

Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus в умовах кокультури

Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С.Веселовський

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ; e-mail: Doomannya@gmail.com

Проведено серію експериментів для виявлення ефектів та механізмів гіпоксичного впливу на синаптичну передачу між гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus (SC). Аплікація гіпоксичного розчину призводила до довготривалої потенціації (ДТП) НМДА-опосередкованої синаптичної передачі. Аналіз впливу дефіциту кисню на спонтанні та мініатюрні постсинаптичні струми (сПСС та мПСС відповідно) виявив збільшення частоти їх виникнення та появу другого піка в гістограмі розподілу мПСС. Оцінка квантових та біноміальних параметрів відображає комплекс пре- та постсинаптичних змін при потенціації, незалежних від ймовірності вивільнення нейромедіатора. ДТП може зумовлюватися збільшенням загальної кількості активних синапсів. Глутаматергічна синаптична передача, опосередкована активацією неНМДА-рецепторканалних комплексів, у відповідь на аплікацію безкисневого розчину реагувала короткотривалою депресією, яка є результатом пресинаптичної дисфункції і асоціюється зі зменшенням ймовірності вивільнення синаптичних везикул та кількості активних зон. ГАМК-ергічна синаптична передача, опосередкована активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів реагувала на гіпоксичну дію довготривалою депресією (ДТД). Аналіз сПСС та мПСС показав суттєве зменшення частоти виникнення цих струмів та зменшення величини кванта ($P=0,05$) протягом дефіциту кисню. Загалом в основі ефекту гіпоксіїндукованої ДТД ГАМК-ергічної синаптичної передачі лежить комплекс змін пресинаптичних (незалежних від ймовірності вивільнення) та постсинаптичних (зменшення чутливості рецепторів постсинаптичної мембрани) механізмів.

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки; нейрони superior colliculus; синаптична передача; гіпоксія; довготривала депресія та потенціація.

ВСТУП

Дослідження механізмів впливу гіпоксії на високоспеціалізовані системи ЦНС, які відповідальні за сприймання, обробку та передачу інформації є актуальною проблемою фізіології та медицини. Гіпоксія – провідний фактор у патогенезі багатьох захворювань, включаючи мозкові травми, дистрофії, інсульти. Втрата зору як наслідок мозкової травми та дистрофій різної етіології – одна з головних причин зорових порушень сьогодні [1, 2]. Пошкодження можуть відбуватися у будь-якому елементі зорової системи: структурі ока, зорових нервах, підкіркових © Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С.Веселовський

зорових центрів, зоровій корі. Найчастіше саме порушення на рівні передачі зорового сигналу від сітківки в первинні підкіркові зорові центри призводить до часткової або повної втрати зору [3,4]. Superior colliculus (SC) – рефлекторний підкірковий центр зорового аналізатора. Саме тут відбувається перемикання первинних аферентних сигналів від сітківки, їх обробка, модуляція та формування рефлекторних реакцій. Ключові моменти гіпоксичного ураження проєкцій гангліозних клітин сітківки (ГКС) до SC досліджені досить детально на рівні структурних порушень та судинних реакцій за допомогою методів магнітнорезонансної томографії [5, 6]. Разом

з тим ефекти та механізми гіпоксичного пошкодження цієї синаптичної передачі дотепер не були досліджені.

Метою нашої роботи було охарактеризувати ефект та виявити механізми гіпоксичного впливу на синаптичну передачу між ГКС та нейронами SC в умовах кокультури.

МЕТОДИКА

Кокультування дисоційованих клітин сітківки та нейронів SC проводили згідно з розробленою нами методикою, яка була описана раніше [7]. В експеримент відбирали пари синаптичнозв'язаних гангліозних клітин (ГКС) і нейронів SC, які візуально ідентифікували за морфологічними особливостями цих популяцій нейронів. Покривне скельце з кокультутованими нейронами розміщали в робочій камері, заповненій стандартним зовнішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 20, глюкоза – 10; рН 7,4. Всі реактиви фірми “Sigma”, (США).

Patch-піпетки з внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм були виготовлені з боросилікатних скляних капілярів (“World Precision Instruments”, США). Внутрішньоклітинний розчин мав такий склад (ммоль/л): калій глюконат – 155, EGTA – 0,5, MgCl₂ – 1, HEPES – 20; рН 7,4. Всі реактиви фірми “Sigma”, (США), Заповнені таким розчином patch-піпетки мали опір 5–7 МОм. Відводили трансмембранні струми та потенціали у парах ГКС і нейронів SC методом patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації струму та напруги одночасно на пре- та постсинаптичній клітині відповідно. 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) прямокутний стимул невеликої амплітуди (-10 мВ). Отримані результати аналізували лише в

тому разі, якщо варіації значень $\tau_{\text{ємн}}$ та $I_{\text{вит}}$ не перевищували 20 %. В усіх експериментах концентрації іонів хлору для зовнішньо- та внутрішньоклітинного розчинів становили 151–144 та 2 ммоль/л відповідно. За таких концентрацій при підтримуваному потенціалі хлорні постсинаптичні струми через канали ГАМК_A-рецепторів мали вихідний напрямок і гіперполяризували мембрану нейронів, а струми через канали іонотропних глутаматних рецепторів – вхідний і де поляризували. Таким чином, під час реєстрації ставало можливим візуально розрізнити збуджувальні та гальмівні постсинаптичні струми, що значно полегшувало аналіз експериментальних результатів. Мініатюрні постсинаптичні струми (мПСС) реєстрували в нейронах SC у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині з додаванням 1 мкмоль/л тетродотоксину, за наявності відповідних блокаторів.

