

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ РАН

*На правах рукописи*

**Иванова Виолетта Олеговна**

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

Специальность 1.5.5 – «Физиология»

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель

к.б.н. Баль Наталья Вячеславовна

**Москва 2021**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1. Апикальные и базальные дендриты пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа.....	9
2. Оксид азота и ионотропные глутаматные рецепторы.....	12
2.1. Оксид азота.....	12
2.1.1. Оксид азота и синаптическая пластичность.....	14
2.1.2. Оксид азота и память.....	17
2.2. АМПА рецепторы.....	18
2.2.1. АМПА рецепторы и синаптическая пластичность.....	20
2.2.2. Кальций-проницаемые АМПА рецепторы и синаптическая пластичность.....	21
2.3. Оксид азота и АМПА рецепторы.....	25
2.3.1. Непрямой путь.....	26
2.3.2. Нитрозилирование.....	28
2.3.3. Белок-белковые взаимодействия.....	29
2.3.4. Оксид азота и АМПА рецепторы в сетчатке глаза как пример взаимодействия.....	36
2.4. Полиамины и оксид азота.....	38
2.5. Оксид азота и НМДА рецепторы.....	39
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
3.1. Содержание животных.....	42
3.2. Приготовление срезов.....	42
3.3. Электрофизиологические эксперименты.....	42
3.3.1. Пэтч-клямп.....	42
3.3.2. Экстраклеточная регистрация полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов.....	45
3.4. Поведенческий эксперимент.....	46

3.5. Используемые препараты.....	48
3.6. Обработка данных и статистический анализ.....	49
4. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	50
4.1. Кальций-проницаемые АМПА рецепторы вносят большой вклад в синаптическую передачу на апикальных дендритах пирамидных нейронов CA1, чем на базальных дендритах.....	50
4.2. Блокада синтазы оксида азота изменяет вклад КП-АМПА рецепторов в токи апикальных, но не базальных дендритов.....	58
4.3. Блокада синтазы оксида азота по-разному влияет на долговременную потенциацию в str. radiatum и str. oriens.....	67
4.4. Ингибирование синтеза оксида азота предотвращает нарушение памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время реактивации условно рефлекторного страха.....	73
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	77
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	82
ВЫВОДЫ.....	83
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	84
БЛАГОДАРНОСТИ.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	87

## ВВЕДЕНИЕ

### 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  $\alpha$ -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, кормление, 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 трансммиттера и его нейротоксичность могут опосредоваться через различные рецепторы, включая ионотропные рецепторы глутамата (AMPA рецепторы, N-метил-d-аспаратат (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 СА1 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 СА1 гиппокампа;
2. С помощью метода пэтч-клямп в режиме «целая клетка» исследовать электрофизиологические свойства синаптической передачи на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов поля СА1 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 звук 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 продемонстрировали разницу во влиянии оксида азота на долговременную потенцию между апикальными и базальными дендритами, а также нами был продемонстрирован 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 СА1 гиппокампа;
2. Оксид азота является агентом, модулирующим электрофизиологические характеристики синаптических ответов на апикальных и базальных дендритах поля СА1 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).



## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. Апикальные и базальные дендриты пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа.

Область CA1 гиппокампа является основной областью для изучения феноменов синаптической пластичности. Эта область с ее широко распространенными проекциями (Cenquizca и Swanson, 2007) является ключевой структурой распространения сигналов из гиппокампа в другие части мозга. Апикальные и базальные дендриты пирамидных клеток области CA1 располагаются в двух основных направлениях: *stratum radiatum/stratum lacunosum moleculare* и *stratum oriens*, соответственно. Большинство возбуждающих входов в пирамидные нейроны области CA1 идут от пирамидальных клеток области CA3 гиппокампа через их ипсилатеральные коллатерали Шаффера и контралатеральные комиссуральные волокна к *str. radiatum* (van Strien и др., 2009), а также из энторинальной коры через перфорантный путь в *stratum lacunosum moleculare* (Masurkar и др., 2017). Из CA3 проекции идут не только в *str. radiatum*, но также частично в *str. oriens* (Kondo и др., 2009). В рамках внутригиппокампальных сетей *str. radiatum* и *str. oriens* имеют схожую иннервацию, за исключением зоны CA2, проекции из которой распространяются преимущественно в *str. oriens* (Shinohara и др., 2012), а также они имеют разницу в рекуррентных связях внутри CA1 (Takács и др., 2012). Проекции из *subiculum* также идут как в *str. radiatum*, так и в *str. oriens* (Köhler, 1985), в том числе проекции нейронов, содержащих нейрональную NO-синтазу (Seress и др., 2002). Помимо перфорантного пути, в зоне CA1 были также обнаружены проекции из других структур головного мозга. Так, аксоны нейронов базального ядра миндалины оканчиваются в *str. oriens* и *str. radiatum*, тогда как латеральное ядро иннервирует в основном *str. radiatum* (Pikkarainen и др., 1999). Область CA1 иннервируется также и из ствола мозга: проекции голубого пятна были замечены в *str. radiatum*, но не в *str. oriens* (Pasquier и Reinoso-Suarez, 1978), хотя в более

позднем исследовании дофаминергические проекции из этой структуры были также обнаружены и в *str. oriens* (Takeuchi и др., 2016, рис 3а). Кроме того, серотониновые проекции из ядер шва продолговатого мозга были обнаружены в *str. radiatum* и частично в *str. oriens* (Moore и Halaris, 1975). Из покрывки среднего мозга проекции также идут в обе зоны (Li и др., 2016). Эти данные говорят о том, что апикальные и базальные дендриты пирамидных нейронов гиппокампа по-разному иннервированы, но при этом синаптическая пластичность на апикальных дендритах CA1 пирамидных нейронов была тщательно изучена, а о механизме синаптической пластичности на базальных дендритах относительно мало известно.

Синаптическая пластичность на базальных дендритах может иметь ключевое значение при обработке информации в CA1, поскольку активность базальных дендритов оказывает метапластическое действие на синапсы, расположенные на противоположной стороне тела клетки у апикальных дендритов (Hulme и др., 2012). Синаптическая пластичность на базальных и апикальных дендритах области CA1 гиппокампа имеет некоторые сходства (Bradshaw и др., 2003), но четкое пространственное разделение этих синапсов в совокупности с различиями в иннервации слоев *str. radiatum* и *str. oriens* позволяют предположить, что молекулярные механизмы, лежащие в основе пластичности, могут отличаться. Так, например, было обнаружено, что долговременная потенция (ДВП) в *str. radiatum* зависит от металлопротеаз в отличие от *str. oriens*, где вызванная тем же протоколом ДВП не зависела от этих ферментов (Brzdak и др., 2019). Кроме того, ингибиторы митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК) и кальций-кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII), которые нарушают позднюю фазу ДВП в *str. radiatum*, не оказали влияния на ДВП в *str. oriens*. Однако протеинкиназа A, которая выполняет специфическую функцию в поддержании ДВП на апикальных дендритах, оказалась необходимой для поздней стадии ДВП на базальных дендритах (Sajikumar и др., 2007). Также были найдены различия в молекулярных каскадах, зависящих от оксида азота: ингибирование протеинкиназы G (PKG),

циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) и растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) при индукции ДВП в *str. oriens* выявило гораздо меньшее снижение амплитуды ответов, чем при индукции ДВП в *str. radiatum* (Son и др., 1998). Авторы статьи предполагают, что данное отличие можно объяснить тем, что в *str. oriens* не присутствует эндотелиальная NO-синтаза, которая, согласно одной работе является основным источником оксида азота в гиппокампальной ДВП (O'Dell и др., 1994). Однако эти выводы противоречат ряду других исследований, в одном из которых выяснили, что эндотелиальная NO-синтаза в *str. radiatum* преобладает из-за более высокой плотности кровяных сосудов (O'Dell и др., 1994), а в другом - что для поддержания ДВП в *str. radiatum* недостаточно заблокировать только одну форму NO-синтазы (Son и др., 1996). Вместе с тем, в последнем упомянутом исследовании нокаут обеих форм NO-синтазы вызвал падение амплитуды ответов только на апикальных дендритах, но не на базальных, что согласуется с другими данными по исследованию вовлеченности NO-синтазы в синаптическую пластичность в *str. radiatum* и *str. oriens* (Haley и др., 1996).

В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что механизм долговременной потенциации на базальных дендритах пирамидных клеток CA1 NO-независимый, однако, необходимо отметить, что в *str. oriens* все же присутствует нейрональная NO-синтаза (O'Dell и др., 1994; Blackshaw и др., 2003), а также продуцируется цГМФ в ответ на аппликацию донора NO (Bartus и др., 2013), что свидетельствует о каких-то других функциях оксида азота в *str. oriens*. Вероятно, одной из таких функций является действие оксида азота в качестве ретроградного мессенджера на ГАМКергических синапсах дендритов пирамидных клеток области CA1 (Szabadits и др., 2007). Так, рецептор NO - NO-чувствительная рГЦ - был обнаружен в интернейронах как в *str. radiatum*, так и в *stratum oriens* (Szabadits и др., 2007). При этом ДВП в интернейронах, вызванная высокочастотной стимуляцией (100 Гц, 1 сек) нарушается при блокаде работы NO-синтазы экстраклеточной аппликацией L-NAME в *stratum oriens* (Ouardouz и Lacaille, 1995). В интернейронах в *stratum lacunosum moleculare* в таких условиях ДВП вообще не формировалась (Ouardouz и Lacaille, 1995). Однако, в другой

работе блокатор NO-синтазы L-NNA не оказывал влияния на ДВП в интернейронах в *stratum oriens*, что может быть связано с другим протоколом индукции ДВП (Nicholson и Kullmann, 2014). Синаптическая пластичность в интернейронах *str. oriens* образуется преимущественно за счет активации кальций-проводящих АМПА-рецепторов (Kullmann и Lamsa, 2007; Oren и др., 2009; Nissen и др., 2010), в том числе в интернейронах, содержащих NO-синтазу (Szabo и др., 2012), в то время как кальций-проводящие АМПА рецепторы пирамидных нейронов области CA1 располагаются в основном в *str. radiatum* (Mattison и др., 2014), где участвуют в синаптической пластичности этих клеток. Таким образом, одни и те же молекулярные составляющие совершенно по-разному вовлекаются в механизмы синаптической пластичности на апикальных и базальных дендритах пирамидальных клеток поля CA1 гиппокампа.

## **2. Оксид азота и ионотропные глутаматные рецепторы.**

### **2.1. Оксид азота**

Оксид азота представляет собой газообразный нейротрансмиттер, который вместе с другими сигнальными молекулами участвует в межклеточной коммуникации и регулирует внутриклеточные процессы. Благодаря своим физико-химическим характеристикам эта небольшая молекула может свободно проходить через мембраны. NO синтезируется из L-аргинина с помощью фермента NO-синтазы; еще один продукт этой реакции - L-цитруллин (Alderton и др., 2001).

Существует три изоформы NO-синтазы: нейрональная (nNOS), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS). eNOS в первую очередь отвечает за генерацию оксида азота в эндотелии сосудов (Fish и Marsden, 2006). iNOS производит больше NO, чем другие изоформы и ее индукция обычно происходит в окислительной среде (Alderton и др., 2001; Dawson и Dawson, 2018). Согласно последним данным, существует две основные области локализации nNOS в головном мозге. nNOS значительно экспрессируется в цитоплазме некоторых

ГАМКергических нейронов коры и гиппокампа (Hardingham и др., 2013; Kubota и др., 2011). Кроме того, методом *in situ* гибридизации показано присутствие мРНК нейрональной NO-синтазы в телах пирамидных нейронов гиппокампа (Blackshaw и др., 2003), а анализ данных электронной микроскопии показал, что многие пирамидные возбуждающие нейроны содержат белок nNOS в своих дендритных шипиках (Burette и др., 2002). nNOS также была обнаружена в клетках сетчатки (Shin и др., 1999) и нейронах спинного мозга (Ху и др., 2007). Нейрональная NO-синтаза представлена несколькими вариантами сплайсинга. Длинная изоформа NOS нейронов ( $\alpha$ NOS1) содержит PDZ-связывающий домен, который способен связываться с доменом PDZ2 синаптически расположенного белка постсинаптической плотности 95 (PSD95) (Brenman, Bredt, 1996; Christopherson и др., 1999). Такое связывание способствует локализации nNOS в постсинаптической плотности. Существуют также усеченные варианты фермента, известные как  $\beta$ NOS1 и  $\gamma$ NOS1, в которых отсутствует PDZ-связывающий домен. Изоформа  $\beta$ NOS1 была обнаружена в некоторых частях мозга, в отличие от  $\gamma$ NOS1, которая не обнаруживается в головном мозге (Eliasson и др., 1997). Так, 5–10% экспрессирующих  $\alpha$ NOS1 клеток в полосатом теле и коре также экспрессируют  $\beta$ -изоформу, в то время как некоторые клетки полосатого тела экспрессируют только  $\beta$ NOS1 (Eliasson и др., 1997).

NO играет ключевую роль в поддержании гомостаза и регуляции активности гладких мышц (особенно гладких мышц кровеносных сосудов), нейронов и желудочно-кишечного тракта. Он участвует в регулировании всех аспектов нашей жизни, включая пробуждение, пищеварение, репродуктивную функцию, восприятие боли и удовольствия, память и сон. 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).

В высоких концентрациях NO токсичен, что может опосредовать развитие инсульта и ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Существует несколько обзоров участия NO в различных патологических процессах (Maher и др., 2017; Dawson и Dawson, 2018; Iadecola, 1997). Цитотоксичность, связанная с NO, в основном обусловлена пероксинитритом, который образуется в результате реакции между NO и другим свободным радикалом - супероксид-анионом. Пероксинитрит взаимодействует с липидами, ДНК и белками посредством прямых окислительных реакций или косвенных механизмов и запускает клеточные реакции, приводящие к некрозу или апоптозу клеток (Pacher и др., 2007). Участие NO в нейродегенеративных заболеваниях также важно в контексте эксайтотоксичности, которая ведет к гибели нейронов, вызванной чрезмерной активацией рецепторов глутамата. Однако эффекты NO зависят не только от концентрации. Другие факторы, в том числе тип клеток и продолжительность воздействия NO, также играют важную роль в определении эффекта оксида азота (Maher и др., 2017).

### **2.1.1 Оксид азота и синаптическая пластичность.**

Синаптическая пластичность в зрелой нервной системе включает структурные и морфологические модификации, такие как рост дендритных шипиков и синаптогенез (Mattson, 2007). Эти модификации являются клеточным ответом на изменения в активности нейронов, которые лежат в основе ДВП и считаются ответственными за обучение и память (Carlisle и Kennedy, 2005). При повторной стимуляции пресинаптических окончаний синаптическая передача усиливается на длительный срок. Основное последствие такого усиления – это приток  $Ca^{2+}$  через рецептор НМДА, расположенный на постсинаптической мембране. Для нейрональной NO-синтазы и NO, регулируемых  $Ca^{2+}$ /кальмодулином, существует потенциальная связь с таким притоком кальция после индукции ДВП.

Однако этот приток кальция не может объяснить, как события, происходящие на постсинаптической мембране, приводят к пресинаптическим изменениям во время устойчивого увеличения синаптической силы. Предполагаемый ответ

включает проницаемый через мембрану ретроградный мессенджер, который высвобождается постсинаптической клеткой и диффундирует к пресинаптическому окончанию, чтобы запустить цепь событий, связанных с ДВП. Одним из таких ретроградных мессенджеров был признан оксид азота (обзор - Huang, 1997). В первоначальных исследованиях было обнаружено, что ингибиторы NO-синтазы блокируют ДВП, и этот эффект был обратим (Schuman и Madison, 1991). Кроме того, ДВП может быть заблокирована, когда ингибиторы NO-синтазы избирательно вводятся в постсинаптические клетки через внутриклеточные регистрирующие электроды, что свидетельствует о необходимости присутствия NO во время индукции ДВП (O'Dell и др., 1991; Schuman и Madison, 1991). Эти результаты также подтверждаются исследованиями, показывающими, что гемоглобин, который связывает NO и не усваивается клетками, ослабляет ДВП при внеклеточной аппликации (Schuman и Madison, 1991).

В работе Schuman и Madison было показано, что индукция ДВП в синапсах на отдельном нейроне CA1 может усиливать синаптическую передачу в синапсах на соседнем нейроне (Schuman и Madison, 1994). При ограниченном диффузионном расстоянии оксида азота его влияние на синаптическую передачу должно быть ограничено в определенном диапазоне. Чтобы проверить эту гипотезу, Schuman и Madison сравнили синаптическое усиление нейрона и отдаленными соседними клетками. Они обнаружили, что ДВП индуцировалась в одном нейроне путем сочетания постсинаптической деполяризации с низкочастотной стимуляцией пресинаптических волокон (парный протокол индукции ДВП), когда тела клеток находились на расстоянии около 35  $\mu\text{m}$  друг от друга. Однако потенциации не было обнаружено в синапсах клеток, которые находились в среднем на расстоянии 595  $\mu\text{m}$  друг от друга. Это показывает, что усиление синаптической передачи в синапсах соседних клеток, по-видимому, ограничивается синапсами рядом с местом генерации ДВП.

Эти данные не могут подтвердить, что NO напрямую участвует в потенциации. Исследователи обнаружили, что ингибирование синтеза NO с помощью ингибитора NO-синтазы L-метиларгинина (L-Me-Arg) блокирует образование ДВП. Более того, инъекция L-Me-Arg в нейрон, подверженный парному протоколу, предотвращала усиление синаптической передачи в синапсах соседних клеток (O'Dell и др., 1991; Schuman и Madison, 1991). Эти результаты подтверждают роль NO в распределении синаптической активности.

В дополнение к этому оксид азота сам вызывает потенциацию в соседних синапсах, и возможно, что задействованы нижестоящие участники каскада. Одной из таких молекул является циклический цГМФ, роль которого, как медиатора ДВП была впервые предложена Haley и его коллегами. Было показано, что аналоги цГМФ могут частично воспроизводить эффекты NO на индукцию ДВП (Haley и др., 1992). Кроме того, высокочастотная стимуляция приводила к повышению уровня цГМФ в области CA1 гиппокампа и блокировалась ингибитором NO-синтазы (Chetkovich и Sweatt, 1993). На срезах гиппокампа, перфузированных селективными ингибиторами ПКГ, ДВП после высокочастотной стимуляции не возникало (Zhuo и др., 1994). Эти данные свидетельствуют о том, что цГМФ опосредует NO-зависимую ДВП.

ДВП имеет несколько временных фаз. Первая фаза связана с усилением возбуждающих постсинаптических потенциалов, которое сохраняется около 90 мин. Эта форма ДВП называется ранней фазой ДВП. Вторая фаза, называемая поздней фазой ДВП, связана с синаптическим усилением, которое сохраняется в течение периода времени, превышающего 90 мин. Многие исследования роли NO в ДВП были сосредоточены на ранней фазе ДВП. Однако поведенческие исследования показали, что NO участвует в задачах с обучением, некоторые из которых запоминаются в течение нескольких дней, свидетельствуя о том, что передача сигналов NO также может быть задействована в поздней фазе ДВП. Ранняя и поздняя фазы ДВП задействуют разные сигнальные пути. В области CA1 гиппокампа поздняя фаза блокируется ингибиторами или генетическим



нарушением цАМФ-зависимой протеинкиназы (РКА), тогда как ранняя фаза ДВП обычно не зависит от РКА (Abel и др., 1997; Frey и др., 1993). Дальнейшие результаты показали, что NO вносит вклад в позднюю фазу ДВП гиппокампа путем стимуляции рГЦ и PKG, которая действует параллельно с РКА, увеличивая фосфорилирование белка, связывающего элемент ответа цАМФ фактора транскрипции (CREB) (Lu и др., 1999 г.). Кроме того, было показано, что одновременная блокада синтеза NO и синтеза белка предотвращает снижение ДВП, обычно вызываемое блокадой NO (Val и др., 2017) или блокадой синтеза белка (Maltsev и др., 2019). Следует отметить, что разные протоколы стимуляции могут индуцировать NO-зависимые и «NO-независимые» формы ДВП. Интересно, что одновременная блокада рГЦ и синтеза белка не предотвращала снижение ДВП (Maltsev и др., 2019). Это предполагает, что эффект «восстановления ДВП» не опосредуется путем NO-рГЦ-PKG а, возможно, опосредуется нитрозилированием.

Однако были и некоторые противоречивые точки зрения. Использование дибутил - цГМФ лишь частично имитировало ДВП в исследовании Haley и др. (1992) и аналог цГМФ 8-бром-цГМФ сам по себе был слишком слабым, чтобы индуцировать ДВП в срезе гиппокампа (Zhuo и др., 1994). Кроме того, NO-опосредованная регуляция синаптических ответов также может включать цГМФ-независимые механизмы. Подтверждая это, некоторые исследования показали, что цГМФ не усиливает синаптическую передачу, даже в некоторых случаях подавляет постсинаптические токи и нейрональную активность (Doerner и Alger, 1988; Kleppisch и Feil, 2009). Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, прежде чем можно будет сделать какие-либо выводы.

### **2.1.2 Оксид азота и память.**

Многие исследования показали, что NO участвует в молекулярных механизмах формирования памяти (Pitsikas, 2015; Susswein и др., 2004; Sase и др., 2016). Концепция реконсолидации памяти предполагает, что вновь приобретенные воспоминания не просто объединяются один раз и затем остаются

нетронутыми навсегда, но могут быть лабильзированы путем извлечения, а затем снова консолидируются (Nader и Hardt, 2009). Многие исследования продемонстрировали на животных от моллюсков до высших позвоночных, что после предъявления определенного напоминания реактивированные «старые» воспоминания становятся лабильными и снова становятся восприимчивыми к таким амнестическим агентам, как блокаторы синтеза белка и т. д. Эту фазу стабилизации обычно называют реконсолидацией (Sara, 2000; Debiec и др., 2002). Одна из гипотез предполагает, что существуют локальные эффекты NO, генерируемого притоком  $Ca^{2+}$  через активированные рецепторы НМДА в нейронах, активируемых специфическим напоминанием (Balaban, 2018). Исследование функции NO в реконсолидации долговременной контекстной памяти у улиток (*helix lucorum L.*) показало, что, если поиск выполнялся в присутствии блокатора синтеза белка анизомицином, контекстная память была нарушена при тестировании через 24 часа и позже, тогда как извлечение при комбинированной инъекции анизомицина и ингибиторов NO-синтазы или сквенджера NO не показало ухудшения долговременной контекстной памяти. На основе сказанного выше можно заключить, что NO необходим для лабильзации/стирания консолидированной контекстной памяти (Balaban и др., 2014).

## 2.2 АМПА рецепторы.

Глутамат служит как основным возбуждающим нейротрансмиттером центральной нервной системы млекопитающих, так и ключевым нейромодулятором для управления синапсами и функциями нейронных сетей. Это функциональное разнообразие обеспечивается двумя семействами рецепторов: ионотропными рецепторами глутамата и метаботропными рецепторами глутамата. Метаботропные рецепторы глутамата модулируют возбудимость клеток и синаптическую передачу через сигнальные пути вторичных мессенджеров. Ионотропные же рецепторы глутамата обеспечивают быстрый ионный ответ, и к ним относятся АМПА, НМДА и каинатные рецепторы,

которые являются тетрамерами, проницаемыми для катионов. АМПА рецептор отвечает за быструю нейротрансмиссию и участвует в формировании зависимой от активности синаптической пластичности, которая, как считается, лежит в основе когнитивных функций высокого порядка, таких как обучение и память (Barry и Ziff, 2002; Malinow и Malenka, 2002; Bredt и Nicoll, 2003).

АМПА рецепторы экспрессируются как в нейронах, так и в глиальных клетках центральной нервной системы (Wisden и Seeburg, 1993). Большинство АМПА рецепторов представляют собой гетеротетрамеры, состоящие из субъединиц GluA1, GluA2, GluA3 и GluA4. Каждая субъединица имеет аналогичную мембранную топологию и основную структуру, содержащую около 900 аминокислот с молекулярной массой около 105 кДа. Концевая аминокислотная группа является внеклеточной и состоит из трех трансмембранных доменов, одного петлевого домена и внутриклеточного домена с карбокси-группой на конце (С-концевой домен). Этот С-концевой домен является очень вариабельной частью рецептора, который обеспечивает платформу как для белковых взаимодействий, так и для пост-трансляционных модификаций, которые регулируют зависимый от субъединицы транспорт (Henley и др., 2011; Huganir и Nicoll, 2013).

Используя методы иммунного окрашивания золотом и электронную микроскопию, Sans и коллеги показали, что количество субъединиц GluA3 в структуре АМПА рецепторов в 10 раз меньше количества субъединиц GluA1 и GluA2 (Sans и др., 2003). Lu и коллеги продемонстрировали, что ~80% синаптических АМПА рецепторов в нейронах поля CA1 гиппокампа являются гетеромерами GluA1-GluA2 (Lu и др. 2009). Однако другие исследования демонстрируют, что АМПА рецепторы в основном являются гетеромерами GluA1/GluA2 или GluA2/GluA3, с приблизительно эквивалентными количествами каждого гетеромерного комплекса в гиппокампе и коре головного мозга крыс (Kessels и Malinow, 2009). Субъединица GluA4, напротив, менее представлена в глутаматергических синапсах взрослого мозга (Zhu и др., 2000).

В мозге взрослого человека почти вся мРНК субъединицы GluA2 подвергается пост-транскрипционному редактированию, которое приводит к замене нейтральной аминокислоты глутамина положительно заряженным аргинином в полипептидной цепи субъединицы. Такая замена изменяет электрофизиологические свойства GluA2-содержащих АМПА рецепторов и делает их непроницаемыми для кальция (Higuchi и др., 1993) вследствие блокады рецепторной поры полиаминами на положительных потенциалах мембраны (Kamboj и др., 1995). АМПА рецепторы, содержащие и не содержащие GluA2, играют разные роли в синаптической пластичности, механизмах развития (Yuan и Bellone, 2013) и патологиях. Так, например, участие GluA2-содержащих АМПА рецепторов было продемонстрировано в предполагаемых механизмах болезни Альцгеймера (Alfonso и др., 2014; Reinders и др., 2016); блокирование взаимодействий субъединицы GluA2 с определенными белками ингибировало механизмы нейропатической боли (Garry и др., 2003); количество flip и flop изоформ субъединицы GluA2 уменьшается при шизофрении (Eastwood и др., 1997). Участие АМПА рецепторов, не содержащих GluA2 в патологиях в основном связано с их способностью проводить ионы кальция, что опасно для клеток при высоких концентрациях кальция. Число этих рецепторов увеличивается при эпилептическом статусе, вызванном пилокарпином (Amakhin и др., 2018; Malkin и др., 2016), инсульте и ишемии (Hanley, 2014; Li и др., 2015), когнитивных нарушениях при диабете (Wang и др., 2019), депрессии (Li и др., 2017) и боковом амиотрофическом склерозе (Yamashita и Kwak, 2014).

### **2.2.1 АМПА рецепторы и синаптическая пластичность.**

Основная форма долговременной потенциации, идентифицированная в головном мозге - это НМДА-зависимая ДВП, которая является результатом повышенной плотности АМПА рецепторов в постсинаптической мембране и/или проводимости одного АМПА канала (Huganir и Nicoll R.A., 2013, Herring и Nicoll, 2016, Poncer и др., 2002, Benke и др., 1998).

Большинство исследований механизмов ДВП было выполнено на возбуждающих синапсах между аксонами коллатералей Шаффера и дендритами пирамидных нейронов CA1 в гиппокампе (Bear и Kirkwood, 1993; Kirkwood и др., 1993; Nicoll и Roche, 2013). Хотя ДВП быстро запускается кратковременной высокочастотной стимуляцией, она сохраняется в течение нескольких дней или даже недель *in vivo*. «Ранняя фаза» ДВП, которая длится примерно 90 минут, требует активации рецепторов НМДА для её индукции вместе с последующим притоком  $Ca^{2+}$  и активацией CaMKII (Malenka и др., 1989; Malinow и др., 1989; Silva и др., 1992; Lisman, 1994; Lisman и др., 1997; Malenka и Nicoll, 1999). Кроме того, считается, что за ДВП на ранних этапах ответственна транспортировка новых АМПА рецепторов к постсинаптическим сайтам. В то же время «поздняя фаза» ДВП, которая длится дни или даже недели, требует транскрипции генов и синтеза новых белков (Schuman и др., 2006; Reymann и Frey J., 2007; Johnstone и Raymond, 2011).

Многие данные свидетельствуют о том, что индукция ДВП опосредуется постсинаптическими механизмами (Lisman и др., 2012; Granger и др., 2013; Granger и Nicoll, 2014) и требует экзоцитоза белков на постсинаптическую мембрану или рядом с ней, что приводит к увеличению количества АМПА рецепторов (Lledo и др., 1998; Lu и др., 2001; Park и др., 2004; Patterson и др., 2010; Wu и др., 2017). Первоначальные исследования показали, что введение различных агентов, которые нарушают слияние мембран в постсинаптические клетки, блокирует ДВП в синапсах коллатерали Шаффера-CA1 (Lledo и др., 1998), подразумевая, что экзоцитоз внутриклеточных везикул, несущих АМПА рецепторы, является важным этапом для ДВП. Данные электронной микроскопии показали, что эндосомные компартменты расположены в дендритах и дендритных шипиках и служат внутриклеточными хранилищами (Cooney и др., 2002). Кроме того, другое исследование показало, что синаптическая активность, которая может индуцировать ДВП, подвергает АМПА рецепторы эндоцитозу и инициирует их повторное встраивание в плазматическую мембрану (Ehlers, 2000).

