

На правах рукописи

Иванова Виолетта Олеговна

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНАПТИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ НА АПИКАЛЬНЫХ
И БАЗАЛЬНЫХ ДЕНДРИТАХ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ
ГИППОКАМПА.**

Специальность 1.5.5 – «Физиология»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2021

Работа выполнена в лаборатории клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук.

Научный руководитель:

Баль Наталья Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, г. Москва

Официальные оппоненты:

Розов Андрей Владимирович, кандидат наук (Doctor scientiarum humanarum), заведующий лабораторией электрофизиологии ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства, России, г. Москва

Зайцев Алексей Васильевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных механизмов нейронных взаимодействий ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова» РАН, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Кафедра высшей нервной деятельности биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», г. Москва

Защита состоится 15 декабря 2021 года в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.046.01 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бултерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН», а также на сайте ИВНД: <https://ihna.ru>

Автореферат разослан ____ 2021 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
д.б.н. Иерусалимский В.Н.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Гиппокамп – это область мозга, которая участвует в таких важных нейрофизиологических процессах, как память, обучение, пространственная навигация. Области гиппокампа, такие как зубчатая фасция, зоны СА3 и СА1, иногда рассматриваются как структуры, состоящие из гомогенных популяций функционально эквивалентных нейронов. Однако становится все более очевидно, что гиппокампальные популяции нейронов в пределах одной области различаются между собой молекулярными механизмами, анатомически и функционально. Более того, такая гетерогенность проявляется и в рамках одной клетки: отростки одного нейрона могут существенно отличаться друг от друга. Функциональная схема гиппокампа включает в себя последовательные и параллельные этапы обработки информации, поступающей из разных источников. Аксоны пирамидных клеток поля СА1 гиппокампа являются основным источником выхода информации из гиппокампа в другие участки мозга, при этом их дендриты расположены в двух основных областях поля СА1: апикальные дендриты - в *stratum radiatum*, базальные – в *stratum oriens*. Так как отростки пирамидных нейронов поля СА1 имеют разные проекции, механизмы долговременной потенциации и характеристики синапсов, располагающихся на них также, вероятно, различаются.

Одна из характеристик синапсов, которая определяет эффективность синаптической передачи – это рецепторный состав и молекулярные механизмы, которые регулируют работу рецепторов на пре- и постсинаптической мембране. Рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (АМПА) – главные посредники быстрой возбуждающей синаптической передачи в пирамидных клетках. Они могут состоять из субъединиц 4 типов. Разный субъединичный состав АМПА-рецепторов определяет их электрофизиологические свойства, а, значит, влияет и на свойства синапса. Кроме того, АМПА-рецепторы с разным субъединичным составом играют разные роли в механизмах пластичности, развития, патологий и их концентрация в зрелых нейронах меняется.

Еще одна молекула, которая играет ключевую роль в механизмах синаптической пластичности – это оксид азота (NO). В центральной нервной системе NO участвует во многих функциях, включая обучение и память, сон, движения, механизмы боли, стресс и репродуктивную деятельность (Chachlaki и др., 2017; Garthwaite, 2008; Steinert и др., 2010). Его роль в формировании долговременной потенциации неоднократно была показана как для пресинапса (Hardingham и др., 2013), так и для постсинапса (Garthwaite, 2008; Maltsev и др., 2019). Оксид азота также важен для обучения (Balaban и др., 2011; Korshunova и

Balaban, 2014; Pitsikas, 2015), консолидации и реконсолидации памяти (Balaban и др., 2014; Val и др., 2017). Он способен взаимодействовать со многими внутриклеточными мишенями, запуская множество путей передачи сигналов, что приводит к активации или ингибированию выходных сигналов. В то же время NO становится токсичным при его избытке (Pacher и др., 2007). Если клетка находится в прооксидантном состоянии, NO может подвергаться окислительно-восстановительным реакциям с образованием токсичных соединений, которые вызывают повреждение клеток (Pacher и др., 2007; Guix и др., 2005). Поскольку NO может опосредовать патогенез во многих сигнальных каскадах, он, вероятно, участвует в некоторых заболеваниях, таких как гипертония, ишемическая болезнь сердца, болезнь Альцгеймера, инсульт и рак (обзор - Maher и др., 2017). Роль оксида азота в качестве транмиттера и его нейротоксичность могут опосредоваться через различные рецепторы, включая ионотропные рецепторы глутамата (AMPA рецепторы, N-метил-d-аспартат (НМДА рецепторы) и каинатные рецепторы). Относительно взаимодействия NO с каинатными рецепторами существует немного информации, в отличие от рецепторов AMPA и НМДА, с которыми NO взаимодействует и определяет многие физиологические функции нервных клеток, включая синаптическую пластичность.

Понимание принципов работы синапсов и рецепторов, располагающихся на их мембране, может многое сказать о работе целой клетки и сети, в которой она функционирует. Таким образом, на данный момент исследование пирамидных нейронов гиппокампа, их синапсов и механизмов, определяющих их работу, актуально для нейробиологии, направленной на изучение таких важных процессов как память, обучение и забывание.

Цель работы и основные задачи исследования.

Основной целью настоящей работы было сравнение электрофизиологических характеристик синаптических ответов на апикальных и базальных дендритах нейронов поля CA1 гиппокампа.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. С помощью метода пэтч-клямп в режиме «целая клетка» исследовать электрофизиологические свойства синаптической передачи на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа;

2. С помощью метода пэтч-клямп в режиме «целая клетка» исследовать электрофизиологические свойства синаптической передачи на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа при блокаде синтеза оксида азота;

3. С помощью метода экстраклеточной регистрации полевых постсинаптических потенциалов изучить влияние ингибирования синтазы оксида

азота на долговременную потенциацию, индуцированную в областях *str. radiatum* и *str. oriens* поля СА1 гиппокампа;

4. Исследовать действие блокады синтеза оксида азота и синтеза белка на реконсолидацию памяти у крыс в модели условно-рефлекторного замирания.

Научная новизна. В нашей работе с помощью методов электрофизиологии впервые показана разница во вкладе кальций-проводящих (КП) АМПА рецепторов в вызванные постсинаптические токи апикальных и базальных дендритов пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа. Кроме того, в наших экспериментах мы впервые показали наличие этих рецепторов на базальных дендритах пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа.

Также в настоящем исследовании была впервые продемонстрирована разница в NO-зависимой регуляции токов КП-АМПА рецепторов между апикальными и базальными дендритами пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа.

В настоящей работе нами впервые был обнаружен эффект ингибирования синтазы оксида азота при индукции долговременной потенциации в областях *str. radiatum* и *str. oriens* поля СА1 гиппокампа.

Кроме того, мы впервые обнаружили, что блокада NO-синтазы предотвращает амнестический эффект, вызванный блокадой синтеза белка с помощью циклогексимида в экспериментах с реконсолидацией памяти в модели условно-рефлекторного замирания на условный стимул у крыс. Подобный эффект ранее был показан только на беспозвоночных (Balaban и др., 2014).

Теоретическая ценность и практическая значимость. В настоящей работе было продемонстрировано присутствие кальций-проводящих АМПА рецепторов не только на апикальных дендритах пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа, но и на базальных. Ранее присутствие КП-АМПА рецепторов на апикальных дендритах было продемонстрировано только в нескольких работах (Rozov и др., 2012; Mattison и др., 2014), и ни в одном найденном нами исследовании не было показано их присутствие на базальных дендритах. Кроме того, в нашей работе мы выявили разницу во влиянии оксида азота на долговременную потенциацию между апикальными и базальными дендритами, а также нами был показан вклад КП-АМПА рецепторов в синаптическую трансмиссию этих отростков. Таким образом, полученные данные вносят вклад в теоретическое понимание о распределении КП-АМПА рецепторов в отростках пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа, а также в понимание роли оксида азота в формировании синаптических характеристик на этих отростках.

Практическая значимость настоящего исследования связана с вовлеченностью в патологические процессы как КП-АМПА рецепторов (Alfonso и др., 2014; Reinders и др., 2016; Amakhin и др., 2018; Malkin и др., 2016), так и оксида азота (обзор - Maher и др., 2017). Неполное понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе патологических изменений, препятствует созданию эффективных методов лечения, в то время как наши результаты могут способствовать созданию более полной картины участия оксида азота и КП-АМПА рецепторов в физиологических процессах в норме и при патологии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Кальций-проницаемые АМПА рецепторы вносят большой вклад в быструю возбуждающую синаптическую трансмиссию на апикальных дендритах, чем на базальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа;
2. Оксид азота является агентом, модулирующим электрофизиологические характеристики синаптических ответов на апикальных и базальных дендритах поля CA1 гиппокампа.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены на Зимней конференции по нейробиологии (Зольден, Австрия, 2015), Конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН (2016-2020 гг.), международной конференции «Простые нервные системы» (Звенигород, 2016), конференции ISN-ESN (Париж, Франция, 2017), конференции Британского Нейронаучного Сообщества (Дублин, Ирландия, 2019).

