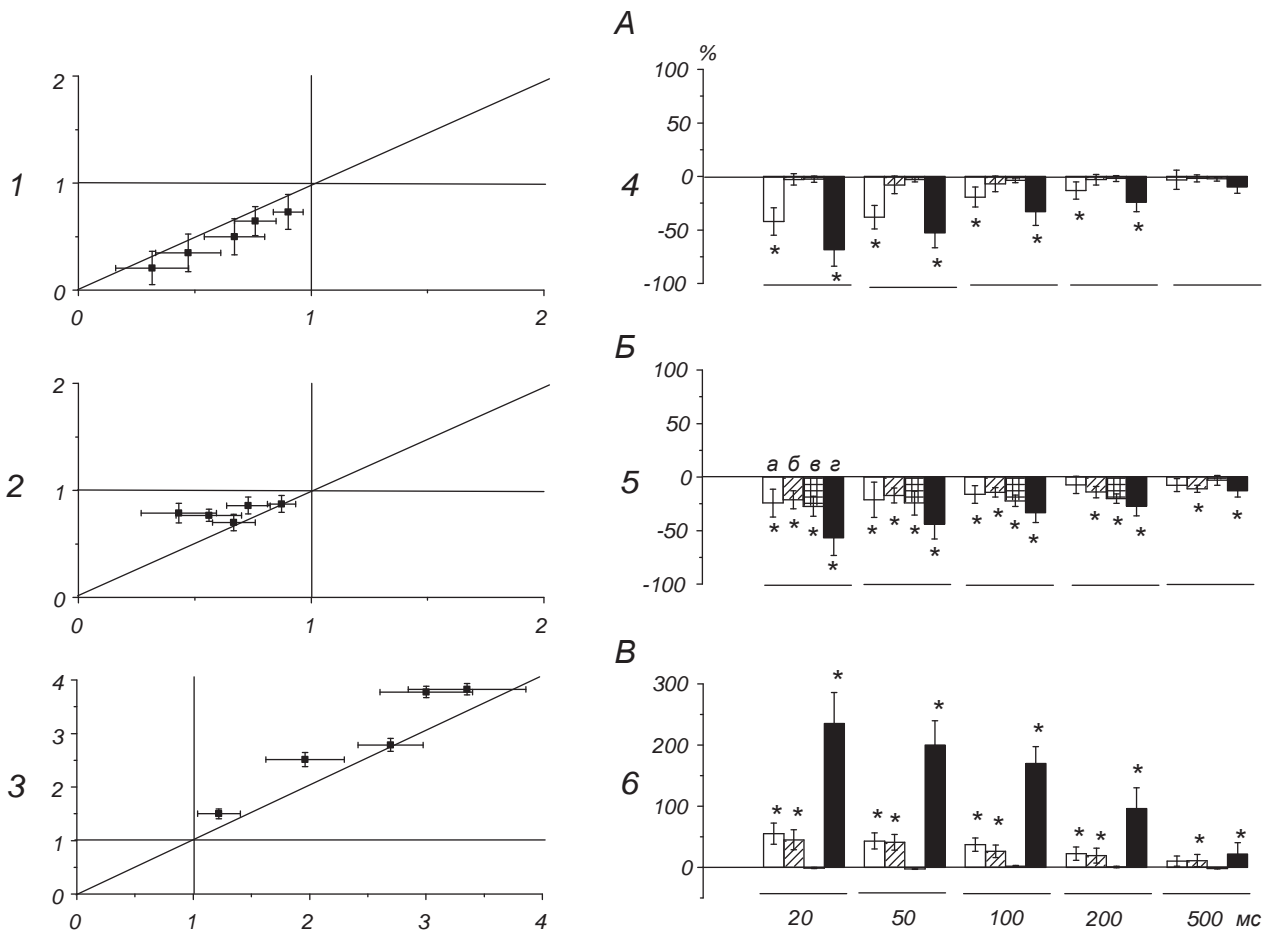
Рис. 2. Депресія та полегшення викликаних збуджувальних постсинаптичних струмів (вЗПСС) при парній пресинаптичній стимуляції.