Аплікацію розчинів на синаптичнозв'язану пару ГКС та нейрона SC проводили за допомогою методу швидкої локальної суперфузії зі швидкостями, достатніми для дослідження лігандкерованих іонних каналів [8]. Піпетки для суперфузії діаметром 20–40 мкм розміщали на відстані 250–300 мкм вище синаптичнозв'язаної пари нейронів. Вплив гіпоксії на викликані, спонтанні та мініатюрні ПСС вивчали за наступним протоколом: на досліджувану пару аплікували робочий зовнішньоклітинний розчин протягом 5 хв, цей період вважався “контрольним”, після цього йшла швидка заміна на відповідний аноксичний розчин (близько 5 хв) – період гіпоксії, з наступною повторною подачею робочого зовнішньо клітинного розчину – реоксигенація. Короткочасну (до 5 хв) аплікацію аноксичного розчину використовували як загальноприйнятту модель гіпоксії *in vitro*. Слід зазначити, що амплітудні та кінетичні характеристики викликаного потенціалу дії (ПД) пресинаптичних ГКС залишалися незмінними протягом всього експерименту.

Гіпоксичні розчини отримували барботуванням робочого зовнішньоклітинного

розчину азотом протягом 20 хв. Концентрацію вимірювали полярографічним методом за допомогою платиного мікроелектрода. Полярографічний аналіз оснований на можливості електрохімічного відновлення або окиснення іонів чи нейтральних молекул на поверхні електрода. Кожен вид іонів чи нейтральних молекул відновлюється або окиснюється при своєму визначеному потенціалі. Полярографічні індикаторні мікроелектроди виготовляли з заготовок для patch-піпеток у кінчики яких був впаяний платиновий дріт діаметром близько 20 мкм і довжиною відкритої ділянки 30–40 мкм. До індикаторного електрода прикладали від'ємний потенціал -60 мВ і вимірювали граничний струм дифузії. Перед використанням електрод калібрували за двома точками, вимірюючи граничний струм дифузії в розчинах з відомою концентрацією. Для отримання нульової точки використовували насичений розчин сульфату натрію (8 ммоль/л). За другу точку приймали граничний струм дифузії, виміряний у розчині, що знаходився в рівновазі з повітрям (об'ємний вміст кисню в повітрі – 21%).

Раніше нами було показано, що в синапсах між кокультивованими ГКС і нейронами SC ймовірність вивільнення медіатора досить висока, тому для вивчення природи ефектів короткотривалої пластичності ми проводили квантовий аналіз, використовуючи біноміальну статистику [9]. Основними параметрами базової квантової теорії вивільнення нейромедіатора є: q – величина кванта - амплітуда постсинаптичного струму, яка опосередкована вивільненням нейромедіатора з однієї синаптичної везикули і є пре- та постсинаптичним фактором; m – середній квантовий вміст (середня кількість вивільнених синаптичних везикул) $m = n \cdot p$, де n та p – біноміальні параметри: n – середня кількість сайтів вивільнення, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного сайту вивільнення, обидва є пресинаптичними факторами [18]. Середня амплітуда вПСС серії реєстрацій визначається $E = m \cdot q$

.Відповідно до базової біноміальної моделі ймовірність вивільнення нейромедіатора в досліджуваних синапсах розраховується за таким рівнянням:

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

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

Наступний метод базується на порівнянні амплітуд та коефіцієнтів варіації вПСС в контролі та при дії гіпоксії чи реоксигенації [11]. Візуалізацію результатів зображали на

графіку залежності $\pi = \left(\frac{CV_{дия}}{CV_{контр}} \right)^{-2}$ від $r = \left(\frac{A_{дия}}{A_{контр}} \right) \cdot (CV)^{-2}$ є функцією параметрів

n і p , тоді як амплітуда вПСС зумовлюється як пре- так і постсинаптичними факторами. Враховуючи припущення описаної раніше моделі та формули базового та повного квантового аналізу, діагональ на цьому графіку розділяє ефекти, пов'язані зі зміною квантового вмісту, від ефектів, зумовлених зміною як квантового вмісту так і величини кванта.

Таким чином, у разі потенціації $\left(\frac{A_2}{A_1} > 1 \right)$

ефекти, пов'язані зі зміною пресинаптичних факторів, відображаються графічно над діагоналлю, тоді як ефекти, пов'язані зі зміною як пре- так і постсинаптичних факторів – під

діагоналлю. При депресії $\left(\frac{A_2}{A_1} < 1 \right)$ – навпаки.