Личное участие автора. Автором проводилось: подготовка переживающих срезов гиппокампа с последующей регистрацией методом пэтч-клямп, электрофизиологическая запись возбуждающих постсинаптических потенциалов в срезах гиппокампа (в сотрудничестве с Мальцевым Александром), поведенческие эксперименты (в составе группы), статистический анализ экспериментов, подготовка публикаций по теме диссертации (в составе группы).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 115 страницах, включает 25 рисунков. Работа состоит из введения, трех глав литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 279 источников, в том числе 1 отечественный и 278 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Электрофизиологические эксперименты. Пэтч-клямп. Эксперименты проводились на переживающих срезах гиппокампа мышей линии C57Bl/6 в возрасте 25-35 дней. Пэтч-электроды заполнялись либо не содержащим полиамины, либо полиаминсодержащим раствором. Эксперименты были выполнены на 70 животных.

Записи всех нейронов выполняли в режиме фиксации потенциала. Клетки с нездоровой морфологией и мембранным потенциалом покоя выше -50 мВ были исключены из экспериментов. Чтобы вызвать синаптический ток, стеклянные электроды, заполненные экстраклеточным раствором, помещали в дендритную область *stratum radiatum* и *stratum oriens* на расстоянии в ~50–100 мкм от тела клетки, чтобы стимулировать входы с интервалами между стимулами 6 с.

Блокада GluR2-несодержащих АМПА рецепторов. Эксперименты проводили с использованием внутриклеточного раствора без спермина, содержащего QX-314. Антагонист GluR2-несодержащих АМПА рецепторов Nasp^m (200 мМ) добавляли в проток через 30 мин после начала регистрации. Для анализа данных 10 последовательных ответов были усреднены и нормализованы к средней амплитуде ВПСТ, полученной между 20 и 30 минутами регистрации.

Регистрация вольт-амперных характеристик. Для каждой точки фиксируемого потенциала было собрано не менее 20 ответов. Ответы были усреднены и нормализованы к средней амплитуде ВПСТ, полученной на -70 мВ. Для оценки различий сравнивали нормализованные значения на +50 мВ.

Индекс выпрямления. Индекс выпрямления рассчитывался как отношение ВПСТ, измеренных на -70 мВ и +35 мВ (ВПСТ-70/ВПСТ+35).

Чтобы проверить синапсы на *полиамин-зависимую фасилитацию*, мы подавали четыре стимула с межстимульным интервалом 33 мс × 40 на каждый вход, через 5 и 20 минут после прорыва мембраны. Чтобы оценить изменения в фасилитации, мы нормализовали каждый из ВПСТ к первому в серии, усреднили полученные значения и отдельно сравнили данные для апикальных и базальных дендритов в разных условиях.

Соотношение парных импульсов контролировали, подавая два стимула с межстимульным интервалом 50 мс.

Соотношение АМПА/НМДА токов. Токи АМПА- и НМДА-рецепторов были фармакологически изолированы путем последовательного предъявления APV и CNQX в проток, соответственно. Для анализа средняя амплитуда АМПА токов была нормирована на амплитуду НМДА токов.

Экстраклеточная регистрация полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов. Эксперименты проводились на мышах линии C57Bl/6 (27-50 дней). Возбуждающие полевые постсинаптические потенциалы (ВПСП) были записаны от *stratum radiatum* и *stratum oriens* в CA1 поле гиппокампа с использованием стеклянных микроэлектродов (1-2 МΩ), заполненных экстраклеточным раствором. Потенциация вызывалась тета-протоколом: 4 пачками по 4 трэйна через каждые 30 с. В экспериментах парная стимуляция была записана на следующих интервалах: 30, 50, 100, 200, 300 и 400 мс в начале (пре-ТБС) и конце (пост-ТБС) каждого эксперимента.

Поведенческий эксперимент. Объектом исследования были половозрелые самцы крыс линии Вистар весом 210-370г (71 животное). Обучение и тестирование животных производилось в двух разных камерах. Камера для обучения являлась контекстом А, а в камере для тестирования были созданы три разных контекста - Б, В и Г. В день обучения крысу помещали в контекст А и через две минуты предъявляли 2 звуковых условных стимула (5кГц, 75 дБ, 30 с) с интервалом 3 минуты. В конце каждого звукового сигнала следовал удар тока через решетку силой 0,4мА и длительностью 2 секунды (Тест 0). Через 24 часа после обучения крыс приучали к контексту Б в течение 10 минут. На следующий день проводилась процедура напоминания путем предъявления одиночного звукового стимула длительностью 30 секунд после 2 минут нахождения в камере (Тест 1). Сразу после напоминания крысам вводили внутривентрикулярно и подкожно сочетания растворов для блокады синтеза белка и/или блокады синтеза оксида азота.

На следующий день крыс приучали к контексту В в течение 5 минут. Через 24 часа в контексте В после 2 минут тишины крысам предъявляли три последовательных звуковых условных стимула длительностью 30 секунд с интервалами 60 и 20 секунд (Тест 2). Еще через 2 дня крысам предъявили одиночный звуковой стимул в контексте Г после двух минут тишины (Тест 3).

Обработка данных и статистический анализ. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (S.E.M.). Все статистические тесты проводились с использованием SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, США). В ходе статистической обработки результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA), двухфакторный дисперсионный анализ (Two-Way ANOVA) и двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (Two-Way Repeated Measures ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.

Кальций-проницаемые АМПА рецепторы вносят больший вклад в синаптическую передачу на апикальных дендритах пирамидных нейронов CA1, чем на базальных дендритах.

Прежде чем оценить влияние оксида азота на синапсы, мы проверили наличие кальций-проводящих (КП) АМПА рецепторов на дендритах пирамидных нейронов CA1 и существуют ли различия во вкладе этих каналов в синаптическую трансмиссию апикальных и базальных дендритов.

Индекс выпрямления (ИВ) отражает внутреннее выпрямление вольт-амперной кривой КП-АМПА рецепторов и оценивается как отношение амплитуды тока, измеренной при -70 мВ и +35 мВ (ВПСТ-70мВ/ВПСТ+35мВ). Мы обнаружили, что индекс выпрямления в ответ на стимуляцию апикальных дендритов (ИВ = 3.4 ± 0.2) значительно выше, чем в ответ на стимуляцию базальных дендритов (ИВ = 2.5 ± 0.2) ($F_{1,27}=9.213$, $p = 0.005$, One-Way ANOVA, $n=14$ нейронов, рис. 1Б).

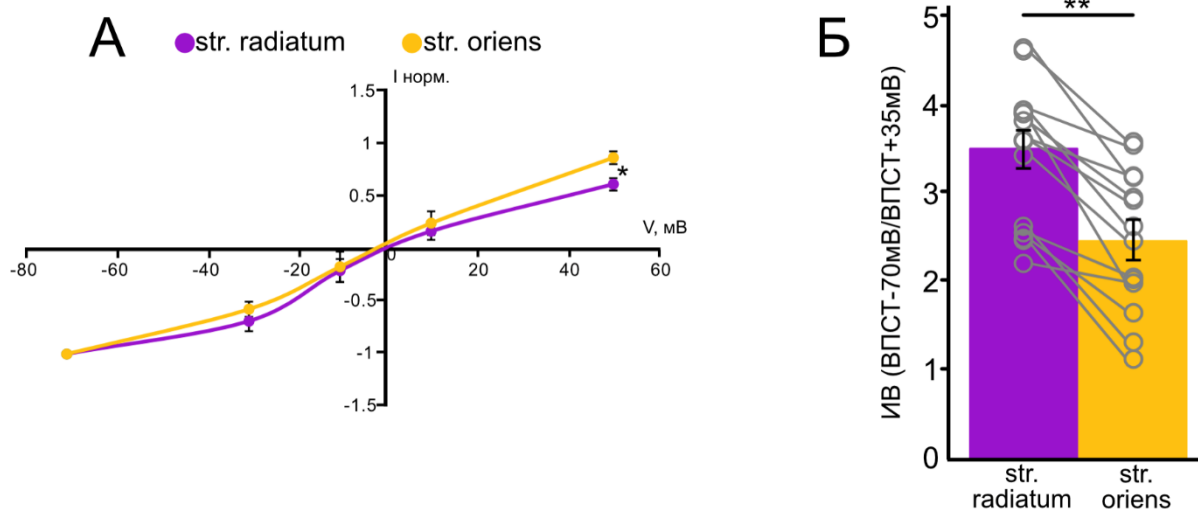


Рисунок 1. Ректификационные характеристики апикальных и базальных дендритов пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа. А. Вольт-амперные кривые апикальных и базальных дендритов. Б. Индекс выпрямления апикальных и базальных дендритов.

