

*На правах рукописи*

**Симонова Наталья Александровна**

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕТЕРОСИНАПТИЧЕСКОЙ  
ПЛАСТИЧНОСТИ В НЕЙРОНАХ НЕОКОРТЕКСА И ГИППОКАМПА**

Специальность 1.5.5 – «Физиология человека и животных»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Москва 2023**

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

**Научный руководитель:**

**Мальшев Алексей Юрьевич**, доктор биологических наук, профессор РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, г. Москва

**Официальные оппоненты:**

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

**Гайнутдинов Халил Латыпович**, доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных, Институт фундаментальной медицины и биологии, ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет", г. Казань

**Ведущая организация:**

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

Защита состоится 26 апреля 2023 года в 14:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.046.01 при Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бултерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН», а также на сайте ИВНД: <https://ihna.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.б.н. Иерусалимский В.Н.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Механизмы формирования памяти и адаптивного поведения, позволяющие животным подстраиваться к сложным изменяющимся внешним условиям, на данный момент понятны далеко не полностью. Предполагается, что обучение связано с вызванными опытом изменениями в мозге, которые, в свою очередь, позволяют успешно получать необходимое и избегать опасностей, а также предсказывать изменения окружающей среды и принимать решения. Объектом, непосредственно подвергающимся изменениям, признаются нейроны, составляющие мозг, и связи между ними, образующие нейронные сети. Предполагается, что для адаптивных изменений нейроны сети трансформируют входящую и исходящую информацию таким образом, чтобы реализовывалось необходимое поведение. Одним из механизмов, обеспечивающих эту трансформацию, является изменение эффективности синаптической связей в результате предыдущей активности, то есть синаптическая пластичность. Синаптическая пластичность, в широком смысле этого понятия, признается научным сообществом одним из основных механизмов обучения и памяти на уровне как отдельных клеток, так и нейронных микросетей. Ее возникновение показано в большинстве синапсов мозга и считается, что ее долговременные формы, а именно долговременная потенциация и депрессия, являются ключевыми для формирования следов памяти в мозге.

Отправной точкой изучения синаптической пластичности считается предложенная Хеббом в 1949 году концепция установления связей между нейронами в зависимости от их синхронной активации (Hebb, 1949). В настоящее время подавляющее большинство работ по изучению синаптической пластичности так или иначе базируется на принципах, которые эволюционировали из исходного принципа Хебба. В настоящий момент принцип Хебба можно сформулировать следующим образом: синапсы между синхронно разряжающимися нейронами потенцируются, а между несинхронно разряжающимися — депрессируются. Однако, как показывают теоретические исследования, нейронная сеть, построенная исключительно на Хеббовских принципах, чрезвычайно нестабильна и стремится к дисбалансу: уже потенцированные синапсы имеют большую вероятность в индукции спайков и, таким образом, склонны к дальнейшей потенциации, в то время как синапсы, подвергшиеся депрессии, будут стремиться к еще большей депрессии (Chen et al., 2013). В реальных сетях таких явлений не наблюдается, что позволяет предположить наличие стабилизирующих механизмов.

Принцип Хебба описывает механизмы пластичности одной синаптической связи, т.е. механизмы гомосинаптической пластичности. При этом игнорируется тот факт, что на одном нейроне другими клетками формируются тысячи возбуждающих и тормозных синапсов, а также то, что индукция гомосинаптической пластичности в одном из них может изменять свойства соседних синапсов (Chistiakova et al., 2014). Изменение эффективности синаптической передачи в неактивном синапсе в результате активности соседних синапсов или постсинаптического нейрона называется гетеросинаптической пластичностью. Предполагается, что она является одной из форм синаптической пластичности, предотвращающих возникновение описанного выше дисбаланса связей в нейрональной сети. Кроме того, как было недавно экспериментально показано, гетеросинаптическая пластичность играет важную роль в подготовке синапсов к участию в формировании нового памятного следа на уровне нейронных сетей и к переучиванию на уровне целого животного (Chasse et al., 2021). Гетеросинаптическая пластичность интересна тем, что имеет временные параметры, сходные с параметрами классической Хеббовской долговременной пластичности (Chistiakova et al., 2015). Показано,

