

## КВАНТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ НЕЙРОПЕРЕДАТЧИКА В ГАМК-ЭРГИЧЕСКИХ СИНАПСАХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫС

Поступила 15.03.09

С использованием методов фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и стимуляции отдельной пресинаптической терминали были исследованы некоторые особенности высвобождения ГАМК в тормозных синапсах культивируемых нейронов спинного мозга крыс. В ходе анализа распределений амплитуд вызванных тормозящих постсинаптических токов были определены основные квантовые параметры выброса медиатора. Показано, что в ГАМК-эргических синапсах спинальных нейронов, культивируемых в течение девяти–11 дней, минимальное высвобождение передатчика осуществляется пакетами квантов (не менее двух-трех). При этом распределение количества высвобождаемых квантов достаточно хорошо соответствовало таковому, теоретически рассчитанному в соответствии с законами Пуассона. Предполагается, что одновременный минимально двухквантовый выброс ГАМК в синапсах нейронов спинного мозга может быть связан с одновременным вовлечением в процесс возбуждения двух близко расположенных терминалей, каждая из которых обладает одной активной зоной, или одной терминали с двумя активными зонами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** спинной мозг, ГАМК, синаптическая передача, квантовый анализ, закон Пуассона, активные зоны.

### ВВЕДЕНИЕ

Исключительно важная роль нейронных систем спинного мозга в восприятии и обработке проприоцептивной, тактильной, висцеральной, температурной и ноцицептивной информации очевидна. В нейронных сетях спинного мозга, как и в других отделах ЦНС, обработка афферентных сигналов в значительной степени основывается на тормозных процессах в ходе межнейронной передачи. ГАМК-эргические синаптические влияния играют основную роль в регуляции такой передачи как в центральных, так и в периферических отделах нервной системы; механизмы этих влияний в настоящее время активно изучаются. Успешная разработка методических подходов к исследованию синаптической передачи через отдельные синапсы

культивируемых нейронов ЦНС открывает возможности непосредственного изучения феноменологии и механизмов высвобождения нейромедиатора в таких соединениях [1, 2].

В подобных экспериментах начал широко применяться метод локальной внеклеточной электрической стимуляции. В ответ на стимуляцию пресинаптической терминали происходит кальцийзависимое высвобождение ГАМК, что в свою очередь приводит к открыванию постсинаптических хлорселективных ионных каналов, ассоциированных с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами [3]. Пиковые значения амплитуд тормозящих постсинаптических токов (ТПСТ), входящих при этом через мембрану постсинаптической клетки, как правило, варьируют. Согласно теории квантового выброса, вызываемое приходящим пресинаптическим потенциалом действия высвобождение нейротрансмиттера осуществляется дискретно (квантами) и имеет вероятностный характер [4]. Постсинаптический ответ в данном случае отражает сумму квантовых выбросов медиатора

<sup>1</sup> Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: shipshina@ya.ru (М. С. Шипшина).

ра во всех локусах высвобождения (релиз-сайтах) в синапсе. Таким образом, важнейшим параметром вызванной синаптической передачи является вероятность высвобождения кванта трансмиттера.

В нашей работе охарактеризованы особенности квантового высвобождения ГАМК в тормозных синапсах культивируемых спинальных нейронов в условиях локальной стимуляции аксонной терминали в непосредственной близости от синаптического контакта.

## МЕТОДИКА

Эксперименты проводились на нейронах спинного мозга, выращиваемых в условиях культуры низкой плотности (примерно  $35 \cdot 10^3 \text{ см}^{-2}$ ) на девятый–11-й день культивирования. Культивировались клетки, полученные из ткани спинного мозга новорожденных крыс линии Вистар, согласно методике, описанной ранее [5]. В данных условиях культивируемые нейроны устанавливают между собой синаптические контакты, хорошо различимые визуально под микроскопом; компартменты синаптически связанных пар нейронов при этом доступны для микроstimуляции и микроэлектродного отведения.