Вольтамперные кривые для каждого из входов подтвердили разницу, выявленную при измерении ИВ: вольтамперная кривая апикальных дендритов, продемонстрировала значительно большее внутреннее выпрямление ($F_{1,13}=19.046$, $p=0.035$, One-Way ANOVA, $n = 7$ нейронов, рис. 1А). Эти результаты свидетельствуют о том, что вклад КП-АМПА рецепторов в токи апикальных дендритов достоверно выше, чем в токи базальных дендритов.

Далее мы проверили, чувствительны ли ответы на стимуляцию апикальных и базальных входов к блоктору КП-АМПА рецепторов Nasp_m (200 μM), добавленному в проток (Рис. 2А-Г). Чтобы оценить степень падения амплитуды, мы усреднили значения из каждой записи в 5-минутном сегменте в конце регистрации (рис. 2В). Мы наблюдали падение АМПА токов на обоих входах (73% ± 4 от базовой линии для *str. radiatum* и 83% ± 6.5 для *str. oriens*, n=10), что может указывать на присутствие КП-АМПА рецепторов на базальных и апикальных дендритах пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа. Однако сравнение с контрольными клетками (n = 6 клеток) показало, что Nasp_m достоверно повлиял ($F_{1,31}=11.271$, $p = 0.002$, Two-Way ANOVA) только на апикальные (73% ± 4 против 109% ± 7, $p = 0.001$, $t=3.806$, тест Холма-Сидака), но не на базальные дендриты (83% ± 6.5 против 94% ± 4, $p= 0.354$, $t=0.942$, тест Холма-Сидака).

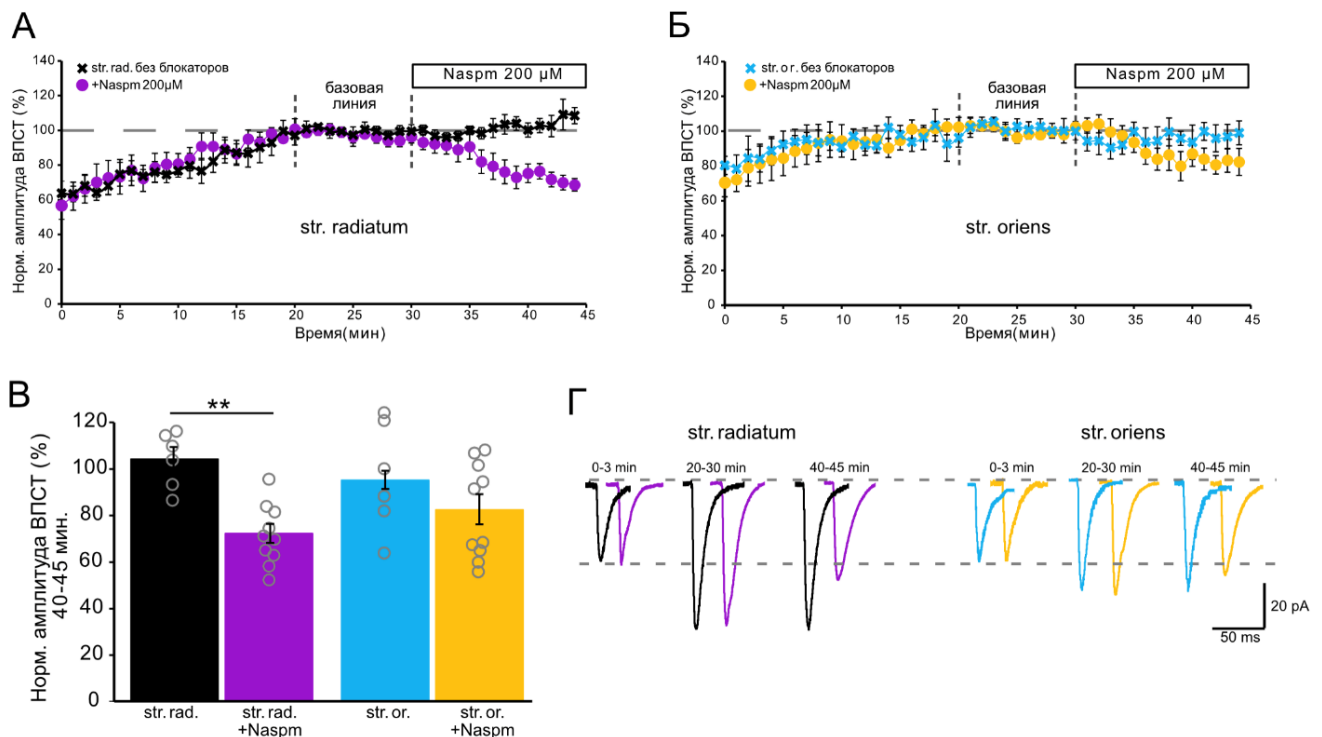


Рисунок 2. Вклад кальций-проницаемых рецепторов АМПА в синаптическую передачу. А и Б. График усредненных амплитуд ВПСТ на апикальных (А) и базальных (Б) входах во время вымывания полиаминов и последующего применения Nasp_m (200 μM). В. Гистограмма, демонстрирующая нормализованные значения ВПСТ за последние 5 минут кривых А и Б. Кружки серого цвета представляют отдельные точки данных, ** $p \leq 0.005$. Г. Типичные усредненные кривые в указанные моменты времени кривых А и Б показаны черным и фиолетовым цветом для апикальных дендритов и голубым и оранжевым цветом для базальных дендритов.

Розов и коллеги ранее показали, что подача нескольких высокочастотных стимулов на входы с КП-АМПА рецепторами вызывает вымывание

полиаминового блока, что, в свою очередь, приводит к полиамин-зависимой фасилитации (Rozov, Burnashev, 1999; Rozov и др., 2018), которая проявляется в увеличении амплитуды каждого последующего ВПСТ. Мы использовали аналогичный протокол чтобы проверить характерна ли такая пластичность для синапсов пирамидных клеток поля СА1 гиппокампа. Мы подавали четыре стимула с межстимульным интервалом 33 мс на каждый из входов в начале записи и 20 минут спустя. Мы использовали внутриклеточные растворы без спермина и с содержанием спермина, чтобы проверить, повлияет ли вымывание полиаминов на ВПСТ.