Обробку та візуалізацію результатів проводили за допомогою програмних пакетів Clamfit 9.0 ("Axon Instruments", США), Excel 2007 ("Microsoft Corporation", США) та Origin 8.5 Pro ("OriginLab Corporation", США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було досліджено 88 синаптичнозв'язаних пар ГКС та нейронів SC від 10 до 28

діб кокультування. Аплікація гіпоксичного розчину призводила до довготривалої потенціації (ДТП) вхідних повільних вПСС (18 пар клітин, рис. 1, I). Амплітуди повільного вПСС були збільшені відносно контролю до $161,4 \pm 7,2\%$ протягом періоду гіпоксії та до $140,9 \pm 12,4\%$ протягом періоду реоксигенації ($P=0,05$). Описаний ефект було зареєстровано у безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині без додавання блокатора неНМДА-рецепторканалних комплексів DNQX (10 мкмоль/л). Такі кінетичні характеристики струму, як час наростання та стала часу спаду вПСС були $3,57 \pm 0,32$ та $37,23 \pm 5,36$ мс відповідно. Цей струм повністю блокувався за наявності 10 мкмоль/л D_L -APV. Тобто

описана синаптична передача опосередковувалась виключно НМДА-рецепторканалним комплексом.

Ми дослідили гіпоксичний вплив на НМДА-опосередковану синаптичну передачу у стандартному зовнішньоклітинному розчині з додаванням 10 мкмоль/л DNQX (6 пар клітин). Наявність Mg^{2+} не давала можливості зареєструвати ці струми при підтримуваному потенціалі -70 мВ у контролі. Постсинаптичний нейрон SC деполаризували до -40 — -30 мВ для підтвердження наявності функціонального синапсу у візуально ідентифікованій парі ГКС та нейрона SC. Потім нейрон утримували за нормальних фізіологічних умов (при -70 мВ). Локальна

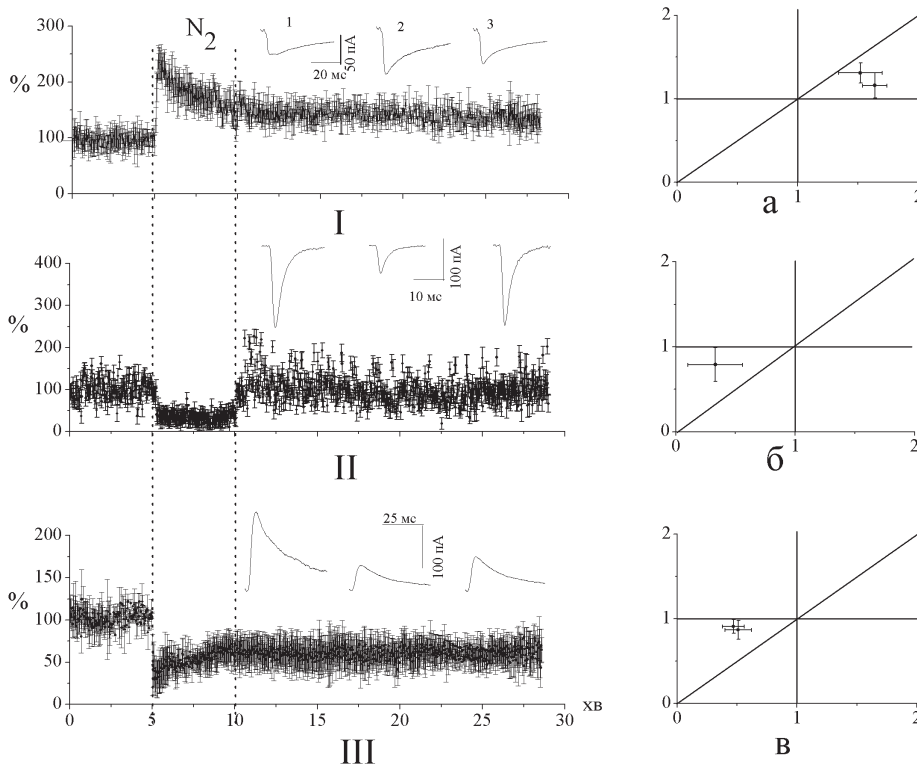


Рис.1. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на синаптичну передачу між гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus та графічні результати методу коефіцієнта варіації. I, II, III - часовий перебіг амплітуд НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) до, під час та після відповідно аплікації гіпоксичного розчину. На верхніх лівих фрагментах I, II та III – усереднені записи вПСС в контролі (1), під час гіпоксії (2) та протягом реоксигенації (3). а, б, в - усереднені графіки залежності $r = \left(\frac{CV_{дия}}{CV_{контр}} \right)^{-2}$ від $\pi = \left(\frac{A_{дия}}{A_{контр}} \right)$ для вПСС, опосередкованих активацією виключно НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-рецепторканалних комплексів відповідно при гіпоксії та реоксигенації