### **2.2.2. Кальций-проницаемые АМПА рецепторы и синаптическая пластичность.**

Роль кальций-проводящих АМПА рецепторов, вероятно, гомомеров GluA1, в ДВП остается спорной. В большинстве синапсов глутаматергических нейронов количество КП-АМПА рецепторов очень низкое. Однако было показано, что КП-АМПА каналы присутствуют в перисинаптических сайтах и могут быстро встраиваться в синапсы сразу после индукции ДВП, внося вклад в усиление синаптического входа  $Ca^{2+}$  (He и др., 2009, Plant и др., 2006, Guire и др., 2008, Yang и др., 2010).  $Ca^{2+}$ , который входит через КП-АМПА рецепторы, затем участвует во встраивании GluA2-содержащих АМПА каналов в клеточную мембрану. Несколько исследований подтвердили, что индукция ДВП в нейронах CA1 гиппокампа 3-недельных крыс вызывает первоначальное встраивание гомомерного GluA1 в постсинаптическую мембрану. Эксперименты с использованием филантотоксина-433 (PhTX-433), который избирательно блокирует GluA2-несодержащие АМПА рецепторы (Washburn и Dingledine, 1996), показали, что применение PhTX-433 во время и сразу после индукции ДВП предотвращает её. Однако PhTX 433 не оказывал эффекта после стабилизации ДВП, указывая на то, что ДВП требует временного включения КП-АМПА рецепторов, которые затем заменяются на GluA2-содержащие АМПА рецепторы (Plant и др., 2006; Yang и др., 2010; Jaafari и др., 2012). Другие исследования опровергли это наблюдение (Adesnik и Nicoll, 2007, Gray и др., 2007). Таким образом, вопрос о том, включаются ли КП-АМПА рецепторы во время ДВП, как и в какой степени, остается активной областью исследований.

Помимо ДВП, в нескольких исследованиях сообщалось о специфическом перемещении КП-АМПА рецепторов во время долговременной депрессии (ДВД). Например, избирательное удаление КП-АМПА рецепторов опосредует специфическую форму индуцированной деполяризацией ДВД, которая встречается только в неонатальных синапсах (Ho и др., 2007). Более того, хотя присутствие КП-АМПА рецепторов в непотенцированных нейронах гиппокампа

остается спорным, сообщалось, что удаление внесинаптических КП-АМПА рецепторов в пирамидных нейронах CA1 связано с ДВД (He и др., 2009).

Пост-трансляционные модификации играют решающую роль в транспорте АМПА рецепторов. Фосфорилирование GluA1 несколькими киназами (такими как РКА, протеинкиназа С (PKC) и CaMKII) в разных сайтах (таких как Ser 845, 831 и 818) увеличивает транспортировку и захват комплекса страгазин-PSD95 в постсинаптическую плотность, а также модулируют биофизические характеристики АМПА каналов.

Фосфорилирование серинов S831 и S845 субъединицы GluA1 тесно связаны с ДВП (Huganir и Nicoll, 2013; Lee и др., 2003; Barria и др., 1997; Lee и др., 2000). НМДА-зависимая ДВП требует притока  $Ca^{2+}$ , что приводит к активации CaMKII и РКС, которые непосредственно фосфорилируют S831, увеличивая проводимость гомомеров GluA1 и способствуя перемещению GluA1 в постсинаптическую плотность (Mammen и др., 1997, Barria и др., 1997a, Derkach и др., 1999, Kristensen и др., 2011, Barria и др., 1997b). РКА может активироваться  $Ca^{2+}$ -чувствительной аденилатциклазой или нейромодуляторами, передающих сигналы через их  $G\alpha_s$ -сопряженные рецепторы, такие как  $\beta$ -адренергический рецептор или дофаминовые рецепторы D1-типа, что приводит к фосфорилированию GluA1 в S845 (Joiner и др., 2010, Sun и др., 2005). Фосфорилирование S845 увеличивает вероятность открытия одного канала, а также способствует интернализации или удержанию GluA1 на поверхности клетки (Banke и др., 2000, Oh и др., 2006, Man и др., 2007). У мышей, содержащих knock-in мутации в S831 и S845, которые устраняют фосфорилирование этих сайтов, отсутствует долговременная депрессия и они имеют частично нарушенную ДВП в гиппокампе (Lee и др., 2003). Фосфорилированная фракция GluA1 может увеличиваться вплоть до 50% при сильной стимуляции РКС/РКА. Содержание мышей в обогащенной среде значительно увеличивает количество субъединиц GluA1 фосфорилированных в S831/S845 (Diering и др., 2016). Нейромодуляторы, такие как норадреналин, могут снижать порог долговременной потенциации, и этот эффект блокируется

GluA1-фосфо-дефицитными нокаутными мутациями S831A/S845A (Hu и др., 2007), тогда как нокаутные мутации S831D/S845D с фосфомиметиком GluA1 демонстрируют пониженный порог ДВП, который блокирует действие норадреналина (Makino и др., 2011). Эти результаты, вместе с несколькими предыдущими исследованиями, подтверждают модель, в которой PKA-опосредованное фосфорилирование GluA1 в S845 способствует переносу рецептора на поверхность, снижая порог, необходимый для индукции ДВП, однако требуется дополнительная передача сигналов от CaMKII, чтобы способствовать перемещению GluA1 в постсинаптическую плотность для максимальной ДВП (Sun и др., 2005, Oh и др., 2006, Esteban и др., 2003).

Хотя ДВП на синапсах коллатерали Шаффера-CA1 была нормальной у мышей, содержащих одиночные knock-in мутации в сайтах S831A или S845A (Lee и др., 2010), потенцирование в других синапсах оказалось чувствительным к мутациям в любом из этих сайтов. Серотонин и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина увеличивают фосфорилирование сайта S831 и вызывают синаптическую потенцию в темпорааммоническом пути CA1 гиппокампа. Это усиление, а также эффекты селективных ингибиторов обратного захвата серотонина отсутствуют у мышей GluA1 S831A (Cai и др., 2013), в то время как обработка кетаминем, который использовался как быстродействующий антидепрессант, требует фосфорилирования GluA1 в S845 для его эффекта (Zhang и др., 2017). Таким образом, хотя фосфорилирование GluA1 S831 или S845 явно вовлечено в механизмы ДВП, строгие требования к каждому сайту, а также синергические эффекты двойного фосфорилирования, вероятно, специфичны для синапсов и индукции ДВП.

Другие пост-трансляционные модификации GluA1 также участвуют в механизмах ДВП, но они не были изучены систематически. Было обнаружено, что S-нитрозилирование GluA1 в S875 с помощью нейрональной NO-синтазы усиливает фосфорилирование GluA1 S831 через CaMKII (Selvakumar и др., 2013), предполагая дополнительную синергическую взаимосвязь между



фосфорилированием S831 и нитрозилированием C875. Первая внутриклеточная петля GluA1 может быть фосфорилирована киназой II $\beta$  в S579, чтобы способствовать транспортировке на поверхность (Lussier и др., 2014). Однако, играют ли эти пост-трансляционные модификации GluA1 роль в ДВП, еще предстоит выяснить. Активность нейронов также может вызывать убиквитинирование АМПА рецепторов (Widagdo и др., 2015), хотя роль этой модификации АМПА рецепторов в ДВП неизвестна. Интересно, что убиквитинирование и фосфорилирование GluA1 взаимно ингибируют друг друга (Guntupalli и др., 2017).

Становится все более очевидным, что пластичность КП-АМПА рецепторов также происходит во время различных поведенческих парадигм *in vivo*. Так, стимуляция единичных вибрисс в отсутствие соседних вибрисс усиливает ответы интактных вибрисс в неокортексе и приводит к усилению возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) за счет включения КП-АМПА рецепторов (Clem и Barth, 2006). Механизмы аддикций также связаны с транспортом КП-АМПА рецепторов. В глутаматергических синапсах вентральной тегментальной области однократное введение кокаина активирует встраивание КП-АМПА рецепторов в мембрану, связанное с белком, взаимодействующим с РКС 1 (PICK1) (Bellone и Lüscher, 2005; Bellone и Lüscher, 2006). В экспериментах с выработкой условного-рефлекторного замирания условный раздражитель (например, звук) сочетается с неблагоприятным раздражителем (например, удар током). После обучения реакция замирания вызывается только на условный раздражитель. Это требует фосфорилирования GluA1 в S845 и встраивания КП-АМПА рецепторов в таламические синапсы на нейронах миндалины (Clem и др., 2010a). Угасание условной реакции происходит через метаботропный рецептор глутамата 1 (mGluR1) - опосредованное удаление КП-АМПА рецепторов из этих синапсов (Clem и др., 2010b). Кроме того, в работе Ingie Hong и коллег (Hong и др., 2013) была продемонстрирована важность КП-АМПА рецепторов для процесса реконсолидации памяти: они показали, что во время реактивации

замирания происходит кратковременная замена кальций-непроницаемых АМПА каналов на кальций-проницаемые.

В другом исследовании было показано, что КП-АМПА рецепторы присутствуют в возбуждающих синапсах на нейронах пятого слоя коры у мышей во время их активной фазы в ночное время, но эти КП-АМПА рецепторы пропадают во время сна в течение дня (Lante и др., 2011). Поскольку большая часть исследований проводится во время световой фазы, когда КП-АМПА рецепторы менее распространены, это открытие предполагает, что некоторые разногласия относительно КП-АМПА рецепторов также могут быть связаны с влиянием разных факторов, например, времени суток.

### **2.3 Оксид азота и АМПА рецепторы.**

Было показано, что производство NO нервными клетками в ответ на возбуждающие стимулы требует притока  $Ca^{2+}$ , что означает, что активность NO-синтазы зависит от кальция и кальмодулина (Förstermann и Sessa, 2012). Основным постсинаптическим стимулом для образования NO является активация рецепторов глутамата и соответствующий приток  $Ca^{2+}$ . Произведенный NO может дополнительно модифицировать глутаматные каналы, вызывая значительные изменения их биохимических и электрофизиологических свойств. NO может модулировать ионотропные рецепторы глутамата прямым или непрямым путем (Ahern и др., 2002). Прямой путь включает S-нитрозилирование АМПА рецепторов и НМДА рецепторов и связанных с ними белков. Непрямой путь воздействия NO начинается со стимуляции рГЦ, что приводит к увеличению продукции цГМФ и активации цГМФ - зависимых протеинкиназ (Bredt и Snyder, 1989). NO также может косвенно контролировать транспортировку субъединиц АМПА рецепторов с помощью различных вспомогательных белков.

#### **2.3.1 Непрямой путь**

Одним из возможных путей NO-опосредованной интернализации субъединиц АМПА рецепторов в нейрональную мембрану является непрямым цГМФ-зависимый каскад (рис. 1). Было показано, что он отвечает за встраивание субъединицы GluA1 и, возможно, может влиять на PKA-зависимое встраивание GluA1 во время синаптической пластичности. Субъединица GluA1 имеет длинный цитозольный хвост из ~ 80 аминокислот, который обеспечивает сайт связывания для белков и несет на С-конце связывающий мотив PDZ класса I (Traynelis и др., 2010). Цитозольные связывающие белки включают четыре белка домена PDZ: SAP97 (Leonard и др., 1998), mLin-10 (Stricker и Huganir, 2003), Shank3 (Uchino и др., 2006) и нексин 27 (Wang и др., 2013). Кроме того, этот терминальный домен связывается не-PDZ-связями с цитоплазматическими белками, включая PKG, которая регулирует встраивание субъединицы GluA1 в синаптическую мембрану, предположительно, NO-зависимым образом. NO активирует рГЦ, которая инициирует образование цГМФ, а одной из мишеней цГМФ является PKG (Francis и др., 2010). Затем PKG фосфорилирует GluA1 по сайту S845, инициируя встраивание этой субъединицы в мембрану (Serulle и др., 2007; Incontro и др., 2013). Кроме того, стимуляция КП-АМПА рецепторов в нейронах полосатого тела вызывала активацию нейрональной NO-синтазы и продукцию цГМФ, что также приводило к фосфорилированию S845 и встраиванию рецептора в мембрану (Tukey и Ziff, 2013).

S845 GluA1 также является мишенью для фосфорилирования цАМФ-зависимой протеинкиназой (PKA) и также контролирует включение GluA1 в синаптическую мембрану (Roche и др., 1996). Ингибирование PKA снижает активность NO-синтазы и нарушает функционирование пути глутамат-NO-цГМФ (Cabrera-Pastor и др., 2016), что в норме может приводить к встраиванию субъединицы GluA1. Следовательно, можно предположить, что PKA и PKG действуют параллельно. Иногда они действуют именно так (Lu и др., 1999); однако увеличение количества цГМФ за счет активности нейрональной NO-синтазы сдерживает индукцию PKA-зависимой формы ДВП, индуцированной

специфическими паттернами синаптической стимуляции (Makhinson и др., 2006). Более того, другой паттерн стимуляции индуцирует РКА-зависимую ДВП, которая также требует включения КП-АМПА рецепторов (Park и др., 2016). Принимая во внимание тот факт, что как путь цГМФ-РКГ, так и РКА-зависимое фосфорилирование S845 регулируют встраивание субъединицы GluA1, можно предположить, что активность NO специфически регулирует механизмы ДВП, индуцированной различными типами протоколов стимуляции.

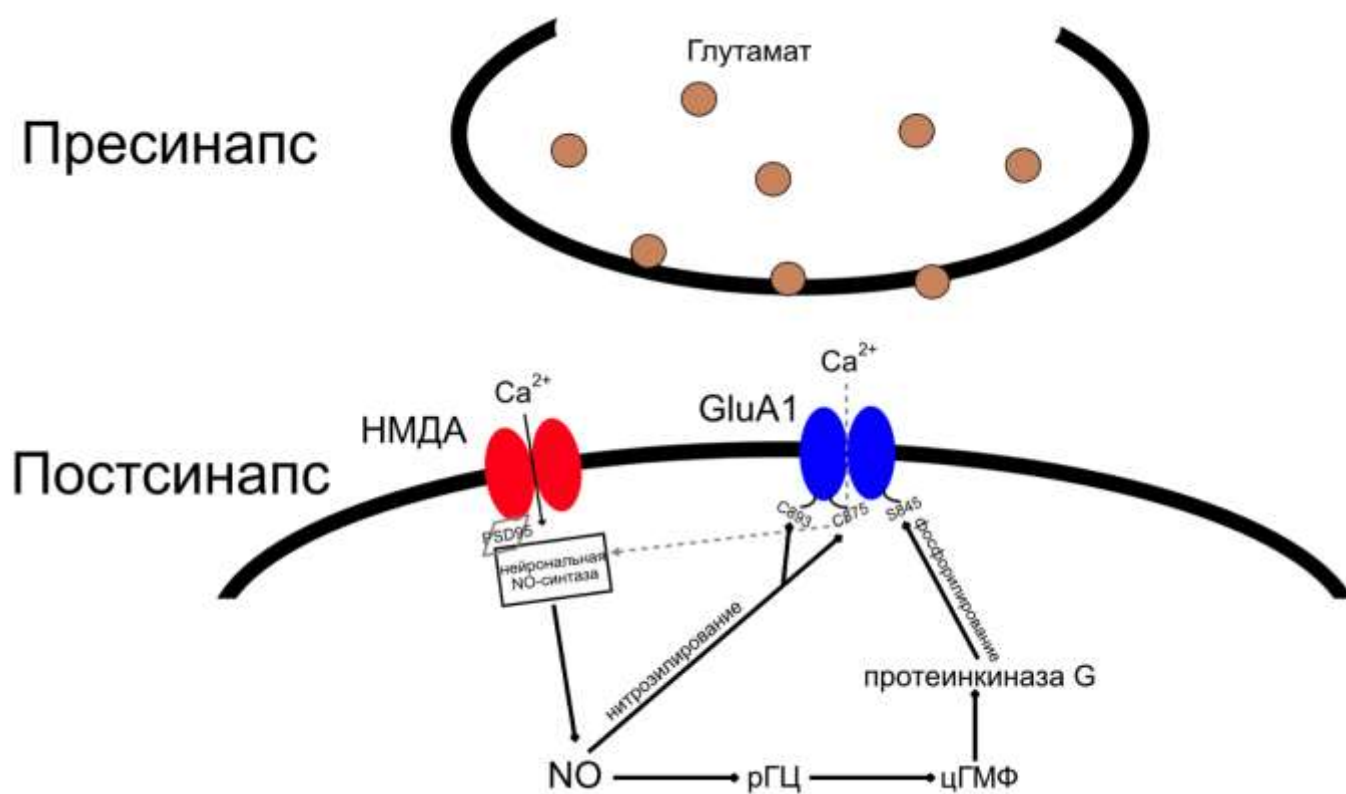


Рисунок 1. Схематическое изображение непрямого пути, зависящего от циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), и прямого нитрозилирования GluA1 АМПА рецептора, регулирующего его встраивание в синаптическую мембрану. Приток кальция через NMDA рецепторы или кальций-проницаемые АМПА рецепторы активирует нейрональную NO-синтазу с образованием оксида азота (NO), который может непосредственно нитрозилировать C893 GluA1 или C875, вызывая встраивание субъединицы в мембрану или фосфорилируя S845 GluA1 посредством активации пути растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) – цГМФ – протеинкиназы G.

### 2.3.2. Нитрозилирование

NO также регулирует субъединицу GluA1 прямым путем - S-нитрозилированием. S-нитрозилирование - это физиологически важное ковалентное связывание NO с тиоловой группой цистеина, которое изменяет физиологическую функцию белка. Было показано, что он играет большую роль в передаче сигналов и регуляции глутаматергических синапсов путем модуляции ионных каналов, слияния мембран, деления и компарментализации; или опосредованной протеазой деградации белка. Подробнее о S-нитрозилировании см. обзор (Tegeeder и др., 2011). Группа исследователей показала, что сайт цистеина-893 субъединицы GluA1 может подвергаться S-нитрозилированию, и с помощью ко-преципитации были получены данные, свидетельствующие о том, что субъединица GluA1 связана с нейрональной NO-синтазой через белок SAP97 (von Ossowski и др., 2017). Эти данные могут объяснить результаты другого исследования, в котором авторы обнаружили, что избыточная экспрессия SAP97 в синапсах культивируемых нейронов гиппокампа также увеличивает уровни PSD-95 и нейрональной NO-синтазы (Poglia и др., 2011).

Другое исследование продемонстрировало сигнальный каскад, ведущий к увеличению проводимости АМПА рецепторов и их эндоцитозу: приток кальция через НМДА рецепторы стимулирует нейрональную NO-синтазу вырабатывать NO, который нитрозилирует GluA1 в сайте C875. Это событие способствует фосфорилированию сайта S831, что приводит к увеличению проводимости канала. Кроме того, приток кальция через НМДА рецепторы регулирует эндоцитоз GluA1 путем связывания нитрозилированного GluA1-C875 с белком AP2 эндоцитотического аппарата (Selvakumar и др., 2013).

Таким образом, S-нитрозилирование является дополнительным путем модуляции субъединиц АМПА рецепторов (рис. 1), во время которого цистеины GluA1 (C893 и C875) модифицируются с помощью NO, влияя на проводимость канала и эндоцитоз субъединицы. Пока это было продемонстрировано только для субъединицы GluA1. S-нитрозилирование также может регулировать транспорт

АМПА рецепторов путем модификации ассоциированных белков, которые мы обсудим ниже.

### 2.3.3 Белок-белковые взаимодействия

Встраивание АМПА рецепторов в синаптическую мембрану зависит не только от состояния самого рецептора, но и от взаимодействия с различными связывающими белками. Например, NO участвует в регуляции встраивания субъединицы GluA2 в мембрану путем нитрозилирования N-метилмалеимид-чувствительного фактора (NSF). S-нитрозилирование NSF регулирует экзоцитоз в клетках (Matsushita и др., 2003) и, в частности, усиливает связывание NSF с GluA2, тем самым увеличивая поверхностную экспрессию этой субъединицы (Huang и др., 2005). Когда NSF не связан с C-терминалями GluA2 и GluA4, амплитуда миниатюрных ВПСТ резко падает, подтверждая роль NSF в функционировании и распределении АМПА рецепторов в мембране (Song и др., 1998). Благодаря АТФазной активности NSF (Hanley и др., 2002) это, вероятно, вызывает декластеризацию комплекса GluA2-PICK1, что приводит к высвобождению GluA2-содержащих АМПА рецепторов (Hanley и др., 2002; Sossa и др., 2007). Кроме того, уже было показано, что PICK1 и NSF необходимы для встраивания субъединицы GluA2, по крайней мере, во время пластичности, связанной с перестройкой кальций-проницаемых и кальций-непроницаемых АМПА рецепторов (Gardner и др., 2005). Можно предположить, что тот же механизм также задействован во время ДВП у GluA1<sup>-/-</sup> мышей, поскольку долговременная потенция у этих мышей зависит от NO-синтазы (Phillips и др., 2008; Hardingham и Fox, 2006); точнее – от  $\alpha$ NOS1 (Dachtler и др., 2011).

Что касается eNOS, то было высказано предположение, что eNOS может производить тонический уровень NO, который также влияет на пластичность (Hopper и Garthwaite, 2006). Кроме того, фосфорилирование нейрональной NO-синтазы по сайту S1412 протеинкиназой B (Akt) увеличивает количество GluA2-содержащих АМПА рецепторов на поверхности мембраны, вероятно, модулируя активность этого фермента и, следовательно, продукцию NO (Rameau и др., 2007).

Хотя последнее исследование не анализировало нитрозилирование NSF, результаты подтверждают участие NO в распределении GluA2 в мембране. Интернализация GluA2, опосредованная NSF, может иметь решающее значение для разработки лекарств, поскольку усиление взаимодействий NSF – GluA2 в прилежащем ядре после отмены подачи кокаина ослабляет проявление поведенческой сенсibilизации и служит негативным регуляторным механизмом у животных, подвергшихся воздействию наркотиков (Lu и др., 2014).

Нитрозилирование также может влиять на белки, связанные с субъединицей GluA1. К ним относятся, например, белки семейства TARP (трансмембранные регуляторные белки АМПА рецептора), одним из которых является старгазин (TARP гамма 2) (Nicoll и др., 2006). Взаимодействие АМПА рецепторов со старгазином регулирует как локализацию рецептора на синаптической мембране, так и электрофизиологические свойства рецепторов, такие как проводимость и скорость десенсibilизации (Chen и др., 2000; Díaz, 2010). Было показано, что NO может нитрозировать старгазин по цистеину-302. Нитрозилирование старгазина увеличивает его связывание с GluA1 и усиливает экспрессию субъединицы на поверхности (Selvakumar и др., 2009). Стимуляция НМДА рецепторов ведет к нитрозилированию старгазина и его взаимодействия с GluA1 NO-зависимым образом (Selvakumar и др., 2009). Этот механизм также может быть вовлечен в активацию АМПА рецепторов во время сенсibilизации к кокаину, поскольку животные, получавшие инъекции кокаина, демонстрировали повышенную поверхностную экспрессию старгазина и GluA1 (Selvakumar и др., 2014).

Более того, некоторые исследования выявили другие белки-мишени нитрозилирования, которые влияют на количество определенных субъединиц АМПА рецепторов в мембране. S-нитрозилирование белка p35 приводит к снижению активности циклин-зависимой киназы 5 (Cdk5) (Zhang и др., 2010), что влечет за собой убиквитинирование белка PSD-95 (Bianchetta и др., 2011). По другим данным, этот процесс приводит к увеличению количества субъединиц GluA1 в синаптической мембране (Zhang и др., 2015). Вероятно, что

интернализация GluA1 в этом механизме происходит из-за убиквитинирования PSD95, которое регулирует поверхностную экспрессию как GluA1, так и GluA2 (Colledge и др., 2002). Используя различные методы, было показано, что NO регулирует убиквитин-зависимую деградацию белков (Bal и др., 2017; Kwak и др., 2010). Убиквитин-зависимая деградация белков, в свою очередь, влияет на транспорт субъединиц GluA1 и GluA2 АМПА рецепторов (Widagdo и др., 2017), и, возможно, путь p35-Cdk5 является звеном, завершающим картину внутриклеточных убиквитин-зависимых каскадов.

Большое количество доказательств демонстрирует, что активация нейрональной NO-синтазы может вызывать фосфорилирование CREB (Peunova и Epikolopov, 1993; Luo и Zhu, 2011; Riccio и др., 2006). Во время ДВП оксид азота стимулирует рГЦ и PKG, которые действуют параллельно с PKA, увеличивая фосфорилирование CREB (Lu и др., 1999). CREB - это фактор транскрипции, который связывается с элементом цАМФ-ответа (CRE), специализированным участком ДНК, который находится в регуляторной области множества генов. События на нейрональной мембране, которые стимулируют внутриклеточные сигнальные каскады, вызывают фосфорилирование CREB и активируют его. Затем фосфорилирование CREB активирует каскад событий, который включает рекрутирование связанных белков, таких как CREB-связывающий белок, что позволяет ему включать или выключать определенные гены (Mayr и Montminy, 2001). Способность CREB изменять экспрессию генов опосредует механизмы, связанные с различными пато- и физиологическими состояниями, такими как зависимость, депрессия, улучшение памяти и т. д. (обзор Carlezon и др., 2005). Таким образом, было продемонстрировано, что фосфорилирование CREB необходимо для вызванных обучением изменений субъединицы GluA1 АМПА рецепторов в постсинаптической плотности (PSD), в то время как оно не влияет на уровни субъединиц GluA2 / GluA3 (Middei и др., 2013). В соответствии с этим фактом весьма вероятно, что NO способствует встраиванию по крайней мере субъединицы GluA1 посредством фосфорилирования CREB. Активация CREB не



контролирует экспрессию гена GluA1 (Middei и др., 2013), хотя она, возможно, регулирует транскрипцию других белков, участвующих в транспортировке АМПА рецепторов, таких как нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) или немедленный ранний ген Arc (Carvalho и др., 2008; Bramham и др., 2008). Таким образом, медиаторы такой NO-зависимой активации CREB остаются неизвестными.

Дополнительными компонентами NO-зависимых каскадов являются внеклеточно регулируемые киназы 1 и 2 (ERK1/2) - подсемейство, которые контролируют эмбриогенез, дифференцировку клеток, пролиферацию и гибель клеток (Pearson и др., 2001). Например, в клетках Пуркинье мозжечка крыс NO и PKG усиливают фосфорилирование ERK1/2 и способствуют декластеризации комплекса GluA2/3 АМПА рецепторов (Endo и Launey, 2003). NO может активировать ERK1/2 либо через активацию мономерного белка G, Ras (Deora и др., 2000), либо через активацию пути рГЦ-цГМФ-PKG (Zaragoza и др., 2002). Последний путь NO-цГМФ-PKG, как было показано, регулирует фосфорилирование CREB в гиппокампе частично путем воздействия на ERK как вышестоящую киназу (Lu и др., 1999); следовательно, ERK1/2, по-видимому, является дополнительным компонентом NO-зависимого каскада, описанного выше, ведущего к активации CREB и регулирующего поверхностную экспрессию GluA1. Что касается первого пути Ras-ERK1/2, группа исследователей предположила, что он действует одновременно с CaMKII, и связь между NO-синтазой и ERK1/2 появляется только во время процессов обучения и формирования памяти (Moosavi и др., 2014). Предыдущие исследования также подтвердили связь между путями NO и ERK во время индукции ДВП (Ping и Schafe, 2010). Более того, сообщалось, что активированный CaMKII стимулирует Ras-ERK (Lisman и др., 2012). Путь Ras-ERK, в свою очередь, регулирует зависимый от активности экзоцитоз рецепторов АМПА (Patterson и др., 2010). Таким образом, ERK1/2 может быть элементом другого возможного NO-зависимого каскада, который приводит к встраиванию субъединицы GluA1 в

мембрану посредством активности CaMKII. По-видимому, этот каскад активируется при формировании памяти. Хотя прямая связь между NO и ERK1/2-опосредованным включением GluA1 требует дополнительных доказательств.

Таким образом, помимо прямого нитрозилирования и непрямого гГМФ-зависимого пути, существует несколько белок-белковых взаимодействий, в которых модуляция с помощью NO регулирует транспорт субъединиц AMPA рецепторов. К ним относятся S-нитрозилирование NSF, старгазина, p35 и сложный путь, который мы суммировали на рисунке 2.