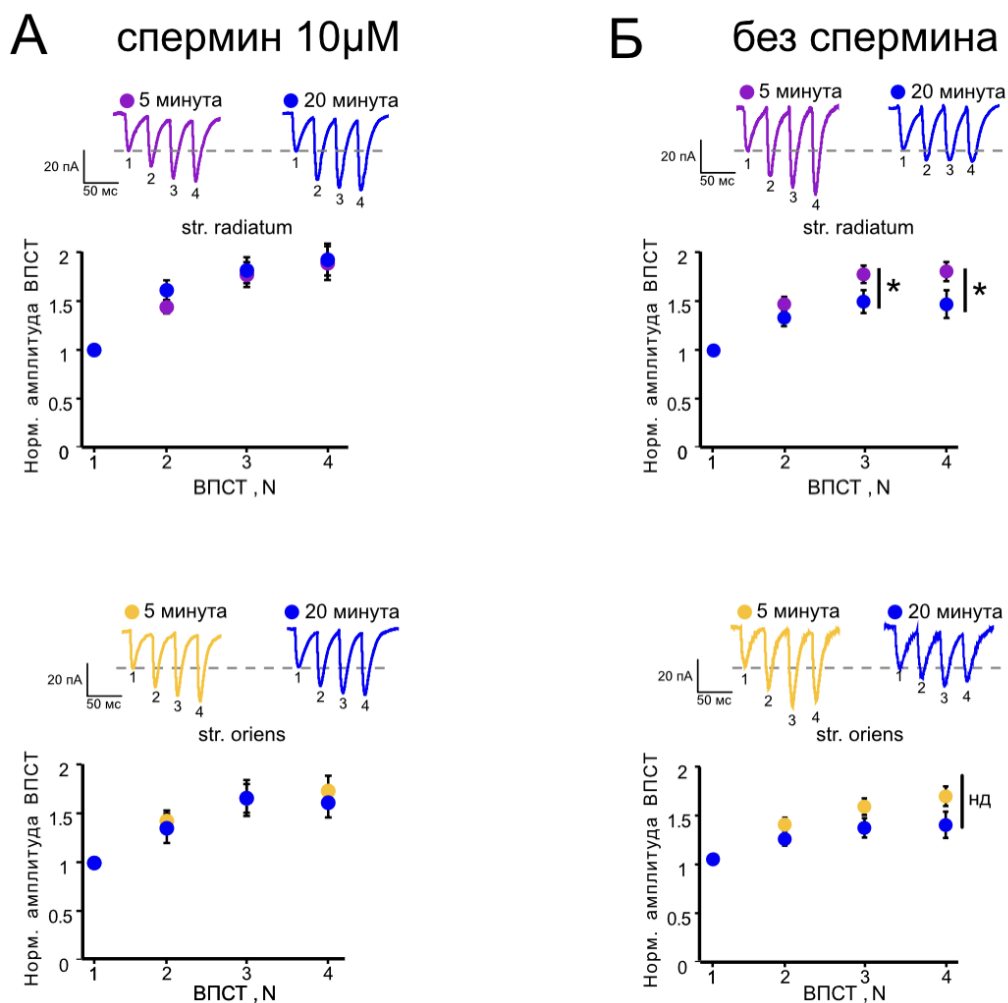


Рисунок 3. Полиамин-зависимая фасилитация характерна для синапсов пирамидных клеток СА1 гиппокампа. (А) Полиамин-зависимая фасилитация присутствует как на апикальных (верхний график), так и на базальных дендритах (нижний график) спустя 20 минут регистрации клетки при наличии 10μМ спермина в пэтч-пипетке; (Б) Спустя 20 минут регистрации нейрона с внутриклеточным раствором без спермина полиамин-зависимая фасилитация достоверно снижается на апикальных дендритах (верхний график), но не базальных. Нд – недостоверная разница

Рисунки 3А и 3Б демонстрируют результаты этих экспериментов. Когда мы использовали внутриклеточный раствор без спермина, амплитуды ВПСТ на 20-й минуте оказались достоверно ниже, чем на 5-й минуте ($F_{1,67}=4.716$, $p=0.046$, Two-Way RM ANOVA, $n=8$ нейронов). Межсубъектный анализ показал, что 3-й и 4-й ВПСТ в серии были значительно ниже через 20 минут после вымывания полиаминов, чем в начале записи на апикальных дендритах ($p=0.023$, $t=2.475$ для 3-х ВПСТ и $p=0.003$, $t=3.191$ для 4-х ВПСТ, тест Холма-Сидака), и мы наблюдали ту же тенденцию на базальных дендритах ($p=0.117$, $t=1.279$ для 3-х ВПСТ и $p=0.066$, $t=1.829$ для 4-х ВПСТ, тест Холма-Сидака, $n=8$ нейронов), тогда как при наличии полиаминов в пэтч-пипетке мы не наблюдали таких различий (апикальные: $F_{1,47}=0.254$; базальные: $F_{1,47}=0.092$, Two-Way RM ANOVA, $n=6$ нейронов). Таким образом, мы показали полиамин-зависимую фасилитацию в синапсах пирамидных клеток CA1, что указывает на присутствие КП-АМПА рецепторов как на апикальных, так и на базальных дендритах этих клеток. Однако эксперименты по измерению вольтамперных характеристик этих входов показали, что КП-АМПА рецепторы вносят больший вклад в синаптическую передачу на апикальных дендритах пирамидных нейронов CA1, чем на базальных дендритах.

Блокада синтазы оксида азота изменяет вклад КП-АМПА рецепторов в токи апикальных, но не базальных дендритов.

Поскольку оксид азота может влиять на встраивание КП-АМПА рецепторов в постсинаптическую мембрану нейронов, мы проверили, влияет ли блокада его синтеза различными ингибиторами NO-синтазы на характеристики апикальных и базальных синапсов пирамидных клеток CA1. На рис. 4 показаны индексы выпрямления апикальных и базальных входов под действием ингибитора NO-синтазы L-NAME (200 μ M), селективного ингибитора нейрональной NO-синтазы 3-бром-7-нитроиндазола (50 μ M) и скавенджера NO карбокси-РТЮ (50 μ M). Последние два ингибитора растворяли в ДМСО, и мы также протестировали влияние на индекс выпрямления ДМСО без блокаторов (25 μ л) и не обнаружили влияния ДМСО на ИВ ($F_{1,43}=1.697$, $p=0.108$, Two-Way ANOVA, $n=8-14$ нейронов). Снижение внутриклеточной концентрации оксида азота значительно снижало индекс выпрямления на апикальных дендритах по сравнению с контрольными клетками ($F_{3,76}=4.704$, $p=0.005$, $n = 7-14$ нейронов, Two-Way ANOVA), но не базальных дендритах ($F_{3,76}=1.204$, $p=0.315$, $n = 7-14$ нейронов, Two-Way ANOVA), тем самым нивелируя достоверную разницу между этими двумя входами.

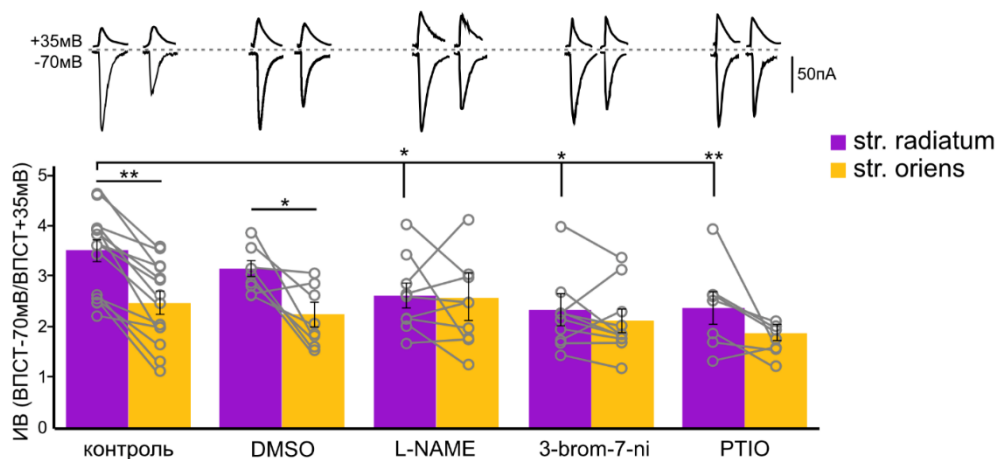


Рисунок 4. Сравнение индексов выпрямления в *stratum radiatum* (фиолетовый) и *stratum oriens* (оранжевый) в контрольных клетках (n=14) и при обработке DMSO (n=8), L-NAME (n=8), 3-бром-7-нитроиндазол (n=10) и РТЮ (n=7). Наверху пример ответов при +35мВ и -70мВ. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$. Открытые серые кружки представляют отдельные точки данных.

Кроме того, ингибирование NO-синтазы предотвратило падение амплитуды тока во время блокады КП-АМПА рецепторов с помощью Naspm в *str. radiatum* ($109\% \pm 7.3$ против $73\% \pm 4$, $F_{1,39}=15.699$, $p = 0.001$, Two-Way ANOVA, $n = 10$ нейронов, рис. 5А-Б); однако в *str. oriens* мы не обнаружили существенной разницы на последних 5 минутах записи ($89.4\% \pm 3.2$ против $83\% \pm 6.5$, $F_{1,39}=0.423$, $p = 0.264$, Two-Way ANOVA, $n = 10$ нейронов, рис. 5В-Г).