что гетеросинаптическая пластичность, вызванная тетанизацией нейрона пачками потенциалов действия, приводит к тому, что часть синаптических входов на данный нейрон потенцируется, часть подвергается долговременной депрессии, а часть не меняется. Направление пластических изменений в возбуждающих синапсах коры головного мозга при этом коррелирует с начальной вероятностью выброса медиатора в данном синапсе. Синапсы с высокой вероятностью выброса (сильные синапсы) имеют склонность к депрессии, в то время как синапсы с низкой вероятностью выброса (слабые синапсы) с большей вероятностью будут потенцированы после внутриклеточной тетанизации (Lee et al., 2012). Гетеросинаптическая пластичность также характерна для тормозных ГАМК-ергических входов. Однако ряд аспектов гетеросинаптической пластичности остаются неизвестными. Во-первых, существует ли разница в характеристиках гетеросинаптической пластичности в синапсах, расположенных на разном удалении от тела клетки? Во-вторых, существуют ли характеристики гетеросинаптической пластичности общие для разных типов нейронов и типов синапсов? И, в-третьих, происходят ли изменения в характеристиках гетеросинаптической пластичности при созревании постсинаптических нейронов? Эксперименты, проведенные в данной работе, посвящены поиску ответов на эти вопросы.

### **Цель и задачи исследования**

Целью данного исследования является изучение особенностей и закономерностей формирования гетеросинаптической пластичности входов в разных отделах мозга: в нейронах неокортекса и гиппокампа.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать особенности развития гомо- и гетеросинаптической пластичности синаптических входов в зависимости от их локализации на апикальном дендрите пирамидного нейрона 2/3 слоя неокортекса крыс. В этой и последующих задачах гетеросинаптическую пластичность индуцировали при помощи внутриклеточной тетанизации постсинаптического нейрона пачками потенциалов действия.

2. Изучить закономерности формирования гетеросинаптической пластичности синаптических связей между пирамидными нейронами 2/3 и 5 слоев неокортекса с использованием метода оптогенетической стимуляции сети пресинаптических нейронов, экспрессирующих канальный родопсин2.

3. Изучить закономерности формирования гетеросинаптической пластичности ГАМК-ергических синаптических входов в новообразованных и зрелых нейронах зубчатой фасции гиппокампа крыс.

### **Научная новизна исследования**

В данной работе были раскрыты ранее неизвестные закономерности формирования гетеросинаптической пластичности в синапсах неокортекса и гиппокампа. В частности, впервые было продемонстрировано, что синапсы, расположенные ближе к телу пирамидного нейрона 2/3 слоя более склонны к гетеросинаптической потенциации по сравнению с входами, приходящими на дистальные дендриты клетки.

Была показана применимость и целесообразность использования метода оптогенетической стимуляции множества пресинаптических нейронов, конвергирующих на одну постсинаптическую клетку, в экспериментах по изучению механизмов гетеросинаптической пластичности. С использованием этого подхода было найдено, что при развитии долговременной гетеросинаптической потенциации, вызванной несочетанной

тетанизацией постсинаптического нейрона, не происходит активации ранее неактивных, т.н. «молчащих» синапсов.

В данной работе было показано, что ГАМК-ергические входы, приходящие как на незрелые, так и на зрелые гранулярные клетки в зубчатой извилине пластичны, и что гетеросинаптическая, неассоциативная пластичность этих входов может быть индуцирована постсинаптическими спайками без пресинаптической активации. Мы также обнаружили, что свойства неассоциативной пластичности изменяются при созревании новообразованных гранулярных клеток. Так, для незрелых клеток была более характерна неассоциативная потенциация, тогда как в зрелых клетках наблюдались оба типа пластических изменений.

Все данные, изложенные в диссертации, были получены лично автором или с его непосредственным участием.