аплікація безкисневого розчину призводила до можливості реєстрації НМДА-опосередкованого вПСС від нейрона SC, струм знову зникав у період реоксигенації (рис 2, а). Можливість реєстрації НМДА-опосередкованих вПСС під час гіпоксії, ймовірно, відбувалася внаслідок ослаблення потенціалзалежного магнієвого блоку НМДА-рецепторканального комплексу на мембрані постсинаптичного нейрона, який за фізіологічних умов є одним з безпосередніх механізмів нейропротекторної дії. Цей ефект при дефіциті кисню за нормальних електрофізіологічних умов дотепер не має конкретно описаного механізму та є предметом багатьох актуальних досліджень [12, 13]. Тривале підвищення активності НМДА-рецепторканальних комплексів на постсинаптичній мембрані нейрона SC за обох зовнішньоклітинних розчинів призводила до підвищення концентрації кальцію в

цитозолі і, як наслідок, відстроченої загибелі нейрона. Явище гіпоксіїіндукованої ДТП, опосередковане активацією НМДА-рецепторканальних комплексів, має назву патологічної пластичності. Ми проаналізували мініатюрні та спонтанні НМДА-опосередковані постсинаптичні струми (мПСС та сПСС відповідно) в контрольних умовах та при дефіциті кисню. Як видно з рис. 3, А, гіпоксія індукує збільшення частоти виникнення НМДА-опосередкованих сПСС, яка залишається підвищеною протягом періоду реоксигенації (n=4). Кількісний аналіз частотних змін зображений на графіку кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними подіями (див. рис. 3, а). Аналогічне збільшення частоти відносно контролю спостерігалось при реєстрації мПСС протягом гіпоксії, відповідні графіки кумулятивної ймовірності інтервалів між мініатюрними подіями зображено на рис. 4,

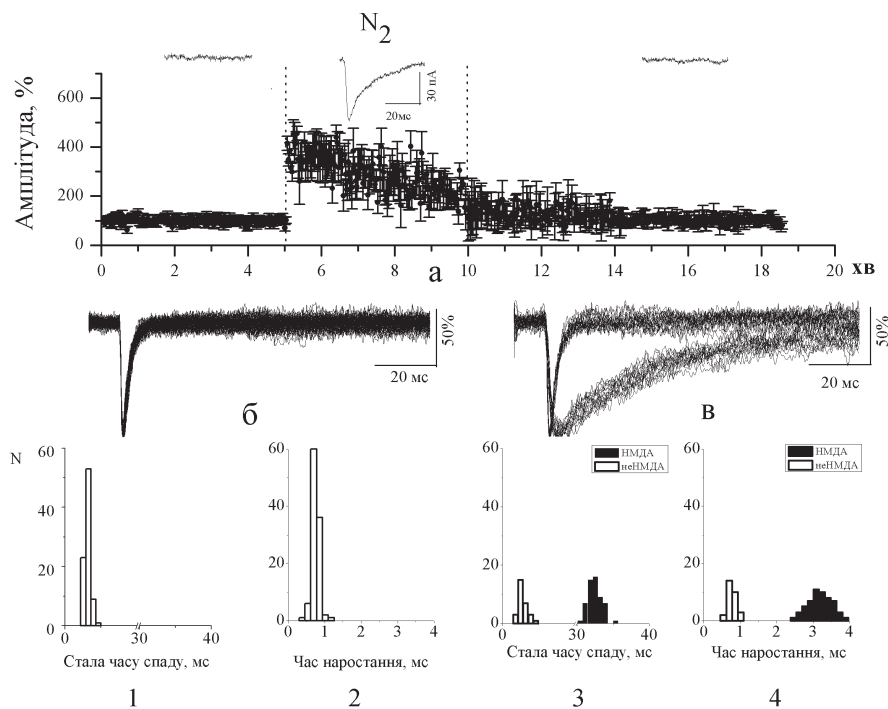


Рис.2. Вплив гіпоксії на НМДА- та неНМДА-опосередковані викликані та спонтанні постсинаптичні струми (вПСС та сПСС відповідно) зареєстровані з використанням стандартного зовнішньоклітинного розчину, без додавання блокторів. а - часовий перебіг амплітуд НМДА-опосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) до, під час та після аплікації гіпоксичного розчину. На верхньому фрагменті а – усереднені записи вПСС у відповідному періоді. б, в – нормовані записи реєстрацій глутаматергічних сПСС в контролі та при гіпоксії відповідно. 1, 2 – гістограми розподілу сталої часу спаду та часу наростання сПСС представлених в б. 3, 4 - гістограми розподілу сталої часу спаду та часу наростання сПСС, представлених у в

а. Порівняльний аналіз амплітуд НМДА-рецепторопосередкованих мПСС ($n=4$) виявив вірогідну появу другого піка в гістограмі розподілу амплітуд в гіпоксичних умовах (див. рис. 4, А, 1, 2). Тобто за умов низької ймовірності вивільнення нейромедіатора протягом періоду гіпоксії спостерігалися як одно- так і двоквантове вивільнення синаптичних везикул.