Для регистрации вызванных ТПСТ (вТПСТ) использовались метод локальной электрической стимуляции аксона в непосредственной близости (на расстоянии 10–20 мкм) от терминали и метод фиксации потенциала на мембране постсинаптического нейрона в конфигурации «целая клетка». Идентификация пресинаптической терминали синаптического соединения производилась под визуальным контролем с применением фазово-контрастной микроскопии при суммарном увеличении  $\times 350$ . Стимуляция осуществлялась короткими (0.3–1.0 мс) толчками тока, пропускаемого через стеклянную микропипетку, которую подвели к терминали; амплитуду стимула варьировали от 12 до 30 В. Стимулирующие пипетки с сопротивлением 10 МОм заполняли внеклеточным базовым раствором следующего состава (в миллимолях на 1 л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 2, глюкоза – 30, NEPES – 20 (рН доводили до 7.4 путем добавления NaOH). Внутриклеточный раствор в пэтч-пипетках содержал в себе во всех случаях (в миллимолях на 1 л): калия глюконат – 100, KCl – 40, EGTA – 10, MgCl<sub>2</sub> – 2.5, NEPES – 20 (рН доводили до 7.4 путем добавления KOH). Заполненные таким раствором

пипетки имели сопротивление 6–8 МОм. Во внеклеточный раствор добавляли блокаторы возбуждающей синаптической передачи (20 мкМ DNQX и 20 мкМ D-APV). Для блокирования ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов использовался их селективный антагонист бикикуллин (2.0 мкМ). Все реактивы были получены от фирмы «Sigma» (США). Смена растворов осуществлялась с помощью метода быстрой локальной суперфузии, описанного ранее [3].

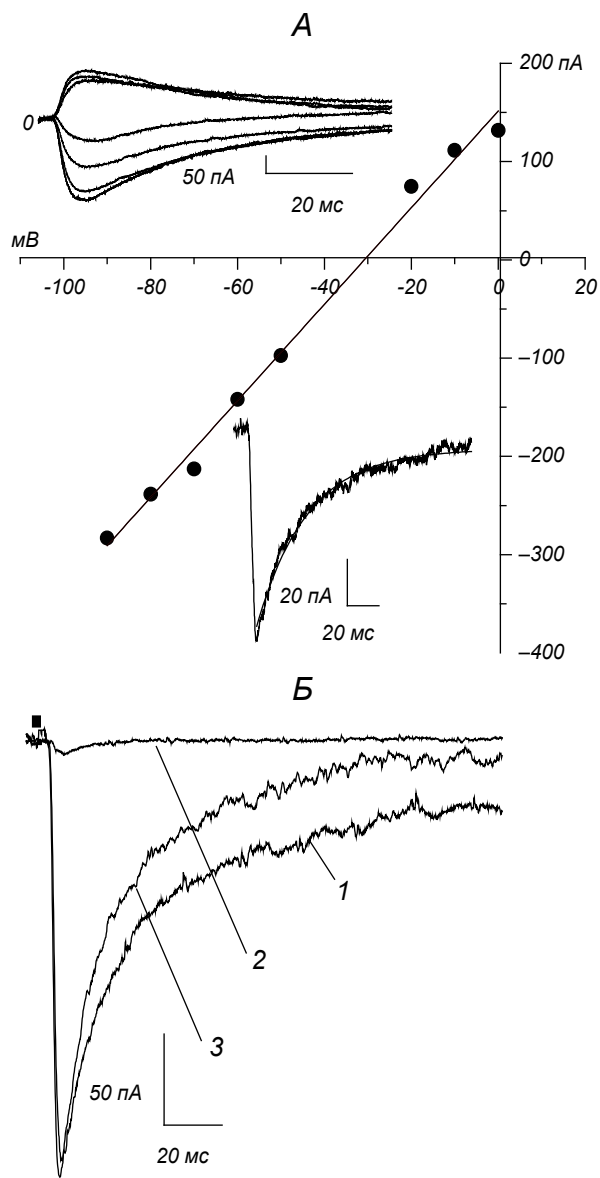
Сигналы, соответствующие постсинаптическим токам, подвергали фильтрации с частотой среза 5 кГц, оцифровывали и записывали с применением АЦП TL-1 и программного пакета «pClamp 9.0» («Axon Instruments», США); частота оцифровки составляла  $10^4 \text{ с}^{-1}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Характеристики вТПСТ и спонтанных ТПСТ (сТПСТ).* Постсинаптические токи, возникающие в ответ на приложение деполяризующих стимулов к пресинаптической терминали в непосредственной близости от синаптического контакта, отводились от исследованных клеток при поддерживаемом потенциале  $-65 \text{ мВ}$ . Их кинетические характеристики соответствовали таковым, описанным ранее для ГАМК<sub>A</sub>-активируемых тормозящих токов [1, 2, 11, 12]. Синаптическая задержка вТПСТ в условиях наших экспериментов составляла в среднем  $4.3 \pm 0.1 \text{ мс}$  ( $n = 10$ ). Значения амплитуд ТПСТ обнаруживали линейную зависимость от величины поддерживаемого потенциала на мембране постсинаптической клетки. Рассчитанный потенциал реверсии этих постсинаптических токов составлял  $-30 \pm 3 \text{ мВ}$  ( $n = 3$ ), что соответствовало равновесному потенциалу для ионов хлора в используемых растворах, определенному в соответствии с уравнением Нернста (рис. 1, А).