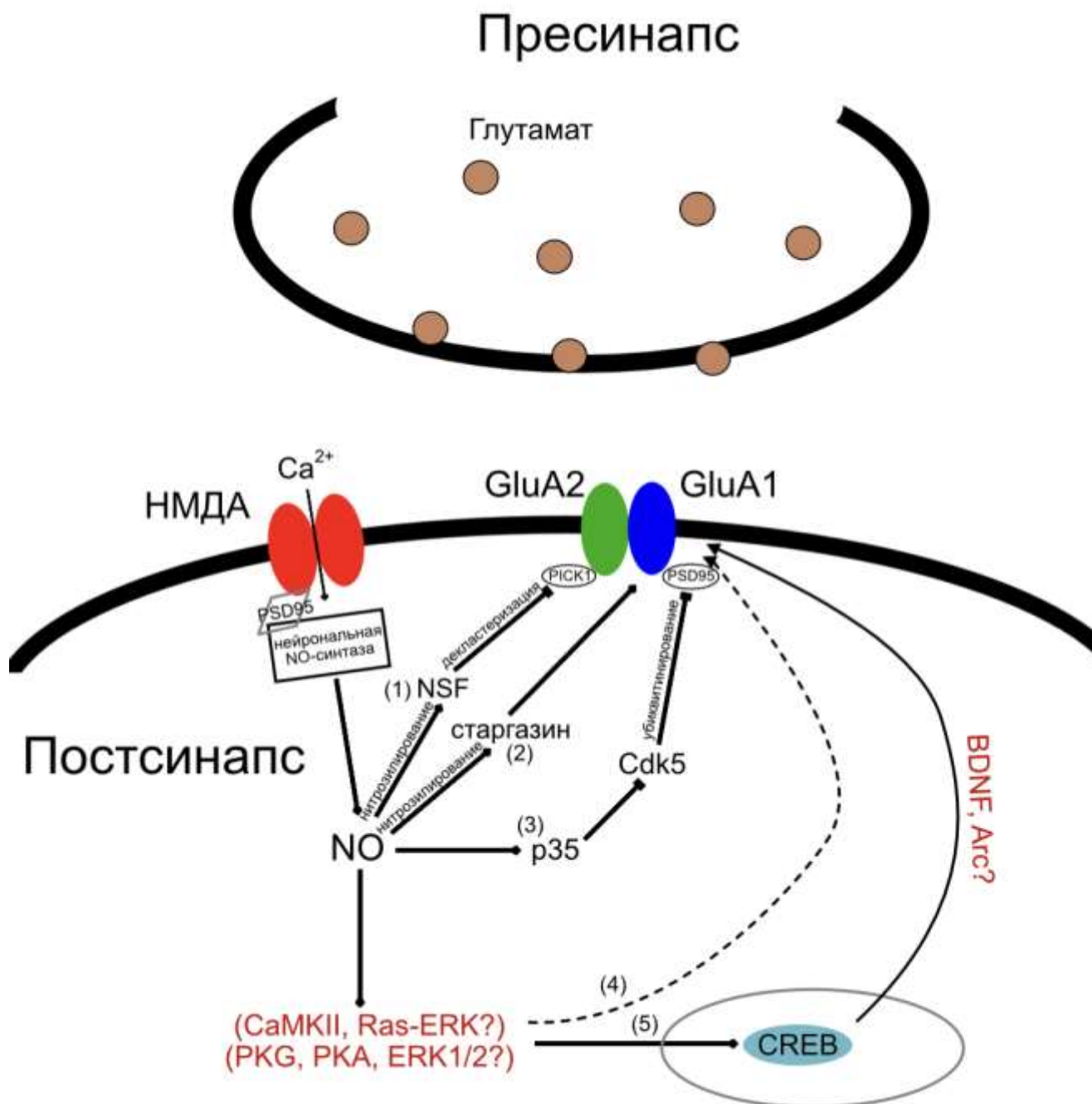


Рисунок 2. Предлагаемая модель NO-зависимых белок-белковых взаимодействий, лежащих в основе транспортировки субъединиц GluA1 и GluA2. Красный текст и черная пунктирная линия обозначают каскады, требующие дополнительных доказательств. (1) S-нитрозилирование NSF, вызывает декластеризацию комплекса PICK1-GluA2, который способствует встраиванию в мембрану GluA2-содержащих рецепторов АМПА рецепторов; (2) нитрозилирование старгазина увеличивает его связывание с GluA1 и усиливает поверхностную экспрессию субъединицы; (3) NO нитрозилирует белок p35, что приводит к снижению активности фермента циклин-зависимой киназы 5 (Cdk5). Этот процесс приводит к увеличению количества субъединиц GluA1 в синаптической мембране, вероятно, за счет убиквитинирования белка постсинаптической плотности 95 (PSD-95); (4) потенциальный NO-зависимый каскад, приводящий к встраиванию GluA1. Связь между NOS и путем Ras-ERK может появляться во время ДВП возможно, через активацию CaMKII; (5) дополнительный предполагаемый путь встраивания GluA1, CREB. NO через ряд возможных белков способствует фосфорилированию CREB, что, в свою очередь, увеличивает экспрессию GluA1 в мембране.

Интересно, что в то время как продукция NO приводит к изменениям в составе субъединиц АМПА рецепторов и поверхностной экспрессии через несколько биохимических каскадов, АМПА рецепторы сами могут влиять на синтез NO. Например, на срезах гиппокампа с помощью индикатора NO было показано, что даже при заблокированных НМДА рецепторах уровень ионов кальция в клетке достаточен для запуска активности нейрональной NO-синтазы, так как количество свободного NO было больше, чем в случае одновременной блокады НМДА и АМПА рецепторов. Более того, блокада кальций-проницаемых АМПА рецепторов с помощью PhTx-433 снижает продукцию NO (Frade и др., 2009), что напрямую указывает на зависимость NO-синтазы от свободных ионов кальция, поступающих не только через каналы НМДА, но и через проницаемые для кальция АМПА рецепторы. Этот АМПА-индуцированный приток кальция, вероятно, происходит через потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа (VDCC) (Giesen и др., 2020). Последнее было продемонстрировано с использованием трансгенных мышей, экспрессирующих индикатор цГМФ на основе резонансного переноса энергии Фёрстера (FRET), для анализа ответов цГМФ, индуцированных NO или глутаматергическими агонистами в

культивируемых нейронах гиппокампа и коры. В этом исследовании, помимо хорошо установленных НМДА-индуцированных ответов цГМФ, глутаматергический агонист АМПА независимо индуцировал сигналы цГМФ в нейронах гиппокампа и коры головного мозга, запуская VDCC-зависимый приток  $\text{Ca}^{2+}$  (Giesen и др., 2020). Это открытие согласуется с предыдущими исследованиями, демонстрирующими, что нейрональная NO-синтаза может быть активирована притоком  $\text{Ca}^{2+}$  через VDCC (Pigott и Garthwaite, 2016) и КП-АМПА рецепторы (Socodato и др., 2012). Этот постсинаптический приток кальция может также опосредовать активацию нейрональной NO-синтазы в постсинапсе и определять пресинаптическую пластичность, зависящую от времени возникновения потенциала действия в глутаматергических синапсах ядра дорсального шва через путь цГМФ/PKG. Эта пластичность не зависит от рецепторов НМДА, но требует активации рецепторов КП-АМПА и VDCC (Haj-Dahmane и др., 2017). Также было показано, что АМПА рецепторы могут влиять на NO-зависимые каскады в клетках сетчатки, которые мы обсудим в следующем параграфе.

#### **2.3.4 Оксид азота и АМПА рецепторы в сетчатке глаза как пример взаимодействия.**

В зрительной системе NO участвует в обработке зрительной информации от сетчатки к высшим зрительным центрам. Существует исчерпывающий обзор Lima и др. обсуждающий роль NO в зрительной системе (Lima и др., 2014). В клетках сетчатки было показано, что не только NO влияет на экспрессию субъединиц АМПА рецепторов, но также, что сами каналы могут влиять на продукцию NO. Мы обсуждаем сетчатку отдельным параграфом и рассматриваем механизмы взаимодействия NO и АМПА рецепторов в ее клетках, потому что эти взаимодействия хорошо отражают многофункциональность NO даже в такой строго специализированной группе клеток. В сетчатке NO-синтаза присутствует в различных типах клеток, включая пигментный эпителий (Bredt и др., 1990), фоторецепторы, клетки Мюллера, горизонтальные, биполярные, амакринные и

ганглиозные клетки (Yamamoto и др., 1993). В этих клетках NO первоначально модулирует сигнал, обычно изменяя уровень цГМФ (Lima и др., 2014). Таким образом, некоторые исследования продемонстрировали участие NO через активацию пути рГЦ-цГМФ-PKG, действующего как модулятор временных свойств глутаматного ответа (Vielma и др., 2014; Vielma и Schmachtenberg, 2016). Перфузия переживающих срезов сетчатки крысы предшественником NO L-аргинином укорачивала зависимый от АМПА рецептора компонент глутаматного ответа и не изменяла зависимый от каинатного рецептора компонент в биполярных клетках (Vielma и др., 2014). Кроме того, путь NO/цГМФ модулирует АМПА рецепторы в культивируемых горизонтальных клетках, снижая их чувствительность к агонистам (McMahon и Ponomareva, 1996). Позже эксперименты с методом линейного увеличения концентрации показали, что этот эффект обусловлен снижением аффинности АМПА рецепторов к глутамату за счет NO. В этих экспериментах NO одновременно увеличивал максимальный ток АМПА рецепторов при высоких концентрациях глутамата, предполагая, что NO является кандидатом на опосредование адаптационных изменений в нейронах и синапсах сетчатки (McMahon и Schmidt, 1999). Точный механизм такой модуляции остается неизвестным.

В нейронах сетчатки соединение NO-GluA1 может одновременно влиять на апоптоз и жизнеспособность клеток: передача сигналов, опосредованная активацией КП-АМПА рецепторов, повышает активность нейрональной NO-синтазы и модулирует продукцию NO, что приводит к гибели клеток (Socodato и др., 2012). Однако NO повышает активность CREB через путь PKG (Socodato и др., 2009), а длительное фосфорилирование CREB предотвращает апоптоз клеток, вызванный КП-АМПА-опосредованной эксайтотоксичностью (Park и др., 2015).

В дополнение к этому защитному эффекту CREB через образование NO, та же самая КП-АМПА-зависимая активация нейрональной NO-синтазы способна вызывать гибель клеток за счет активации другого важного белка - нерцепторной тирозинкиназы Src. Src имеет два специфических сайта фосфорилирования,

которые регулируют его активность в клетке - Tyr416 и Tyr527. Когда Tyr416 фосфорилируется с помощью Shp-1 (тирозинфосфатаза 1, содержащая домен области 2 гомологии Src) или с помощью Shp-2, Src оказывается в своей активной конформации, что приводит к полной каталитической активации (Roskoski, 2005). Повышенные уровни NO посредством цГМФ- и PKG-зависимым образом индуцируют фосфорилирование Src в сайте Tyr416 и дефосфорилирование по Tyr527, что приводит к активации Src и апоптозу в культивируемых нейронах сетчатки (Socodato и др., 2012). В этом механизме ERK действует как нижележащая мишень для AMPA-индуцированной активации Src и передачи сигналов NO (Socodato и др., 2012; Mejía-García и др., 2013). Интересно, что в одном исследовании было показано, что активация ERK вызывает описанное выше фосфорилирование CREB (Socodato и др., 2009), что предотвращает эксайтотоксичность, вызванную CP-AMPA (Park и др., 2015), тогда как в другом исследовании фосфорилирование ERK через тот же каскад NO-PKG - механизм участвует апоптоз клеток сетчатки (Socodato и др., 2012). По-видимому, в этом каскаде присутствуют дополнительные белки, определяющие судьбу клетки.

Подводя итог, в клетках сетчатки NO может одновременно служить модулятором сигнала АМПА рецепторов и участвовать в молекулярных каскадах, приводящих к гибели клетки или к ее выживанию во время эксайтотоксичности, вызванной с КП-АМПА рецепторами. Дальнейшее изучение этих взаимодействий может способствовать пониманию молекулярных механизмов зрения.

### **2.3. Полиамины и оксид азота**

На внутренней стороне мембраны кальций-проводящие АМПА рецепторы могут блокироваться полиаминами, такими как спермин и спермидин. При положительном мембранном потенциале полиамины блокируют выходящие токи, формируя выпрямленную кривую вольт-амперной характеристики для этих рецепторов (Bowie и Mayer, 1995; Burnashev и др., 1995). В зависимости от мембранного потенциала открытие канала приводит либо к освобождению от

полиаминов, либо к блокированию потока ионов (Rozov и Burnashev, 1999). Полиамины - это органические соединения с более чем двумя аминогруппами ( $\text{NH}_3^+$ ), которые присутствуют в эукариотических и прокариотических клетках (Coffino, 2001; Tiburcio и др., 2014). Полиамины синтезируются почти во всех клетках млекопитающих из аминокислот, таких как аргинин, орнитин и метионин (Wang и др., 2014). Аргинин также может метаболизироваться до NO через NO-синтазу. Уровни внутриклеточного аргинина ограничивают скорость продукции орнитина аргиназой и скорость продукции NO (Boucher и др., 1999), что приводит к конкуренции за внутриклеточный аргинин. В клетках, в которых экспрессируются и нейрональная NO-синтаза, и аргиназа 1, конкуренция за аргинин снижает продукцию NO из-за сверхэкспрессии аргиназы (Wu и Morris, 1998; Singh и др., 2000; и др., 2002). Кроме того, в одном из исследований на клетках мозжечка авторы показали, что эндогенные полиамины не влияют на активность NO-синтазы. Это контрастирует с экзогенными полиаминами, которые ингибируют превращение [3H] L-аргинина в [3H] L-цитруллин под действием NO-синтазы. На способность полиаминов взаимодействовать с NO-синтазой сильно влияет концентрация L-аргинина и NALTPH (Hu и др., 1994). Это может иметь решающее значение во время экспериментов с пэтч-клямпом в режиме «целая клетка», когда концентрация полиаминов в пэтч-пипетке может влиять на активность NO-синтазы и может привести к искаженным результатам. Учитывая это подавление продукции NO полиаминами, ингибирование синтазы NO, в свою очередь, может влиять на образование полиаминов. Например, в некоторых работах показано, что при воспалении уровень NO снижается, а также усиливается синтез L-орнитина и полиаминов во время восстановления тканей и пролиферации клеток (Buga и др., 1998). Таким образом, поскольку полиамины определяют проводимость КП-АМПА рецепторов, NO может участвовать в определении физиологических свойств этих каналов, регулируя выработку полиаминов в клетках.

Таким образом, NO влияет на встраивание субъединиц АМПА рецепторов различными путями, от прямого нитрозилирования субъединиц рецептора до различных модификаций АМПА-связывающих белков. Эти модуляции также могут влиять на функции АМПА рецепторов, такие как проницаемость, посредством NO-зависимых модификаций и многих других, которые определяют уникальный профиль функционирования АМПА рецепторов в разных синапсах и в разное время, регулируя синаптическую передачу в головном мозге (Diering и Huganir, 2018).

#### 2.4. Оксид азота и НМДА рецепторы

НМДА рецепторы играют важную роль в синаптической пластичности благодаря высокой проницаемости для катионов, в том числе для ионов кальция. Многими авторами продемонстрирован НМДА-зависимый синтез оксида азота в нейронах (Garthwaite и др., 1988; Shibuki и Okada, 1991; Bredt и Snyder, 1992). НМДА рецептор - это уникальный потенциал-зависимый ионный канал. Коактивация НМДА каналов эндогенными медиаторами (глутаматом и глицином) и высвобождение потенциал-зависимого блока  $Mg^{2+}$  запускают открытие ионных каналов, позволяя поступать  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  внутрь клеток (обзор Dingledine, 1999). НМДА рецепторы представляют собой совокупность обязательных субъединиц NR1 и модуляторных субъединиц NR2. Среди всех модуляторных субъединиц NR2A и NR2B являются преобладающими компонентами НМДА каналов в нейронах (обзор Stephenson, 2001). Активация НМДА рецепторов повышает активность нейрональной NO-синтазы в цитоплазме нейронов, которая катализирует выработку эндогенного NO из l-аргинина (обзор Bredt и Snyder, 1992). Ряд исследований *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали ингибирующую модуляцию НМДА каналов с помощью оксида азота в условиях, приближенных к физиологическим (Manzoni и Vockaert, 1993; Kendrick и др., 1996). Учитывая, что стимуляция НМДА рецепторов увеличивает синтез оксида азота, такая модуляция является одним из механизмов отрицательной обратной связи, которая предотвращает чрезмерную активацию НМДА каналов и



поддерживает активность рецептора на физиологическом уровне (Choi и др., 2000).

S-нитрозилирование цистеинового остатка C399 на внеклеточном N-конце субъединицы NR2A служит важным путем, связывающим NO с НМДА каналами (Choi и др., 2000). Кроме того, две пары остатков цистеина NR1 (C744, C789) и NR2A (C87, C322) могут подвергаться S-нитрозилированию и тем самым ингибировать НМДА каналы, если они находятся в форме свободного тиола (обзор Lipton и др., 2002). Следует отметить, что нейрональная NO-синтаза образует комплекс с NR1 (Brennan и др., 1996) и NR2B (Sun и др., 2015) субъединицами через каркасный белок PSD-95 в постсинаптической плотности. Причем совместная локализация оксида азота с этими белками в определенных синаптических сайтах имеет совершенно противоположные эффекты: NO, полученный путем работы комплекса NR2B/PSD95/nNOS не только опосредует НМДА-зависимую эксайтотоксичность, но также ингибирует регенеративную репарацию посредством регуляции деацетилазы гистона 2 на стадии восстановления (Luo и др., 2014). Комплекс же NR1/PSD95/nNOS вместе с нитрозилированием субъединицы NR2A обеспечивают быстрое ингибирование обратной связи НМДА рецепторов через NO-чувствительный механизм (Brennan и др., 1996). NO также может косвенно модулировать НМДА рецепторы посредством S-нитрозилирования основных регуляторов этих каналов, например, серин-рацемазы (фермент, который превращает l-серин в d-серин, коагонист глутамата) (Mustafa и др., 2007) и PSD-95 (Ho и др., 2011).

Нормальная активность НМДА каналов важна для клеточной сигнализации и синаптической пластичности. Чрезмерная активация рецептора приводит к эксайтотоксичности и гибели клеток. С этой целью НМДА рецепторы имеют решающее значение для выживания нейронов при различных нейродегенеративных расстройствах (обзор Wu и Tymianski, 2018). Поскольку NO ингибирует чрезмерную стимуляцию НМДА рецепторов, он может, следовательно, ослаблять нейротоксичность. Ингибирующий контроль NO имеет потенциальное клиническое приложение. Фармакотерапия, нацеленная на

нитрозилируемые остатки цистеина, может быть разработана для предотвращения НМДА-опосредованной нейротоксичности во время инсульта (обзор Wu и Tymianski, 2018).

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**3.1. Содержание животных.** Животные содержались в виварии с регулируемой температурой ( $22 \pm 2$  °C) при 12-часовом цикле свет/темнота (свет включался в 08:00) с пищей и водой *ad libitum*. Были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшить количество используемых животных.

**3.2. Приготовление срезов.** Поперечные срезы гиппокампа толщиной 300  $\mu\text{m}$  были получены из мозга мышей C57Bl/6 в возрасте 25-35 дней, умерщвленных декапитацией. Камера для приготовления срезов содержала насыщенный кислородом ледяной раствор (модифицированный из (Dugue и др., 2005), состоящий из (в mM): K-gluconate, 140; 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), 10; Na-gluconate, 15; этиленгликоль-бис (2-аминоэтил) -N, N, N', N'-тетрауксусная кислота (EGTA) 0.2, NaCl, 4 (pH 7.2). Срезы головного мозга были изготовлены на вибраторе (Leica VT1000S, Германия). Срезы инкубировались не менее 40 мин при 35°C перед помещением в искусственную спинномозговую жидкость (ACSF) комнатной температуры, содержащей (в mM): NaCl, 125; NaHCO<sub>3</sub>, 25; KCl 2.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25; MgCl<sub>2</sub>, 3.9; CaCl<sub>2</sub>, 2; и glucose, 25; аэрация 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>.

**3.3. Электрофизиологические эксперименты.**

**3.3.1 Пэтч-клямпы.** Пэтч-электроды (сопротивление 4-5 МОм) изготавливались из твердого боросиликатного капиллярного стекла (Narishige PC-100 Puller, Япония), заполнялись либо не содержащим полиамины, либо полиаминсодержащим раствором. Не содержащий полиамины раствор состоял из (в мМ) Cs-gluconate, 100; CsCl, 10; HEPES, 10; NaCl, 8; EGTA, 0.2; MgATP, 2; Na<sub>3</sub>GTP, 0.3; phosphocreatine, 10 (pH 7.3 с CsOH). Раствор, содержащий полиамины, был идентичным, за исключением добавления 10 мМ спермина. Эксперименты были выполнены на 70 животных.

Пирамидные клетки области CA1 идентифицировались визуально с использованием микроскопа Olympus, оснащенного инфракрасной оптикой для дифференциального интерференционного контраста (Olympus BX51WI). Записи всех нейронов выполнялись в режиме фиксации потенциала с использованием усилителя ELC-03XS (NPI electronics, Tamm, Германия) и программного обеспечения Clampex (Axoclamp, Molecular Devices). Клетки держали при потенциале -70 мВ. Клетки с нездоровой морфологией и мембранным потенциалом покоя выше -50 мВ были исключены из экспериментов. Чтобы вызвать синаптический ток, стеклянные электроды, заполненные ACSF, 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. Быстрая тормозная синаптическая передача была заблокирована во время регистрации путем добавления 50 мМ пикротоксина в проток. Во всех экспериментах, кроме измерения соотношения АМПА/ НМДА токов, НМДА токи блокировались путем добавления 50 мМ APV в ACSF. Регистрация в режиме «целая клетка» обычно начиналась спустя 5-10 минут после прорыва мембраны, когда был установлен баланс между внутриклеточным раствором и цитоплазмой и достигался стабильный ток, за исключением экспериментов с ингибированием GluR2-несодержащих АМПА рецепторов. Интенсивность стимуляции регулировалась для получения ВПСТ с амплитудой ~ 50 пА в начале каждой записи. При нестабильной базовой линии эксперименты не начинались.

Последовательное сопротивление отслеживали, и записи, в которых последовательное сопротивление изменялось на  $> 15\%$ , исключали из анализа. Во всех экспериментах фиксируемый потенциал корректировался на потенциал жидкого перехода (-10 мВ).

*Блокада GluR2-несодержащих АМПА рецепторов.* Эксперименты проводились с использованием внутриклеточного раствора без спермина, содержащего QX-314. Регистрация начиналась после стабилизации базовой линии (спустя 1–2 мин после начала регистрации). Амплитуда тестовых ответов стабилизировалась через 15–20 мин записи. Антагонист GluR2-несодержащих АМПА рецепторов Naspm (200  $\mu\text{M}$ ) 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. Степень блокады оценивалась как отношение средней установившейся амплитуды тока до и после добавления Naspm.

*Регистрация вольт-амперных характеристик.* Эксперименты начались после стабилизации базовой линии ( $\sim 100$  ответов). 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.* Эксперименты начинались после стабилизации базовой линии ( $\sim 100$  ответов). Для точек фиксируемого потенциала -70 мВ и +35 мВ было собрано не менее 30 и 50 ответов, соответственно. Индекс выпрямления рассчитывался как отношение ВПСТ, измеренных на -70 мВ и +35 мВ ( $\text{ВПСТ}_{-70}/\text{ВПСТ}_{+35}$ ). Для каждой точки +35 мВ были проанализированы только последние 30 ответов.

*Чтобы проверить синапсы на полиамин-зависимую фасилитацию,* мы подавали четыре стимула с межстимульным интервалом 33 мс  $\times$  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. Для анализа фасилитации применялся дополнительный критерий отбора: из анализа удалялись свипы с пиками первого ВПСТ в серии, амплитуду которых невозможно было определить. Количество исключенных свипов составляло <1% от общего количества свипов.

*Соотношение парных импульсов контролировали*, подавая два стимула с межстимульным интервалом 50 мс. Эксперименты начались после стабилизации базовой линии (~ 100 ответов), и было собрано не менее 20 ответов.

*Соотношение АМПА/НМДА токов.* Отношение АМПА/НМДА измерялось в ACSF без  $Mg^{2+}$ . Токи АМПА- и НМДА-рецепторов были фармакологически изолированы путем последовательного предъявления APV и CNQX в проток, соответственно. Сначала совместные токи АМПА и НМДА рецепторов и регистрировались в ACSF, не содержащем  $Mg^{2+}$ . После регистрации по меньшей мере 100 ответов АМПА-опосредованная компонента блокировалась путем предъявления 50  $\mu M$  CNQX. Были собраны дополнительные 100 ответов НМДА-опосредованных токов, и НМДА-природа этих токов была подтверждена последующим добавлением APV в проток. Компонент, опосредованный АМПА рецепторами, был получен путем вычитания усредненных токов, опосредованных НМДА, из усредненного общего ответа. Для последующего анализа средняя амплитуда АМПА токов была нормирована на амплитуду НМДА токов.

Клетки, не соответствующие стандартным критериям электрофизиологических свойств, таким как входное сопротивление, последовательное сопротивление и базовый ток удержания, были исключены из анализа.

**3.3.2. Экстраклеточная регистрация полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов.** Самцы мышей C57Bl/6 (27-50 дней) были анестезированы изофлураном и декапитированы. Мозг был быстро извлечён и

перенесён в ледяной базовый раствор, содержащий в мМ: 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, и 10 D-глюкозы, pH доводился перфузией с 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>. Парасагиттальные срезы гиппокампа (толщина 350 μм) были приготовлены с использованием микротомы Leica VT1000S, Germany, и непосредственно переносились в регистрирующий раствор, содержащий соли в тех же концентрациях, что и базовый, за исключением CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> (2.5 и 1.3 мМ, соответственно). Срезы инкубировались при 34°C на водяной бане в течение 40 минут, после чего хранились при комнатной температуре до внесения их в регистрирующую камеру. В течение эксперимента срезы перфузировались оксигенированным регистрирующим раствором (скорость потока около 4 мл/мин) при температуре 32-33 °C. Электрофизиологические записи были получены с использованием SliceMaster system (Scientifica, UK). Возбуждающие полевые постсинаптические потенциалы (ВПСП) были записаны от *stratum radiatum* и *stratum oriens* в CA1 поле гиппокампа с использованием стеклянных микроэлектродов (1-2 MΩ), заполненных регистрирующим раствором. Базальные синаптические ответы вызывались парной стимуляцией с 50 мс интервалом коллатералей Шафера и базальных дендритов пирамидных клеток CA1 биполярным электродом на частоте 0.033 Гц. Интенсивность тестовой стимуляции была такой, чтобы вызывать ВПСП амплитудой 50% от максимальной, и сохранялась на протяжении каждого эксперимента. Потенциация вызывалась тета-протоколом: четырьмя 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. Данные были записаны и анализированы в программе Spike2. Эксперименты были выполнены на 5 животных.

### **3.4. Поведенческий эксперимент.**

Объектом исследования были половозрелые самцы крыс линии Вистар весом 210-370г (71 животное). Крысы приучались ежедневно в течение недели до начала эксперимента.

*Поведенческая установка.*

Обучение проводилось в камере размером 28x30x45см с диагональной перегородкой. Стенки камеры выполнены из прозрачного пластика, а в качестве пола использовалась решетка из нержавеющей стали со стержнями толщиной 3 мм (Контекст А). На решетку подавали электрический ток с помощью источника, управляемого компьютером (PanLab, Harvard Apparatus). Звук воспроизводился через динамик на верхней крышке камеры. Камера очищалась 5% уксусной кислотой после каждой крысы. Камера была тускло освещена лампой (30 люкс). Тестирование после обучения проводилось в другой камере (28 × 28 × 28 см, PanLab / Harvard Apparatus), в которой оценивался уровень затухания рефлекса в ответ на звук независимо от окружающей среды. Во время различных сеансов тестирования в этой камере были созданы три разных контекста - Б, В и Г. Во всех тестах комната была полностью темной, только камера освещалась красной лампой мощностью 20 Вт.

Контекст Б (Тест 1, напоминание): латексное покрытие пола с наполнителем Fresh Step и белыми металлическими стенками. Камера очищалась 70%-ным этанолом после каждого животного.

Контекст В (Тест 2, тестирование): округлая стенка из прозрачного пластика, на полу коврик с древесными опилками, для очистки камеры использовали раствор мяты (1 часть медицинской настойки мяты перечной на 90% этиловом спирте (ООО "Тульская фармацевтическая фабрика"), 15 частей 96% этилового спирта, 20 частей дистиллированной воды).

Контекст D (Тест 3, тестирование): пол покрыт полиэтиленовой воздушно-пузырчатой пленкой, для очистки камеры использовали раствор эвкалипта. Регистрация замирания животных производилась во время эксперимента двумя экспертами, также производилась видеозапись экспериментов с помощью фотоаппарата Canon EOS 600D.

*Поведенческие процедуры.*

В день обучения крысу помещали в контекст А и через две минут 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). После дополнительной минуты тишины животное извлекали из обучающей камеры. 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 внутривнутрибрюшинно и подкожно следующие растворы:

Контрольная группа: ДМСО 100% + ДМСО 1% в физиологическом растворе (n=15);

Группа СХМ (n=23): ДМСО 100% + циклогексимид 2,8 мг/кг в 1% растворе ДМСО;

Группа 3-Br-7-ni (n=12): 3-Br-7-ni в 100% ДМСО + ДМСО 1% в физиологическом растворе;

Группа 3-Br-7-ni/СХМ (n=13): 3-Br-7-ni в 100% ДМСО+ циклогексимид 2,8 мг/кг в 1% растворе ДМСО;

Группа ARL/СХМ (n=9): ARL 5мг/кг в 100% ДМСО+ циклогексимид 2,8 мг/кг в 1% растворе ДМСО.

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). Животные были исключены из поведенческих экспериментов если: 1) процент замирания в контексте был более 60% в Тестах 0 и 1, и 2) процент замирания на звук в Тесте 1 был менее 20%, в данном случае крысу считали необученной.



### 3.5 Используемые препараты.

ODQ от Sigma-Aldrich был приготовлен в виде 25-мМ исходного раствора в ДМСО и разбавлен до конечной концентрации в ванне 30 мкМ. 3-Бromo-7-нитроиндазол (3-Br-7-ni) (Enzo Life Sciences) растворяли в виде 100-мМ исходного раствора в ДМСО и разбавляли до достижения конечной концентрации в ванночке 50 мкМ. Гидрохлорид метилового эфира N $\omega$ -нитро-L-аргинина (L-NAME) (Sigma-Aldrich) готовили в виде 200 мМ исходного раствора в деионизированной воде, разбавленной до достижения конечной концентрации в ванночке 200 мкМ. Карбокси-PTIO (калиевая соль 2- (4-карбоксифенил) -4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксида) от Enzo Life Sciences получали в виде 100-мМ исходного раствора в ДМСО и разбавляли до достичь конечной концентрации в ванночке 50 мкМ. Naspmt (1-нафтилацетил спермин) получали в виде 100-мМ исходного раствора в деионизированной воде и разбавляли до достижения конечной концентрации в ванночке 200 мкМ (Tocris Bioscience). Пикртоксин от Sigma-Aldrich был приготовлен в виде 100 мМ исходного раствора в ДМСО и разбавлен до конечной концентрации в ванне 50 мкМ. Натриевая соль DL-2-амино-5-фосфонопентановой кислоты (APV) от Tocris была приготовлена в виде 100-мМ исходного раствора в деионизированной воде и разбавлена до достижения конечной концентрации в ванне 50 мкМ. Динатриевая соль CNQX от Tocris Bioscience была приготовлена в виде 100-мМ исходного раствора в деионизированной воде и разбавлена до достижения конечной концентрации в ванне 50 мкМ.