### **Теоретическая ценность и практическая значимость диссертации**

Данные об особенностях и закономерностях формирования гетеросинаптической пластичности входов на нейроны зрительной коры и зубчатой фации гиппокампа расширяют имеющиеся теоретические представления о работе нейронных сетей головного мозга и могут быть использованы для построения адекватных моделей нервной системы и создания искусственных нейронных сетей, в том числе в целях создания нейроморфного искусственного интеллекта. Кроме того, полученные данные могут быть использованы для создания и корректировки учебных курсов для студентов высших учебных заведений.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Существует закономерность в формировании гетеросинаптической пластичности возбуждающих глутаматергических входов, приходящих на апикальный дендрит пирамидного нейрона: входы, расположенные ближе к соматическим клеткам более склонны к потенциации, тогда как в удаленных входах гетеросинаптические изменения сбалансированы таким образом, что потенциация уравновешивается депрессией.

2. В процессе созревания новообразованных нейронов зубчатой фации гиппокампа происходит смещение баланса неассоциативной пластичности ГАМК-ергической передачи от преобладания гетеросинаптической потенциации к сбалансированным изменениям.

### **Апробация результатов исследования**

Результаты исследования неоднократно докладывались на научных конференциях, в том числе: FENS 2016г., Копенгаген, Дания; Международная научно-практическая школа "От нейрона к мозгу: расширенный курс по нейрофизиологии – II" 2016г., Казань; XX научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии 2016г., Москва; The Brain Conference: Learning, Memory and Synaptic Plasticity 2017г., Рунгстедгаард, Дания; ENCODS 2017г., Аликанте, Испания; XXI научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии 2017 г., Москва; Конференция "ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ" 2018 г., Москва; XXII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии 2018 г., Москва; СОВЕЩАНИЕ ПО ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ имени академика Л.А. Орбели» (19–22 октября 2020 года) и IX ШКОЛЫ ПО ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ (22–24 октября 2020 года), Санкт-Петербург, Россия.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Объекты исследования** Работа выполнена на пирамидных нейронах переживающих срезов коры головного мозга крыс линии Вистар (Wistar) в возрасте 21–30 дней и гранулярных нейронах зубчатой фасции переживающих срезов гиппокампа крыс линии Лонг-Эванс (Long-Evans) в возрасте 5–9 недель. Использовались как немодифицированные крысы, так и крысы, нейроны которых были трансфицированы канальным родопсином 2 (ChR2).

***In utero* электропорация** Операцию по введению плазмиды в мозг эмбрионов (*in utero* электропорация) проводили на беременных самках крыс линии Вистар на 17й–18й (Miyashita et al., 2010) день эмбрионального развития плода. Операция проводилась по методике, изначально разработанной Табата и Накадзима в 2001 г (Tabata and Nakajima, 2001). Для трансфекции использовалась смесь плазмид pCAG-ChR2-Venus и pCAG-mCherry в суммарной концентрации 1.5 мкг/мкл в стерильном фосфатном буфере. Операция выполнялась под изофлюрановым наркозом (поток кислорода 1 л/мин, концентрация анестетика 1.5%).

**Приготовление переживающих срезов головного мозга** Переживающие срезы головного мозга для экспериментов с нейронами неокортекса готовились по описанной ранее методике (Pin et al., 2013). Использовались крысы линии Вистар обоего пола в возрасте 21–30 дней. Крыс анестезировали изофлюрановым наркозом. Для приготовления срезов толщиной 350 нм использовали вибратор VT1200S, Leica, Германия. Полученные срезы инкубировали при температуре 37°C в течение 35 минут, и при комнатной — до часа суммарного времени инкубации в аэрируемом растворе ИЦСЖ, содержащем сахарозу.

Для экспериментов с образованными во взрослом возрасте нейронами зубчатой фасции гиппокампа приготавливались срезы обоих гиппокампов крыс в возрасте 5–9 недель по методике, основанной на описанной в (Pannasch et al., 2012). Использовались крысы линии Лонг-Эванс (Long-Evans) обоего пола. Полушария разделялись, из каждого полушария выделялся гиппокамп. Далее приготовление срезов гиппокампа не отличалось от срезов мозга, описанных выше. Для приготовления и хранения срезов использовалась искусственная цереброспинальная жидкость с добавлением сахарозы (Maher and LoTurco, 2012).