Спад вТПСТ наилучшим образом аппроксимировался одной экспонентой со средней постоянной времени  $30.7 \pm 2.8 \text{ мс}$  ( $n = 10$ ) (рис. 1, А). Локальная аппликация селективного антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикикуллина в концентрации 2.0 мкМ почти полностью и обратимо угнетала вТПСТ (Б). Приложение стрихнина в концентрации 1.0 мкМ не приводило к достоверному изменению амплитуды этих токов, что позволяло исключить наличие в них глицинергического компонента.

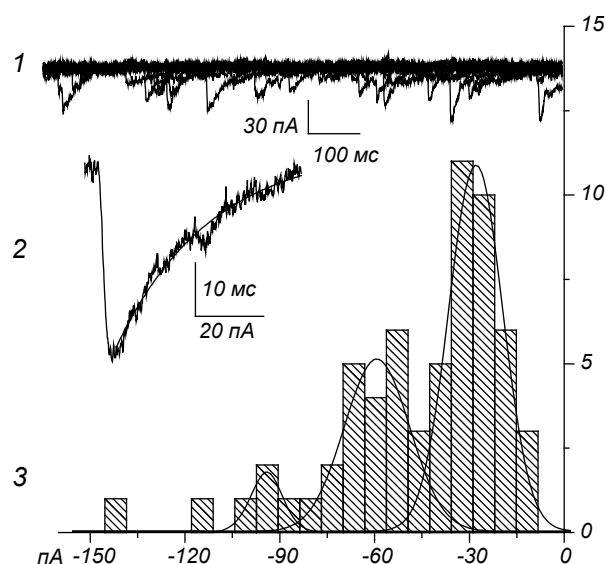
Значения амплитуд сТПСТ флуктуировали относительно кратных величин, соответствующих



**Р и с. 1.** Свойства вызванных тормозящих постсинаптических токов (вТПСТ), регистрируемых в культуре клеток спинного мозга.

*А* – вольт-амперная характеристика вТПСТ. Равновесный потенциал для ионов хлора, рассчитанный по уравнению Нернста, составляет  $-30.49$  мВ; регистрации проводились при  $t = 20$  °С. На верхнем фрагменте – записи постсинаптических токов, регистрируемых при значениях поддерживаемого потенциала, который изменялся в пределах  $-90 \dots -0$  мВ с шагом  $10$  мВ. На нижнем фрагменте – аппроксимация спада вТПСТ средней амплитуды с помощью одной экспоненты. *Б* – блокирующее действие бикуккуллина ( $2.0$  мкМ) на вТПСТ в культивируемом нейроне спинного мозга: *1* – в условиях контроля, *2* – при аппликации бикуккуллина, *3* – после отмывания.

**Р и с. 1.** Властивості викликаних гальмуючих постсинаптичних струмів, зареєстрованих у культурі клітин спинного мозку.