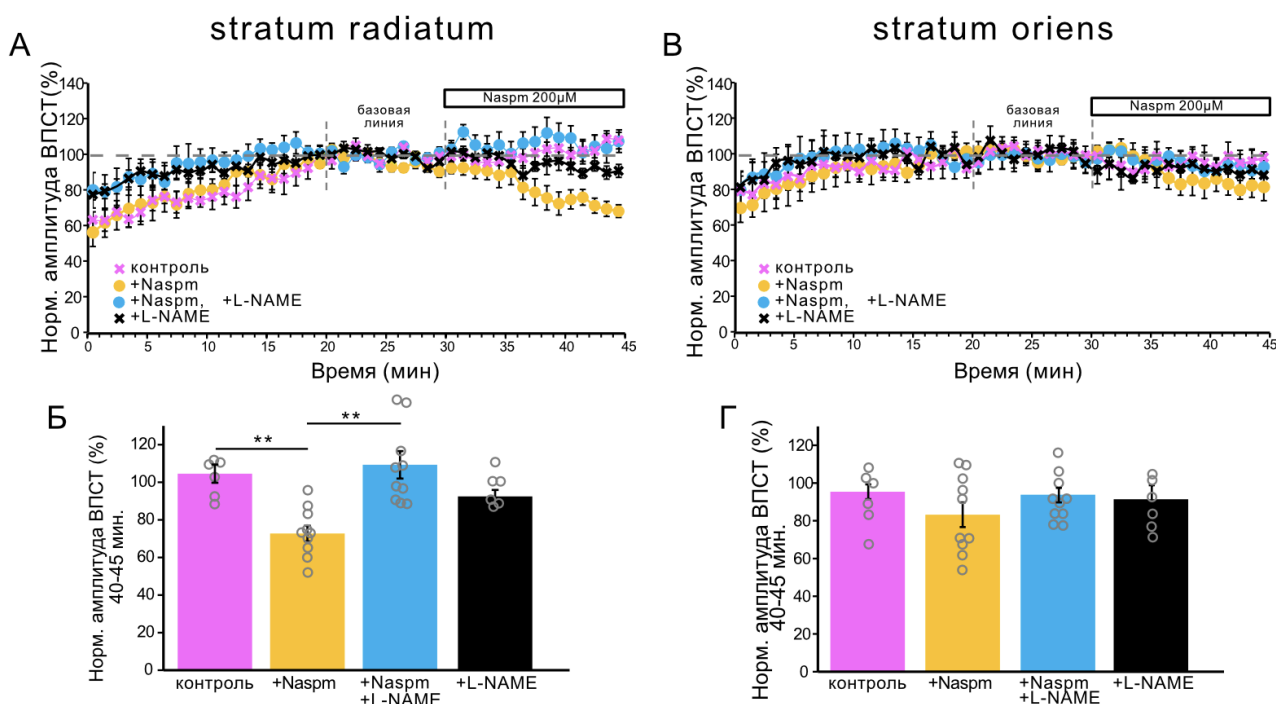


Рисунок 5. А и В. График усредненных амплитуд ВПСТ на апикальных (А) и базальных (В) входах во время вымывания полиаминов (розовый, $n = 6$ клеток), последующего

применения Naspn (200 μ M) (желтый, n = 10 клеток), после обработки L-NAME (черный, n=6) и после ингибирования NOS с применением Naspn (голубой, n=10). Б и Г. Гистограммы, демонстрирующие нормализованные значения ВПСТ за последние 5 минут кривых А и В, соответственно. Кружки серого цвета представляют отдельные точки данных, ** $p \leq 0.005$.

Затем мы проверили, как уменьшение оксида азота в клетке будет влиять на полиамин-зависимую фасилитацию на исследуемых входах в присутствии спермина в регистрирующей пипетке (рис. 6). Ингибирование NO-синтазы значительно повлияло на кривую фасилитации на апикальных дендритах ($F_{3,53}=3.518$, $p=0.025$, Two-Way RM ANOVA, n=7 нейронов), а именно на 4-й ВПСТ на апикальных дендритах ($p = 0.005$, $t=2.983$, тест Холма-Сидака), но не на базальные дендриты ($F_{3,53}=0.971$, $p = 0.417$, Two-Way RM ANOVA, n=7 нейронов). Запись полиамин-зависимой фасилитации выполнялась на пятой минуте после прорыва мембраны.

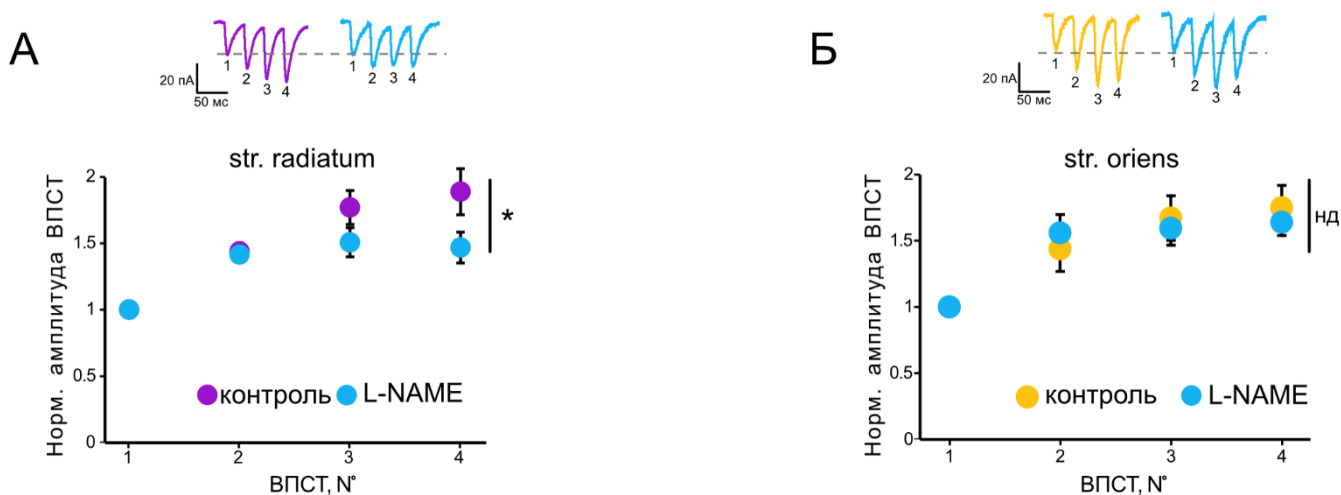


Рисунок 6. Полиамин-зависимая фасилитация в *str. radiatum* (левый график) и в *str. oriens* (правый график), записанная на пятой минуте после прорыва мембраны до и после ингибирования NOS. Нд – недостоверная разница.

Мы также исследовали, участвует ли рГЦ-зависимый путь в этом взаимодействии, путем добавления ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ (30 μ M) в проток. Мы измерили индекс выпрямления в этих условиях и обнаружили, что ингибирование рГЦ не влияет на ИВ ни апикальных (ИВ = 3.5 ± 0.2 , n=5 нейронов), ни базальных (ИВ = 2.5 ± 0.3 , n=5 нейронов) входов, между ними по-прежнему наблюдалась достоверная разница (рис. 7, $F_{1,9}=7.513$, $p=0.025$, One-Way ANOVA, n=5 нейронов). Затем мы заблокировали NO-синтазу и рГЦ одновременно и обнаружили, что инкубация в L-NAME также выравнивает индексы выпрямления апикального (ИВ = 3.3 ± 0.3 , n=5 нейронов) и базального (ИВ = 3 ± 0.4) входов, как и в клетках, обработанных только ингибиторами NO-синтазы ($F_{1,9}=0.281$, $p = 0.611$, One-Way ANOVA, n=5 нейронов).

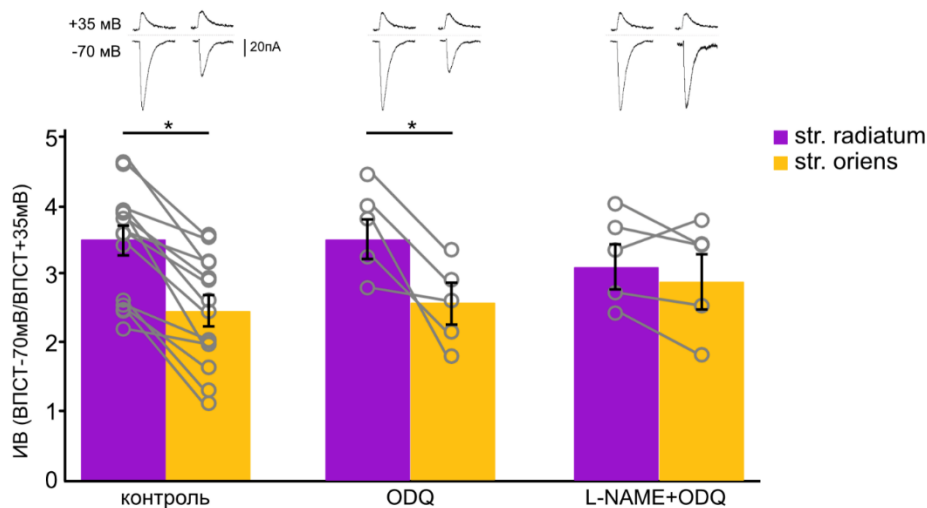


Рисунок 7. Сравнение индексов выпрямления в *stratum radiatum* (фиолетовый) и *stratum oriens* (оранжевый) в контрольных клетках, после обработки ODQ и после обработки ODQ+L-NAME. Наверху пример ответов при +35 мВ и -70 мВ. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$. Открытые серые кружки представляют отдельные точки данных.