**Экспериментальная установка для исследования нейронов методом patch-clamp** Для регистрации нейронов неокортекса использовались пипетки сопротивлением 4–6 МΩ, для нейронов гиппокампа использовались пипетки сопротивлением 6–8 МΩ. Запись производилась с помощью усилителя MultiClamp 700B (Molecular Devices, США) в режиме фиксации тока. После усиления и фильтрации частот выше 10 кГц данные оцифровывались с частотой 20 кГц и вводились в компьютер с использованием АЦП Digidata 1500 и программного обеспечения pCLAMP (Molecular Devices, США). Полученные данные обрабатывались в программе Matlab, с помощью специально написанных скриптов. Для оптической стимуляции применялся специализированный фотостимулятор Polygon400 (Mightex, США), оснащенный светодиодом с выходной мощностью 400 мВт и длиной волны излучения 470 нм. Для визуализации клеток использовался микроскоп Olympus BX51 (Olympus, Япония) с водноиммерсионными объективами 40x и 5x Olympus с числовой апертурой 0,8; изображение выводилось на отдельный экран с помощью камеры.

**Протоколы экспериментов** Для индукции неассоциативной пластичности использовался метод внутриклеточной тетанизации: 30 пачек потенциалов действия (три сессии тетанизации по 10 пачек) с частотой 100 Гц и амплитудой 1 нА. Локальная стимуляция внеклеточным электродом проводилась по следующей схеме. Подбирался тестовый электрический стимул так, чтобы амплитуда возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) в клетке оказывалась на уровне 1–2 мВ. Затем записывались ВПСП в ответ на подобранный стимул в течение 8–10 минут в режиме фиксации тока (current clamp). При этом клетка стимулировалась парой одинаковых стимулов с временным интервалом 50 мс. Затем производилась внутриклеточная тетанизация, в течение следующих 25–45 минут записывались ответы клетки на тестовый стимул.

**Протокол эксперимента «Гетеросинаптическая пластичность «дальних» и «ближних» входов клетки»** Клетка выбиралась в нижней части 2–3 слоя неокортекса. В срез мозга крысы вводился стимулирующий внеклеточный электрод, на расстояние — 40–60 мкм от предполагаемой для регистрации клетки (в верхнюю часть 2–3 слоя неокортекса) для «ближних» входов, и на расстояние 120–150 мкм (1 слой неокортекса) для «дальних» входов. После этого определялся потенциал реверсии полученного ответа. Для этого в режиме фиксации потенциала проводилась запись тока, вызванного этим стимулом, при потенциале покоя и при потенциале в -40 мВ. Если ток реверсировался, это указывало на тормозный вход, и далее клетка не записывалась, либо менялось положение стимулирующего электрода. Далее производилась локальная стимуляция входов клетки и индукция гетеросинаптической пластичности методом внутриклеточной тетанизации.

#### **Протокол эксперимента «Оптогенетическая стимуляция пресинаптической сети»**

В этом эксперименте использовали срезы мозга крыс, в нейронах 2/3 слоя коры которых был экспрессирован светоактивируемый белок ChR2. В качестве постсинаптического нейрона мы использовали пирамидный нейрон 5 слоя; в качестве пресинаптической сети была выбрана популяция пирамидных нейронов 2/3 слоя коры крысы. Клетки, экспрессирующие ChR2, стимулировали при помощи системы оптической стимуляции Mightex Polygon 400. Вся область стимуляции была разбита на 180 квадратов для нанесения световых стимулов (матрица 10x18).

Пирамидная клетка 5 слоя приводилась в конфигурацию whole-cell, для регистрации, после чего поле зрения микроскопа сдвигали к 2/3 слою, который стимулировали световыми стимулами. В каждый квадрат стимуляционной матрицы наносился парный световой стимул, состоящий из двух импульсов, длительность каждого импульса 1–2 мс, интервал между импульсами 50 мс. Квадраты матрицы стимулировались в псевдослучайном порядке с интервалом 250 мс так чтобы за один цикл стимуляции была покрыта вся область. В остальном протокол не отличался от описанного для локальной стимуляции. Гетеросинаптическая пластичность индуцировалась методом внутриклеточной тетанизации.