**Р и с. 2.** Кинетические характеристики спонтанных тормозящих постсинаптических токов (сТПСТ).

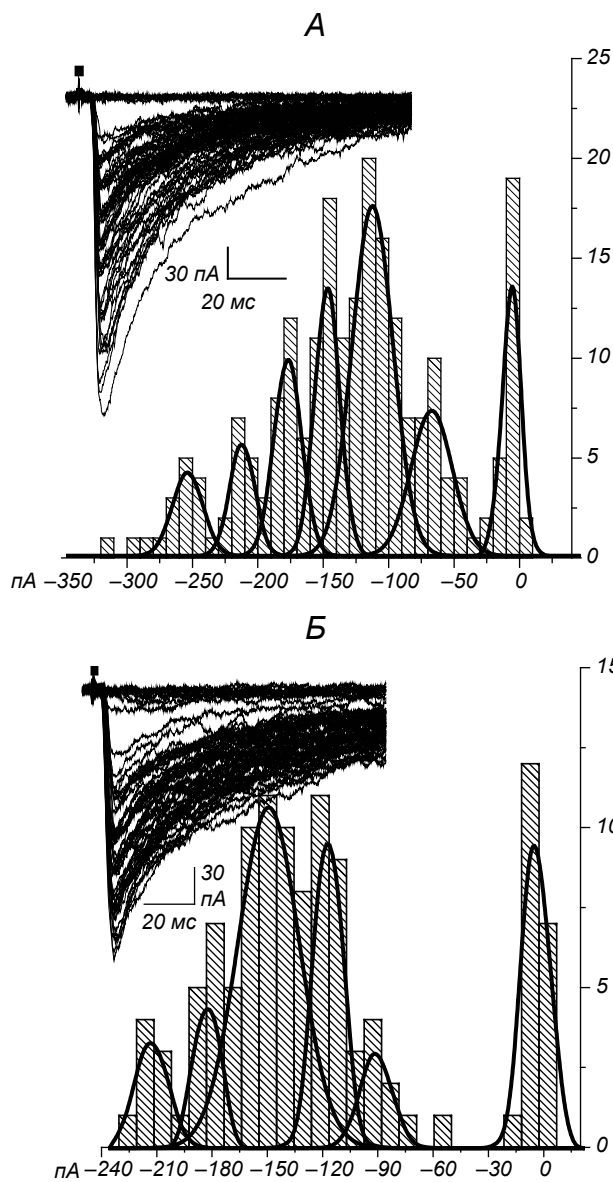
*1* – наложенные записи сТПСТ, регистрируемых при значении поддерживаемого потенциала  $-65$  мВ; *2* – аппроксимация спада сТПСТ минимальной амплитуды с помощью одной экспоненты; *3* – гистограмма распределения амплитуд сТПСТ (по оси абсцисс – амплитуда сТПСТ, пА; по оси ординат – число событий).

**Р и с. 2.** Кінетичні характеристики спонтанних гальмуючих постсинаптичних струмів.

пикам амплитудного распределения (рис. 2). При этом значение первой моды, отражающей эффект высвобождения единичного кванта, составляло  $-31.6 \pm 0.8$  пА ( $n = 4$ ). Спад сТПСТ также хорошо аппроксимировался одной экспонентой со средней постоянной времени  $30.5 \pm 8.6$  мс ( $n = 4$ ).

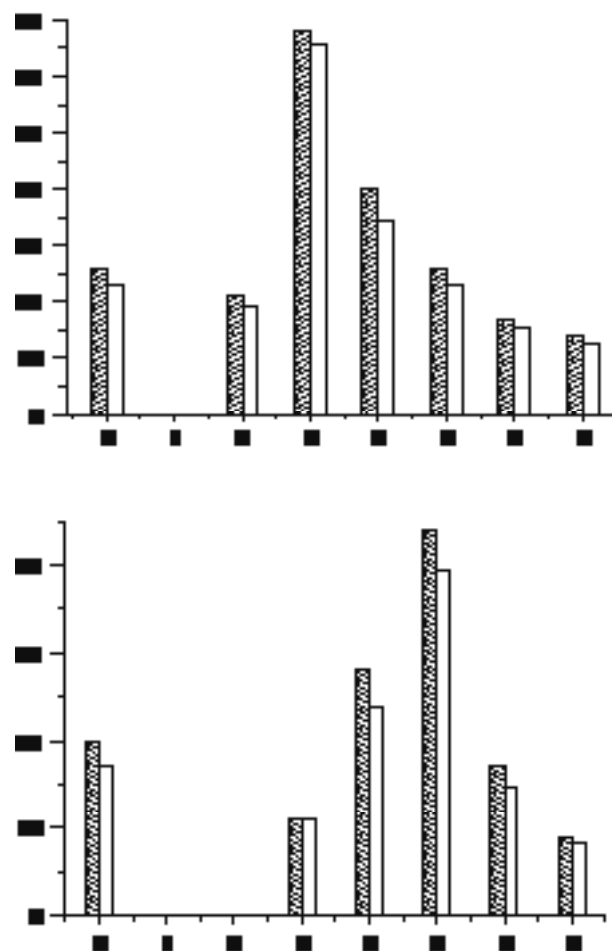
Таким образом, временной ход вТПСТ соответствовал таковому сТПСТ, однако пиковые значения амплитуд вТПСТ при поддерживаемом потенциале  $-65$  мВ варьировали в широких пределах (от  $-20$  до  $-350$  пА).