В поведенческом эксперименте: ингибитор синтеза белка циклогексимид (Sigma-Aldrich) был растворен в день введения в физиологическом растворе (0,9% NaCl) с добавлением 1% ДМСО и введен подкожно в концентрации 2.8 мг/кг. 3-Бromo-7-нитроиндазол (3-Br-7-ni) (Enzo Life Sciences) был растворен в день введения в 100% ДМСО и вводился внутривентриально в дозе 10мг/кг. Ранее показано, что эта доза нарушает память в тесте пассивного избегания (Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011). Селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы ARL

17477 дигидрохлорид (ARL, Tocris) был растворен в ДМСО и инъецировался внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг. Ранее было показано, что ARL оказывает дозозависимое (0,1-10 мг/кг) влияние на ассоциативное обучение (Du, Weiss, Harvey, 2000).

### **3.6 Обработка данных и статистический анализ.**

Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (S.E.M.). Все статистические тесты проводились с использованием SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, США). Для попарных сравнений использовался однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA). Для множественных сравнений использовался двухфакторный дисперсионный анализ (Two-Way ANOVA). При наличии значимых межгрупповых различий или достоверных изменений между факторами применяли post-hoc анализ с использованием множественных сравнений с контрольной группой (критерий Холма-Сидака); для межсубъектного анализа необработанные клетки оценивали как «контрольную группу». Для оценки полиамин-зависимой фасилитации мы использовали двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (Two-Way Repeated Measures ANOVA) с поправкой Холм-Сидака для множественных сравнений (при этом производилось сравнение с контрольной группой и первым ВПСТ). В ходе статистического анализа поведенческих результатов использовался дисперсионный анализ для повторных измерений (Repeated Measures ANOVA) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений (при этом производилось сравнение с контрольной группой и Тестом 1). Уровень вероятности 0.05 и менее считался статистически значимым (\* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $p \leq 0.005$ ).

## **4. РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **4.1. 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 на апикальных и базальных дендритах. Сначала мы измерили индекс выпрямления (ИВ) путем стимуляции входов на апикальные и базальные дендриты стеклянными электродами, расположенными, как показано на рисунке 3.

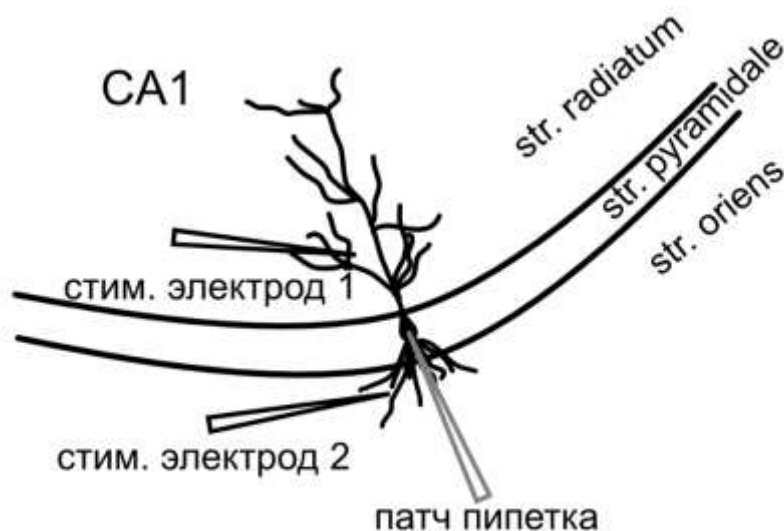


Рисунок 3. Схема расположения стимулирующих электродов и пэтч-пипетки в срезе гиппокампа.

Вследствие посттранскрипционного редактирования GluA2 субъединицы АМПА рецептора (Higuchi и др., 1993) и блокады рецепторной поры внутриклеточными полиаминами (Kamboj и др., 1995), меняются электрофизиологические свойства этих каналов, которые заключаются в сниженной проводимости каналов на положительных потенциалах мембраны нейрона. Поэтому при регистрации вольт-амперных характеристик клеток, содержащих такие каналы, наблюдается так называемое внутреннее выпрямление – вольт-амперная кривая на положительных потенциалах мембраны выпрямляется по сравнению с кривой GluA2-содержащих АМПА рецепторов.

Индекс выпрямления отражает внутреннее выпрямление 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 ( $ИВ = 3.4 \pm 0.2$ ) значительно выше, чем в ответ на стимуляцию базальных дендритов ( $ИВ = 2.5 \pm 0.2$ ) ( $F_{1,27}=9.213$ ,  $p = 0.005$ , One-Way ANOVA,  $n=14$  нейронов, рис. 4Б).

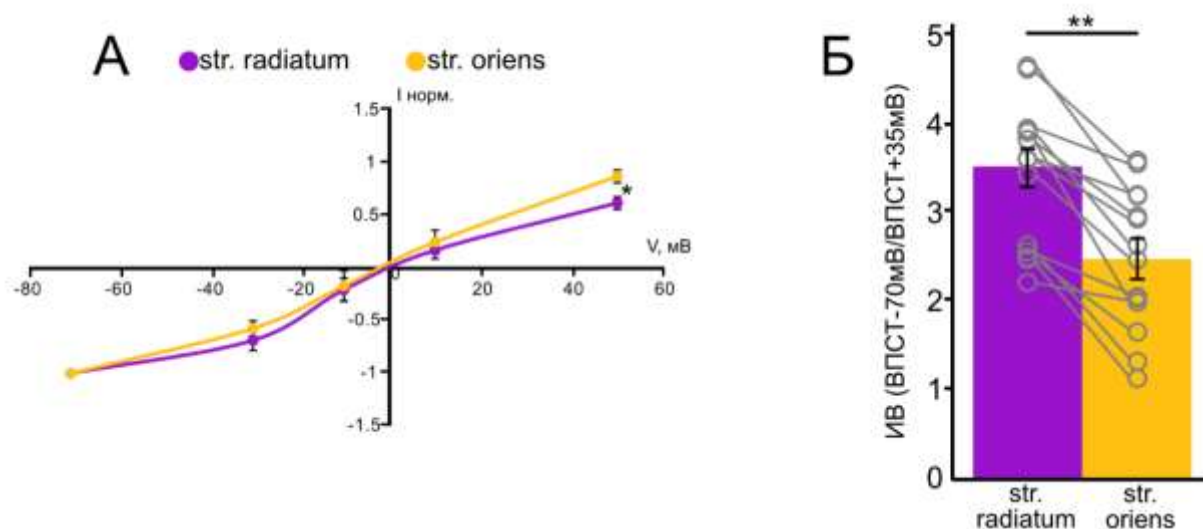


Рисунок 4. Ректификационные характеристики апикальных и базальных дендритов пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа. А. Вольт-амперные кривые апикальных и базальных дендритов. Б. Индекс выпрямления апикальных и базальных дендритов.

Вольт-амперные кривые для каждого из входов подтвердили разницу, выявленную при измерении ИВ: вольт-амперная кривая апикальных дендритов, продемонстрировала значительно большее внутреннее выпрямление ( $F_{1,13}=19.046$ ,  $p = 0.035$ , One-Way ANOVA,  $n = 7$  нейронов, рис. 4А). Эти результаты свидетельствуют о том, что вклад КП-АМПА рецепторов в токи апикальных дендритов достоверно выше, чем в токи базальных дендритов.

Наиболее распространенный подход к выявлению вклада КП-АМПА рецепторов в синаптическую передачу - это проверка чувствительности входов к антагонистам КП-АМПА рецепторов, например, тригидрохлориду 1-нафтилацетилспермина (Naspm). Поэтому мы проверили, чувствительны ли ответы на стимуляцию апикальных и базальных входов к Naspm (200  $\mu\text{M}$ ), добавленному в проток (Рис. 5А-Г).

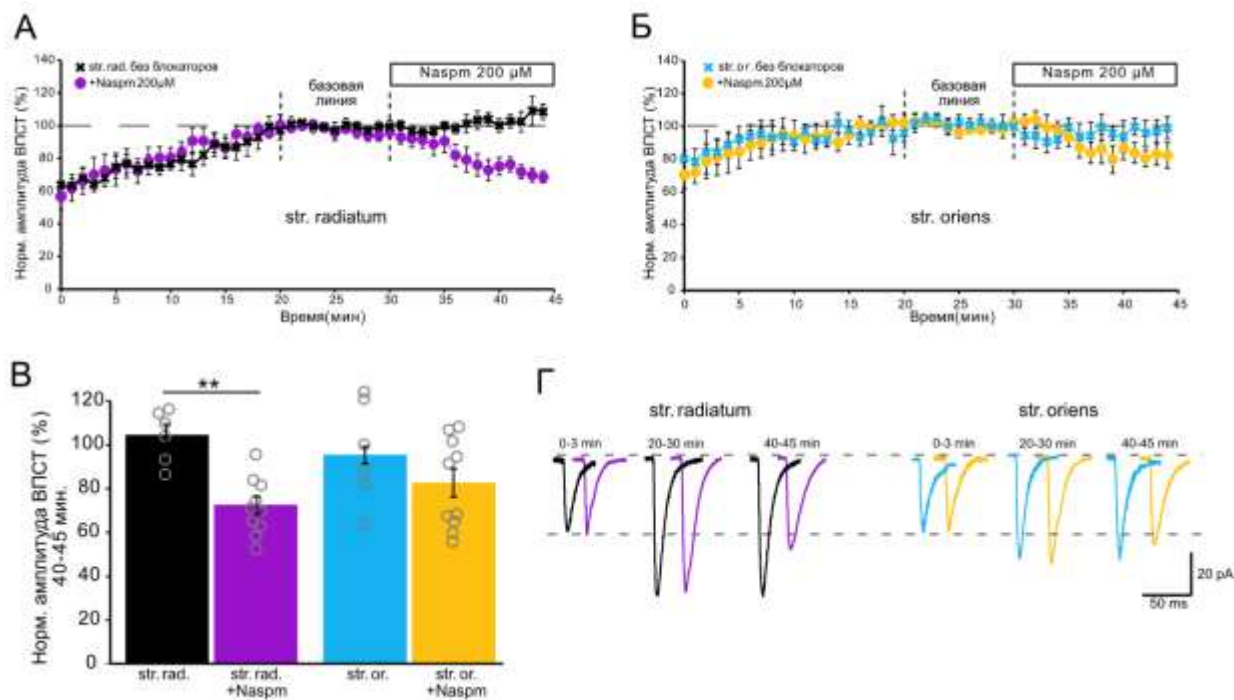


Рисунок 5. Вклад кальций-проницаемых рецепторов АМПА в синаптическую передачу. А. График усредненных амплитуд ВПСТ на апикальных входах во время вымывания полиаминов (черный,  $n = 6$  клеток) и последующего применения Naspm ( $200 \mu\text{M}$ ) (фиолетовый,  $n = 10$  клеток). Б. График усредненных амплитуд ВПСТ на базальных входах во время вымывания полиаминов (голубой,  $n = 6$  клеток) и последующего применения Naspm ( $200 \mu\text{M}$ ) (желтый,  $n = 10$  клеток). 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 синим и оранжевым цветом для базальных дендритов.

Чтобы оценить степень падения амплитуды, мы усреднили значения из каждой записи в 5-минутном сегменте в конце регистрации (рис. 5В). Мы наблюдали падение АМПА токов на обоих входах ( $73\% \pm 4$  от базовой линии для *str. radiatum* и  $83\% \pm 6.5$  для *str. oriens*,  $n = 10$  нейронов), что может указывать на присутствие КП-АМПА рецепторов на базальных и апикальных дендритах пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа. Однако сравнение с контрольными клетками ( $n = 6$  нейронов) показало, что Naspm достоверно повлиял ( $F_{1,31}=11.271$ ,  $p = 0.002$ , Two-Way ANOVA) только на апикальные ( $73\% \pm 4$  против  $109\% \pm 7$ ,  $p = 0.001$ ,  $t=3.806$ , тест Холма-Сидака), но не на базальные дендриты ( $83\% \pm 6.5$

против  $94\% \pm 4$ ,  $p=0.354$ ,  $t=0.942$ , тест Холма-Сидака). Даже при физиологических потенциалах мембраны покоя ( $\sim -70$  мВ) значительная часть КП-АМПА рецепторов все еще может блокироваться полиаминами во время единичных унитарных ВПСТ. Таким образом, в этих экспериментах мы использовали внутриклеточный раствор без спермина. В результате вымывания эндогенных полиаминов из апикальных и базальных дендритов амплитуда ответов росла вплоть до 20-й минуты записи. В присутствии полиаминов во внутриклеточном растворе такого роста амплитуды ответов не происходит (рис. б). Этот факт также позволяет предположить, что КП-АМПА рецепторы присутствуют как на апикальных, так и на базальных дендритах.

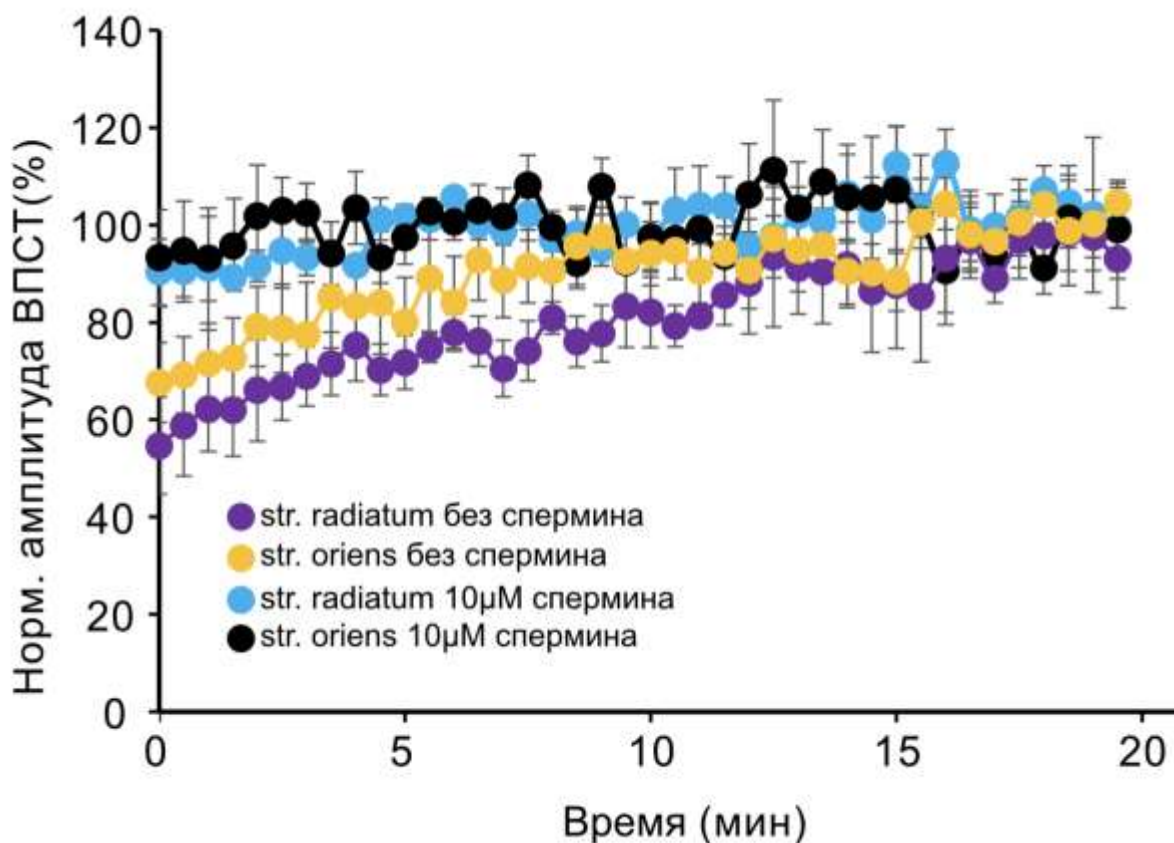


Рисунок 6. Сравнение базовых ВПСТ, зарегистрированных в течение 20 минут со спермином и без спермина во внутриклеточном растворе в *str. radiatum* и *str. oriens*.

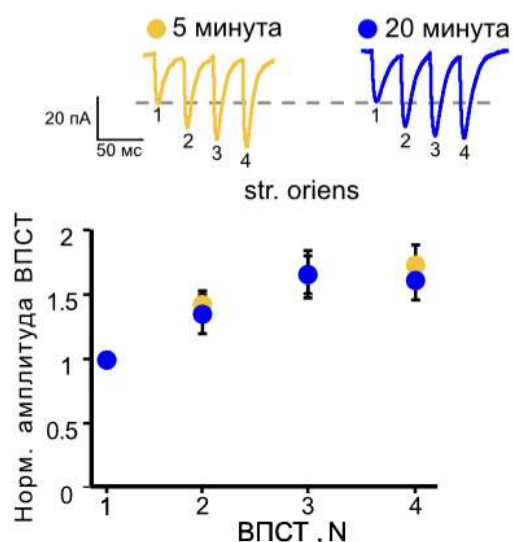
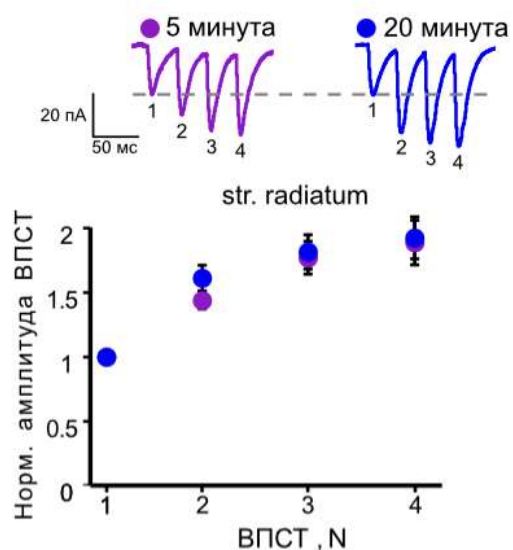
Чтобы избежать образования спайков вследствие роста амплитуды ВПСТ, мы добавили  $30 \mu\text{M}$  QX-314 во внутриклеточный раствор. Из-за различной морфологии апикальных и базальных дендритов (Benavides-Piccione и др., 2020)

амплитуда ответа на базальных входах имеет тенденцию к стабилизации раньше, чем на апикальных входах.

Кроме того, 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. Для экспериментов с вымыванием полиаминов мы корректировали силу стимула на 20 минуте, чтобы избежать образования спайков.



## А спермин 10 $\mu$ M



## Б без спермина

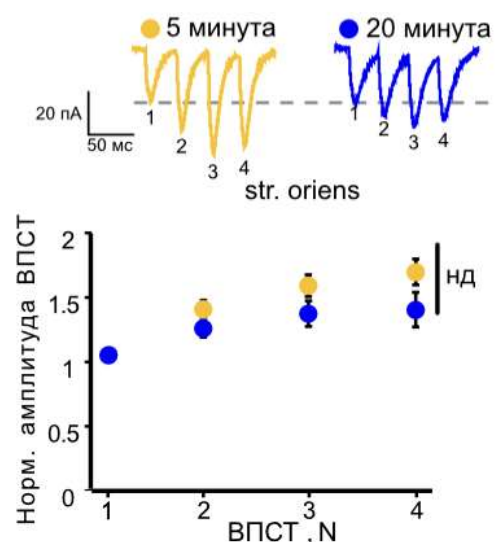
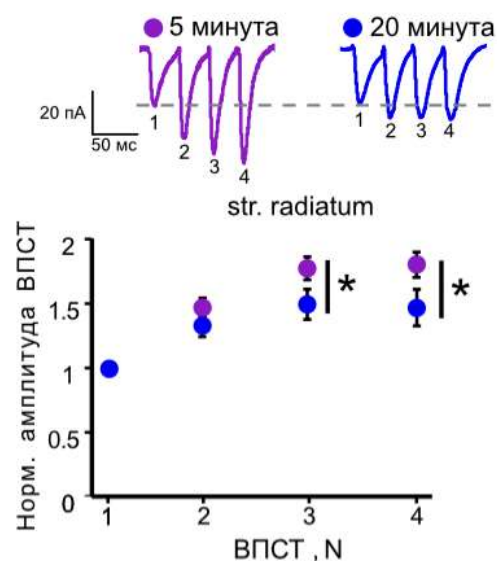


Рисунок 7. Полиамин-зависимая фасилитация характерна для синапсов пирамидных клеток CA1 гиппокампа. (А) Полиамин-зависимая фасилитация присутствует как на апикальных (верхний график), так и на базальных дендритах (нижний график) спустя 20 минут регистрации клетки при наличии 10 $\mu$ M спермина в пэтч-пипетке; (Б) Спустя 20 минут регистрации нейрона с внутриклеточным раствором без спермина полиамин-зависимая фасилитация достоверно снижается на апикальных дендритах (верхний график), но не на базальных. Нд – недостоверная разница

Рисунки 7А и 7Б 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). Из-за различий в морфологии (Benavides-Piccione R. и др., 2020), при регистрации полиамин-зависимой фасилитации на 5-й минуте уровень падения фасилитации на базальных дендритах может быть выше, так как полиамины из базальных дендритов могут вымываться быстрее, чем из апикальных. Чтобы проверить это предположение, мы зарегистрировали полиамин-зависимую фасилитацию без спермина во внутриклеточном растворе на ~1й минуте после прорыва мембраны (рис. 8). Регистрация ВПСТ немедленно после прорыва мембраны нежелательна, так как наличие цезия во внутриклеточном растворе блокирует калиевые каналы, что, в свою очередь, ведет к небольшой деполяризации клетки, на которую требуется ~1 минута. Действительно, спустя ~1 минуту после прорыва мембраны 4-й ВПСТ на базальных дендритах достоверно выше ( $p=0.024$ ,  $t=2.616$ , тест Холма-Сидака) чем на 20-й минуте. 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 вольт-амперных характеристик этих входов показали, что КП-АМПА рецепторы вносят больший вклад в синаптическую передачу на апикальных дендритах пирамидных нейронов CA1, чем на базальных дендритах.

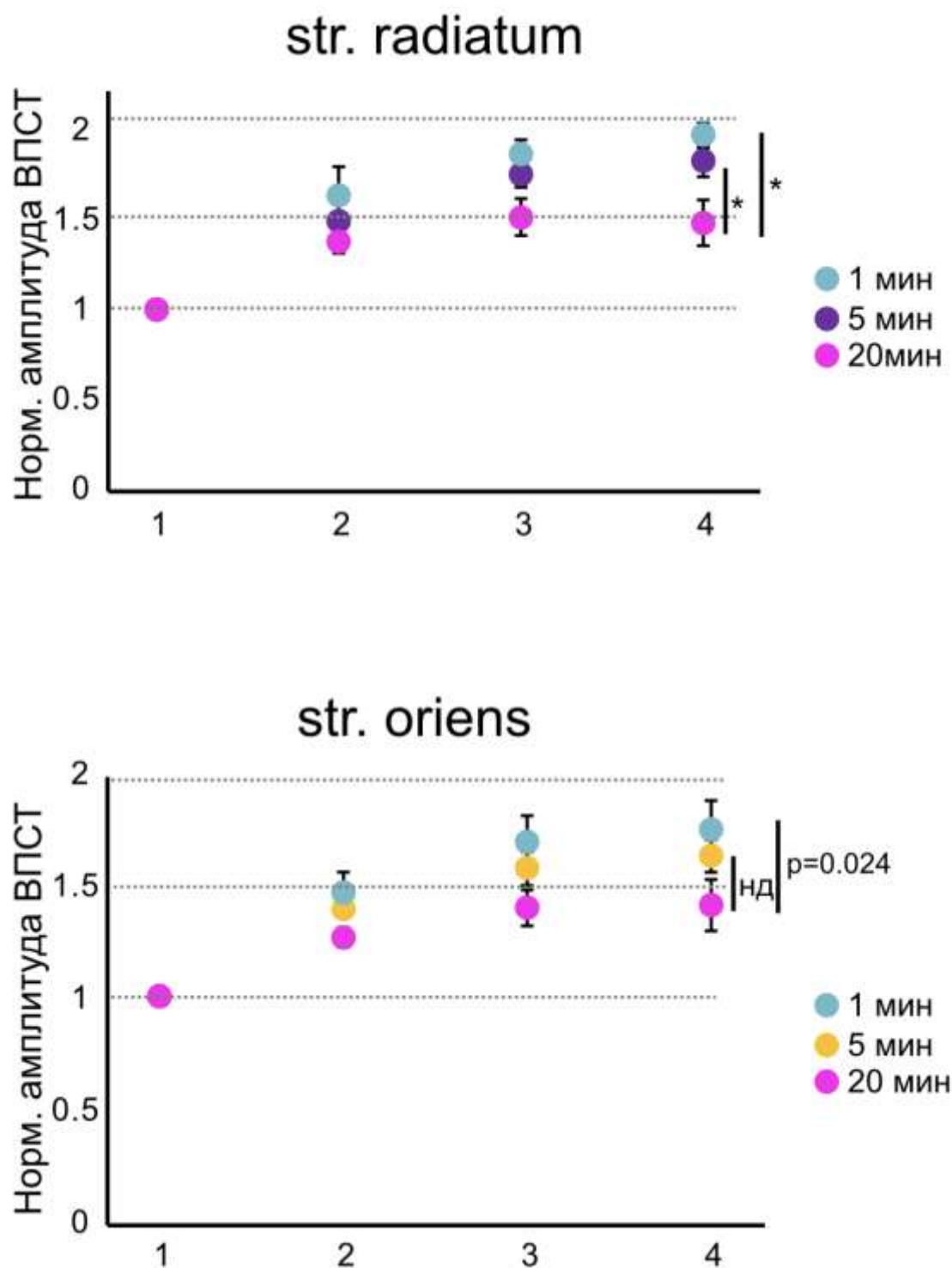


Рисунок 8. Полиамин-зависимая фасилитация на апикальных (верхний график) и базальных (нижний график) дендритах спустя 1, 5 и 20 минут регистрации после прорыва мембраны. Нд – недостоверная разница.

## 4.2 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 синапсов пирамидных клеток CA1. На рис. 9 показаны индексы выпрямления в ответ на стимуляцию апикальных и базальных входов под действием ингибитора NO-синтазы L-NAME (200  $\mu\text{M}$ ), селективного ингибитора нейрональной NO-синтазы 3-бром-7-нитроиндазола (50  $\mu\text{M}$ ) и сквенджера NO карбокси-PTIO (50  $\mu\text{M}$ ). Последние два ингибитора растворяли в ДМСО, и мы также протестировали влияние на индекс выпрямление ДМСО без блокаторов (25  $\mu\text{l}$ ) 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 ИВ 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.

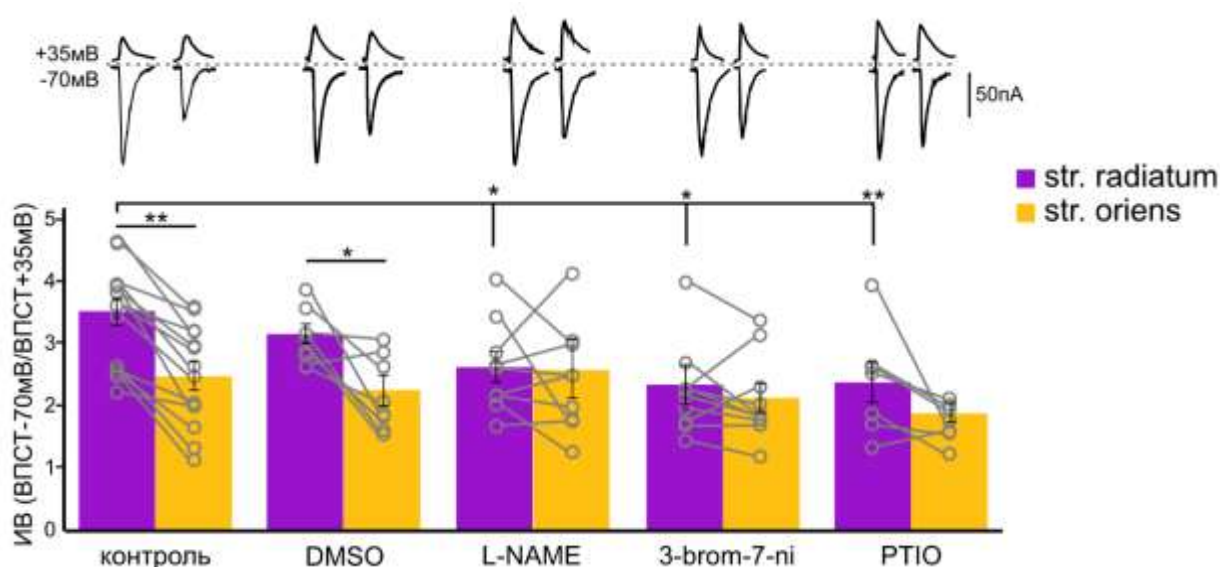


Рисунок 9. Сравнение индексов выпрямления в *stratum radiatum* (фиолетовый) и *stratum oriens* (оранжевый) в контрольных клетках ( $n=14$ ) и при обработке DMSO ( $n=8$ ), L-NAME ( $n=8$ ), 3-

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.