А – приклади записів трансмембранних струмів та потенціалів у синаптично зв'язаній парі гангліозних клітин сітківки (ГКС) та нейронів *superior colliculus* (SC) з використанням парного петч-клемпу в конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації струму/напруги одночасно на пре- та постсинаптичній клітинах. 1 – пара викликаних дії (ПД), генерованих пресинаптичною ГКС при міжстимульному інтервалі 100 мс; 2, 3 – пара вЗПСС, виниклих у відповідь на парну пресинаптичну стимуляцію при значенні підтримуваного потенціалу – 70 мВ. Б – графік залежності коефіцієнта парної стимуляції від нормованої амплітуди вЗПСС, виниклого у відповідь на дію першого стимулу для синаптично зв'язаної пари клітин, відведення від якої представлені на А. В – гістограми розподілу амплітуд A_1 та A_2 вЗПСС, виниклих у відповідь на пред'явлення першого та другого ПД.

лення вЗПСС, викликаного дією першого стимулу; тому квантові та біноміальні параметри, розраховані для перших вЗПСС, вважалися контрольними. Контрольні параметри, оцінені для кожної окремої синаптично зв'язаної пари клітин, вірогідно не розрізнялися ($P > 0.05$). Для визначення пре- або постсинаптичної природи КТП глутамат- та ГАМК-ергічної синаптичної передачі між кокультивованими ГКС та нейронами SC ми аналізували середні нормовані зміни параметрів q , p , n та КПС. Такі зміни були розраховані наступним чи-

ном: $\frac{\bar{X} \cdot 100}{\bar{X}_{\text{контр}}} - 100(\%)$, де \bar{X} – середня величина того або іншого параметра (n , p , q або КПС), оціненого для вЗПСС, який викликався пред'явленням

другого стимулу; $\bar{X}_{\text{контр}}$ – середня величина параметра (n , p , q або КПС), оціненого для першого вЗПСС. Для НМДА-опосередкованих вЗПСС ефект депресії спостерігався поряд із вірогідним зменшенням ($P < 0.05$) біноміального параметра n порівняно з таким у контролі. Дане зменшення складало в середньому 42.13, 38.23, 19.24 та 13.24 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс відповідно (рис. 3, а). Отже, з урахуванням вищеописаних припущень прийнятої нами моделі під час оцінки квантових та біноміальних параметрів депресія даних струмів зумовлюється зменшенням пресинаптичного фактора n і, відповідно, зменшенням квантового вмісту m . У деяких публікаціях ефекти депресії або полегшення синаптичної передачі по-



Р и с. 3. Графічні представлення результатів, отриманих за допомогою обчислення коефіцієнта варіації та методів базового та повного квантового аналізу.

A–B – усереднені графіки залежності $\left(\frac{CV_2}{CV_1}\right)^{-2}$ від $\frac{A_2}{A_1}$ для викликаних постсинаптичних струмів (вПСС), опосередкованих

активацією виключно НМДА-, неНМДА- та ГАМКА-рецептор-каналних комплексів відповідно при різних міжстимульних інтервалах (1–3 відповідно) та графіки середніх нормованих змін величин n , p , q (а–в) та коефіцієнта парної стимуляції – КПС (2) щодо контрольних значень при різних міжстимульних інтервалах (4–6). Середні нормовані зміни

були розраховані наступним чином: $\frac{\bar{X} \cdot 100}{\bar{X}_{\text{контр}}} - 100$ (%), де \bar{X} – середня величина параметра (n , p , q або КПС), оціненого для

вПСС, який викликався дією другого стимулу; $\bar{X}_{\text{контр}}$ – середня величина параметра (n , p , q або КПС), оціненого для вПСС, який викликався дією першого стимулу. q – величина кванту; n та p – біноміальні параметри: n – середня кількість сайтів вивільнення, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного сайту вивільнення.