**Протокол эксперимента «Гетеросинаптическая пластичность незрелых и зрелых гранулярных клеток зубчатой фасции»** Эксперимент проводили на переживающих срезах гиппокампа. Незрелые гранулярные клетки выбирали визуально, на основе их месторасположения (нижняя часть гранулярного слоя) и формы (Schmidt-Hieber et al., 2004). Зрелые гранулярные клетки выбирали так же в нижней части гранулярного слоя. Стимулирующий электрод устанавливали близ верхней границы гранулярного слоя. После получения конфигурации whole-cell с гранулярной клеткой, записывалась вольт-амперная характеристика клетки, для определения ее входного сопротивления. Дальнейший протокол для зрелых и незрелых клеток не различался, вся запись проводилась в режиме фиксированного тока. Использовали методы локальной стимуляции и внутриклеточной тетанизации.

Для подтверждения ГАМКергической природы записанных ПСП были проведены две дополнительные серии экспериментов. В первой использовался селективный блокатор ГАМК-А рецепторов — бикуккуллин, добавлявшийся в систему протока через 10–15 минут от начала записи (до концентрации 10  $\mu\text{M}$ ). Во второй серии экспериментов использовался блокатор АМПА рецепторов — CNQX (водорастворимая форма, disodium salt; Sigma-Aldrich, USA) с конечной концентрацией 10  $\mu\text{M}$ .

Для определения морфологии незрелых и зрелых гранулярных клеток производилось их окрашивание нейробиотином. Так же проводилось иммунохимическое окрашивание срезов антителами к полисиалически кислотной нейрональной молекуле адгезии (PSA-NCAM). Использовались стандартные для иммунохимического окрашивания — анти-PSA-NCAM моноклональные мышинные антитела, 1:100, Millipore, USA и поликлональные антитела козы к антителам мыши, 1:50, Invitrogen, USA.

Для более точного разделения всех зарегистрированных гранулярных клеток на зрелые и незрелые проводили их классификацию с помощью квадратичного дискриминантного анализа (скрипты на языке R, функции qda.fit и qda.pred из библиотеки MASS), которая затем проверялась экспертной оценкой. Только классифицированные клетки были использованы для окончательного анализа.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Гомо- и гетеросинаптическая пластичность «дальних» и «ближних» входов**

Как было показано в ряде работ, закономерности формирования Хеббовской пластичности зависят от удаления синаптических входов от тела клетки (Larkum et al., 1999; Sjöström and Häusser, 2006; Froemke, 2010). Для гетеросинаптической пластичности подобные закономерности являются абсолютно не исследованными. Для их изучения мы использовали метод локальной стимуляции синаптических входов пирамидной клетки 2/3 слоя коры крысы внеклеточным электродом, расположенным во 2 слое (ближние входы) либо в 1 слое (дальние входы). ВПСП регистрировались методом whole-cell patch clamp (Рис 1А,Б).

Внутриклеточная тетанизация нейрона вызывала в части экспериментов долговременную потенциацию (ДП), в части — долговременную депрессию (ДД) стимулировавшихся входов, в части входов достоверных пластических изменений выявлено не было (примеры ответов приведены на рисунке 1А, примеры ДП и ДД на рисунке 1В, Г). Для определения достоверности изменений, произошедших с данным синаптическим входом, ответы до тетанизации сравнивали с ответами после тетанизации, используя t-критерий Стьюдента. Если изменения были достоверными, то данный вход определялся как подвергшийся потенциации или депрессии. При стимуляции дистальных входов ( $n=20$ ) преобладающим типом пластичности, вызванной внутриклеточной тетанизацией, оказалась ДД