Для виявлення локусу гіпоксіїіндукованих змін ми оцінили біноміальні параметри та коефіцієнт варіації НМДА-опосередкованих ВПСС у контролі, при гіпоксії та протягом реоксигенації. Контрольні параметри, оцінені для кожної окремої синаптично зв'язаної пари, в сукупності не відрізнялися при $P=0,05$. Ми аналізували середні відсоткові зміни параметрів n , p , m та CV відносно контролю. Для НМДА-опосередкованої синаптичної

передачі ефект ДТП спостерігався разом зі збільшенням квантового вмісту (m) і відповідно достовірним збільшенням ($P=0,05$) біноміального параметра n порівнянно з контролем на 61,4 та 52,2 % при гіпоксії та реоксигенації відповідно. Значущих змін у значеннях p та CV при гіпоксії та реоксигенації щодо контролю не виявлялося. Тобто в реалізацію ДТП залучаються пресинаптичні механізми, незалежні від ймовірності вивільнення нейромедіатора. Використовуючи метод коефіцієнта варіації було виявлено, що

всі точки на графіку $\left(\frac{CV_2}{CV_1}\right)^{-2}$ від $\left(\frac{A_2}{A_1}\right)$ для

НМДА-опосередкованих ВПСС були локалізовані в зоні, яка відображає комплекс змін пре- та постсинаптичних параметрів при потенціації (див. рис. 1, а). Наразі ДТП може

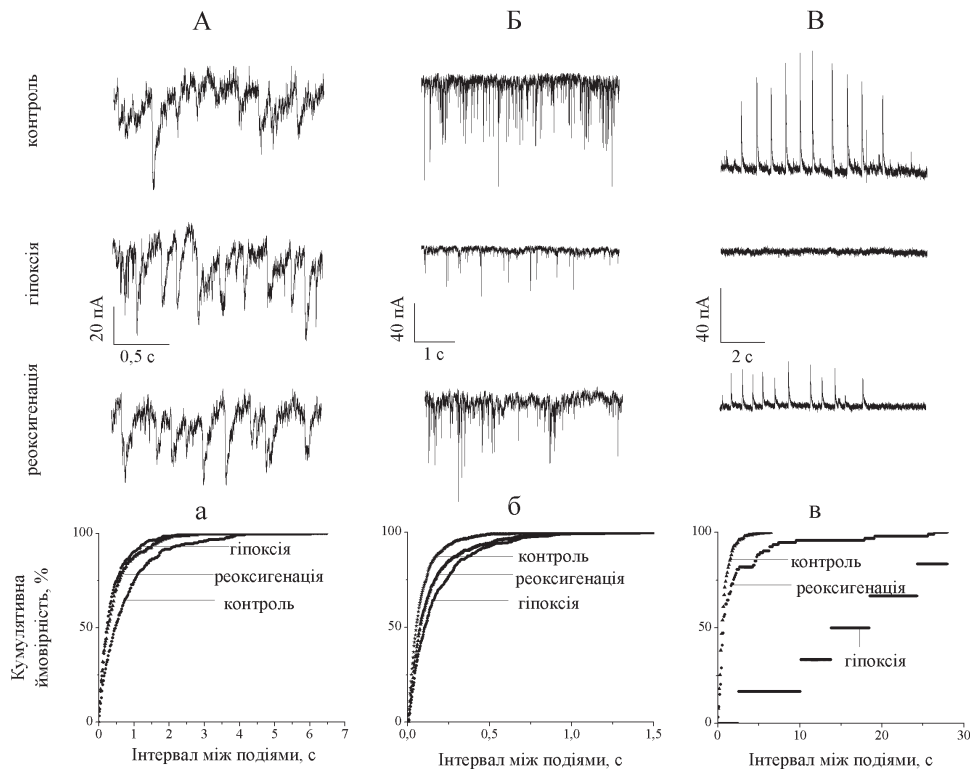


Рис.3. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на спонтанні постсинаптичні струми (сПСС). А, Б, В - записи реєстрацій НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованих сПСС відповідно, в контролі, при гіпоксії та протягом реоксигенації. а, б, в – графіки кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованими подіями відповідно в контролі при гіпоксії та протягом реоксигенації

зумовлюватися збільшенням загальної кількості активних синапсів. Існує серія робіт в яких було досліджено структурні модифікації синапсів протягом та через певний час після гіпоксичного ушкодження [14, 15].

Глутаматергічна синаптична передача, опосередкована активацією неНМДА-рецепторканалних комплексів (16 пар клітин) у відповідь на гіпоксичну дію, реагувала короткотривалою депресією (див. рис. 1, П). Амплітуди цього вПСС зменшились на $62,4 \pm 6,2\%$ ($P=0,05$) від значень контролю лише протягом гіпоксії. Дослідження впливу дефіциту кисню на неНМДА-опосередковані сПСС виявили зворотне зменшення частоти їх виникнення ($n=5$, див. рис. 3, Б, б). Аналіз амплітуд та частот реєстрацій мПСС ($n=3$) не виявив достовірних змін протягом безкисневого періоду (див. рис. 4, Б, 3, 4, б). Ці експерименти проводили у відповідному зовнішньоклітинному розчині з додаванням $10 \text{ мкмоль/л } D_L\text{-APV}$.