Вольт-амперные характеристики исследуемых входов при блокаде NO-синтазы посредством L-NAME продемонстрировали потерю внутреннего выпрямления на синаптических входах апикальных, но не базальных дендритов ( $p=0.031$ ,  $t=2.297$  для апикальных,  $p=0.402$ ,  $t=0.853$  для базальных, post-hoc сравнение методом Холма-Сидака, n=7 нейронов. Рис. 10).

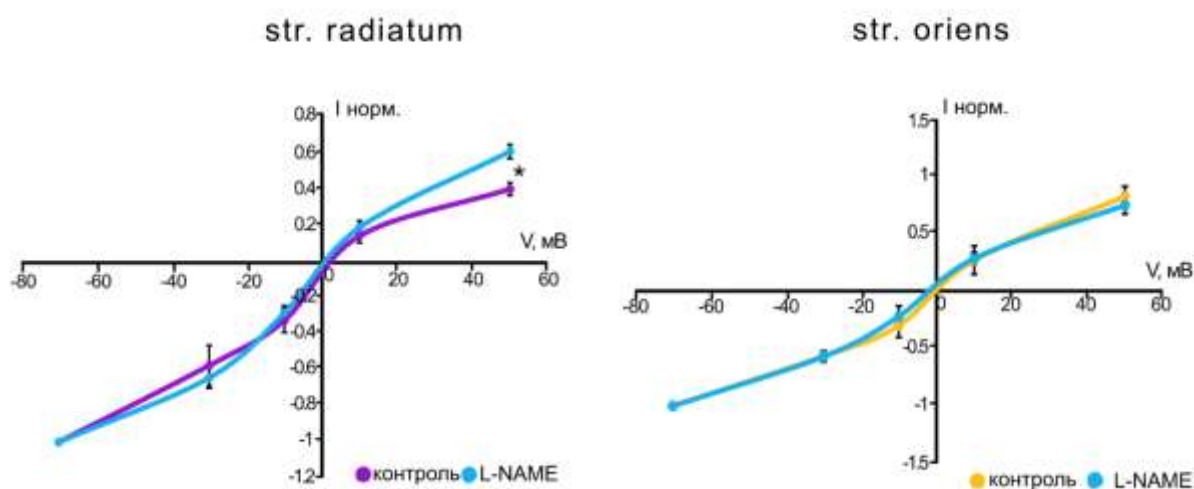


Рисунок 10. Вольт-амперные характеристики апикальных (левый график) и базальных (правый график) входов до и после обработки L-NAME. \* $p < 0.05$

Мы также сравнили соотношение АМПА/НМДА рецепторов на апикальных и базальных дендритах с ингибированием NO-синтазы или без него (рис. 11). В контрольных клетках это соотношение было значительно выше на апикальных дендритах, чем на базальных ( $6.7 \pm 0.6$  против  $4.9 \pm 0.6$ ,  $F_{1,9}=5.327$ ,  $p = 0.04$ , One-Way ANOVA, n = 5 нейронов), и эта разница исчезла после ингибирования NO-синтазы ( $4.3 \pm 0.8$  против  $3.9 \pm 0.8$ ,  $F_{1,19}=1.73$ ,  $p=0.108$ , Two-Way ANOVA), что подтверждает результаты экспериментов с измерением индекса выпрямления.

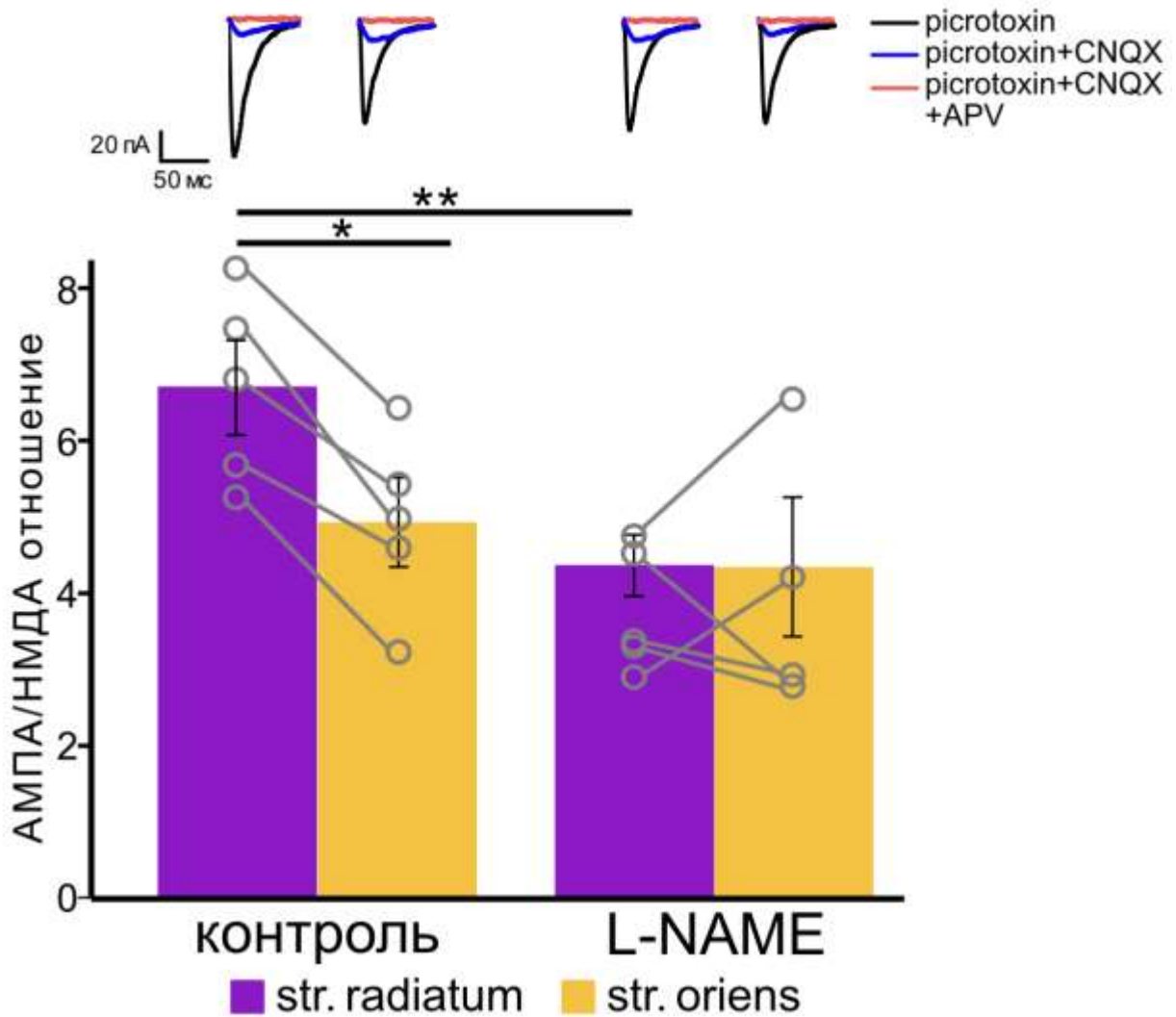


Рисунок 11. Соотношение АМПА/НМДА токов в *stratum radiatum* (фиолетовый) и *stratum oriens* (оранжевый) в контрольных клетках и после ингибирования NOS. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$

Кроме того, ингибирование NO-синтазы предотвратило падение амплитуды тока во время блокады КП-АМПА рецепторов с помощью Naspn 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. 12); 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. 13). Интересно отметить, что увеличение амплитуды тока в начале записи, связанное с вымыванием полиаминов и в *str. radiatum*, и в *str. oriens*, сохранилось после инкубации в L-NAME (рис. 12-13). Это может быть связано либо со специфическими механизмами, связанными с вымыванием полиаминов, либо с возможностью NO-

зависимой регуляции чувствительности КП- АМПА рецепторов к полиаминам. В последнем случае полиамины все еще могут блокировать рецепторную пору, но блокада легче снимается, что вызывает меньшее увеличение амплитуды ВПСТ и более быструю стабилизацию базовой линии.

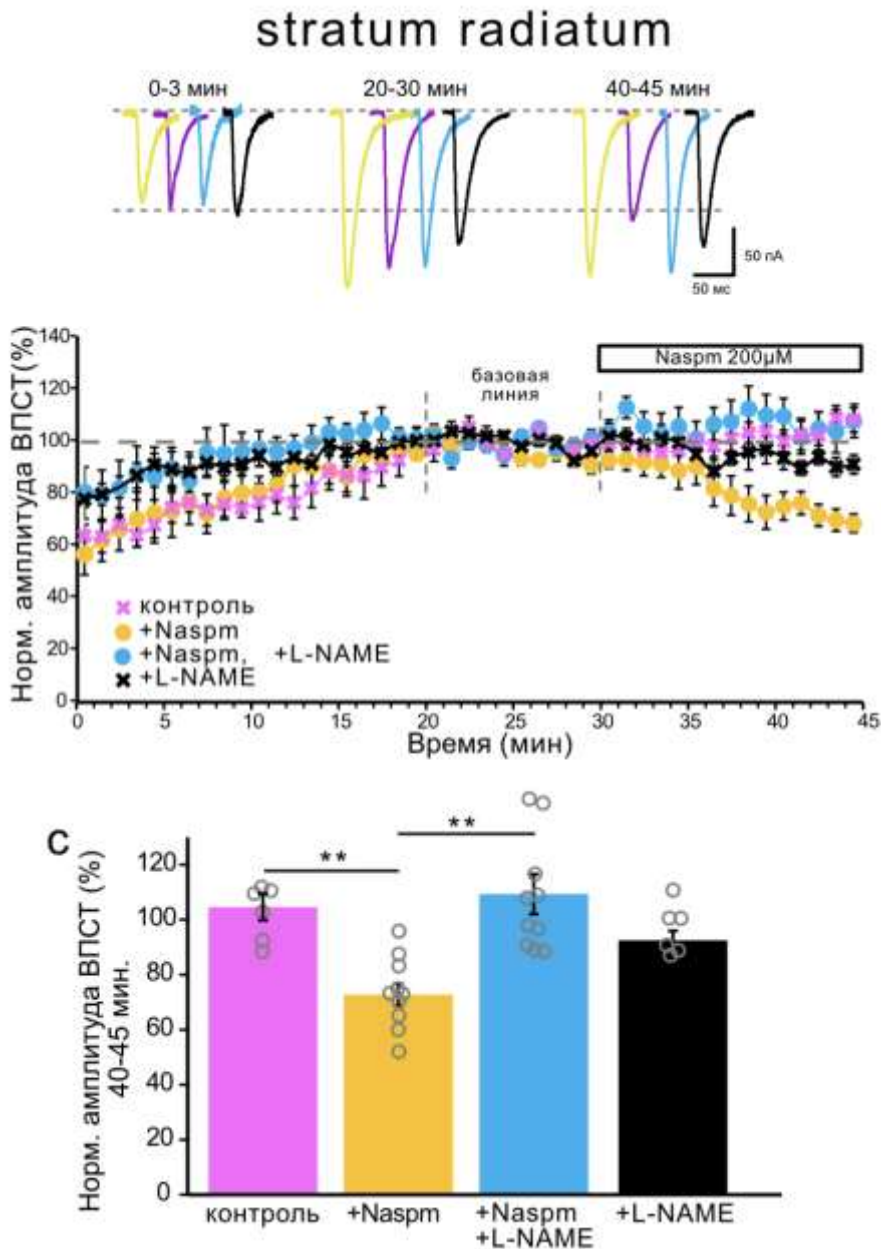


Рисунок 12. А. Типичные усредненные кривые в указанные моменты времени кривой Б. Б. График усредненных амплитуд ВПСТ на апикальных входах во время вымывания полиаминов (розовый,  $n = 6$  клеток), последующего применения Naspm (200  $\mu\text{M}$ ) (оранжевый,  $n = 10$  клеток), после обработки L-NAME (черный,  $n=6$ ) и после ингибирования NOS с применением Naspm (голубой,  $n=10$ ). В. Гистограмма, демонстрирующая нормализованные значения ВПСТ

за последние 5 минут кривой Б. Кружки серого цвета представляют отдельные точки данных, \*\*  $p \leq 0.005$ .

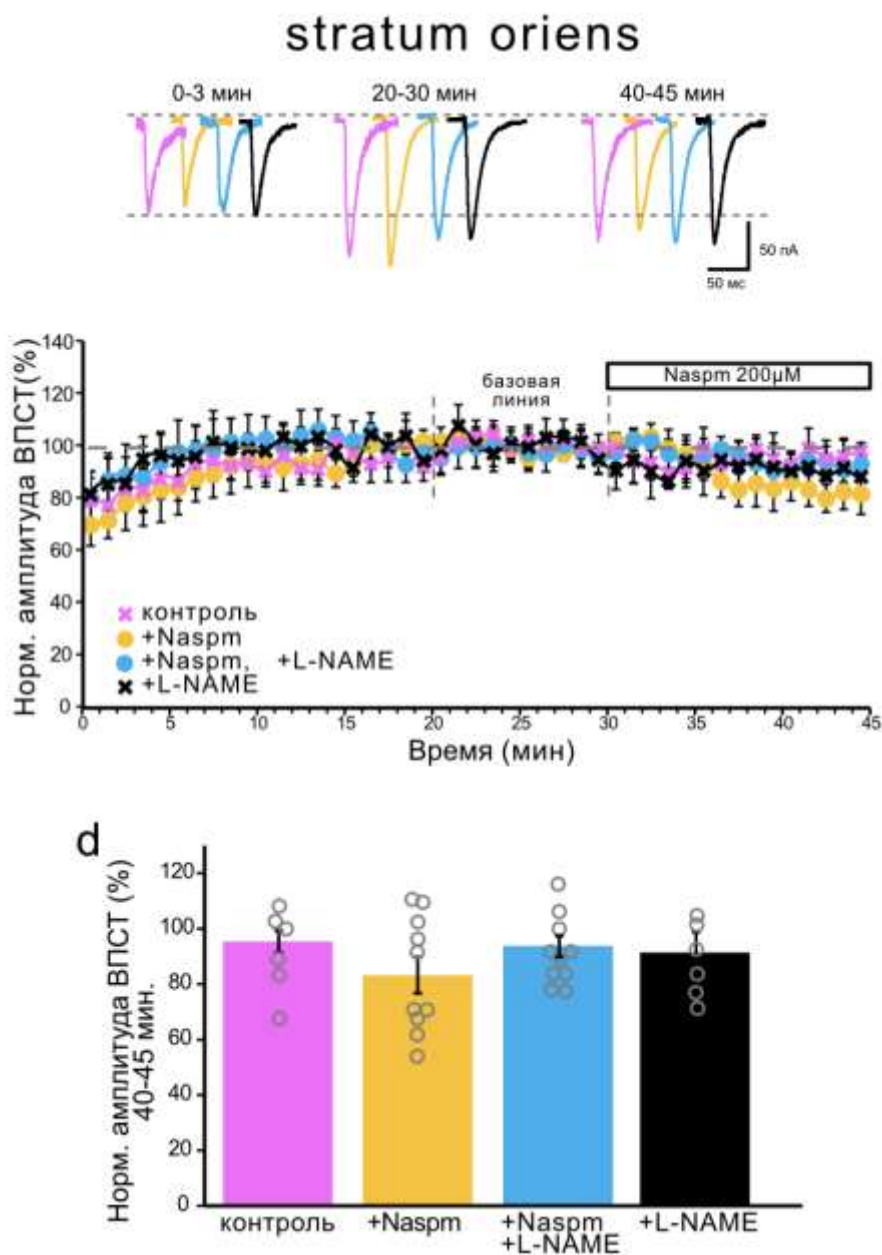


Рисунок 13. А. Типичные усредненные кривые в указанные моменты времени кривой Б. Б. График усредненных амплитуд ВПСТ на базальных входах во время вымывания полиаминов (розовый,  $n = 6$  клеток), последующего применения Naspm (200  $\mu\text{M}$ ) (оранжевый,  $n = 10$  клеток), после обработки L-NAME (черный,  $n=6$ ) и после ингибирования NOS с применением Naspm (голубой,  $n=10$ ). В. Гистограмма, демонстрирующая нормализованные значения ВПСТ за последние 5 минут кривой Б. 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. 14). 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.

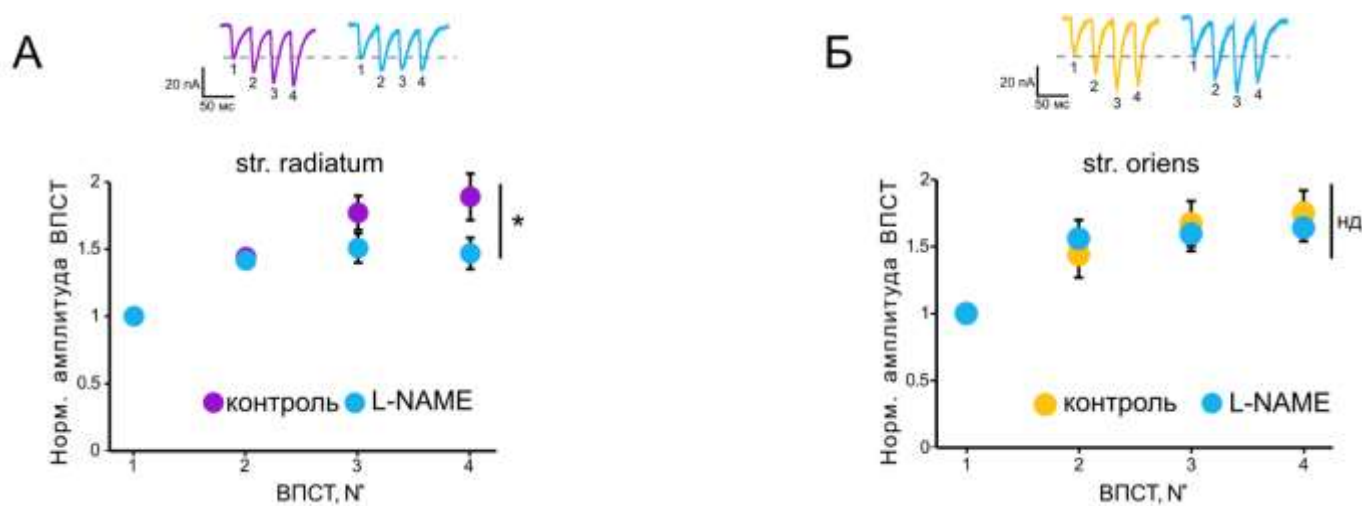


Рисунок 14. Полиамин-зависимая фасилитация в *str. radiatum* (левый график) и в *str. oriens* (правый график), записанная на пятой минуте после прорыва мембраны до и после ингибирования NOS. Нд – недостоверная разница.

Учитывая широкий спектр действия оксида азота в пресинапсе клеток (Hardingham и др., 2013), мы проверили, является ли обнаруженный эффект следствием пресинаптического эффекта оксида азота. Одним из возможных подходов к оценке пресинаптического вклада в синаптическую передачу является измерение отношения парных импульсов (Schulz и др., 1994; Christie и Jahr, 2006). Регистрация парных импульсов (рис. 15) в синапсах пирамидных клеток CA1 во время ингибирования NO-синтазы не выявила значимых различий в этих клетках по сравнению с контрольными клетками ( $F_{2,42}=1.28$ ,  $p=0.290$ , контроль:  $1.6\pm 0.1$  для *str. radiatum* и  $1.4\pm 0.06$  для *str. oriens*,  $n=8$  нейронов; L-NAME:  $1.5\pm 0.1$  для *str.*

*radiatum* и  $1.4 \pm 0.07$  для *str. oriens*,  $n=7$  нейронов; 3-Br-7-ni:  $1.4 \pm 0.06$  для *str. radiatum* и  $1.4 \pm 0.1$  для *str. oriens*,  $n=7$  нейронов). Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что исчезновение полиамин-зависимой фасилитации в *str. radiatum* после ингибирования синтеза оксида азота был связан с взаимодействием оксида азота с КП-АМПА рецепторами.

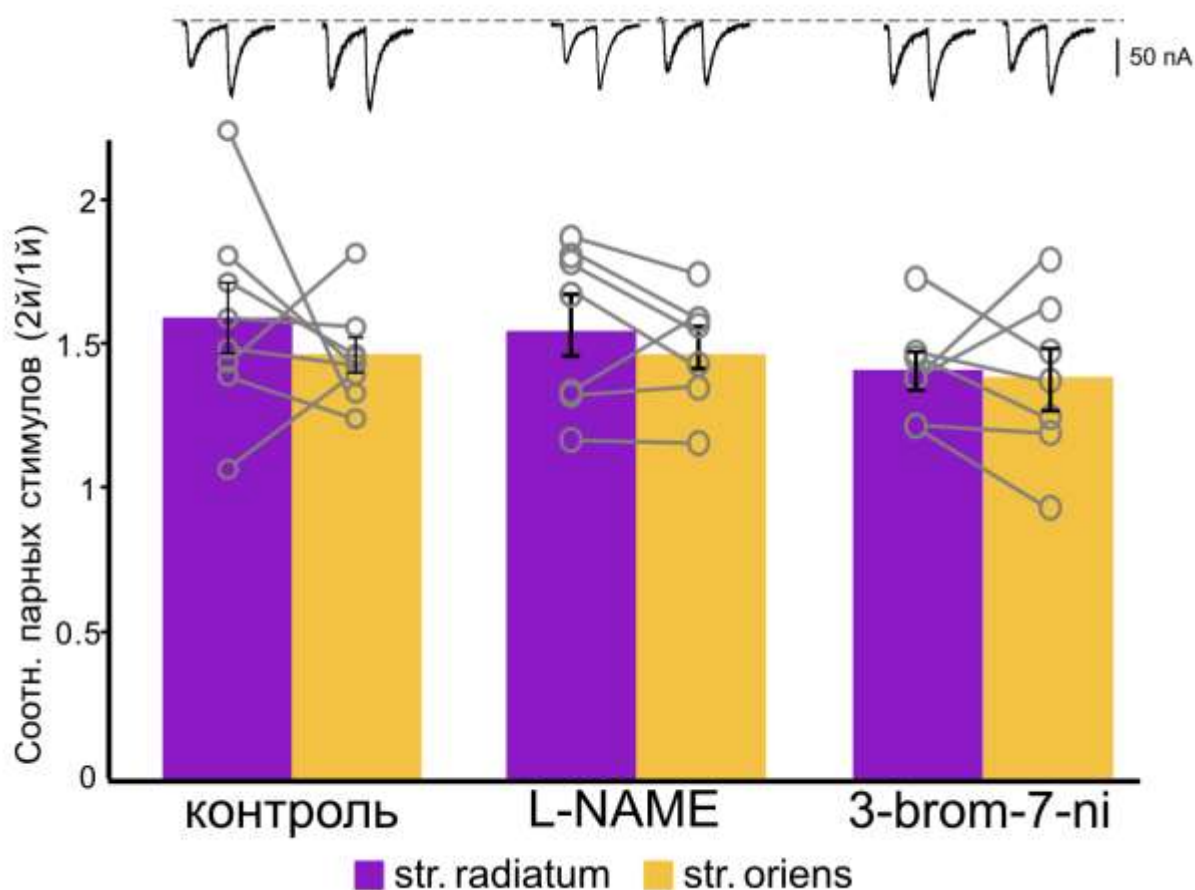


Рисунок 15. Гистограммы, отражающие отношения парных импульсов в *str. radiatum* (фиолетовый) и в *str. oriens* (оранжевый) без и после инкубации с ингибиторами NOS.

Мы исследовали, участвует ли рГЦ-зависимый путь в этом взаимодействии, путем добавления ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ ( $30 \mu\text{M}$ ) в проток. Мы измерили индекс выпрямления в этих условиях и обнаружили, что ингибирование рГЦ не влияет на ИВ ни апикальных ( $\text{ИВ} = 3.5 \pm 0.2$ ,  $n=5$ ), ни базальных ( $\text{ИВ} = 2.5 \pm 0.3$ ,  $n=5$ ) входов, между ними по-прежнему наблюдалась достоверная разница (рис. 16,  $F_{1,9}=7.513$ ,  $p=0.025$ , 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 =  $3.3 \pm 0.3$ ,  $n=5$ ) и базального (ИВ =  $3 \pm 0.4$ ) входов, как и в клетках, обработанных только ингибиторами NO-синтазы ( $F_{1,9}=0.281$ ,  $p = 0.611$ , One-Way ANOVA,  $n=5$  нейронов).

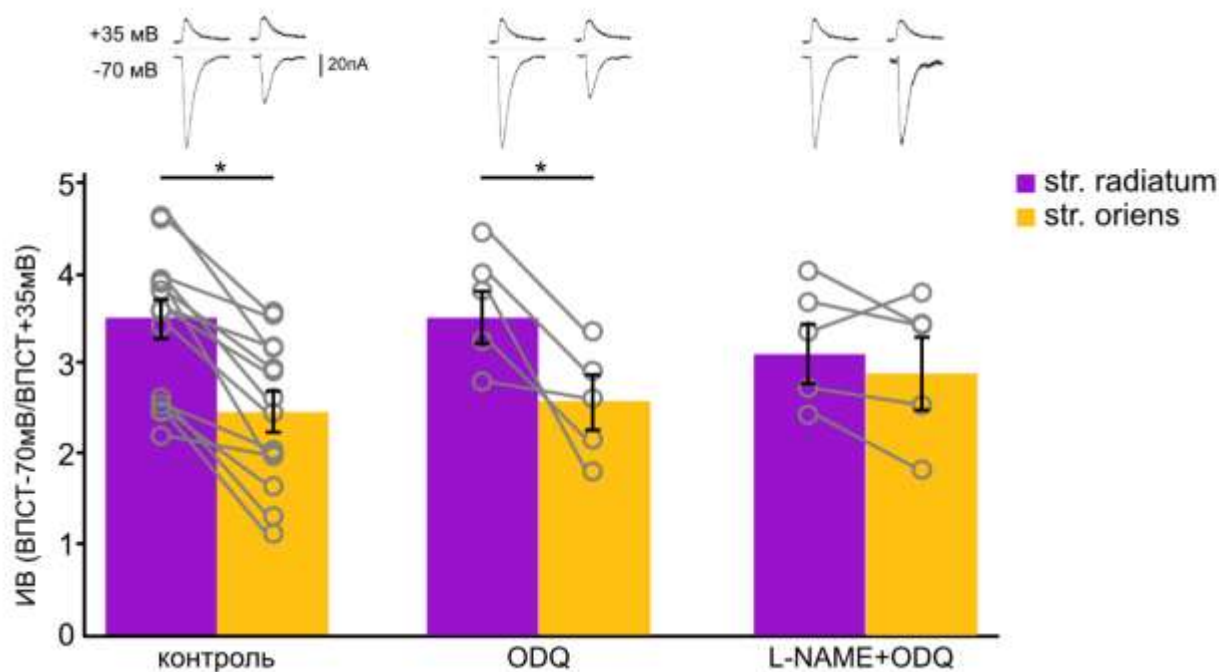


Рисунок 16. Сравнение индексов выпрямления в *stratum radiatum* (фиолетовый) и *stratum oriens* (оранжевый) в контрольных клетках, после обработки ODQ и после обработки ODQ+L-NAME. Наверху пример ответов при +35 мВ и -70 мВ. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ . Открытые серые кружки представляют отдельные точки данных.

В работе Ну и др. (Ну и др., 1994, рис. 1) показано, что высокие концентрации полиаминов могут ингибировать работу NOS, поэтому мы также зарегистрировали индексы выпрямления со  $100 \mu\text{M}$  спермина в пипетке. Мы обнаружили, что в присутствии  $100 \mu\text{M}$  спермина во внутриклеточном растворе статистически достоверная разница между апикальными и базальными дендритами пропадает (рис. 17), что говорит о возможном влиянии спермина на NO-синтазу.

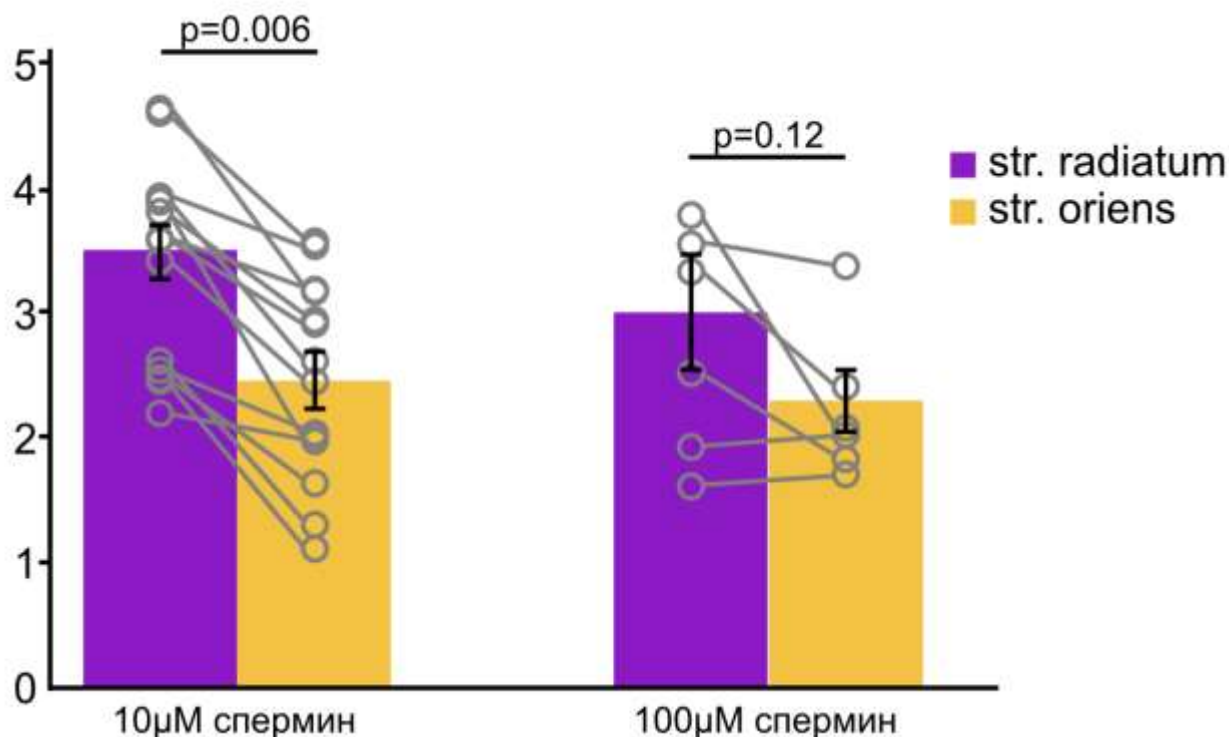


Рисунок 17. Индексы выпрямления в *str. radiatum* (фиолетовый) и *str. oriens* (оранжевый) с 10 и 100 μM в пэтч-пипетке.