*Квантовые свойства вТПСТ в культуре клеток спинного мозга.* Анализ числа квантовых событий проводили на основании распределений пиковых амплитуд вТПСТ. Известно, что амплитуда постсинаптического ответа пропорциональна количеству выброшенного нейротрансмиттера; при этом последний высвобождается дискретными приблизительно равными порциями. Эффекты такого высвобождения, суммируясь, приводят к полимодальному распределению амплитуд. В условиях локальной стимуляции аксона амплитуды регистрируемых вТПСТ флуктуировали от-



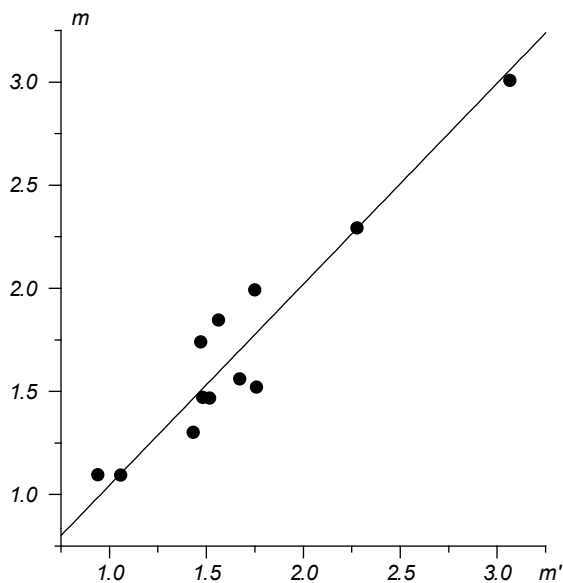
**Р и с. 3.** Амплитудные распределения вызванных тормозящих постсинаптических токов (вТПСТ).  
*А* – гистограмма амплитуд вТПСТ, возникающих в результате минимального одновременного выброса двух квантов ГАМК, и аппроксимация амплитудного распределения семью нормальными распределениями. *Б* – гистограмма амплитуд вТПСТ, возникающих в результате минимального одновременного выброса трех квантов ГАМК, и аппроксимация амплитудного распределения шестью нормальными распределениями. Над каждой гистограммой представлены наложенные записи анализируемых вТПСТ. По оси абсцисс на *А* и *Б* – амплитуда вТПСТ, пА; по оси ординат – число событий.

**Р и с. 3.** Амплітудні розподіли викликаних гальмуючих постсинаптичних струмів.



**Р и с. 4.** Применение пуассоновской статистики для описания вероятности высвобождения ГАМК в синапсах культивируемых нейронов спинного мозга.  
*А* – распределение количества синаптических событий, соответствующих высвобождению различного числа квантов. Распределение построено на основе гистограммы, представленной на рис. 3, *А*. *Б* – такое же распределение, которое было построено на основе гистограммы, изображенной на рис. 3, *Б*. Заштрихованные столбцы соответствуют экспериментальным данным, белые – величинам, полученным при описании экспериментальных данных законом Пуассона. По оси абсцисс на *А* и *Б* – количество одновременно выбрасываемых квантов нейромедиатора; по оси ординат – число событий, соответствующих выбросу того или иного количества квантов.

**Р и с. 4.** Застосування пуассонівської статистики для опису імовірності вивільнення ГАМК у синапсах культивованих нейронів спинного мозку.



**Р и с. 5.** График линейной регрессии (коэффициент корреляции 0.87), который отражает соответствие величин  $m$  и  $m'$  ( $n = 12$ ), где  $m$  – среднее квантовое содержание, рассчитанное с применением метода подсчета пропусков (ось ординат),  $m'$  – среднее квантовое содержание, определяемое отношением средней амплитуды вызванных тормозящих постсинаптических токов к средней величине кванта (ось абсцисс).