Серію експериментів з дослідження впливу гіпоксії на неНМДА-опосередковані сПСС проводили у стандартному зовнішньоклітинному розчині без додавання блокатора НМДА-опосередкованої передачі ($n=6$). Аналіз часу наростання та кінетики спаду сПСС у контролі показав наявність лише неНМДА-опосередкованих струмів (див. рис. 2, б). Однорідність популяції за параметрами часового ходу та кінетики спаду струмів відображено на рис. 2, 1, 2. Водночас при гіпоксії з'являлися одно- та двоквантові НМДА-опосередковані сПСС. Нормовані сПСС на рис. 2, в та гістограми розподілу кінетичних характеристик чітко розрізняють два типи глутаматергічних сПСС (див. рис. 2, 3, 4). Збільшення частоти реєстрації сПСС у період гіпоксії пояснюється появою НМДА-опосередкованих сПСС.

Для оцінки внеску можливих пре- та постсинаптичних механізмів, що лежать в основі гіпоксіїндукованої короткотривалої депресії

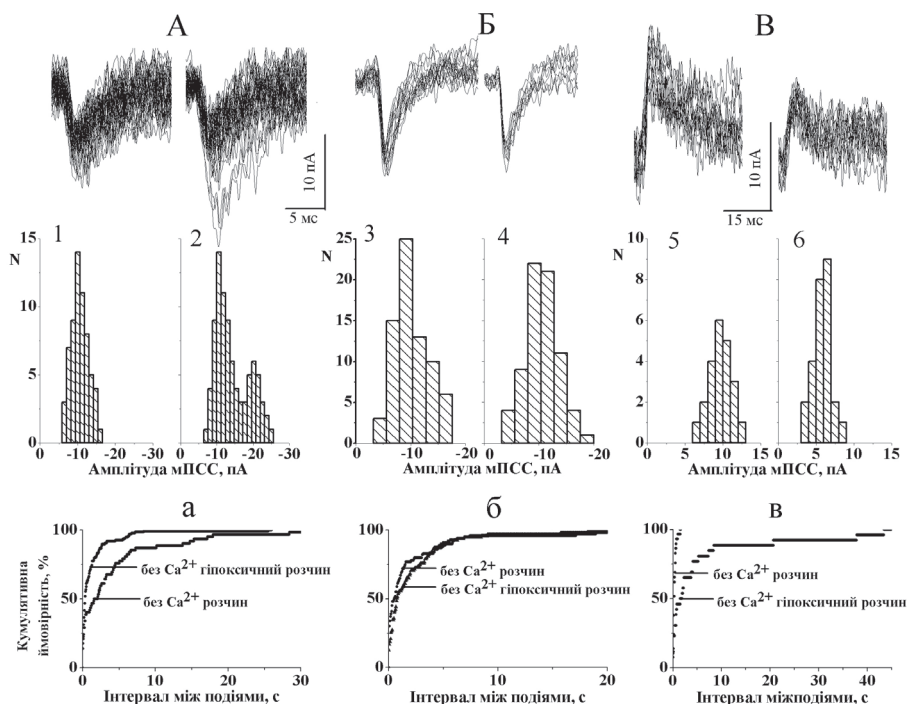


Рис. 4. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на мініатюрні постсинаптичні струми (мПСС). А, Б, В - записи реєстрацій НМДА-, не НМДА- та ГАМК_A-опосередкованих мПСС відповідно, в контролі та протягом гіпоксії. 1, 2; 3, 4; 5, 6 – гістограми розподілу амплітуд НМДА-, неНМДА-, ГАМК_A-опосередкованих мПСС в контролі та при гіпоксії відповідно. а, б, в – графіки кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованими подіями відповідно в контролі та при гіпоксії

неНМДА-опосередкованої синаптичної передачі між ГКС та нейронами SC ми оцінили відсоткові зміни біноміальних параметрів і коефіцієнта варіації відносно контролю та використали метод коефіцієнта варіації. Цей ефект збігався зі змінами ($P=0,05$) таких параметрів: зменшенням CV на 47,3 % протягом гіпоксії та його ж збільшенням на 86,7 % протягом реоксигенації; зі зменшенням p на 23,9 та 12,6 % при гіпоксії та реоксигенації відповідно; та зі зменшенням n на 54,73 % протягом гіпоксії. Але, як зазначалося раніше, гіпоксііндукована депресія була короткочасною та зворотною, тобто вірогідних змін амплітуд вПСС у період реоксигенації порівнянно з контролем не спостерігалось. На графіку методу коефіцієнта варіації точка при гіпоксії локалізована в зоні змін пресинаптичних параметрів при депресії (див. рис. 1, б). Отже, незалежні методи оцінки вказують на залучення пресинаптичних механізмів у реалізації короткотривалої депресії неНМДА-опосередкованої синаптичної передачі. Більшість досліджень підтверджують припущення, що ефект ослаблення ефективності синаптичної передачі при короткотривалій гіпоксії є результатом пресинаптичної дисфункції і асоційовано зі зменшенням ймовірності вивільнення синаптичних везикул та кількості активних зон [16, 17].