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

Роль оксида азота в механизмах синаптической пластичности была неоднократно показана как в гиппокампе (Bal и др., 2017; Blackshaw и др., 2003; Frade и др., 2009), так и в других структурах головного мозга (Dachtler и др., 2011; Chachlaki и др., 2017; Naj-Dahmane и др., 2017). Кроме того, известно, что он по-разному задействован в механизмах синаптической пластичности на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа (Son и др., 1998; Son и др., 1996; Haley и др., 1996). В нашей работе мы также проверили, как блокада NO- синтазы 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. Схема расположения стимулирующих и регистрирующих электродов показана на рисунке 18. Стимуляция апикальных и базальных отростков происходила отдельно на

разных срезах мозга одного животного. Срезы помещались в разные камеры и регистрация полевых ВПСП происходила одновременно.

При записи базовой линии оценивались стабильность амплитуды и формы ответов. При выраженном падении или росте амплитуды ВПСП производилась замена среза. На рисунках 19 и 21 (слева) показаны примеры ВПСП при различных экспериментальных условиях. Оценка ВПСП производится по углу наклона переднего фронта ВПСП, который отражает, в первую очередь, вклад быстрых АМПА-токов в амплитуду ответа. Поскольку основным типом регуляции амплитуды ответа является фосфорилирование/встраивание/эндоцитоз АМПА рецепторов, то при анализе использовалась скорость нарастания ВПСП. При этом выбирался наиболее прямой участок переднего фронта, и на этом участке были поставлены курсоры, расположение которых сохранялось на протяжении всего эксперимента.

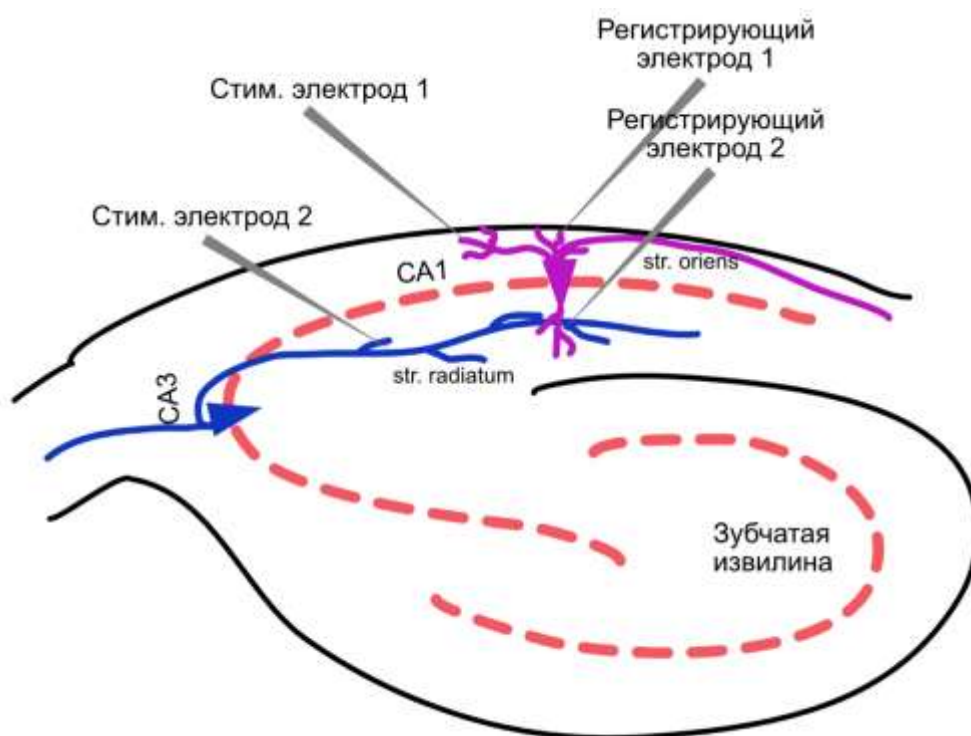


Рисунок 18. Схема расположения электродов в экспериментах с экстраклеточной регистрацией полевых потенциалов. Стимулирующие электроды располагались в *stratum radiatum* и *stratum oriens*. Регистрирующие электроды помещались в область коллатералей Шаффера в *stratum radiatum* и в *stratum oriens*.

Индукция долговременной потенциации производилась с помощью протокола тета-стимуляции, для которого 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 (100μM).

Полученные результаты, показали, что блокада NO-синтазы по-разному влияет на долговременную потенциацию на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа. Так, в *str. radiatum* оксид азота оказался необходим для поздней фазы ДВП (рис. 19 и 20): угол наклона ВПСП 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%±15, L-NNA (n=6): 205.5±22.8% от базовой линии, p=0.559, Two-Way ANOVA), тогда как на 59-60 минуте после индукции ДВП угол наклона ВПСП под L-NNA был достоверно ниже, чем у контрольных срезов (контроль: 184.9%±9, L-NNA: 121±22% от базовой линии, p=0.43, 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).

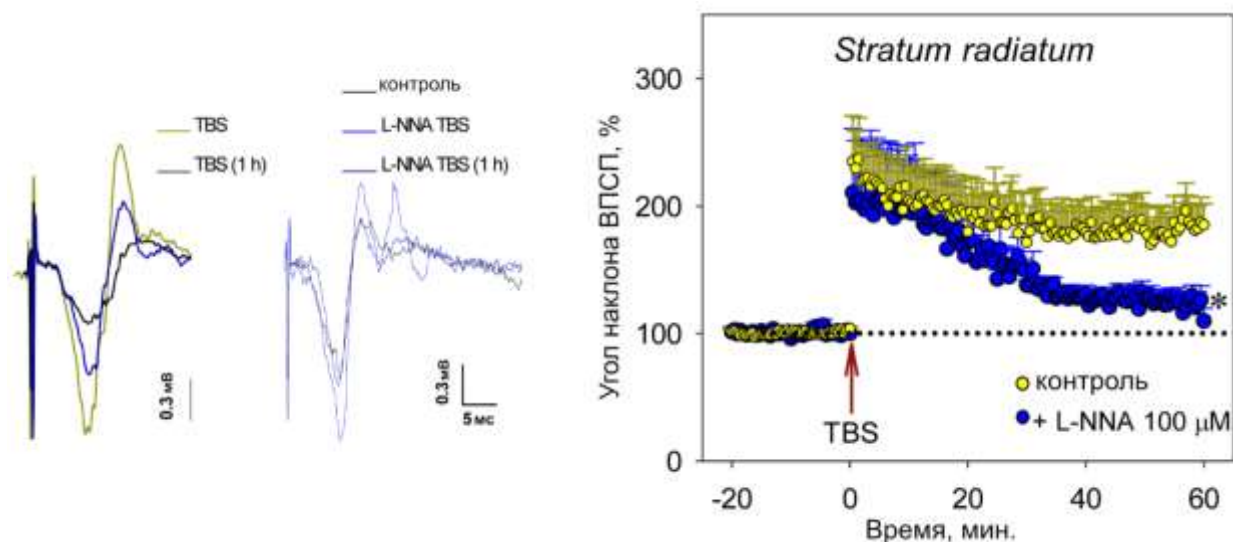


Рисунок 19. Слева – примеры ВПСП. Справа – графики долговременных потенциалов в контрольных срезах (желтые кружки) и в срезах, инкубированных в L-NNA (синие кружки) в *str. radiatum*. TBS – протокол пачечной тета-стимуляции (theta-burst stimulation).

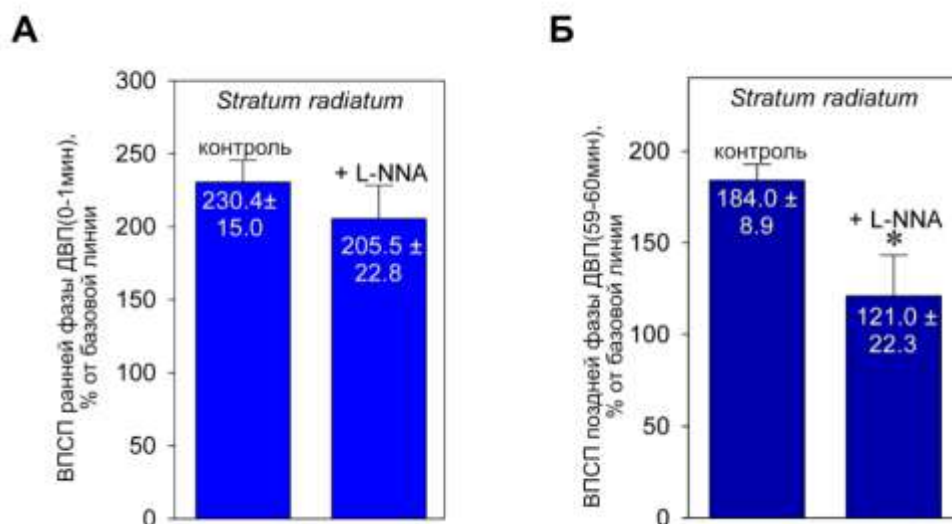


Рисунок 20. Гистограммы, отражающие угол наклона ВПСП в контрольных срезах и срезах, инкубированных в L-NNA в *str. radiatum*: (А) 0-1 мин после индукции ДВП и (Б) 59-60 мин после индукции ДВП. \* $p < 0.05$

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. 21 и 22). 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, для базальных дендритов пирамидных нейронов CA1 оксид азота необходим для ранней фазы долговременной потенциации.

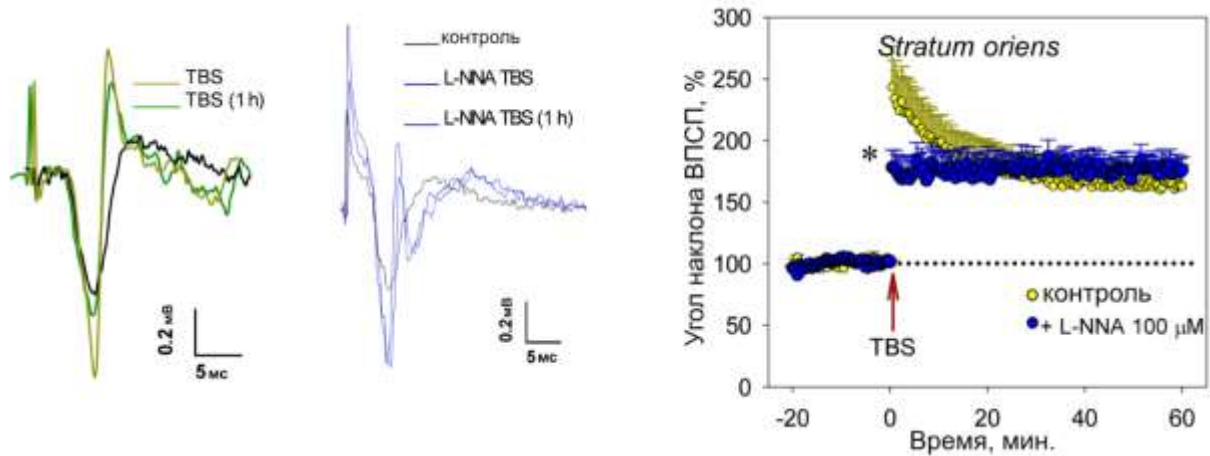


Рисунок 21. Слева – примеры ВПСП. Справа – графики долговременных потенций в контрольных срезах (желтые кружки) и в срезах, инкубированных в L-NNA (синие кружки) в *str. oriens*. TBS – протокол пачечной тета-стимуляции (theta-burst stimulation).  $*p<0.05$

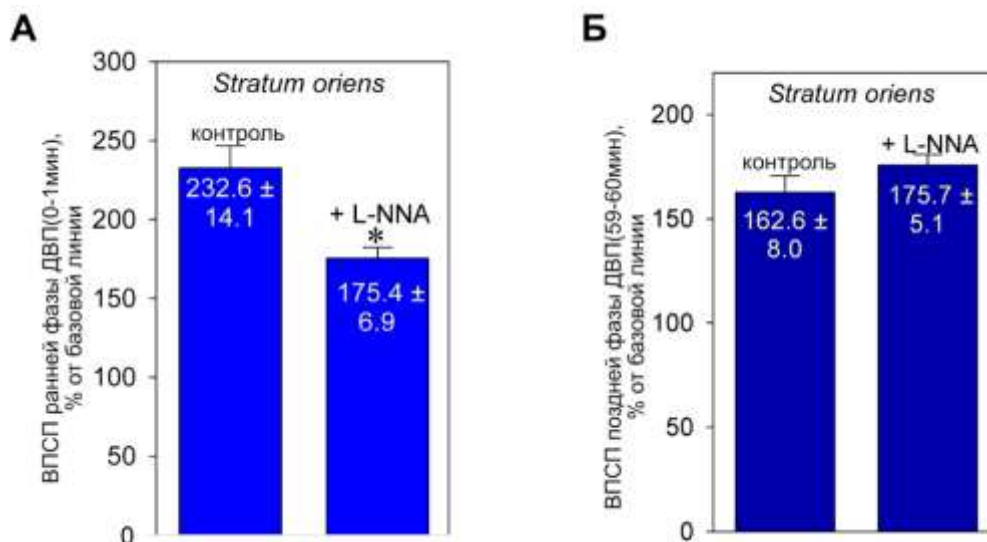


Рисунок 22. Гистограммы, отражающие угол наклона ВПСП в контрольных срезах и срезах, инкубированными в L-NNA в *str. oriens*: (А) 0-1 мин после индукции ДВП и (Б) 59-60 мин после индукции ДВП.  $*p<0.05$



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:  $0.96 \pm 0.7$ , L-NNA:  $1.9 \pm 0.4$ , One Way ANOVA,  $p=0.025$ , рис. 23), тогда как в *str. radiatum* таких различий выявлено не было. Эти результаты могут свидетельствовать о пресинаптическом вкладе в раннюю фазу ДВП на базальных дендритах и различия, отраженные на рис. 19 и 21 могут быть обусловлены именно пресинаптическим вкладом в механизмы потенциации.

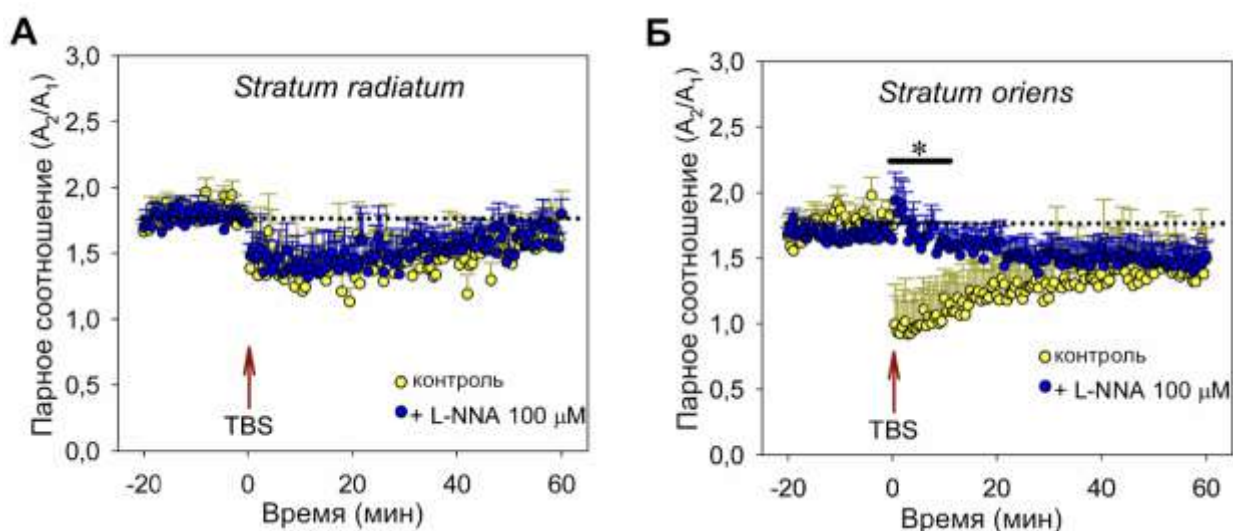


Рисунок 23. Парное соотношение в (А) *str. radiatum* и (Б) *str. oriens* после индукции ДВП в контрольных срезах (желтые кружки) и в срезах, инкубированных в L-NNA (синие кружки). \* $p < 0.05$

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.

#### **4.4. 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, сразу 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). Мы не исследовали влияние ДМСО на реактивацию памяти, так как ранее в работе Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011 было продемонстрировано отсутствие какого-либо эффекта.

Через два дня крысам были предъявлены три условных стимула в камере С (Тест 2), и еще одно тестирование проводилось через 3 дополнительных дня (Тест 3).

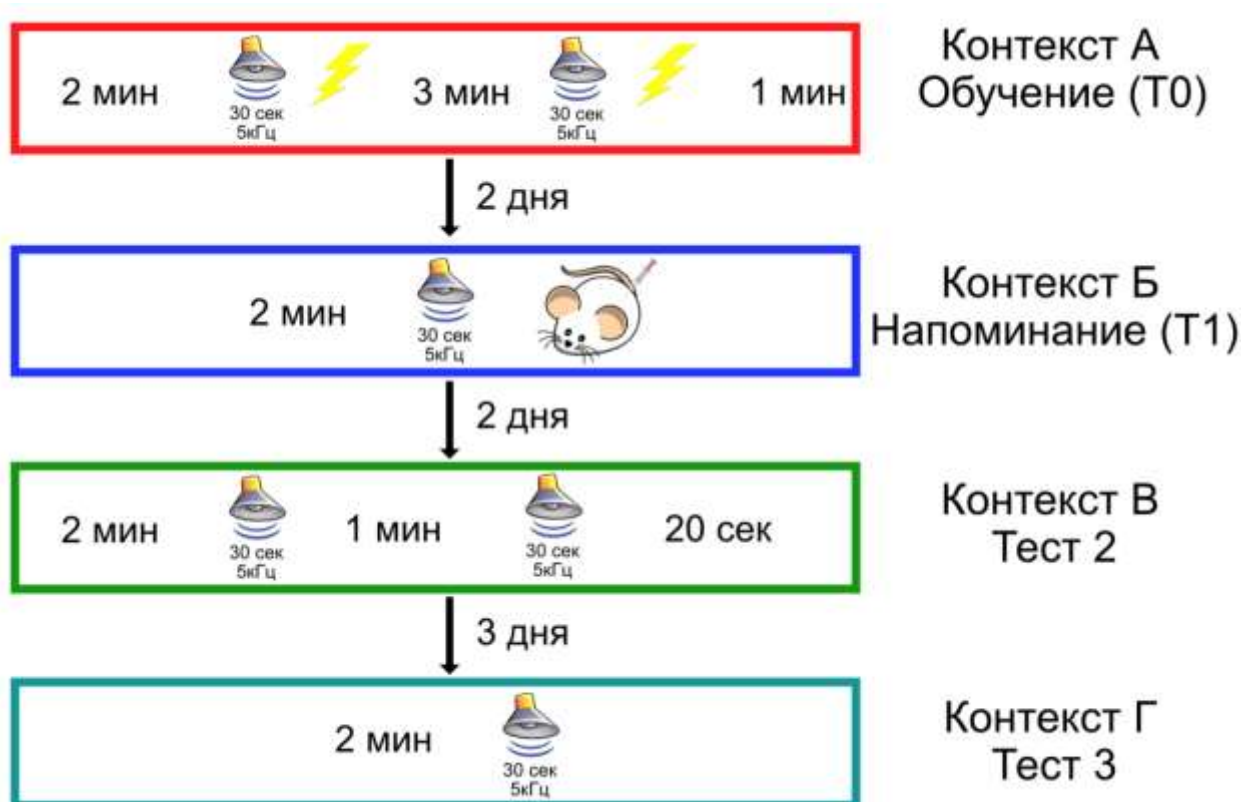


Рисунок 24. Схема проведения эксперимента по модели условно-рефлекторного замирания. Цвета прямоугольников отражают различные контексты, указанные справа.

Проценты замирания на первый условный стимул были использованы для статистического анализа. Полученные проценты замирания в Тесте 1 свидетельствуют о том, что животные во всех группах обучились условно-рефлекторному замиранию, так как во всех группах наблюдалось достоверное увеличение процента замирания по сравнению с днем обучения ( $F_{1,67}=528.77$ ,  $P=0.0001$ , рис. 25).

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), 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 предотвратила 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.

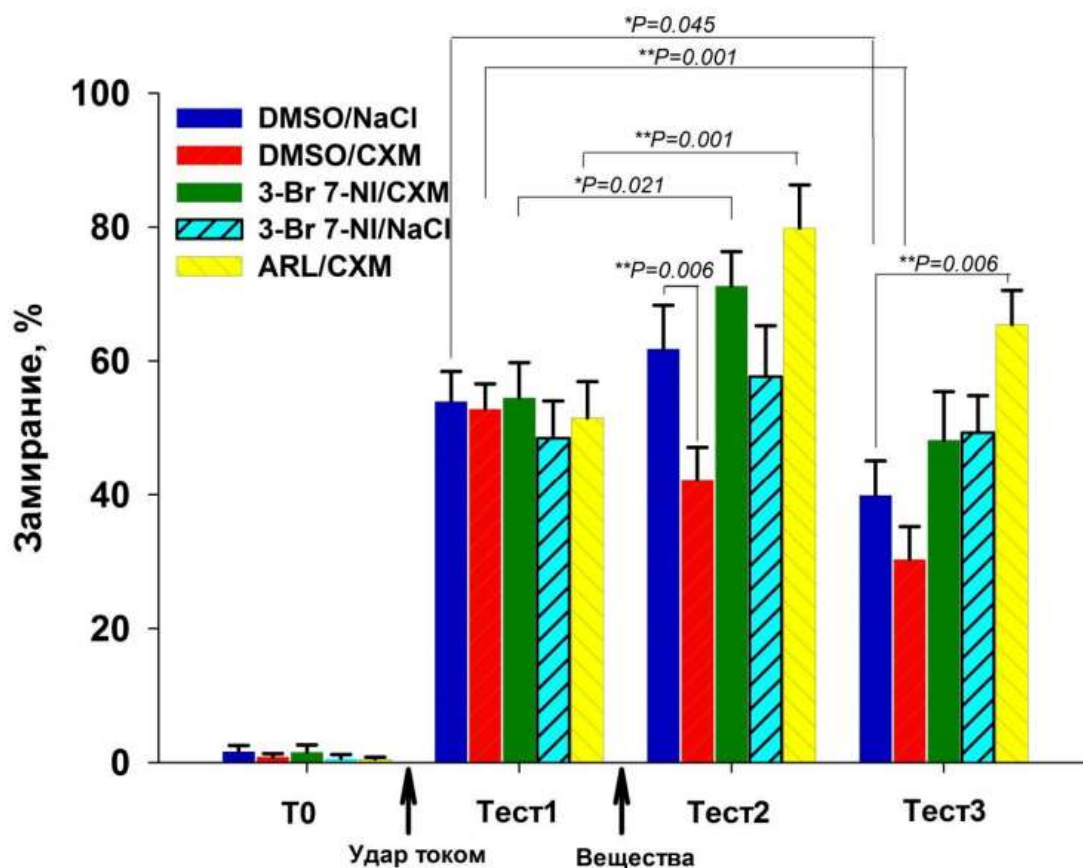


Рисунок 25. Проценты замирания животных на предъявление звукового стимула. Синий – животные, инъецированные контрольным раствором сразу после напоминания (Тест1). Красный – инъекция циклогексида. Зеленый - 3-Br-7-ni и циклогексида. Голубой - 3-Br-7-ni. Желтый - ARL и циклогексида.

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 циклогексида ( $p<0.001$ ,  $t=4.874$ , 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.

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 (рис. 5), что связано с высвобождением GluR2-несодержащих АМПА рецепторов от полиаминового блока, которое приводит к увеличению проводимости этих рецепторов (Rozov и др., 2012). Этого роста не происходит в присутствии 10  $\mu$ M спермина в пипетке (рис. 6). 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 (рис. 2). Однако при регистрации спустя  $\sim$ 1 минуту после прорыва мембраны полиамин-зависимая фасилитация также проявилась на базальных дендритах, что может быть связано с тем, что апикальные и базальные отростки отличаются морфологически, из-за чего, вероятно, полиамины из базальных дендритов вымываются быстрее. 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 (рис. 4), что позволяет предположить, что физиология или количество рецепторов различаются в этих компартментах.

Присутствие КП-АМПА рецепторов в клетках CA1 вызывает вопрос об их локализации, поскольку исследования показали разные данные об их присутствии в постсинапсе после индукции ДВП (Plant и др., 2006; Adesnik и Nicoll, 2007; Yang и др., 2010; Gray и др., 2007). Некоторые исследования показали, что КП-АМПА рецепторы составляют небольшую субпопуляцию синаптических рецепторов АМПА в непотенцированных пирамидных нейронах CA1 у взрослых грызунов (Rozov и др., 2012; Mattison и др., 2014), а в других исследованиях было показано, что АМПА рецепторы, лишённые GluA2, в пирамидных клетках гиппокампа заменяются GluA2-содержащими АМПА рецепторами у взрослых животных (Ho и др., 2007; Malkin и др., 2016). Это несоответствие можно объяснить присутствием полиаминов в пэтч-пипетке, что влияет на способность антагонистов КП-АМПА рецепторов блокировать их (Rozov и др., 2012). Кроме того, присутствие полиаминов в пипетке также определяет ректификационные характеристики синапсов с АМПА рецепторами, не содержащими GluA2 в их мембране (Kamboj и др., 1995): вольт-амперные характеристики таких синапсов в отсутствие спермина линейны, как у мутантных  $\text{GluA1}^{-/-}$  мышей (Rozov и др., 2012).

Концентрация полиаминов в пэтч-пипетке варьируется в разных исследованиях (Rozov и др., 2012; Mattison и др., 2014; Malkin и др., 2016). Точная концентрация внутриклеточных свободных полиаминов в пирамидных клетках CA1 неизвестна; однако известно, что концентрация варьирует в разных областях мозга крысы (Shaskan и др., 1973), а также у других млекопитающих (Igarashi и Kashiwagi, 2010). В нашем исследовании мы использовали 10  $\mu\text{M}$  спермина во внутриклеточном растворе для записи ректификационных свойств синапсов. Можно предположить, что концентрация спермина в наших экспериментах была недостаточной для успешного блокирования КП-АМПА рецепторов; однако эксперименты с полиамин-зависимой фасилитацией показали обратное: 10  $\mu\text{M}$  спермина в пэтч-пипетке предотвращали вымывание полиаминов из дендритов. Более того, использование внутриклеточного раствора, содержащего 10  $\mu\text{M}$

спермина, не вызвало роста амплитуды ВПСТ, как при регистрации базовой трансмиссий без спермина в пипетке. Кроме того, Ну и др. показали, что 100  $\mu\text{M}$  спермина ингибирует образование [3H] L-цитруллина, который отражает активность NO-синтазы, в  $\sim 60\%$  в клетках мозжечка, тогда как 10  $\mu\text{M}$  лишь незначительно ингибирует эту реакцию (Ну и др., 1994, рис. 1). Это может указывать на то, что высокая концентрация спермина в пэтч-пипетке может вызвать ингибирование NOS. Действительно, когда в пэтч-пипетку было добавлено 100  $\mu\text{M}$  спермина, разница в индексах выпрямления между апикальными и базальными дендритами пирамидных клеток CA1 не была статистически достоверной (апикальные:  $3 \pm 0.4$ ; базальные:  $2.3 \pm 0.2$ ,  $n=7$ ,  $p=0.12$ , Two Way ANOVA) (рис. 17), как и в случае блокады NOS.

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 (рис. 9), что отражает уменьшение вклада КП-АМПА рецепторов в токи этих синапсов. Кроме того, ингибирование NOS предотвратило снижение амплитуды ответа при обработке Nasp $m$  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 (рис. 16), но не обнаружили никаких различий в индексах выпрямления исследуемых синапсов.

Полученные результаты также позволяют предположить, что оксид азота повышает чувствительность КП-АМПА рецепторов к полиаминам: это может объяснить изменения в вольт-амперных характеристиках, снижение полиамин-зависимой фасилитации и сохранение роста амплитуды ВПСТ во время отмывания полиаминов при ингибировании NOS. Более того, такая модуляция с помощью вспомогательного белка старгазина была продемонстрирована для АМПА рецепторов, не содержащих GluA2 субъединицы (Soto и др., 2007). Однако механизм этой модуляции требует дальнейшего уточнения. Одним из возможных объяснений эффекта ингибирования NOS является снижение поверхностной экспрессии КП-АМПА рецепторов. Однако это не объясняет увеличения амплитуды ВПСТ во время вымывания полиаминов после инкубации в L-NAME.