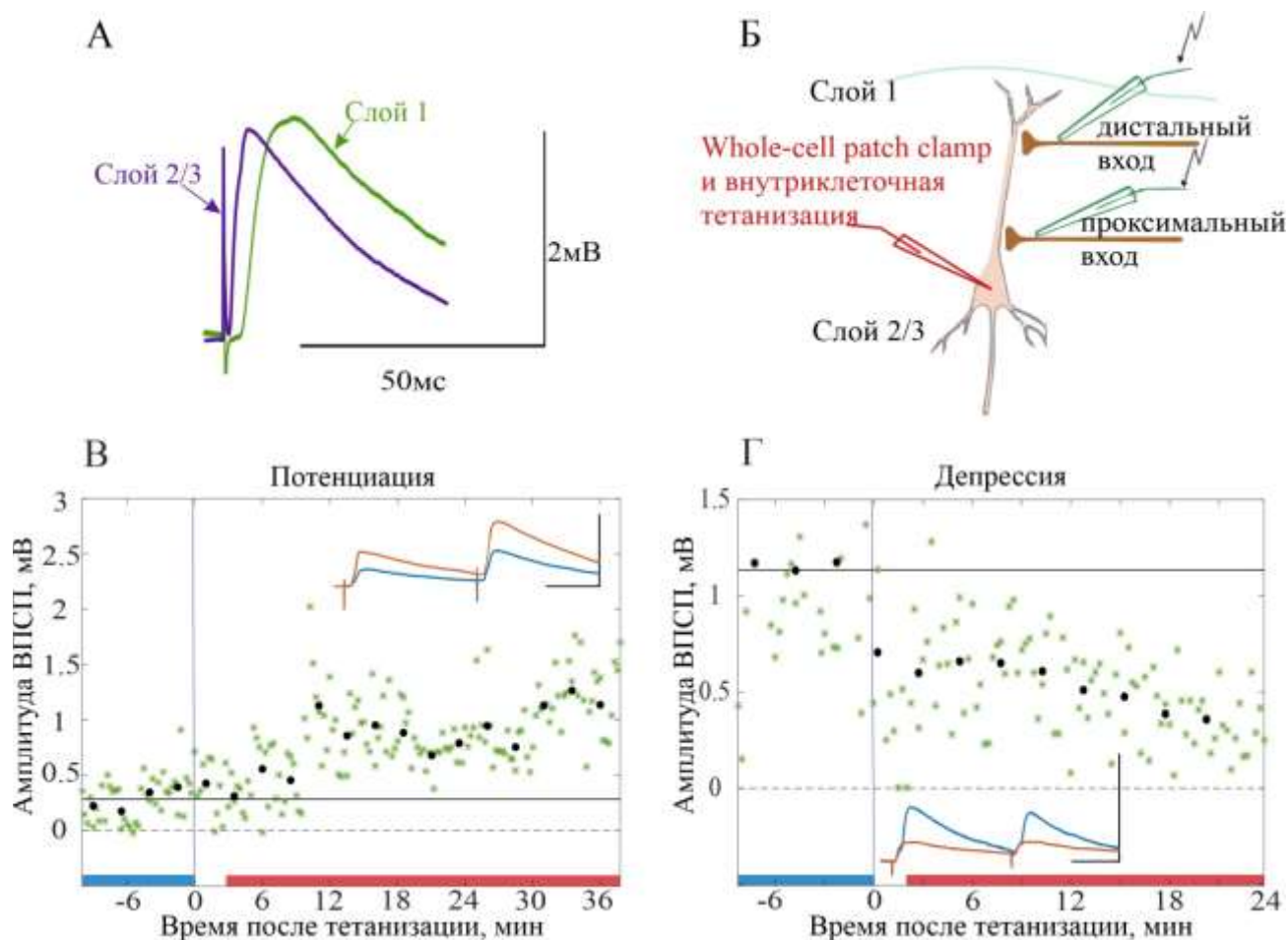


Рисунок 1. Долговременные изменения эффективности дистальных и проксимальных синаптических входов, вызванные внутриклеточной тетанизацией пирамидного нейрона 2/3 слоя неокортекса. А: примеры ВПСП, полученных при стимуляции «ближних» и «дальних» входов. Б: Схема, демонстрирующая положение регистрирующего и стимулирующих электродов. В,Г: примеры экспериментов, в которых внутриклеточная тетанизация индуцировала ДП (В) и ДД (Г).