Аплікація гіпоксичного розчину призводила до ефекту довготривалої депресії (ДТД) ГАМК-ергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів (16 пар; див.рис. 1, III). Зменшення амплітуди ГАМК_A-опосередкованих вПСС на $47,2 \pm 9,3\%$ та на $39,4 \pm 5,7\%$ ($P=0,05$) спостерігалось протягом періоду гіпоксії та реоксигенації відповідно. Дія гіпоксичного розчину на ГАМК_A-опосередковані сПСС призводила до майже повного припинення спонтанної активності (див. рис. 3, В, в). Аналіз гістограм розподілу амплітуд мПСС показав зменшення величини кванта протягом дефіциту кисню ($10,1 \pm 1,3$ та $6,1 \pm 1,2$ пА в контролі та при гіпоксії відпо-

відно при $P=0,05$) (рис. 4, В, 5, 6) та частоти реєстрації мПСС (рис. 4, в). Ймовірніше за все, зменшення величини кванта опосередковане зниженням чутливості рецепторів постсинаптичної мембрани. Оскільки досить сумнівно, що за робочих тривалостей періоду гіпоксії при реєстрації мПСС можливі такі зміни розміру везикули чи концентрації нейротрансмітера в кожній везикулі. До того ж числені мікрофотографії свідчать, що в терміналі одного аксона ГКС на нейроні SC може бути до 8 синаптичних контактів і в кожному з яких близько 20 готових до негайного вивільнення везикул та близько сотні синаптичних везикул у терміналі [18, 19]. Оцінка відсоткових змін параметрів відносно контролю виявила достовірне зменшення квантового вмісту і відповідно зменшення ($P=0,05$) n порівнянно з контролем на 51,3 та 47,2 % при гіпоксії та реоксигенації відповідно. Значущих змін параметрів p та CV при гіпоксії та реоксигенації порівнянно з контролем виявлено не було. За графіком методу коефіцієнта варіації було виявлено, що всі точки для ГАМК_A-опосередкованих вПСС були локалізовані в зоні, яка відображає комплекс змін пре- та постсинаптичних параметрів при депресії (див. рис. 1, в). Загалом в основі ефекту гіпоксііндукованої ДТД ГАМК-ергічної синаптичної передачі лежить комплекс змін пресинаптичних механізмів, незалежних від ймовірності вивільнення, та постсинаптичних – зменшення чутливості постсинаптичної мембрани.

Цінність та інформативність отриманих результатів має велике практичне значення для розуміння проблематики гіпоксичних ушкоджень зорової системи на рівні аферентних входів в підкорковий зоровий центр та розробки відповідних терапевтичних заходів.

Автори статті висловлюють подяку д-ру мед. наук проф. В. Я. Березовському за консультації під час виконання цієї роботи.

**А.В. Думанская, О.В. Рихальский,
Н.С.Веселовский**

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ МЕЖДУ ГАНГЛИОЗНЫМИ КЛЕТКАМИ СЕТЧАТКИ И НЕЙРОНАМИ SUPERIOR COLLICULUS В УСЛОВИЯХ КОКУЛЬТУРЫ

Провели серию экспериментов для определения эффектов и механизмов гипоксического воздействия на синаптическую передачу между ганглиозными клетками сетчатки и нейронами superior colliculus (SC). Аппликация гипоксического раствора приводила к долгодлящей потенциации (ДДП) НМДА-опосредованной синаптической передачи. Анализ влияния дефицита кислорода на спонтанные и миниатюрные постсинаптические токи (сПСТ и мПСТ соответственно) выявил увеличение частоты их возникновения и появление второго пика в гистограмме распределения мПСТ. Оценка квантовых и биномиальных параметров отображает комплекс пре- и постсинаптических изменений при потенциации, независимых от вероятности выброса нейромедиатора. ДДП может быть вызвана увеличением общего числа активных синапсов. Глутаматэргическая синаптическая передача, опосредованная активацией нНМДА-рецепторканальных комплексов, в ответ на аппликацию безкислородного раствора реагировала кратковременной депрессией, которая является результатом пресинаптической дисфункции и ассоциируется с уменьшением вероятности выброса синаптических везикул и количества активных зон. ГАМК-эргическая синаптическая передача, опосредованная активацией ГАМК_A-рецепторканальных комплексов, реагировала на гипоксическое действие долгодлящей депрессией (ДДД). Анализ сПСТ и мПСТ показал существенное уменьшение частоты возникновения данных токов и достоверное уменьшение величины кванта на протяжении периода дефицита кислорода. В целом в основе эффекта гипоксиндуцированной ДДД ГАМК-эргической синаптической передачи лежит комплекс изменений пресинаптических (независимых от вероятности выброса нейромедиатора) и постсинаптических (уменьшение чувствительности рецепторов постсинаптической мембраны) механизмов. Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки; нейроны superior colliculus; синаптическая передача; долговременная потенциация и депрессия.