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 улитках были продемонстрированы данные, свидетельствующие о необходимом участии оксида азота в реконсолидации памяти на виноградной улитке (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 синапсов 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**

В заключение, настоящая работа демонстрирует эффекты ингибирования NOS на КП-АМПА-опосредованные вызванные постсинаптические 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 полученные в нашей работе данные раскрывают более подробную информацию об этом сложном коде.

## ВЫВОДЫ

1. Методом пэтч-клямп 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 срезе 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.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМПА -  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислота

ВПСП - Возбуждающие постсинаптические потенциалы

ВПСТ – возбуждающие постсинаптические токи

ГАМК -  $\gamma$ -Аминомасляная кислота

ДВП – долговременная потенция

ИВ – индекс выпрямления

КП-АМПА рецептор – кальций-проводящий АМПА рецептор

МАПК - митоген-активируемые протеинсинтазы

НМДА - N-метил-d-аспартат

рГЦ - растворимая гуанилатциклаза

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат

Akt – протеинкиназа В

BDNF - нейротрофический фактор головного мозга

CaMKII – кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II

Cdk5 - циклин-зависимая киназа 5

CRE - элемент цАМФ-ответа

CREB - белок, связывающий элемент ответа цАМФ фактора транскрипции

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза

ERK1/2 - внеклеточно регулируемые киназы 1 и 2

FRET - резонансный перенос энергии Фёрстера

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

L-Me-Arg - L-метиларгинин

nNOS – нейрональная NO-синтаза

NO – оксид азота

NSF - N-метилмалеимид-чувствительный фактор

PICK1 - белок, взаимодействующий с РКС 1

PKA – протеинкиназа А, цАМФ-зависимой протеинкиназа

PKC - протеинкиназа С

PKG – протеинкиназа G, цГМФ-зависимая протеинкиназа

PSD95 - белок постсинаптической плотности 95

Shp-1,2 - тирозинфосфатаза 1,2, содержащая домен области 2 гомологии Src

TARP - трансмембранные регуляторные белки АМПА рецептора

VDCC - потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает сердечную благодарность за неоценимый вклад и поддержку в ходе выполнения настоящей работы руководителю диссертационной работы Баль Наталье Вячеславовне, а также соавторам опубликованных по теме диссертации статей Винарской Алие Халиловне, Рысаковой Марии Павловной, Зюзиной Алене Борисовне, Балабану Павлу Милославовичу. Также автор выражает благодарность Мальцеву Александру Владимировичу за неоценимую помощь в экспериментах с экстраклеточной регистрацией полевых постсинаптических потенциалов, Балабану Павлу Милославовичу и Малышеву Алексею Юрьевичу за критические замечания в ходе выполнения настоящей работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abel T., Nguyen P.V., Barad M., Deuel T.A., Kandel E.R., Bourtchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. // *Cell*. 1997. Т. 88. № 5. С. 615-26.
2. Adesnik H., Nicoll R.A. Conservation of glutamate receptor 2-containing AMPA receptors during long-term potentiation. *J Neurosci*. 2007. Т. 27. № 17. С. 4598-602.
3. Ahern G.P., Klyachko V.A., Jackson M.B. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. // *Trends Neurosci*. 2002. Т. 25. № 10. С. 510-7.
4. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. // *Biochem. J*. 2001. Т. 357. № 3. С. 593–615.
5. Alfonso S., Kessels H.W., Banos C.C., Chan T.R., Lin E.T., Kumaravel G., Scannevin R.H., Rhodes K.J., Huganir R., Guckian K.M., Dunah A.W., Malinow R. Synapto-depressive effects of amyloid beta require PICK1. // *Eur J Neurosci*. 2014. Т. 39. № 7. С. 1225-33.
6. Amakhin D.V., Soboleva E.B., Ergina J.L., Malkin S.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. Seizure-Induced Potentiation of AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission in the Entorhinal Cortex. // *Front Cell Neurosci*. 2018. Т. 12. С. 486.

7. Bal N., Roshchin M., Salozhin S., Balaban P. Nitric Oxide Upregulates Proteasomal Protein Degradation in Neurons. // *Cell Mol Neurobiol.* 2017. T. 37. № 5. C. 763-769.
8. Bal N.V., Rysakova M.P., Vinarskaya A.K., Ivanova V., Zuzina A.B., Balaban P.M. Cued memory reconsolidation in rats requires nitric oxide. // *Eur. J. Neurosci.* 2017. T. 45. № 5. C. 643–647.
9. Balaban P.M. Molecular Mechanism of Memory Modification. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2018. T. 48. C. 734–740
10. Balaban P.M., Roshchin M., Timoshenko A.K., Gainutdinov K.L., Bogodvid T.K., Muranova L.N., Zuzina A.B., Korshunova T.A. Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails. // *Eur. J. Neurosci.* 2014. T. 40. № 6. C. 2963–2970.
11. Balaban P.M., Roshchin M.V., Korshunova T.A. [Two-faced nitric oxide is necessary for both erasure and consolidation of memory] // *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I P Pavlova.* 2011. T. 61. № 3. C. 274–280.
12. Banke T.G., Bowie D., Lee H., Huganir R.L., Schousboe A., Traynelis S.F. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. // *J Neurosci.* 2000. T. 20. № 1. C. 89-102.
13. Barria A., Derkach V., Soderling T. Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. // *J Biol Chem.* 1997. T. 272. № 52. C. 32727-30.
14. Barria A., Muller D., Derkach V., Griffith L.C., Soderling T.R. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. // *Science.* 1997. T. 276. № 5321. C. 2042-5.
15. Barry M.F., Ziff E.B. Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol.* 2002. T. 12. № 3. C. 279-86.
16. Bartus K., Pigott B., Garthwaite J. Cellular targets of nitric oxide in the hippocampus. // *PLoS One.* 2013. T. 8. № 2. C. e57292.



17. Bear M.F., Kirkwood A. Neocortical long-term potentiation. // *Curr Opin Neurobiol.* 1993. T. 3. № 2. C. 197-202.
18. Bellone C., Lüscher C. Cocaine triggered AMPA receptor redistribution is reversed in vivo by mGluR-dependent long-term depression. // *Nat Neurosci.* 2006. T. 9. № 5. C. 636-41.
19. Bellone C., Lüscher C. mGluRs induce a long-term depression in the ventral tegmental area that involves a switch of the subunit composition of AMPA receptors. // *Eur J Neurosci.* 2005. T. 21. № 5. C. 1280-8.
20. Benavides-Piccione R., Regalado-Reyes M., Fernaud-Espinosa I., Kastanauskaite A., Tapia-González S., León-Espinosa G., Rojo C., Insausti R., Segev I., DeFelipe J. Differential Structure of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in the Human and Mouse. // *Cereb Cortex.* 2020. T. 30. № 2. C. 730-752.
21. Benke T.A., Lüthi A., Isaac J.T., Collingridge G.L. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. // *Nature.* 1998. T. 393. № 6687. C. 793-7.
22. Bianchetta M.J., Lam T.T., Jones S.N., Morabito M.A. Cyclin-dependent kinase 5 regulates PSD-95 ubiquitination in neurons. // *J Neurosci.* 2011. T. 31. № 33. C. 12029-35.
23. Blackshaw S., Eliasson M.J., Sawa A., Watkins C.C., Krug D., Gupta A., Arai T., Ferrante R.J., Snyder S.H. Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. // *Neuroscience.* 2003. T. 119. № 4. C. 979-90.
24. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. // *Cell Mol Life Sci.* 1999. T. 55. № 8-9. C. 1015-28.
25. Bowie D., Mayer M.L. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. // *Neuron.* 1995. T. 15. № 2. C. 453-62.

26. Bradshaw K.D., Emptage N.J., Bliss T.V. A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. // *Eur J Neurosci*. 2003. T. 18. № 11. C. 3150-2.
27. Bramham C.R., Worley P.F., Moore M.J., Guzowski J.F. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. // *J Neurosci*. 2008. T. 28. № 46. C. 11760-7.
28. Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. // *Nature*. 1990. T. 347. № 6295. C. 768-70.
29. Bredt D.S., Nicoll R.A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. // *Neuron*. 2003. T. 40. № 2. C. 361-79.
30. Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989. T. 86. № 22. C. 9030-3.
31. Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. // *Neuron*. 1992. T. 8. № 1. C. 3-11.
32. Brenman J.E., Bredt D.S. Nitric oxide signaling in the nervous system. // *Methods Enzymol*. 1996. T. 269. C. 119-129.
33. Brenman J.E., Christopherson K.S., Craven S.E., McGee A.W., Bredt D.S. Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. // *J Neurosci*. 1996. T. 16. № 23. C. 7407-15.
34. Brzdak P., Wójcicka O., Zareba-Koziol M., Minge D., Henneberger C., Włodarczyk J., Mozrzymas J.W., Wójtowicz T. Synaptic Potentiation at Basal and Apical Dendrites of Hippocampal Pyramidal Neurons Involves Activation of a Distinct Set of Extracellular and Intracellular Molecular Cues. // *Cereb Cortex*. 2019. T. 29. № 1. C. 283-304.
35. Buga G.M., Wei L.H., Bauer P.M., Fukuto J.M., Ignarro L.J. NG-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. // *Am J Physiol*. 1998. T. 275. № 4. C. R1256-64.

36. Burette A., Zabel U., Weinberg R.J., Schmidt H.H., Valtschanoff J.G.. Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. // *J Neurosci.* 2002. T. 22. № 20. C. 8961-70.
37. Burnashev N., Zhou Z., Neher E., Sakmann B. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. // *J Physiol.* 1995. T. 485. C. 403-18.
38. Cabrera-Pastor A., Llansola M., Felipe V. Extracellular Protein Kinase A Modulates Intracellular Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II, Nitric Oxide Synthase, and the Glutamate-Nitric Oxide-cGMP Pathway in Cerebellum. Differential Effects in Hyperammonemia. // *ACS Chem Neurosci.* 2016. T. 7. № 12. C. 1753-1759.
39. Cai Y.Q., Wang W., Hou Y.Y., Zhang Z., Xie J., Pan Z.Z. Central amygdala GluA1 facilitates associative learning of opioid reward. // *J Neurosci.* 2013. T. 33. № 4. C. 1577-88.
40. Carlezon W.A. Jr., Duman R.S., Nestler E.J. The many faces of CREB. // *Trends Neurosci.* 2005. T. 28. № 8. C. 436-45.
41. Carlisle H.J., Kennedy M.B. Spine architecture and synaptic plasticity. // *Trends Neurosci.* 2005. T. 28. № 4. C. 182-7
42. Carvalho A.L., Caldeira M.V., Santos S.D., Duarte C.B. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. // *Br J Pharmacol.* 2008. T. 153 приложение 1: C. 310-24.
43. Cenquizca L.A., Swanson .LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. // *Brain Res Rev.* 2007. T. 56. № 1. C. 1-26.
44. Chachlaki K., Garthwaite J., Prevot V. The gentle art of saying NO: How nitric oxide gets things done in the hypothalamus. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2017. T. 13. № 9. C. 521–535.
45. Chen L., Chetkovich D.M., Petralia R.S., Sweeney N.T., Kawasaki Y., Wenthold R.J., Brecht D.S., Nicoll R.A. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA

- receptors by two distinct mechanisms. // *Nature*. 2000. T. 408. № 6815. C. 936-43.
46. Chetkovich D.M., Sweatt J.D. NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. // *J Neurochem*. 1993. T. 61. № 5. C. 1933-42.
47. Choi Y.B., Tenneti L., Le D.A., Ortiz J., Bai G., Chen H.S., Lipton S.A. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. // *Nat Neurosci*. 2000. T. 3. № 1. C. 15-21.
48. Christie J.M., Jahr C.E. Multivesicular release at Schaffer collateral-CA1 hippocampal synapses. // *J Neurosci*. 2006. T. 26. № 1. C. 210-6.
49. Christopherson K.S., Hillier B.J., Lim W.A., Brecht D.S. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. // *J. Biol. Chem*. 1999. T. 274. № 39. C. 27467–27473.
50. Clem R.L., Anggono V., Huganir R.L. PICK1 regulates incorporation of calcium-permeable AMPA receptors during cortical synaptic strengthening. // *J Neurosci*. 2010. T. 30. № 18. C. 6360-6.
51. Clem R.L., Barth A. Pathway-specific trafficking of native AMPARs by in vivo experience. // *Neuron*. 2006. T. 49. № 5. C. 663-70.
52. Clem R.L., Huganir R.L. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. // *Science*. 2010. T. 330. № 6007. C. 1108-12.
53. Coffino P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001. T. 2. № 3. C. 188-94.
54. Colledge M., Snyder E.M., Crozier R.A., Soderling J.A., Jin Y., Langeberg L.K., Lu H., Bear M.F., Scott J.D. Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. // *Neuron*. 2003. T. 40. № 3. C. 595-607.
55. Cooney J.R., Hurlburt J.L., Selig D.K., Harris K.M., Fiala J.C. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. // *J Neurosci*. 2002. T. 22. № 6. C. 2215-24.

56. Dachtler J., Hardingham N.R., Glazewski S., Wright N.F., Blain E.J., Fox K. Experience-dependent plasticity acts via GluR1 and a novel neuronal nitric oxide synthase-dependent synaptic mechanism in adult cortex. // *J Neurosci*. 2011. T. 31. № 31. C. 11220-30.
57. Dawson T.M., Dawson V.L. Nitric Oxide Signaling in Neurodegeneration and Cell Death. // *Adv. Pharmacol*. 2018. T. 82. C. 57–83
58. Debiec J., LeDoux J.E., Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*. 2002. T. 36. № 3. C. 527-38.
59. Deora A.A., Hajjar D.P., Lander H.M. Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. // *Biochemistry*. 2000. T. 39. № 32. C. 9901-8.
60. Derkach V., Barria A., Soderling T.R. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. T. 96. № 6. C. 3269-74.
61. Díaz E. Regulation of AMPA receptors by transmembrane accessory proteins. // *Eur J Neurosci*. 2010. T. 32. № 2. C. 261-8.
62. Diering G.H., Heo S., Hussain N.K., Liu B., Huganir R.L. Extensive phosphorylation of AMPA receptors in neurons. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016. T 113. № 33. C. E4920-7.
63. Diering G.H., Huganir R.L. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. // *Neuron*. 2018. T. 100. № 2. C. 314-329.
64. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. The glutamate receptor ion channels. // *Pharmacol Rev*. 1999. T. 51. № 1. C. 7-61.
65. Doerner D., Alger B.E. Cyclic GMP depresses hippocampal Ca<sup>2+</sup> current through a mechanism independent of cGMP-dependent protein kinase. // *Neuron*. 1988. T. 1. № 8. C. 693-9.
66. Du W., Weiss H., Harvey J.A. Associative learning is enhanced by selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors and retarded by a nitric oxide donor in the rabbit. // *Psychopharmacology (Berl)*. 2000. T. 150. № 3. C. 264-71.

67. Dugué G.P., Dumoulin A., Triller A., Dieudonné S. Target-dependent use of co-released inhibitory transmitters at central synapses. // *J Neurosci*. 2005. T. 25. № 28. C. 6490-8.
68. Eastwood S.L., Burnet P.W., Harrison P.J. GluR2 glutamate receptor subunit flip and flop isoforms are decreased in the hippocampal formation in schizophrenia: a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) study. // *Brain Res Mol Brain Res*. 1997. T. 44. № 1. C. 92-8.
69. Ehlers M.D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. // *Neuron*. 2000. T. 28. № 2. C. 511-25.
70. Eliasson M.J.L., Blackshaw S., Schell M.J., Snyder S.H. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: Prominent functional localizations in the brain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. T. 94. № 7. C. 3396–3401.
71. Endo S., Launey T. Nitric oxide activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and enhances declustering of ionotropic glutamate receptor subunit 2/3 in rat cerebellar Purkinje cells. // *Neurosci Lett*. 2003. T. 350. № 2. C. 122-6.
72. Esteban J.A., Shi S.H., Wilson C., Nuriya M., Huganir R.L., Malinow R. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. // *Nat Neurosci*. 2003. T. 6. № 2. C. 136-43.
73. Fish J.E., Marsden P.A. Endothelial nitric oxide synthase: Insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. // *Cell. Mol. Life Sci*. 2006. T. 63. № 2. C. 144–162.
74. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. // *Eur Heart J*. 2012. T. 33. № 7. C. 829-37, 837a-837d.
75. Frade J.G., Barbosa R.M., Laranjinha J. Stimulation of NMDA and AMPA glutamate receptors elicits distinct concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal slices. // *Hippocampus*. 2009. T. 19. № 7. C. 603-11.
76. Francis S.H., Busch J.L, Corbin J.D., Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. // *Pharmacol Rev*. 2010. T. 62. № 3. C. 525-63.

77. Frey U., Huang Y.Y., Kandel E.R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. // *Science*. 1993. T. 260. № 5114. C. 1661-4.
78. Gardner S.M., Takamiya K., Xia J., Suh J.G., Johnson R., Yu S., Huganir R.L. Calcium-permeable AMPA receptor plasticity is mediated by subunit-specific interactions with PICK1 and NSF. // *Neuron*. 2005. T. 45. № 6. C. 903-15.
79. Garry E.M., Moss A., Rosie R., Delaney A., Mitchell R., Fleetwood-Walker S.M. Specific involvement in neuropathic pain of AMPA receptors and adapter proteins for the GluR2 subunit. // *Mol Cell Neurosci*. 2003. T. 24. № 1. C. 10-22.
80. Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. // *Eur. J. Neurosci*. 2008. T. 27. № 11. C. 2783–2802.
81. Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. // *Nature*. 1988. T. 336. № 6197. C. 385-8.
82. Giesen J., Füchtbauer E.M., Füchtbauer A., Funke K., Koesling D., Russwurm M. AMPA Induces NO-Dependent cGMP Signals in Hippocampal and Cortical Neurons via L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. // *Cereb Cortex*. 2020. T. 30. № 4. C. 2128-2143.
83. Granger A.J., Nicoll R.A. LTD expression is independent of glutamate receptor subtype. // *Front Synaptic Neurosci*. 2014. T. 6. C. 15.
84. Granger A.J., Shi Y., Lu W., Cerpas M., Nicoll R.A. LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. // *Nature*. 2013. T. 493. № 7433. C. 495-500.
85. Gray E.E., Fink A.E., Sariñana J., Vissel B., O'Dell T.J. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region does not require insertion and activation of GluR2-lacking AMPA receptors. // *J Neurophysiol*. 2007. T. 98. № 4. C. 2488-92.
86. Guire E.S., Oh M.C., Soderling T.R., Derkach V.A. Recruitment of calcium-permeable AMPA receptors during synaptic potentiation is regulated by CaM-kinase I. // *J Neurosci*. 2008. T. 28. № 23. C. 6000-9.

87. Guntupalli S., Jang S.E., Zhu T., Huganir R.L., Widagdo J., Anggono V. GluA1 subunit ubiquitination mediates amyloid- $\beta$ -induced loss of surface  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. // *J Biol Chem*. 2017. T. 292. № 20. C. 8186-8194.
88. Haj-Dahmane S., Béique J.C., Shen R.Y. GluA2-Lacking AMPA Receptors and Nitric Oxide Signaling Gate Spike-Timing-Dependent Potentiation of Glutamate Synapses in the Dorsal Raphe Nucleus. // *eNeuro*. 2017. T. 4. № 3.
89. Haley J.E., Schaible E., Pavlidis P., Murdock A., Madison D.V. Basal and apical synapses of CA1 pyramidal cells employ different LTP induction mechanisms. // *Learn Mem*. 1996. T. 3. № 4. C. 289-95.
90. Haley J.E., Wilcox G.L., Chapman P.F.. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. // *Neuron*. 1992. T. 8. № 2. C. 211-6.
91. Hanley J.G. Subunit-specific trafficking mechanisms regulating the synaptic expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. // *Semin Cell Dev Biol*. 2014. T. 27. C. 14-22.
92. Hanley J.G., Khatri L., Hanson P.I., Ziff E.B. NSF ATPase and alpha-/beta-SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. // *Neuron*. 2002. T. 34. № 1. C. 53-67.
93. Hardingham N., Dachtler J., Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. // *Front. Cell. Neurosci*. 2013. T. 7. C. 190.
94. Hardingham N., Fox K.. The role of nitric oxide and GluR1 in presynaptic and postsynaptic components of neocortical potentiation. // *J Neurosci*. 2006. T. 26. № 28. C. 7395-404.
95. He K., Song L., Cummings L.W., Goldman J., Huganir R.L., Lee H.K. Stabilization of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors at perisynaptic sites by GluR1-S845 phosphorylation. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. T. 106. № 47. C. 20033-8.
96. Henley J.M., Barker E.A., Glebov O.O. Routes, destinations and delays: recent advances in AMPA receptor trafficking. // *Trends Neurosci*. 2011. T. 34. № 5. C. 258-68.



97. Herring B.E., Nicoll R.A. Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. // *Annu Rev Physiol.* 2016. T. 78. C. 351-65.
98. Higuchi M., Single F.N., Köhler M., Sommer B., Sprengel R., Seeburg P.H. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. // *Cell.* 1993. T. 75. № 7. C. 1361-70.
99. Ho G.P., Selvakumar B., Mukai J., Hester L.D., Wang Y., Gogos J.A., Snyder S.H. S-nitrosylation and S-palmitoylation reciprocally regulate synaptic targeting of PSD-95. // *Neuron.* 2011. T. 71. № 1. C. 131-41.
100. Ho M.T., Pelkey K.A., Topolnik L., Petralia R.S., Takamiya K., Xia J., Huganir R.L., Lacaille J.C., McBain C.J. Developmental expression of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors underlies depolarization-induced long-term depression at mossy fiber CA3 pyramid synapses. // *J Neurosci.* 2007. T. 27. № 43. C. 11651-62.
101. Hong I., Kim J., Kim J., Lee S., Ko H.G., Nader K., Kaang B.K., Tsien R.W., Choi S. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. T. 110. № 20. C. 8218-23.
102. Hopper R.A., Garthwaite J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. // *J Neurosci.* 2006. T. 26. № 45. C. 11513-21.
103. Hu J., Mahmoud M.I., el-Fakahany E.E. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. // *Neurosci Lett.* 1994. T. 175. № 1-2. C. 41-5.
104. Hu X.D., Huang Q., Yang X., Xia H. Differential regulation of AMPA receptor trafficking by neurabin-targeted synaptic protein phosphatase-1 in synaptic transmission and long-term depression in hippocampus. // *J Neurosci.* 2007. T. 27. № 17. C. 4674-86.
105. Huang E.P. Synaptic plasticity: a role for nitric oxide in LTP. // *Curr Biol.* 1997. T. 7. № 3. C. 141-3.
106. Huang Y., Man H.Y., Sekine-Aizawa Y., Han Y., Juluri K., Luo H., Cheah J., Lowenstein C., Huganir R.L., Snyder S.H. S-nitrosylation of N-

- ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. // *Neuron*. 2005. T. 6. № 4. C. 533-40.
107. Huganir R.L., Nicoll R.A. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. // *Neuron*. 2013. T. 80. № 3. C. 704-17.
108. Hulme S.R., Jones O.D., Ireland D.R., Abraham W.C. Calcium-dependent but action potential-independent BCM-like metaplasticity in the hippocampus. // *J Neurosci*. 2012. T. 32. № 20. C. 6785-94.
109. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. // *Trends Neurosci*. 1997. T. 20. № 3. C. 132–139.
110. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. // *Int J Biochem Cell Biol*. 2010. T. 42. № 1. C. 39-51.
111. Incontro S., Ciruela F., Ziff E., Hofmann F., Sánchez-Prieto J., Torres M. The type II cGMP dependent protein kinase regulates GluA1 levels at the plasma membrane of developing cerebellar granule cells. // *Biochim Biophys Acta*. 2013. T. 1833. № 8. C. 1820-31.
112. Ivanova V.O., Balaban P.M., Bal N.V. Modulation of AMPA Receptors by Nitric Oxide in Nerve Cells. // *Int J Mol Sci*. 2020. T. 21. № 3. C. 981.
113. Jaafari N., Henley J.M., Hanley J.G. PICK1 mediates transient synaptic expression of GluA2-lacking AMPA receptors during glycine-induced AMPA receptor trafficking. // *J Neurosci*. 2012. T. 32. № 34. C. 11618-30.
114. Johnstone V.P., Raymond C.R. A protein synthesis and nitric oxide-dependent presynaptic enhancement in persistent forms of long-term potentiation. // *Learn Mem*. 2011. T. 18. № 10. C. 625-33.
115. Joiner M.L., Lisé M.F., Yuen E.Y., Kam A.Y., Zhang M., Hall D.D., Malik Z.A., Qian H., Chen Y., Ulrich J.D., Burette A.C., Weinberg R.J., Law P.Y., El-Husseini A., Yan Z., Hell J.W.. Assembly of a beta2-adrenergic receptor--GluR1 signalling complex for localized cAMP signalling. // *EMBO J*. 2010. T. 29. № 2. C. 482-95..

116. Kamboj S.K., Swanson G.T., Cull-Candy S.G. Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. // *J Physiol*. 1995. T. 486. C. 297-303.
117. Kendrick K.M., Guevara-Guzman R., de la Riva C., Christensen J., Ostergaard K., Emson P.C. NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmitters in the rat striatum: in vivo evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. // *Eur J Neurosci*. 1996. T. 8. № 12. C. 2619-34.
118. Kessels H.W., Malinow R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. // *Neuron*. 2009. T. 61. № 3. C. 340-50.
119. Kirkwood A., Dudek S.M., Gold J.T., Aizenman C.D., Bear M.F. Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. // *Science*. 1993. T. 260. № 5113. C. 1518-21.
120. Kleppisch T., Feil R. cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. // *Handb Exp Pharmacol*. 2009. № 191. C. 549-79.
121. Köhler C. Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. I. The subicular complex. // *J Comp Neurol*. 1985. T. 236. № 4. C. 504-22.
122. Komsuoglu-Celikyurt I., Gocmez S.S., Mutlu O., Gacar N., Aricioglu F., Utkan T. Evidence for the involvement of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase on cognitive functions in rats. // *Life Sci*. 2011. T. 89. № 23-24. C. 905-10.
123. Kondo H., Lavenex P., Amaral D.G. Intrinsic connections of the macaque monkey hippocampal formation: II. CA3 connections. // *J Comp Neurol*. 2009. T. 515. № 3. C. 349-377.
124. Korshunova T.A., Balaban P.M. Nitric oxide is necessary for long-term facilitation of synaptic responses and for development of context memory in terrestrial snails. // *Neuroscience*. 2014. T. 266. C. 127–135.
125. Kristensen A.S., Jenkins M.A., Banke T.G., Schousboe A., Makino Y., Johnson R.C., Huganir R., Traynelis S.F. Mechanism of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-

- dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. // *Nat Neurosci*. 2011. T. 14. № 6. C. 727-35.
126. Kubota Y., Shigematsu N., Karube F., Sekigawa A., Kato S., Yamaguchi N., Hirai Y., Morishima M., Kawaguchi Y. Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical gabaergic neurons. // *Cereb. Cortex*. 2011. T. 21. № 8. C. 1803–1817.
127. Kullmann D.M., Lamsa K.P. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. // *Nat Rev Neurosci*. 2007. T. 8. № 9. C. 687-99.
128. Kwak Y.D., Ma T., Diao S., Zhang X., Chen Y., Hsu J., Lipton S.A., Masliah E., Xu H., Liao F.F. NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. // *Mol Neurodegener*. 2010. T. 5. C. 49.
129. Lanté F., Toledo-Salas J.C., Ondrejcek T., Rowan M.J, Ulrich D. Removal of synaptic Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors during sleep. // *J Neurosci*. 2011. T. 31. № 11. C. 3953-61.
130. Lee H.K., Barbarosie M., Kameyama K., Bear M.F., Huganir R.L. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. // *Nature*. 2000. T. 405. № 6789. C. 955-9.
131. Lee H.K., Takamiya K., Han J.S., Man H., Kim C.H., Rumbaugh G., Yu S., Ding L., He C., Petralia R.S., Wenthold R.J., Gallagher M., Huganir R.L. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. // *Cell*. 2003. T. 112. № 5. C. 631-43.
132. Lee H.K., Takamiya K., He K., Song L., Huganir R.L. Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. // *J Neurophysiol*. 2010. T. 103. № 1. C. 479-89.
133. Leonard A.S., Davare M.A., Horne M.C., Garner C.C., Hell J.W. SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. // *J Biol Chem*. 1998. T. 273. № 31. C. 19518-24.
134. Lewis D.J. Psychobiology of active and inactive memory. // *Psychol Bull*. 1979. T. 86. № 5. C. 1054-83.