**Р и с. 5.** Графік лінійної регресії (коефіцієнт кореляції 0.87), що відображує відповідність величин  $m$  і  $m'$  ( $n = 12$ ), де  $m$  – середній квантовий вміст, розрахований із застосуванням методу підрахунку пропусків (вісь ординат),  $m'$  – середній квантовий вміст, визначений відношенням середньої амплітуди викликаних гальмуючих постсинаптичних струмів до середньої величини кванта (вісь абсцисс).

носительно неких кратных величин, соответствующих модам гистограмм распределений амплитуд этих токов [2, 6]. Аппроксимация экспериментальных распределений пиковых значений амплитуд суммой нескольких гауссовых (нормальных) распределений продемонстрировала наличие нескольких равно отстоящих друг от друга мод в диапазоне  $-20 \dots -350$  пА (рис. 3, А). Среднее расстояние между этими модами составляло  $30.2 \pm 3.4$  пА ( $n = 5$ ), а количество явных мод варьировало от двух до шести. Первая мода (на нуле) соответствует отсутствием реализации постсинаптического тормозного ответа; следовательно, предполагается, что в данных случаях квантового выброса в ответ на стимуляцию пресинаптического участка аксона не происходит. Исходя из того, что расстояние между модами соответствует величине эффекта высвобождения одного кванта в составе интегрального ТПСТ, можно заключить, что средняя величина эффекта выброса единичного кванта при поддерживаемом потенциале

$-65$  мВ составляет порядка  $-30$  пА. Это полностью соответствует величине эффекта, рассчитанной для сТПСТ (около  $-31$  пА).

Следует обратить особое внимание на то, что в условиях локальной стимуляции аксона высвобождения единичного кванта нейротрансмиттера не происходило. Об этом свидетельствует полное отсутствие на гистограммах амплитудного распределения вТПСТ моды на уровне  $-30$  пА ( $n = 5$ ) (рис. 3, А). В ряде экспериментов также не наблюдалось одновременного выброса двух квантов ГАМК– на амплитудных гистограммах отсутствовали две моды в районах значений  $-30$  и  $-60$  пА ( $n = 5$ ). Таким образом, можно предположить, что в ГАМК-эргических синапсах нейронов спинного мозга крыс на девятый–11-й день культивирования высвобождение передатчика осуществляется группами («пакетами»), состоящими как минимум из двух-трех квантов.

*Описание вероятности выброса ГАМК в синапсах культивируемых нейронов спинного мозга.* Использование амплитудного распределения ТПСТ позволяет применить вариационную статистику для описания процессов высвобождения нейромедиатора. В ходе анализа квантовой синаптической передачи вероятность высвобождения нейротрансмиттера при условии низких вероятностей выброса может быть описана статистическим законом Пуассона [7]. Для этого необходимы переход от непрерывного амплитудного распределения к распределению дискретных квантовых событий [2, 6] и выявление эффекта высвобождения единичного кванта. Учитывая то обстоятельство, что в наших экспериментах единичные квантовые события не реализовались (см. выше), амплитуды вТПСТ в пределах  $-50 \dots -80$  пА соответствовали одновременному выбросу двух квантов передатчика, амплитуды данных токов в пределах  $-80 \dots -110$  пА – высвобождению трех квантов и т. д.

Вероятность наблюдения любого данного количества квантовых единиц ( $x$ ) в одной регистрации вТПСТ имеет вид:  $P(x) = e^{-m} m^x / x!$ , где  $m$  – среднее квантовое содержание, т. е. среднее количество квантов нейротрансмиттера, высвобождаемых в ответ на единичную стимуляцию. Эта величина может быть представлена как отношение общего количества реализаций вызванных ответов к общему количеству регистраций ( $N$ ) [2]. На рис. 4 сопоставлены экспериментально определенные количества событий, отражающих реализацию соответствующего числа квантов, с аналогичными значениями,

полученными при описании этих экспериментальных данных статистическим законом Пуассона. Таким образом, дискретное распределение количества квантов ГАМК, высвобождающихся в ответ на пресинаптическую стимуляцию, достаточно хорошо соответствует таковому, теоретически рассчитанному в соответствии с законом Пуассона.