Блокада синтазы оксида азота по-разному влияет на долговременную потенциацию в *str. radiatum* и *str. oriens*.

В нашей работе мы проверили как блокада синтазы оксида азота повлияет на синаптическую пластичность в *stratum radiatum* и *stratum oriens*. Для этого мы использовали экстраклеточную регистрацию полевых потенциалов на срезах гиппокампа мышей. Данные эксперименты были выполнены совместно с к.б.н. А.В. Мальцевым. Индукция долговременной потенции (ДВП) производилась с помощью протокола тета-стимуляции, для которой ранее было показано, что такой протокол вызывает NO-зависимую ДВП как в *str. radiatum*, так и в *str. oriens* (Haley и др., 1996). Протокол состоял из 4 пачек четырех импульсов частотой 100 Гц, разделенных межпачечным интервалом 200 мс. Такие пачечные стимуляции подавались 4 раза с интервалом в 30 секунд.

Для экспериментов с блокадой NO-синтазы, срезы предварительно инкубировались на протяжении 40 минут с ингибитором синтазы оксида азота L-NNA (100 μ M). Полученные таким образом результаты, показали, что блокада NO-синтазы по-разному влияет на долговременную потенциацию апикальных и базальных дендритов пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа. Так, в *str. radiatum* оксид азота оказался необходим для поздней фазы ДВП (рис. 8А): угол наклона ВПСР на ранней фазе ДВП (0-1 минута после индукции) не отличался у контрольных срезов и срезов, подверженным инкубации в L-NNA (контроль (n=7): 230.4% \pm 15, L-NNA (n=6): 205.5 \pm 22.8% от базовой линии, $p=0.559$, Two-Way ANOVA), тогда как на 59-60 минуте после индукции ДВП угол наклона ВПСР под L-NNA был достоверно ниже, чем у контрольных срезов (контроль: 184.9% \pm 9, L-NNA: 121 \pm 22% от базовой линии, $p=0.043$, Two-Way

ANOVA). Эти данные согласуются с ранее полученными результатами другими группами ученых (Son и др., 1998; Son и др., 1996; Haley и др., 1996).

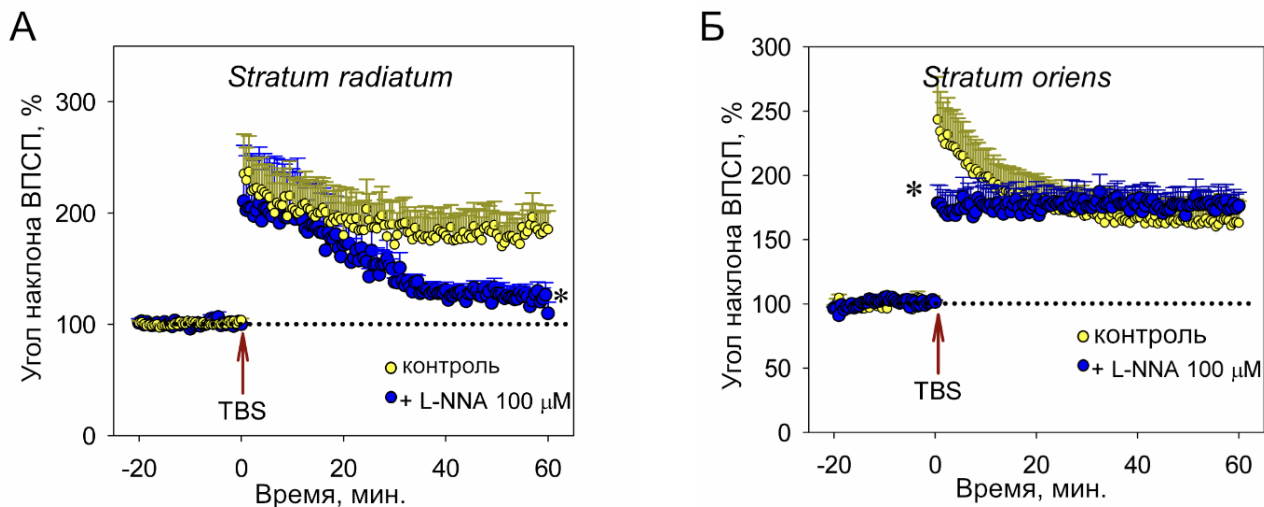


Рисунок 8. А. Графики долговременных потенциалов в контрольных срезах (желтые кружки) и в срезах, инкубированных в L-NNA (синие кружки) в *str. radiatum*; Б. Графики долговременных потенциалов в контрольных срезах (желтые кружки) и в срезах, инкубированных в L-NNA (синие кружки) в *str. oriens*.

В вышеуказанных работах ингибирование синтазы оксида азота не повлияло на потенциацию в *str. oriens*. В наших экспериментах мы обнаружили, что угол наклона ВПСП на 59-60 минуте после индукции ДВП не отличался достоверно между контрольными срезами и срезами, проинкубированными в L-NNA (контроль: $162.6\% \pm 8$, L-NNA: $175.7\% \pm 5$ от базовой линии, Two-Way ANOVA, рис. 8Б). Однако, ранняя фаза ДВП у срезов после инкубации L-NNA оказалась достоверно ниже, чем у контрольных срезов (контроль: $232.4\% \pm 14$, L NNA: $175.4\% \pm 7$ от базовой линии, Two-Way ANOVA, $p=0.034$). Таким образом, можно предположить, что для базальных дендритов пирамидных нейронов CA1 оксид азота необходим для ранней фазы долговременной потенциации.

Кроме того, мы обнаружили различия в соотношении парных импульсов в *str. radiatum* и *str. oriens* после индукции ДВП: в *str. oriens* парное соотношение контрольных срезов было достоверно ниже, чем срезов после инкубации в L-NNA на ранней фазе (0-1 мин) ДВП (контроль: 0.96 ± 0.7 , L-NNA: 1.9 ± 0.4 , One-Way ANOVA, $p=0.025$, рис. 9), тогда как в *str. radiatum* таких различий выявлено не было. Эти результаты могут свидетельствовать о пресинаптическом вкладе в раннюю фазу ДВП на базальных дендритах.

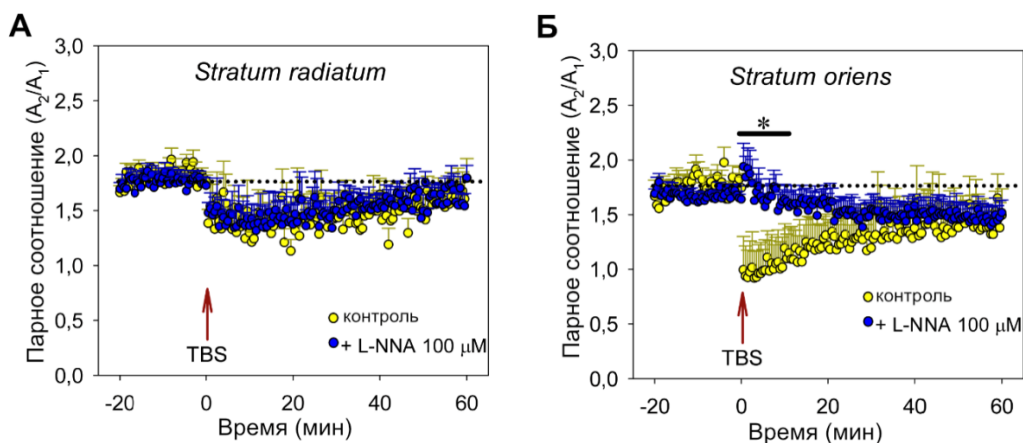


Рисунок 9. Парное соотношение в (А) str. radiatum и (Б) str. oriens после индукции ДВП в контрольных срезах (желтые кружки) и в срезах, инкубированных в L-NNA (синие кружки). TBS – протокол пачечной тета-стимуляции (theta-burst stimulation). * $p < 0.05$

Таким образом, путем экстраклеточной регистрации полевых постсинаптических потенциалов мы показали, что оксид азота необходим для поддержания долговременной потенциации на апикальных дендритах, а на базальных дендритах эта молекула вовлечена в механизмы ранней фазы ДВП, где роль оксида азота, вероятно, обусловлена вкладом пресинаптических механизмов.