яснювалися зміною кількості “вільних” сайтів викиду трансмітера в перебігу парної стимуляції [8]. Для неНМДА-опосередкованих вПСС ефект депресії відповідав вірогідному зменшенню ($P < 0.05$) квантового параметра q на 27.36, 24.33, 22.32 та 20.13 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс відповідно, зменшенню біноміального параметра p на 21.36, 17.33, 14.24, 13.97 та 11.03 % при інтервалах 20, 50, 100, 200 та 500 мс та зменшенню біноміального параметра n на 24.33, 21.24

та 16.24 % при міжстимульних інтервалах 20, 50 та 100 мс відповідно (б). Отже, в даному випадку депресія може зумовлюватися не тільки особливостями роботи пресинаптичної терміналі (зменшенням пресинаптичних факторів n та p , пов’язаним із відповідним зниженням квантового вмісту m), а й можливими постсинаптичними механізмами (десенситизацією постсинаптичних рецепторів) [24, 25]. У деяких роботах зміну величини кванта в ході реалізації КТП асоціювали зі зміною кількості мо-

лекул трансмітера в одному кванті [26].

Для ГАМК_A-опосередкованих вПСС ефект полегшення спостерігався поряд із вірогідним збільшенням ($P < 0.05$) біноміального параметра p на 45.02, 41.03, 26.33, 19.33 та 11.02 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100, 200 та 500 мс відповідно та з вірогідним збільшенням біноміального параметра n на 55.32, 43.20, 37.02 та 22.35 % при міжстимульних інтервалах 20, 50, 100 та 200 мс (рис. 3, в). Таким чином, в основі полегшення ГАМК_A-опосередкованих вПСС лежать пресинаптичні механізми (збільшення пресинаптичних факторів n , p та, відповідно, збільшення квантового вмісту m) [27, 28]. Максимальні вірогідні зміни параметрів q , p та n спостерігалися при мінімальних міжстимульних інтервалах.

Дана робота є частиною спільного наукового проекту НАН України та РФФД „Вивчення клітинних механізмів нейроректорної дії гліпролінів при системних пошкодженнях нейронів”, № держреєстрації 0114U005000.

Дослідження виконувалися згідно з положеннями Міжнародної конвенції із захисту тварин, яких використовують в експериментах (Страсбург, 1985), а також положеннями Комітетів з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України.