*Проверка применимости пуассоновской статистики.* При соблюдении пуассоновских условий квантовое содержание  $m$  пропорционально логарифму относительного количества нулевых реализаций (отсутствий ТПСТ после нанесения стимула) [7]:  $m = \ln N/n_0$ . Кроме того,  $m$  может быть рассчитано как отношение средней амплитуды вТПСТ ( $I_{cp}$ ) к средней величине постсинаптического ответа, эквивалентного выбросу (высвобождению) единичного кванта ( $q$ ) [2]. О применимости закона Пуассона для описания экспериментальных данных будет свидетельствовать соответствие величин квантового содержания, рассчитанных с использованием и первого, и второго подхода. Согласно результатам наших исследований, корреляция величины  $m$ , рассчитанной с использованием метода подсчета пропусков, с таковой, определенной по отношению средней амплитуды ТПСТ к величине эффекта выброса единичного кванта, подтверждает гипотезу применимости пуассоновской статистики для описания вероятности выброса ГАМК в синапсах культивируемых нейронов спинного мозга крыс (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа особенностей квантового выброса ГАМК в тормозных синапсах культивируемых нейронов спинного мозга крыс подтвердили положение о том, что высвобождение нейротрансмиттера из терминалей нейронов ЦНС в ряде случаев является многоквантовым. Показана также применимость пуассоновской статистики для описания вероятности этого процесса. Величина эффекта выделения одного кванта, полученная в результате анализа характеристик вызванных ответов, соответствует минимальной амплитуде сТПСТ, отражающих потенциалнезависимое случайное высвобождение содержимого одной или нескольких синаптических везикул. Кинетические характеристики вТПСТ соответствовали таковым сТПСТ. Таким образом, амплитуда вТПСТ определяется количеством одновременно высвобождаемых кван-

тов ГАМК во всех активных зонах терминали аксона нейрона спинного мозга, вовлеченных в возбуждение.

Основоположники базисной теории квантового выброса постулировали, что одна пресинаптическая терминаль обладает, как правило, одной активной зоной (АЗ) – участком пресинаптической мембраны, вблизи которого сосредоточены синаптические везикулы, готовые к выбросу находящегося в них нейротрансмиттера [4]. Результаты некоторых исследований, однако, показали, что в отдельном центральном синапсе при существовании только одной АЗ на мембране пресинаптической терминали выброс нейротрансмиттера может носить мультивезикулярный характер [8]. Однако в соответствии с такими представлениями следует ожидать, что наряду с многоквантовым выбросом при минимальной амплитуде стимуляции пресинаптической зоны все же может происходить и выброс единичного кванта. В наших же экспериментах высвобождения единичного кванта ГАМК в условиях стимуляции пресинаптической терминали вообще не наблюдалось (рис. 3, А, Б). Это позволяет поставить под серьезное сомнение гипотезу о наличии единичной АЗ на отдельной терминали в группе синаптических контактов, исследованной в описанных выше экспериментальных условиях.

Результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что одиночная синаптическая терминаль не всегда обладает только одной АЗ с одним местом выброса, позволяющим реализовывать высвобождение только одной везикулы в данный момент времени [2]. Так, статистическая оценка количества АЗ на пресинаптических окончаниях интернейронов дорсальных рогов спинного мозга (по данным электронной микроскопии) показала наличие нескольких сайтов выброса нейротрансмиттера в синапсах, образуемых аксонами этих нейронов [9]. Не исключено, что в нашем случае в процесс возбуждения одновременно могли вовлекаться две близко расположенные терминали, на каждой из которых имеется по одной АЗ, или же одна терминаль с двумя АЗ. В данном случае каждая АЗ обладает несколькими местами выброса везикул, что и обеспечивает мультивезикулярный минимальный выброс. В таких условиях при наличии двух АЗ (причем часть из них может иметь более одного сайта) возможным становится выброс как минимум двух квантов ГАМК, по одному из каждой зоны. Очевидно, что в данном случае также возможно одновременное высвобождение трех и более квантов.

Это заключение согласуется с современными ультраструктурными данными о наличии более одной АЗ на пресинаптических окончаниях ГАМК-эргических синапсов между нейронами ядра диафрагмального нерва в спинном мозгу крыс [10].