Ингибирование синтеза оксида азота предотвращает нарушение памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время реактивации условно-рефлекторного страха.

Известно, что даже консолидированная память может снова стать дестабилизированной при извлечении (реактивации), после чего воспоминания должны пройти процесс повторной консолидации, зависящий от синтеза белка *de novo* (Nader и др., 2000; Lewis, 1979). Было показано, что во время такого синтеза белков также происходит встраивание кальций-проницаемых АМПА рецепторов, которые оказались необходимы для реактивации памяти (Hong и др., 2013). Кроме того, ранее в нашей лаборатории были получены результаты, свидетельствующие о необходимом участии оксида азота в реконсолидации памяти на виноградной улитке (Balaban и др., 2014; Balaban, Roshchin, Korshunova, 2011). В настоящей работе мы проверили, может ли ингибитор синтеза оксида азота препятствовать нарушению памяти во время напоминания под действием блокады синтеза белка у крыс. Для экспериментов был выбран циклогексимид, который, как и анизомицин, блокирует трансляцию на стадии элонгации. В качестве блокаторов нейрональной NO-синтазы использовали 3-бromo-7-нитроиндазол (3-Br-7-ni) в концентрации 10 мг/кг (Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011), а также ARL 17 477 дигидрохлорид (ARL) в концентрации 5 мг/кг (Du, Weiss, Harvey, 2000).

Работа была выполнена совместно с Рысаковой М. П., Винарской А.Х., Зюзиной А.Б., Баль Н.В. В качестве модели обучения мы выбрали модель условно-рефлекторного замирания на звуковой стимул. Крысы были обучены условно-рефлекторному замиранию на звук в сочетании с ударом тока в камере А в первый день эксперимента (Тест 0). Через 48 часов, после напоминания (Тест1, предъявление звука) им вводили активные вещества (ДМСО/физ. раствор; ДМСО/циклогексимид; 3-Br-7-ni /циклогексимид; 3-Br-7-ni /физ. р-р; ARL/циклогексимид). Через два дня проводилось тестирование условно-рефлекторного замирания в камере С (Тест 2), и еще одно тестирование проводилось через 3 дополнительных дня (Тест 3).

Уровень замирания в Тесте 2 у животных, которым вводили циклогексимид оказался достоверно ниже по сравнению с контрольной группой ($p=0.006$; $t=3.219$, t -тест Бонферрони, рис. 10), что свидетельствует о необходимости синтеза белков во время реконсолидации. В то же время, мы не нашли достоверных отличий между контрольной группой и группами ARL/циклогексимид и 3-Br-7-ni/циклогексимид. Данные результаты указывают на то, что ингибирование нейрональной NO-синтазы предотвратило нарушение памяти, вызванное блокадой только синтеза белка. Таким образом, наши данные предполагают, что в условиях, когда новая память не может сформироваться (из-за блокады синтеза белка), «старая» память сохраняется, если заблокирована NO-синтаза.

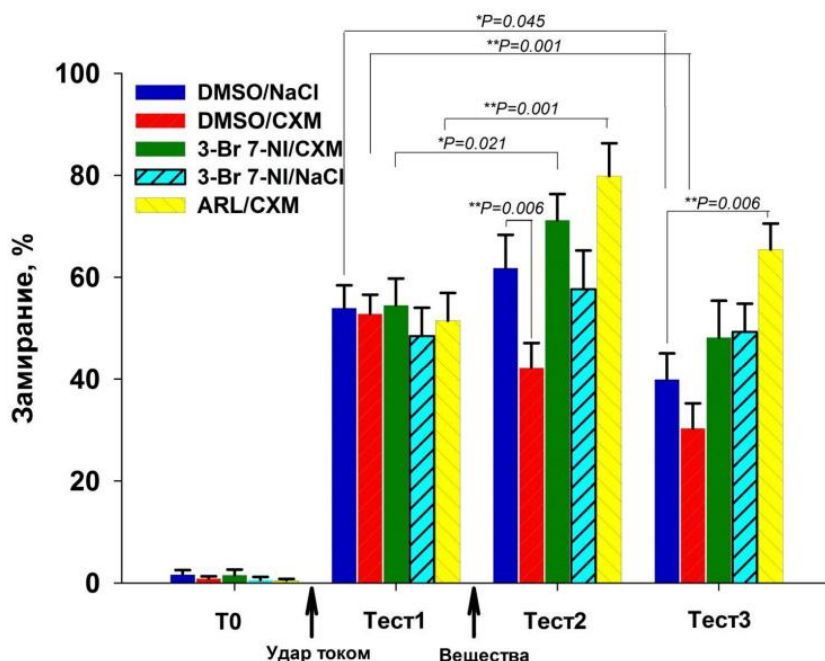


Рисунок 10. Проценты замирания животных на предъявление звукового стимула. Синий – животные, инъецированные контрольным раствором сразу после напоминания (Тест1). Красный – инъекция циклогексимида. Зеленый - 3-Br-7-ni и циклогексимида. Голубой - 3-Br-7-ni. Желтый - ARL и циклогексимида.

Через 7 дней после обучения был проведен Тест 3, который продемонстрировал достоверное снижение замирания животных в контрольной группе ($p=0.045$, $t=2.451$, t -тест Бонферрони) и в группе с инъекцией циглогексимида ($p<0.001$, $t=4.874$, t -тест Бонферрони) по сравнению с Тестом 1. В контрольной группе снижение замирания, вероятно, обусловлено угашением памяти вследствие предъявлений стимулов без подкрепления. Снижения уровня замирания не обнаружено в группах 3-Br-7-ni/циклогексимид, 3-Br-7-ni/физ.раствор и ARL/циклогексимид. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что синтез оксида азота вовлечен также в процессы угашения памяти.

ОБСУЖДЕНИЕ.

В настоящем исследовании мы продемонстрировали данные, свидетельствующие о присутствии кальций-проводящих АМПА рецепторов не только на апикальных дендритах пирамидных клеток CA1, но и на базальных дендритах. Регистрация базовой трансмиссии методом пэтч-клямп в режиме «целая клетка» с внутриклеточным раствором без спермина показала постепенное увеличение амплитуд ВПСТ на обоих входах, что связано с высвобождением GluR2-несодержащих АМПА рецепторов от полиаминового блока, которое приводит к увеличению проводимости этих рецепторов (Rozov и др., 2012). Блокада КП-АМПА рецепторов достоверно снизила амплитуду ответов на апикальных дендритах и недостоверно на базальных дендритах. Кроме того, применение высокочастотной стимуляции на входы выявило полиамин-зависимую фасилитацию (Rozov, Burnashev, 1999; Rozov и др., 2018) в *str. radiatum*, а в *str. oriens* мы наблюдали только тенденцию. Однако мы наблюдали значительно более высокий вклад КП-АМПА рецепторов в глутаматергическую синаптическую передачу в *stratum radiatum*, чем в *stratum oriens*, путем измерения индекса выпрямления, что позволяет предположить, что физиология или количество рецепторов различаются в этих компартментах.

Показано, что оксид азота участвует в поддержании ДВП в *str. radiatum*, но не в *str. oriens*; однако присутствие nNOS было показано и в *str. radiatum*, и в *str. oriens* (см. п. 3). Мы предположили, что этот контраст связан с различием в модуляции синаптических характеристик оксидом азота в этих областях. В частности, оксид азота может по-разному влиять на вклад КП-АМПА рецепторов в синаптическую передачу апикальных и базальных дендритов. Мы обнаружили, что ингибирование NOS двумя разными ингибиторами и обработка скавенджером NO уменьшило внутреннюю ректификацию и вызывало падение индекса выпрямления на апикальных дендритах, что отражает уменьшение вклада КП-АМПА рецепторов в токи этих синапсов. Кроме того, ингибирование NOS

предотвратило снижение амплитуды ответа при обработке Nspmt и снизило полиамин-зависимую фасилитации, тогда как на базальных входах ингибирование NOS не повлияло ни на одну из этих синаптических характеристик. Таким образом, наши данные показывают, что оксид азота не влияет на вклад КП-АМПА рецепторов в синапсы базальных дендритов пирамидных клеток CA1, в то время как ингибирование синтеза оксида азота значительно снижает вклад этих рецепторов в синаптические токи апикальных дендритов. Пока неясно, какой механизм, зависимый от оксида азота, вызывает этот эффект в *str. radiatum*. Например, концентрация свободного оксида азота в клетке может влиять на синтез внутриклеточных полиаминов (Buga и др., 1998; Boucher и др., 1999), что, в свою очередь, определяет проводимость КП-АМПА рецепторов. Однако, согласно нашим данным, рост амплитуды тока во время полиамин-зависимой фасилитации при ингибировании NOS исчезает, что свидетельствует о маловероятности повышения концентрации внутриклеточных полиаминов в апикальных дендритах.