Автори даної роботи – Г. В. Думанська, О. В. Рихальський та М. С. Веселовський – підтверджують, що у них немає конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. M. Tsodyks and H. Markram, “The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability,” *PNAS*, **94**, 719-723 (1997).
2. D. Debanne, N. C. Guerineau, B. H. Gähwiler, and S. M. Thompson, “Paired pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release,” *J. Physiol.*, **491**, No. 1, 163-176 (1996).
3. H. Markram, Y. Wang, and M. Tsodyks, “Differential signaling via the same axon of neocortical pyramidal neurons,” *PNAS*, **95**, 5323-5328 (1998).
4. R. S. Zucker and W. G. Regehr, “Short-term synaptic plasticity,” *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 355-405 (2002).
5. M. C. Bellingham and B. Walmsley, “A novel presynaptic inhibitory mechanism underlies paired pulse depression at a fast central synapse,” *Neuron*, **23**, No. 1, 159-170 (1999).
6. K. Hashimoto and M. Kano, “Presynaptic origin of paired-pulse depression at climbing fiber Purkinje cell synapses in the rat cerebellum,” *J. Physiol.*, **506**, No. 2, 391-405 (1998).
7. L. E. Dobrunz and C. F. Stevens, “Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses,” *Neuron*, **18**, No. 6, 995-1008 (1997).
8. S. Royer, R. L. Coulson, and M. Klein, “Switching off and on of synaptic sites at *Aplysia* sensorimotor synapses,” *J. Neurosci.*, **20**, 626-638 (2000).
9. J. del Castillo and B. Katz, “Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression,” *J. Physiol.*, **124**, No. 3, 574-585 (1954).
10. M. K. Worden, M. Bykhovskaya, and J. T. Hackett, “Facilitation at the lobster neuromuscular junction: a stimulus-dependent mobilization model,” *J. Neurophysiol.*, **78**, No. 1, 417-428 (1997).
11. S. A. Neale and T. E. Salt, “Modulation of GABAergic inhibition in the rat superior colliculus by a presynaptic group II metabotropic glutamate receptor,” *J. Physiol.*, **577**, No. 2, 659-669 (2006).
12. C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe, and R. Grantyn, “Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus,” *J. Neurophysiol.*, **88**, 595-603 (2002).
13. W. Lu and M. Constantine-Paton, “Eye opening rapidly induces synaptic potentiation and refinement,” *Neuron*, **43**, 237-249 (2004).
14. Г. В. Думанська, С. О. Кошелева, М. С. Веселовський, “Хімічна нейропередача між гангліозними клітинами сітківки та нейронами верхнього чотиригорбикового тіла в умовах тривалого суміжного культивування”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **43**, № 4, 369-371 (2011).
15. M. L. Mayer, G. L. Westbrook, and P. B. Guthrie, “Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons,” *Nature*, **309**, 261-263 (1984).
16. B. L. Sabatini and W. G. Regehr, “Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain,” *Nature*, **384**, No. 14, 170-172 (1996).
17. Г. В. Думанська, О. В. Рихальський, М. С. Веселовський, “Квантові характеристики вивільнення глутамату та ГАМК в синапсах між кокультивованими гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus”, *Фізіол. журн.*, **60**, № 1, 3-11 (2014).
18. B. Katz, “Quantal mechanism of neural transmitter release,” *Science*, **173**, 123-126 (1971).
19. L. L. Voronin, “Commentary on the quantal analysis of hippocampal long-term potentiation and related phenomena of synaptic plasticity,” *Neuroscience*, **56**, No. 2, 275-304 (1993).
20. D. S. Faber and H. Korn, “Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity,” *J. Biophys.*, **60**, 1288-1294 (1991).
21. H. Kucukdereli, N. J. Allen, A. T. Lee, et al., “Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC,” *PNAS*, **108**, No. 32, 440-449 (2011).
22. M. Vidal-Sanz, G. M. Bray, and A. J. Aguayo, “Regeneration synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons,” *J. Neurocytol.*, **20**, 940-952 (1991).
23. M. Tigges, J. Tigges, G. L. Luttrell, and C. M. Frazier, “Ultrastructural changes in the superficial layers of the superior colliculus in *Galago crassicaudatus* (primates) after eye enucleation,” *Z. Zellforsch.*, **140**, 291-307 (1973).
24. L. G. Wu and J. G. G. Borst, “The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression,” *Neuron*, **23**, 821-832 (1999).
25. A. C. Meyer, E. Neher, and R. Schneggenburger, “Estimation of quantal size and number of functional active zones at the calyx of held synapse by nonstationary EPSC variance,” *J. Neurosci.*, **21**, No. 20, 7889-7900 (2001).
26. I. A. Fleidervish and M. J. Gutnick, “Paired pulse facilitation of

- IPSCs in slices of immature and mature mouse somatosensory neocortex," *J. Neurophysiol.*, **73**, No. 6, 2591-2596 (1995).
27. G. Hess, U. Kuhnt, and L. L. Voronin, "Quantal analysis of paired-pulse facilitation in quinea pig hippocampal slices," *Neurosci. Lett.*, **77**, 187-192 (1987).
28. L. Jiang, S. Sun, M. Nedergaard, and J. Kang, "Paired-pulse modulation at individual GABAergic synapses in rat hippocampus," *J. Physiol.*, **523**, No. 2, 425-439 (2000).