G.V. Dumanska, O. V. Rikhalsky, N. S. Veselovsky

EFFECT OF HYPOXIA ON SYNAPTIC TRANSMISSION BETWEEN RETINAL GANGLION CELLS AND SUPERIOR COLLICULUS NEURONS IN COCULTURE

In this study we conducted a series of experiments to characterize the effect and define the mechanisms of hypoxia on synaptic transmission between retinal ganglion cells and superior col-

liculus (SC) neurons. Application of hypoxic solution leads to a long lasting potentiation (LTP) NMDA-mediated synaptic transmission. Analysis of the oxygen deficiency effect on the spontaneous and miniature postsynaptic currents (sPSC and mPSC respectively) revealed an increase in the frequency of their occurrence and the appearance of the second peak in the mPSC histogram distribution. The assessment of quantum and binomial parameters reflects the complex pre- and postsynaptic changes during the potentiation, independent of the release probability. Most likely this LTP can be caused by an increase in the total number of active synapses. Glutamatergic synaptic transmission mediated by non-NMDA activation receptor-channel complexes, responded to application of deoxygenated solution by the brief depression, which is the result of presynaptic dysfunction and associates with decrease in release probability and number of active zones. GABAergic synaptic transmission mediated by activation GABA_A-receptor-channel complexes, responded to hypoxic action by long term depression (LTD). Analysis of sPSC and mPSC showed a significant decrease in the frequency of their occurrence and significant ($P = 0,05$) decrease in the quantum over a period of oxygen deficiency. In general, the effect of hypoxia-induced LTD of GABAergic synaptic transmission is based on complex changes of presynaptic (independent on the release probability) and postsynaptic (reduction sensitivity of receptors in postsynaptic membrane) mechanisms. Key words: retinal ganglion cells; superior colliculus neurons; synaptic transmission; hypoxia; long-term potentiation and depression.

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
International Center for molecular Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.*

REFERENCES

1. Pike MG, Holmstrom G, de Vries LS. Patterns of visual impairment associated with lesions of the preterm infant brain. *Dev Med Child Neurol.* 1994;36: 849–862.
2. 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.
3. Hoyt CS. Visual function in the brain-damaged child. *Eye.* 2003; 17: 369–384.
4. Dutton GN, McKillop ECA, Saidkasimova A. Visual problems as a result of brain damage in children. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90: 932–933.
5. Zhou IY, Wu EX, Cheung MM, Chan KC, Xing KK. Functional MRI of postnatal visual development in normal and hypoxic-ischemic-injured superior colliculi. *Neuroimage.* 2010;49(3):2013–2020.
6. Chan KC, Kancherla S, Fan S-J, Wu EX. Long-term effects of neonatal hypoxia-ischemia on structural and physiological integrity of the eye and visual pathway by multimodal MRI. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:1-9.

7. Dumanska GV, Kosheleva SO, Veselovsky MS. Chemical transmission between cocultivated ratinal ganglion cells and superior colliculus neurons. *Neurophysiol.* 2011;43(4):369-371.
8. Veselovsky NS, Engert F, Lux HD. Fast local superfusion technique. *Pflugers Arch.* 1996; 432(2):351-4.
9. Dumanska HV, Rykhalskyi OV, Veselovskyi MS. Characteristics of quantal release of glutamate and GABA in synapses between retinal ganglion cells and superior colliculus neurons in coculture. *Fiziol Zh.* 2014;60(1):3-10.
10. Sola E, Prestori F, Rossi P. et. al. Increased neurotransmitter release during long-term potentiation at mossy fibre-granule cell synapses in rat cerebellum. *J. Physiol.* 2004;557:843-861.
11. Faber BC and Korn H. Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *J Biophys.* 1991;60:1288-1294.
12. Hori N, Carpenter DO. Functional and morphological changes induced by transient in vivo ischemia. *Exp Neurol.* 1994;129:279 –289.
13. Hsu KS, Huang CC. Protein kinase C inhibitors block generation of anoxia-induced long-term potentiation. *Neuroreport.* 1998;9:3525–3529.
14. Jourdain P, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci.* 2002;22:3108 –3116.
15. Piccini A, Malinow R. Transient oxygen-glucose deprivation induces rapid morphological changes in rat hippocampal dendrites. *Neuropharmacol.* 2001;41:724 –729.
16. Choi S, Lovinger DM. Decrease probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1997;94:2665-2670.
17. Geiman S. Heterogeneous release probability and activity-dependent short-term synaptic depression. *Commun Integr Biol.* 2011;4(5):603-605.
18. Kucukdereli H, Allen NJ, Lee ATl. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *PNAS.* 2011;108(32):440-449.
19. Vidal-Sanz M, Bray GM and Aguayo AJ. Regeneration synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J Neurocyt.* 1991;20:940-952.

Матеріал надійшов до редакції 25.10.2015.