Оксид азота также может действовать посредством регуляции транспорта КП-АМПА рецепторов или модификации встроенных рецепторов. Ингибирование NO может нарушить один из возможных механизмов, участвующих в транспортировке субъединиц АМПА рецепторов: непрямой рГЦ-зависимый путь (Serulle и др., 2007), прямое нитрозилирование субъединиц GluA1 (Selvakumar и др., 2013; Von Ossowski и др., 2017) или различных белок-белковых взаимодействий (Chen и др., 2000; Zhang и др., 2015; см. обзор Ivanova и др., 2020). Мы протестировали цГМФ-зависимый путь путем блокирования рГЦ, но не обнаружили никаких различий в индексах выпрямления исследуемых синапсов.

В настоящей работе мы также продемонстрировали, что оксид азота по-разному влияет на долговременную потенциацию в *str. radiatum* и в *str. oriens*. Методом экстраклеточной регистрации полевых постсинаптических потенциалов мы обнаружили, что ингибирование NO-синтазы вызывает падение поздней фазы ДВП в *str. radiatum*, тогда как в *str. oriens* такое ингибирование влияет только на раннюю фазу ДВП, но не на позднюю. Мы также обнаружили, что парные отношения в *str. oriens* на ранней фазе ДВП под действием ингибитора NOS достоверно отличаются от парных отношений в *str. radiatum*. Этот факт может указывать на пресинаптический вклад оксида азота в раннюю фазу ДВП в области *str. oriens*.

В некоторых работах (Clem и др., 2010а, Clem и др., 2010б, Hong и др., 2013) показано, что кальций-проводящие АМПА-рецепторы могут быть вовлечены как в консолидацию памяти, так и в реконсолидацию памяти после напоминания. В настоящей работе мы показали, что встраивание кальций-проводящих АМПА-

рецепторов в некоторые синапсы может регулироваться оксидом азота. Ранее на виноградной улитке было показано, что участие оксида азота необходимо для реконсолидации памяти (Balaban и др., 2014; Balaban, Roshchin, Korshunova, 2011). В настоящей работе эффект блокады синтеза оксида азота во время напоминания при добавлении амнестического агента был воспроизведён на крысах, что свидетельствует о том, что некоторая общность механизмов действия оксида азота на память наблюдается в очень отдалённых таксономических единицах. Однако, электрофизиологические данные, в том числе полученные в настоящей работе, говорят о том, что на клеточном уровне действие оксида азота на синаптическую передачу может различаться даже в пределах одного нейрона. Кроме того, обнаруженные различия влияния блокады синтеза оксида азота во время долговременной потенциации даже усиливают разнообразие этих механизмов: в пределах одного типа нейронов блокада синтеза оксида азота оказывает различное влияние как на поддержание долговременной потенциации, так и на изменение парной фасилитации на разных входах в ходе долговременной потенциации. Таким образом, внешне сходные процессы могут быть опосредованы разными механизмами и для более глубокого понимания обнаруженного действия блокады синтеза оксида азота при напоминании необходимы дополнительные эксперименты, в том числе с исследованием вовлечения кальций-проводящих АМПА-рецепторов в разные стадии консолидации и реконсолидации памяти.

Таким образом, мы показали различия в электрофизиологических характеристиках синаптических ответов на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа, и что оксид азота является одним из ключевых факторов таких различий не только в потенцированных нейронах, но и в их базовом состоянии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Настоящая работа демонстрирует эффекты ингибирования NOS на КП-АМПА-опосредованные токи на апикальных, но не на базальных дендритах пирамидных нейронов CA1. Этот эффект может лежать в основе различий в синаптической пластичности вышеупомянутых синапсов, хотя механизмы этого эффекта требуют дальнейшего изучения. Многие исследования продемонстрировали различия в механизмах синаптической пластичности между разными компартментами нейрона; обсуждается концепция специализированного «синапса памяти» (Sossin, 2018). Наше исследование подчеркивает важность такого явления, как синаптическая гетерогенность, которая может лежать в основе особенностей обработки информации в гиппокампе. Кроме того, неоспорима важность АМПА рецепторов для таких аспектов жизни клетки, как синаптическая пластичность и поддержание гомеостаза. Транспортировка

субъединиц GluA1-4 АМПА рецепторов, субъединично-специфические белковые взаимодействия, вспомогательные субъединицы и посттрансляционные модификации могут предсказывать типы и степень синаптической пластичности; это так называемый «АМПА код синаптической пластичности» (Diering and Huganir, 2018), и наши данные раскрывают более подробную информацию об этом сложном коде.

ВЫВОДЫ.

1. Методом пэтч-клямпы в режиме «целая клетка» в переживающих срезах гиппокампа мышей линии C57Bl/6 обнаружен вклад кальций-проницаемых АМПА рецепторов в синаптическую трансмиссию как на апикальных, так и на базальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1;

2. На переживающих срезах гиппокампа продемонстрировано, что вклад кальций-проницаемых АМПА рецепторов достоверно выше в синаптическую трансмиссию на апикальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1, чем базальных;

3. В переживающих срезах гиппокампа блокада синтеза оксида азота влияет на вклад кальций-проницаемых АМПА рецепторов в синаптическую трансмиссию на апикальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1, но не базальных;

4. В переживающих срезах гиппокампа блокада синтеза оксида азота нарушает позднюю фазу долговременной потенциации в str. radiatum, тогда как в str. oriens нарушается только ранняя фаза;

5. В экспериментах с поведением на крысах продемонстрировано, что блокада нейрональной NO-синтазы предотвращает нарушение памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время реактивации условно-рефлекторного страха.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА.

Статьи по теме диссертации.

1. Bal N.V., Rysakova M.P., Vinarskaya A.Kh., **Ivanova V.**, Zuzina A.B., Balaban P.M. Cued memory reconsolidation in rats requires nitric oxide // *European Journal of Neuroscience*. - 2017. doi: 10.1111/ejn.13503.

2. Ivanova V.O., Balaban P.M., Bal N.V. Modulation of AMPA Receptors by Nitric Oxide in Nerve Cells. // *Int J Mol Sci*. 2020. Т. 21. № 3. С. 981. doi:10.3390/ijms21030981.

3. Ivanova V.O., Balaban P.M., Bal N.V. Nitric Oxide Regulates GluA2-Lacking AMPAR Contribution to Synaptic Transmission of CA1 Apical but Not Basal Dendrites. // *Front Synaptic Neurosci*. 2021. Т. 13. С. 656377. doi:10.3389/fnsyn.2021.656377.

Тезисы конференций.

1. Ivanova V.O., Bal N.V., Balaban P.M. Role of nitric oxide in the mechanism of AMPA receptor trafficking. - 18th International Neuroscience Winter Conference. - Sölden Austria - April 2nd - 6th 2016.

2. Иванова В.О., Баль Н.В., Балабан П.М. Индукция долговременной потенциации с K^+ в качестве главного катиона во внутриклеточном растворе. - XI Региональная Конференция Международного Общества Нейробиологии Беспозвоночных, Звенигородской биостанции МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва. - 15 мая 2016 – 19 мая 2016.

3. Иванова В.О., Баль Н.В. Роль оксида азота в механизме транспорта АМРА-рецепторов. - XX Школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. - Москва. - 31 октября 2016.

4. Иванова В.О., Баль Н.В. Роль оксида азота в механизме перестройки АМРА-рецепторов. - XXI Школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. - Москва. - 31 октября 2017.

5. V. Ivanova, V. Natalya, V. Pavel Nitric oxide and AMPA receptor trafficking. - ISN-ESN Meeting. – Paris, France. – 20-24 August 2017.

6. Violetta Ivanova, Natalia Bal, Pavel Balaban. Nitric oxide is involved in the mechanism of AMPA receptors incorporation into dendrites of pyramidal neurons in hippocampus. - BNA Festival of Neuroscience 2019 supplement – Dublin, Ireland – 14-17 April 2019.

7. Иванова В.О., Мальцев А.В., Баль Н.В. Влияние оксида азота на свойства синапсов апикальных и базальных дендритов пирамидных нейронов гиппокампа. - XXIII Школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – Москва. - 1 ноября 2019.