Как видно из рис. 3 и 4, в условиях нашего препарата, исследуемого с применением внеклеточной стимуляции единичного аксона в непосредственной близости от синаптической терминали, наиболее вероятными являются одновременные выбросы нескольких квантов передатчика, причем минимально возможным представляется двухквантовое высвобождение. По-видимому, высокоамплитудные ТПСТ, обусловленные выбросом нескольких квантов медиатора, даже при минимальной интенсивности пресинаптической активации обеспечивают достаточно высокий уровень гиперполяризации/шунтирования мембран постсинаптических нейронов спинного мозга, тем самым гарантируя высокую надежность передачи тормозных сигналов и безотказность системы модуляции и преобразования афферентной импульсации.

М. С. Шипшина<sup>1</sup>, М. С. Веселовський<sup>1</sup>, С. А. Федулова<sup>1</sup>

#### КВАНТОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИВІЛЬНЕННЯ НЕЙРОПЕРЕДАВАЧА В ГАМК-ЕРГІЧНИХ СИНАПСАХ КУЛЬТИВОВАНИХ НЕЙРОНІВ СПИННОГО МОЗКУ ЩУРІВ

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

#### Резюме

З використанням методів фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та стимуляції окремої пресинаптичної терминалі були досліджені деякі особливості вивільнення ГАМК у гальмівних синапсах культивованих нейронів спинного мозку щурів. У перебігу аналізу розподілів амплітуд викликаних гальмівних постсинаптичних струмів були визначені основні квантові параметри викиду медиатора. Показано, що в ГАМК-ергічних синапсах спінальних нейронів, культивованих протягом дев'яти–11 діб, мінімальне вивільнен-

ня передавача здійснюється пакетами квантів (не менш за два-три). При цьому розподіл кількості вивільнених квантів достатньо добре відповідав такому, що теоретично розрахований відповідно до закону Пуассона. Передбачається, що одночасний мінімально двоквантовий викид ГАМК у синапсах нейронів спинного мозку може бути пов'язаний з одночасним залученням у процес збудження двох близько розташованих терміналей, кожна з яких має одну активну зону, або однієї терміналі з двома активними зонами.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. S. A. Fedulova and N. S. Veselovsky, "Quantal GABA release in hippocampal synapses: role of local  $Ca^{2+}$  dynamics within the single terminals," *Eur. J. Pharmacol.*, **447**, Nos. 2/3, 163-171 (2002).
2. Н. С. Веселовський, С. А. Федулова, П. Г. Костюк, *Биофизика одиночного синапса*, Наук. думка, Київ (2004).
3. N. S. Veselovsky, F. Engert, and H. D. Lux, "Fast local superfusion technique," *Pflügers Arch.*, **432**, No. 2, 351-354 (1996).
4. B. Katz, *The Release of Neural Transmitter Substances*, Liverpool Univ. Press, Liverpool (1969).
5. Yu. O. Kolodin, A. O. Moskalyuk, N. S. Veselovsky, et al., "Synaptic connections in a dissociated mixed culture of rat dorsal root ganglion and spinal cord neurons," *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **38**, № 4, 358-360 (2006).
6. S. A. Fedulova and N. S. Veselovsky, "Multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons," in: *Calcium Signaling*, M. Morad, P. G. Kostyuk (eds.), IOS Press, Amsterdam (2001), pp. 190-195.
7. J. S. Isaacson and B. Walmsley, "Counting quanta: direct measurements of transmitter release at a central synapse," *Neuron*, **15**, 875-884 (1995).
8. C. Auger and A. Marty, "Quantal currents at single site central synapses," *J. Physiol.*, **526**, No. 1, 3-11 (2000).
9. Д. А. Русаков, "Статистическая оценка площади мембраны и количества активных зон в пресинаптических окончаниях", *Нейрофізіологія*, **22**, № 1, 29-36 (1990).
10. Q. Tai and H. G. Goshgarian, "Ultrastructural quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic synaptic terminals in the phrenic nucleus after spinal cord injury," *J. Comp. Neurol.*, **372**, No. 3, 343-355 (1996).
11. A. Takahashi, A. Tokunaga, H. Yamanaka, et al., "Two types of GABAergic miniature inhibitory postsynaptic currents in mouse *substantia gelatinosa* neurons," *Eur. J. Pharmacol.*, **553**, 120-128 (2006).
12. A. Maximov, Z. P. Pang, D. Tervo, et al., "Monitoring synaptic transmission in primary neuronal cultures using local extracellular stimulation," *J. Neurosci. Meth.*, **161**, 75-87 (2007).