135. Li C., Meng L., Li X., Li D., Jiang L.H. Non-NMDAR neuronal Ca(2+)-permeable channels in delayed neuronal death and as potential therapeutic targets for ischemic brain damage. // *Expert Opin Ther Targets*. 2015. T. 19. № 7. C. 879-92.
136. Li R., Zhao X., Cai L., Gao W.W. Up-regulation of GluR1 in paraventricular nucleus and greater expressions of synapse related proteins in the hypothalamus of chronic unpredictable stress-induced depressive rats. // *Physiol Behav*. 2017. T. 179. C. 451-457.
137. Li S.B., Du D., Hasan M.T., Köhr G. D4 Receptor Activation Differentially Modulates Hippocampal Basal and Apical Dendritic Synapses in Freely Moving Mice. // *Cereb Cortex*. 2016. T. 26. № 2. C. 647-55.
138. Lima M.G., Maximino C., Matos Oliveira K.R., Brasil A., Crespo-Lopez M.E., Batista Ede J., Rocha F.A., Picanço-Diniz D.L., Herculano A.M. Nitric oxide as a regulatory molecule in the processing of the visual stimulus. // *Nitric Oxide*. 2014. T. 36. C. 44-50.
139. Lipton S.A., Choi Y.B., Takahashi H., Zhang D., Li W., Godzik A., Bankston L.A. Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation. // *Trends Neurosci*. 2002. T. 25. № 9. C. 474-80.
140. Lisman J., Malenka R.C., Nicoll R.A., Malinow R. Learning mechanisms: the case for CaM-KII. // *Science*. 1997. T. 276. № 5321. C. 2001-2.
141. Lisman J. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. // *Trends Neurosci*. 1994. T. 17. № 10. C. 406-12.
142. Lisman J., Yasuda R., Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. // *Nat Rev Neurosci*. 2012. T. 13. № 3. C. 169-82.
143. Lledo P.M., Zhang X., Südhof T.C., Malenka R.C., Nicoll R.A. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. // *Science*. 1998. T. 279. № 5349. C. 399-403.
144. Lu H.F., Wu P.F., Yang Y.J., Xiao W., Fan J., Liu J., Li Y.L., Luo Y., Hu Z.L, Jin Y., Wang F., Chen J.G. Interactions between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluR2 in the nucleus accumbens contribute to the expression

- of locomotor sensitization to cocaine. // *J Neurosci.* 2014. T. 34. № 10. C. 3493-508.
145. Lu W., Man H., Ju W., Trimble W.S., MacDonald J.F., Wang Y.T. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. // *Neuron.* 2001. T. 29. № 1. C. 243-54.
146. Lu W., Shi Y., Jackson A.C., Bjorgan K., During M.J., Sprengel R., Seeburg P.H., Nicoll R.A. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. // *Neuron.* 2009. T. 62. № 2. C. 254-68.
147. Lu Y.F., Kandel E.R., Hawkins R.D. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. // *J Neurosci.* 1999. T. 19. № 23. C. 10250-61.
148. Luo C.X., Lin Y.H., Qian X.D., Tang Y., Zhou H.H., Jin X., Ni H.Y., Zhang F.Y., Qin C., Li F., Zhang Y., Wu H.Y., Chang L., Zhu D.Y. Interaction of nNOS with PSD-95 negatively controls regenerative repair after stroke. // *J Neurosci.* 2014. T. 34. № 40. C. 13535-48.
149. Luo C.X., Zhu D.Y. Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase. // *Neurosci Bull.* 2011. T. 27. № 1. C. 23-35.
150. Lussier M.P., Gu X., Lu W., Roche K.W. Casein kinase 2 phosphorylates GluA1 and regulates its surface expression. // *Eur J Neurosci.* 2014. T. 39. № 7. C. 1148-58.
151. Maher A., Abdel Rahman M.F., Gad M.Z. The role of nitric oxide from neurological disease to cancer. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. T. 1007. C. 71-88.
152. Maher Guix F.X., Uribealago I., Coma M., Muñoz F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. // *Prog. Neurobiol.* 2005. T. 76. № 2. C. 126-152.
153. Makhinson M., Opazo P., Carlisle H.J., Godsil B., Grant S.G., O'Dell T.J. A novel role for cyclic guanosine 3',5'monophosphate signaling in synaptic

- plasticity: a selective suppressor of protein kinase A-dependent forms of long-term potentiation. // *Neuroscience*. 2006. T. 140. № 2. C. 415-31.
154. Makino Y., Johnson R.C., Yu Y., Takamiya K., Huganir R.L. Enhanced synaptic plasticity in mice with phosphomimetic mutation of the GluA1 AMPA receptor. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. T. 108. № 20. C. 8450-5.
155. Malenka R.C., Kauer J.A., Perkel D.J., Nicoll R.A. The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission--its role in long-term potentiation. // *Trends Neurosci*. 1989. T. 12. № 11. C. 444-50.
156. Malenka R.C., Nicoll R.A. Long-term potentiation--a decade of progress? // *Science*. 1999. T. 285. № 5435. C. 1870-4.
157. Malinow R., Malenka R.C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. // *Annu Rev Neurosci*. 2002. T. 25. C. 103-26.
158. Malinow R., Schulman H., Tsien R.W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. // *Science*. 1989. T. 245. № 4920. C. 862-6.
159. Malkin S.L., Amakhin D.V., Veniaminova E.A., Kim K.Kh., Zubareva O.E., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. Changes of AMPA receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. // *Neuroscience*. 2016. T. 327. C. 146-55.
160. Maltsev A.V., Bal N.V., Balaban P.M. LTP suppression by protein synthesis inhibitors is NO-dependent. // *Neuropharmacology*. 2019. T. 146. C. 276–288.
161. Mammen A.L., Kameyama K., Roche K.W., Huganir R.L. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. // *J Biol Chem*. 1997. T. 272. № 51. C. 32528-33.
162. Man H.Y., Sekine-Aizawa Y., Huganir R.L. Regulation of {alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. T. 104. № 9. C. 3579-84.

163. Manzoni O., Bockaert J. Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. // *J Neurochem.* 1993. T. 61. № 1. C. 368-70.
164. Masurkar A.V., Srinivas K.V., Brann D.H., Warren R., Lowes D.C., Siegelbaum S.A. Medial and Lateral Entorhinal Cortex Differentially Excite Deep versus Superficial CA1 Pyramidal Neurons. // *Cell Rep.* 2017. T. 18. № 1. C. 148-160.
165. Matsushita K., Morrell C.N., Cambien B., Yang S.X., Yamakuchi M., Bao C., Hara M.R., Quick R.A., Cao W., O'Rourke B., Lowenstein J.M., Pevsner J., Wagner D.D., Lowenstein C.J. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. // *Cell.* 2003. T. 115. № 2. C. 139-50.
166. Mattison H.A., Bagal A.A., Mohammadi M., Pulimood N.S., Reich C.G., Alger B.E., Kao J.P., Thompson S.M. Evidence of calcium-permeable AMPA receptors in dendritic spines of CA1 pyramidal neurons. // *J Neurophysiol.* 2014. T. 112. № 2. C. 263-75.
167. Mattson M.P. Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. // *Neurochem Res.* 2007. T. 32. № 4-5. C. 707-15
168. Mayr B., Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001. T. 2. № 8. C. 599-609.
169. McMahan D.G., Ponomareva L.V. Nitric oxide and cGMP modulate retinal glutamate receptors. // *J Neurophysiol.* 1996. T. 76. № 4. C. 2307-15.
170. McMahan D.G., Schmidt K.F. Horizontal cell glutamate receptor modulation by NO: mechanisms and functional implications for the first visual synapse. // *Vis Neurosci.* 1999. T. 16. № 3. C. 425-33.
171. Mejía-García T.A., Portugal C.C., Encarnação T.G., Prado M.A., Paes-de-Carvalho R. Nitric oxide regulates AKT phosphorylation and nuclear translocation in cultured retinal cells. // *Cell Signal.* 2013. T. 25. № 12. C. 2424-39.
172. Middei S., Houeland G., Cavallucci V., Ammassari-Teule M., D'Amelio M., Marie H. CREB is necessary for synaptic maintenance and learning-induced



- changes of the AMPA receptor GluA1 subunit. // *Hippocampus*. 2013. T. 23. № 6. C. 488-99.
173. Moore R.Y., Halaris A.E. Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *J Comp Neurol*. // 1975. T. 164. № 2. C. 171-83.
174. Moosavi M., Abbasi L., Zarifkar A., Rastegar K. The role of nitric oxide in spatial memory stages, hippocampal ERK and CaMKII phosphorylation. // *Pharmacol Biochem Behav*. 2014. T. 122. C. 164-72.
175. Mustafa A.K., Kumar M., Selvakumar B., Ho G.P., Ehmsen J.T., Barrow R.K., Amzel L.M., Snyder S.H. Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. T. 104. № 8. C. 2950-5.
176. Nader K., Hardt O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. // *Nat Rev Neurosci*. 2009. T. 10. № 3. C. 224-34.
177. Nader K., Schafe G.E., Le Doux J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. // *Nature*. 2000. T. 406. № 6797. C. 722-6.
178. Nicholson E., Kullmann D.M. Long-term potentiation in hippocampal oriens interneurons: postsynaptic induction, presynaptic expression and evaluation of candidate retrograde factors. // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013. T. 369. № 1633. C. 20130133.
179. Nicoll R.A., Roche K.W. Long-term potentiation: peeling the onion. // *Neuropharmacology*. 2013. T. 74. C. 18-22.
180. Nicoll R.A., Tomita S., Brecht D.S. Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. // *Science*. 2006. T. 311. № 5765. C. 1253-6.
181. Nissen W., Szabo A., Somogyi J., Somogyi P., Lamsa K.P. Cell type-specific long-term plasticity at glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons expressing either parvalbumin or CB1 cannabinoid receptor. // *J Neurosci*. 2010. T. 30. № 4. C. 1337-47.
182. O'Dell T.J., Hawkins R.D., Kandel E.R., Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a

- possible early retrograde messenger. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991. T. 88. № 24. C. 11285-9.
183. O'Dell T.J., Huang P.L., Dawson T.M., Dinerman J.L., Snyder S.H., Kandel E.R., Fishman M.C. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. // *Science*. 1994. T. 265. № 5171. C. 542-6.
184. Oh M.C., Derkach V.A., Guire E.S., Soderling T.R. Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. // *J Biol Chem*. 2006. T. 281. № 2. C. 752-8.
185. Oren I., Nissen W., Kullmann D.M., Somogyi P., Lamsa K.P. Role of ionotropic glutamate receptors in long-term potentiation in rat hippocampal CA1 oriens-lacunosum moleculare interneurons. // *J Neurosci*. 2009. T. 29. № 4. C. 939-50.
186. Ouardouz M., Lacaille J.C. Mechanisms of selective long-term potentiation of excitatory synapses in stratum oriens/alveus interneurons of rat hippocampal slices. // *J Neurophysiol*. 1995. T. 73. № 2. C. 810-9.
187. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. // *Physiol. Rev*. 2007. T. 87. № 1. C. 315–424.
188. Park M., Penick E.C., Edwards J.G., Kauer J.A., Ehlers M.D. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. // *Science*. 2004. T. 305. № 5692. C. 1972-5.
189. Park P., Sanderson T.M., Amici M., Choi S.L., Bortolotto Z.A., Zhuo M., Kaang B.K., Collingridge G.L. Calcium-Permeable AMPA Receptors Mediate the Induction of the Protein Kinase A-Dependent Component of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. // *J Neurosci*. 2016. T. 36. № 2. C. 622-31.
190. Park Y.H., Mueller B.H. 2nd, McGrady N.R., Ma H.Y., Yorio T. AMPA receptor desensitization is the determinant of AMPA receptor mediated excitotoxicity in purified retinal ganglion cells. // *Exp Eye Res*. 2015. T. 132. C. 136-50.

191. Pasquier D.A., Reinoso-Suarez F. The topographic organization of hypothalamic and brain stem projections to the hippocampus. // *Brain Res Bull.* 1978. T. 3. № 4. C. 373-89.
192. Patterson M.A., Szatmari E.M., Yasuda R. AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010. T. 107. № 36. C. 15951-6.
193. Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E, Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. // *Endocr Rev.* 2001. T. 22. № 2. C. 153-83.
194. Peunova N., Enikolopov G. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. // *Nature.* 1993. T. 364. № 6436. C. 450-3.
195. Phillips K.G, Hardingham N.R., Fox K. Postsynaptic action potentials are required for nitric-oxide-dependent long-term potentiation in CA1 neurons of adult GluR1 knock-out and wild-type mice. // *J Neurosci.* 2008. T. 28. № 52. C. 14031-41.
196. Pigott B.M., Garthwaite J. Nitric Oxide Is Required for L-Type Ca(2+) Channel-Dependent Long-Term Potentiation in the Hippocampus. // *Front Synaptic Neurosci.* 2016. T. 8. C. 17.
197. Pikkarainen M., Rönkkö S., Savander V., Insausti R., Pitkänen A. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. // *J Comp Neurol.* 1999. T. 403. № 2. C. 229-60
198. Ping J., Schafe G.E. The NO-cGMP-PKG signaling pathway coordinately regulates ERK and ERK-driven gene expression at pre- and postsynaptic sites following LTP-inducing stimulation of thalamo-amygdala synapses. // *Neural Plast.* 2010.
199. Pitsikas N. The role of nitric oxide in the object recognition memory. // *Behav. Brain Res.* 2015. T. 285. C. 200–207.

200. Plant K., Pelkey K.A., Bortolotto Z.A., Morita D., Terashima A., McBain C.J., Collingridge G.L., Isaac J.T. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. // *Nat Neurosci.* 2006. T. 9. № 5. C. 602-4.
201. Poglia L., Muller D., Nikonenko I. Ultrastructural modifications of spine and synapse morphology by SAP97. // *Hippocampus.* 2011. T. 21. № 9. C. 990-8.
202. Poncer J.C., Esteban J.A., Malinow R. Multiple mechanisms for the potentiation of AMPA receptor-mediated transmission by alpha-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. // *J Neurosci.* 2002. T. 22. № 11. C. 4406-11.
203. Que L.G., George S.E., Gotoh T., Mori M., Huang Y.C. Effects of arginase isoforms on NO Production by nNOS. // *Nitric Oxide.* 2002. T. 6. № 1. C. 1-8.
204. Rameau G.A., Tukey D.S., Garcin-Hosfield E.D., Titcombe R.F., Misra C., Khatri L., Getzoff E.D., Ziff E.B. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. // *J Neurosci.* 2007. T. 27. № 13. C. 3445-55.
205. Reinders N.R., Pao Y., Renner M.C., da Silva-Matos C.M., Lodder T.R., Malinow R., Kessels H.W. Amyloid- $\beta$  effects on synapses and memory require AMPA receptor subunit GluA3. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016. T. 113. № 42. C. E6526-E6534.
206. Reymann K.G., Frey J.U. The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. // *Neuropharmacology.* 2007. T. 52. № 1. C. 24-40.
207. Riccio A., Alvania R.S., Lonze B.E., Ramanan N., Kim T., Huang Y., Dawson T.M., Snyder S.H., Ginty D.D. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. // *Mol Cell.* 2006. T. 21. № 2. C. 283-94.
208. Roche K.W., O'Brien R.J., Mammen A.L., Bernhardt J., Huganir R.L. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. // *Neuron.* 1996 T. 16. № 6. C. 1179-88.

209. Roskoski R. Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. T. 331. № 1. C. 1-14.
210. Rozov A., Burnashev N. Polyamine-dependent facilitation of postsynaptic AMPA receptors counteracts paired-pulse depression. // *Nature*. 1999. T. 401. № 6753. C. 594-8.
211. Rozov A., Sprengel R., Seeburg P.H. GluA2-lacking AMPA receptors in hippocampal CA1 cell synapses: evidence from gene-targeted mice. // *Front Mol Neurosci*. 2012. T. 5. C. 22.
212. Rozov A., Zakharova Y., Vazetdinova A., Valiullina-Rakhmatullina F. The Role of Polyamine-Dependent Facilitation of Calcium Permeable AMPARs in Short-Term Synaptic Enhancement. // *Front Cell Neurosci*. 2018. T. 12. C. 345.
213. Sajikumar S., Navakkode S., Frey J.U. Identification of compartment- and process-specific molecules required for "synaptic tagging" during long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1. // *J Neurosci*. 2007. T. 27. № 19. C. 5068-80.
214. Sans N., Vissel B., Petralia R.S., Wang Y.X., Chang K., Royle G.A., Wang C.Y., O'Gorman S., Heinemann S.F., Wenthold R.J. Aberrant formation of glutamate receptor complexes in hippocampal neurons of mice lacking the GluR2 AMPA receptor subunit. // *J Neurosci*. 2003. T. 23. № 28. C. 9367-73.
215. Sara S.J. Strengthening the shaky trace through retrieval. // *Nat Rev Neurosci*. 2000. T. 1. № 3. C. 212-3.
216. Sase A., Nawaratna G., Hu S., Wu G., Lubec G.. Decreased hippocampal homoarginine and increased nitric oxide and nitric oxide synthase levels in rats parallel training in a radial arm maze. // *Amino Acids*. 2016. T. 48. № 9. C. 2197-204.
217. Schulz P.E., Cook E.P., Johnston D. Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. // *J Neurosci*. 1994. T. 14. № 9. C. 5325-37.

218. Schuman E.M., Dynes J.L., Steward O. Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. // *J Neurosci*. 2006. T. 26. № 27. C. 7143-6.
219. Schuman E.M., Madison D.V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. // *Science*. 1991. T. 254. № 5037. C. 1503-6.
220. Schuman E.M., Madison D.V. Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. // *Science*. 1994. T. 263. № 5146. C. 532-6.
221. Selvakumar B., Campbell P.W., Milovanovic M., Park D.J., West A.R., Snyder S.H., Wolf M.E. AMPA receptor upregulation in the nucleus accumbens shell of cocaine-sensitized rats depends upon S-nitrosylation of stargazin. // *Neuropharmacology*. 2014. T. 77. C. 28-38.
222. Selvakumar B., Huganir R.L., Snyder S.H. S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA-glutamate neurotransmitter receptors. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. T. 106. № 38. C. 16440-5.
223. Selvakumar B., Jenkins M.A., Hussain N.K., Huganir R.L., Traynelis S.F., Snyder S.H. S-nitrosylation of AMPA receptor GluA1 regulates phosphorylation, single-channel conductance, and endocytosis. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. T. 110. № 3. C. 1077-82.
224. Seress L., Abrahám H., Lin H., Totterdell S. Nitric oxide-containing pyramidal neurons of the subiculum innervate the CA1 area. // *Exp Brain Res*. 2002. T. 147. № 1. C. 38-44.
225. Serulle Y., Zhang S., Ninan I., Puzzo D., McCarthy M., Khatri .L, Arancio O., Ziff E.B. A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking. // *Neuron*. 2007. T. 56. № 4. C. 670-88.
226. Shaskan E.G., Haraszti J.H., Snyder S.H. Polyamines: developmental alterations in regional disposition and metabolism in rat brain. // *J Neurochem*. 1973. T. 20. № 5. C. 1443-52.
227. Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. // *Nature*. 1991. T. 349. № 6307. C. 326-8.

228. Shin D.H., Lee H.Y., Kim H.J., Lee E., Lee K.H., Lee W.J., Cho S.S., Baik S.H. In situ localization of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA in the rat retina. // *Neurosci. Lett.* 1999. T. 22. № 1. C. 53-55.
229. Silva A.J., Stevens C.F., Tonegawa S., Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. // *Science.* 1992. T. 257. № 5067. C. 201-6.
230. Singh R., Pervin S., Karimi A., Cederbaum S., Chaudhuri G. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. // *Cancer Res.* 2000. T. 60. № 12. C. 3305-12.
231. Socodato R., Santiago F.N., Portugal C.C., Domingues A.F., Santiago A.R., Relvas J.B., Ambrósio A.F., Paes-de-Carvalho R. Calcium-permeable  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors trigger neuronal nitric-oxide synthase activation to promote nerve cell death in an Src kinase-dependent fashion. // *J Biol Chem.* 2012. T. 287. № 46. C. 38680-94.
232. Socodato R.E., Magalhães C.R., Paes-de-Carvalho R. Glutamate and nitric oxide modulate ERK and CREB phosphorylation in the avian retina: evidence for direct signaling from neurons to Müller glial cells. // *J Neurochem.* 2009. T. 108. № 2. C. 417-29.
233. Son H., Hawkins R.D., Martin K., Kiebler M., Huang P.L., Fishman M.C., Kandel E.R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. // *Cell.* 1996. T. 87. № 6. C. 1015-23.
234. Son H., Lu Y.F., Zhuo M., Arancio O., Kandel E.R., Hawkins R.D. The specific role of cGMP in hippocampal LTP. // *Learn Mem.* 1998. T. 5. № 3. C. 231-45.
235. Song I., Kamboj S., Xia J., Dong H., Liao D., Huganir R.L. Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. // *Neuron.* 1998. T. 21. № 2. C. 393-400.

236. Sossa K.G., Beattie J.B., Carroll R.C. AMPAR exocytosis through NO modulation of PICK1. // *Neuropharmacology*. 2007. T. 53. № 1. C. 92-100.
237. Sossin W.S. Memory Synapses Are Defined by Distinct Molecular Complexes: A Proposal. // *Front Synaptic Neurosci*. 2018. T. 10. C. 5.
238. Soto D., Coombs I.D., Kelly L., Farrant M., Cull-Candy S.G. Stargazin attenuates intracellular polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors. // *Nat Neurosci*. 2007. T. 10. № 10. C. 1260-7.
239. Steinert J.R., Chernova T., Forsythe I.D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. // *Neuroscientist*. 2010. T. 16. № 4. C. 435–452.
240. Stephenson F.A. Subunit characterization of NMDA receptors. // *Curr Drug Targets*. 2001. T. 2. № 3. C. 233-9.
241. Stricker N.L., Huganir R.L. The PDZ domains of mLin-10 regulate its trans-Golgi network targeting and the surface expression of AMPA receptors. // *Neuropharmacology*. 2003. T. 45. № 6. C. 837-48.
242. Sun X., Zhao Y., Wolf M.E. Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. // *J Neurosci*. 2005. T. 25. № 32. C. 7342-51.
243. Sun Y., Zhang L., Chen Y., Zhan L., Gao Z. Therapeutic Targets for Cerebral Ischemia Based on the Signaling Pathways of the GluN2B C Terminus. // *Stroke*. 2015. T. 46. № 8. C. 2347-53.
244. Susswein A.J., Katzoff A., Miller N., Hurwitz I. Nitric oxide and memory. // *Neuroscientist*. 2004. T. 10. № 2. C. 153-62.
245. Szabadits E., Cserép C., Ludányi A., Katona I., Gracia-Llanes J., Freund T.F., Nyíri G. Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. // *J Neurosci*. 2007. T. 27. № 30. C. 8101-11.
246. Szabo A., Somogyi J., Cauli B., Lambolez B., Somogyi P., Lamsa K.P. Calcium-permeable AMPA receptors provide a common mechanism for LTP in



- glutamatergic synapses of distinct hippocampal interneuron types. // *J Neurosci*. 2012. T. 32. № 19. C. 6511-6.
247. Takács V.T., Klausberger T., Somogyi P., Freund T.F., Gulyás A.I. Extrinsic and local glutamatergic inputs of the rat hippocampal CA1 area differentially innervate pyramidal cells and interneurons. // *Hippocampus*. 2012. T. 22. № 6. C. 1379-1391.
248. Takeuchi T., Duzskiewicz A.J., Sonneborn A., Spooner P.A., Yamasaki M., Watanabe M., Smith C.C., Fernández G., Deisseroth K., Greene R.W., Morris R.G. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. // *Nature*. 2016. T. 537. № 7620. C. 357-362.
249. Tegeder I., Scheving R., Wittig I., Geisslinger G. SNO-ing at the nociceptive synapse? // *Pharmacol Rev*. 2011. T. 63. № 2. C. 366-89.
250. Tiburcio A.F., Altabella T., Bitrián M., Alcázar R. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. // *Planta*. 2014. T. 240. № 1. C. 1-18.
251. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. // *Pharmacol Rev*. 2010. T. 62. № 3. C. 405-96.
252. Tukey D.S., Ziff E.B. Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptors and dopamine D1 receptors regulate GluA1 trafficking in striatal neurons. // *J Biol Chem*. 2013. T. 288. № 49. C. 35297-306.
253. Uchino S., Wada H., Honda S., Nakamura Y., Ondo Y., Uchiyama T., Tsutsumi M., Suzuki E., Hirasawa T., Kohsaka S. Direct interaction of post-synaptic density-95/Dlg/ZO-1 domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. // *J Neurochem*. 2006. T. 97. № 4. C. 1203-14.

254. van Strien N.M., Cappaert N.L., Witter M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. // *Nat Rev Neurosci.* 2009. T. 10. № 4. C. 272-82.
255. Vielma A.H., Agurto A., Valdés J., Palacios A.G., Schmachtenberg O. Nitric oxide modulates the temporal properties of the glutamate response in type 4 OFF bipolar cells. // *PLoS One.* 2014. T. 9. № 12.
256. Vielma A.H., Schmachtenberg O. Electrophysiological fingerprints of OFF bipolar cells in rat retina. // *Sci Rep.* 2016. T. 6. № 30259.
257. von Ossowski L., Li L.L., Möykkynen T., Coleman S.K., Courtney M.J., Keinänen K. Cysteine 893 is a target of regulatory thiol modifications of GluA1 AMPA receptors. // *PLoS One.* 2017. T. 12. № 2.
258. Wang X., Ying W., Dunlap K.A., Lin G., Satterfield M.C., Burghardt R.C., Wu G., Bazer F.W. Arginine decarboxylase and agmatinase: an alternative pathway for de novo biosynthesis of polyamines for development of mammalian conceptuses. // *Biol Reprod.* 2014. T. 90. № 4. C. 84.
259. Wang X., Zhao Y., Zhang X., Badie H., Zhou Y., Mu Y., Loo L.S., Cai L., Thompson R.C., Yang B., Chen Y., Johnson P.F., Wu C., Bu G., Mobley W.C., Zhang D., Gage F.H., Ranscht B., Zhang Y.W., Lipton S.A., Hong W., Xu H. Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome. // *Nat Med.* 2013. T. 19. № 4. C. 473-80.
260. Wang X.P., Ye P., Lv J., Zhou L., Qian Z.Y., Huang Y.J., Mu Z.H., Wang X., Liu X.J., Wan Q., Yang Z.H., Wang F., Zou Y.Y. Expression Changes of NMDA and AMPA Receptor Subunits in the Hippocampus in rats with Diabetes Induced by Streptozotocin Coupled with Memory Impairment. // *Neurochem Res.* 2019. T. 44. № 4. C. 978-993.
261. Washburn M.S., Dingledine R. Block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by polyamines and polyamine toxins. // *J Pharmacol Exp Ther.* 1996. T. 278. № 2. C. 669-78.

262. Widagdo J., Chai Y.J., Ridder M.C., Chau Y.Q., Johnson R.C., Sah P., Huganir R.L., Anggono V. Activity-Dependent Ubiquitination of GluA1 and GluA2 Regulates AMPA Receptor Intracellular Sorting and Degradation. // *Cell Rep.* 2015. T. 10. № 5. C. 783-795.
263. Widagdo J., Guntupalli S., Jang S.E., Anggono V. Regulation of AMPA Receptor Trafficking by Protein Ubiquitination. // *Front Mol Neurosci.* 2017. T. 10. C. 347.
264. Wisden W., Seeburg P.H. Mammalian ionotropic glutamate receptors. // *Curr Opin Neurobiol.* 1993. T. 3. № 3. C. 291-8.
265. Wu D., Bacaj T., Morishita W., Goswami D., Arendt K.L., Xu W., Chen L., Malenka R.C., Südhof T.C. Postsynaptic synaptotagmins mediate AMPA receptor exocytosis during LTP. // *Nature.* 2017. T. 544. № 7650. C. 316-321.
266. Wu G., Morris S.M Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. // *Biochem J.* 1998. T. 336. C. 1-17.
267. Wu Q.J., Tymianski M. Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. // *Mol Brain.* 2018. T. 11. № 1. C. 15.
268. Xu L., Mabuchi T., Katano T., Matsumura S., Okuda-Ashitaka E., Sakimura K., Mishina M., Ito S. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. // *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 2007. T. 17. № 1. C. 18–24.
269. Yamamoto R., Bredt D.S., Snyder S.H., Stone R.A. The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. // *Neuroscience.* 1993. T. 54. № 1. C. 189-200.
270. Yamashita T., Kwak S. The molecular link between inefficient GluA2 Q/R site-RNA editing and TDP-43 pathology in motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. // *Brain Res.* 2014. T. 1584. C. 28-38.
271. Yang Y., Wang X.B., Zhou Q. Perisynaptic GluR2-lacking AMPA receptors control the reversibility of synaptic and spines modifications. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010. T. 107. № 26. C. 11999-2004.

272. Yuan T., Bellone C. Glutamatergic receptors at developing synapses: the role of GluN3A-containing NMDA receptors and GluA2-lacking AMPA receptors. // *Eur J Pharmacol.* 2013. T. 719. № 1-3. C. 107-111.
273. Zaragoza C., Soria E., López E., Browning D., Balbín M., López-Otín C., Lamas S. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. // *Mol Pharmacol.* 2002. T. 62. № 4. C. 927-35.
274. Zhang K., Yamaki V.N., Wei Z., Zheng Y., Cai X. Differential regulation of GluA1 expression by ketamine and memantine. // *Behav Brain Res.* 2017. T. 316. C. 152-159.
275. Zhang P., Fu W.Y., Fu A.K., Ip N.Y. S-nitrosylation-dependent proteasomal degradation restrains Cdk5 activity to regulate hippocampal synaptic strength. // *Nat Commun.* 2015. T. 6. C. 8665.
276. Zhang P., Yu P.C., Tsang A.H., Chen Y., Fu A.K., Fu W.Y., Chung K.K., Ip N.Y. S-nitrosylation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulates its kinase activity and dendrite growth during neuronal development. // *J Neurosci.* 2010. T. 30. № 43. C. 14366-70.
277. Zhu J.J., Esteban J.A., Hayashi Y., Malinow R. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. // *Nat Neurosci.* 2000. T. 3. № 11. C. 1098-106.
278. Zhuo M., Hu Y., Schultz C., Kandel E.R., Hawkins R.D. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. // *Nature.* 1994. T. 368. № 6472. C. 635-9.
279. Zhuo M., Kandel E.R., Hawkins R.D. Nitric oxide and cGMP can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimulation in the hippocampus. // *Neuroreport.* 1994. T. 5. № 9. C. 1033-6.