(40% входов), ДП наблюдалась в 30% входов, в остальных достоверных пластических изменений выявлено не было (30% входов). При этом, если просуммировать все эксперименты с внутриклеточной тетанизацией и стимуляцией «дальних» входов, то среднее изменение амплитуд ВПСП составит  $104,9 \pm 13,1\%$  от изначального, то есть гетеросинаптические изменения, вызванные тетанизацией в дистальных входах, были сбалансированными.

При стимуляции проксимальных входов ( $n=16$ ) преобладающим типом пластичности, вызванной внутриклеточной тетанизацией, оказалась ДП (63% входов), ДД наблюдалась в одном эксперименте (6%), в остальных опытах достоверных пластических изменений выявлено не было (31% входов). При этом, если просуммировать результаты всех экспериментов со стимуляцией проксимальных входов, то оказывается, что тетанизация вызывала гетеросинаптическую потенциацию этих входов (среднее увеличение амплитуды ВПСП составило  $190,8 \pm 30,4\%$  по сравнению со значениями до тетанизации и достоверно отличалось от изменений амплитуд ВПСП, вызванных стимуляцией «дальних» входов ( $p < 0,01$ , критерий Манна-Уитни). Таким образом, внутриклеточная тетанизация вызывала суммарную гетеросинаптическую потенциацию «ближних» входов.

Было найдено, что направление и сила пластических изменений после тетанизации прямо коррелировали с начальным коэффициентом парной стимуляции (КПС) как для «дальних» ( $r=0,81$ ,  $p<0,001$ ,  $n=20$ ), так и для «ближних» входов ( $r=0,79$ ,  $p<0,001$ ,  $n=16$  входов).

Для сравнения гетеросинаптической и Хеббовской пластичности в сходных условиях мы поставили серию экспериментов, в которых индуцировалась гомосинаптическая пластичность проксимальных и дистальных входов. Для этого стимул, вызывающий ВПСП, подавался за 10 мс до каждой пачки из 5 тетанизирующих потенциалов действия. Гомосинаптическая пластичность успешно вызывалась как в «ближних», так и в «дальних» входах, и, как и ожидалось, представляла собой преимущественно ДП (68% для дистальных входов,  $n=19$ ; 83% для проксимальных входов,  $n=12$ ).

Рисунок 2 суммирует распределение случаев различных пластических изменений для «дальних» и «ближних» входов после сочетанной и несочетанной внутриклеточной тетанизации.

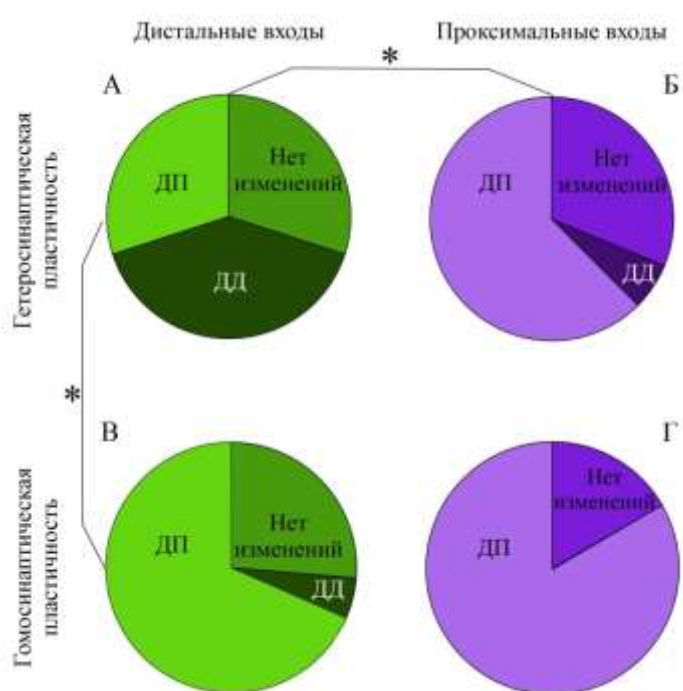


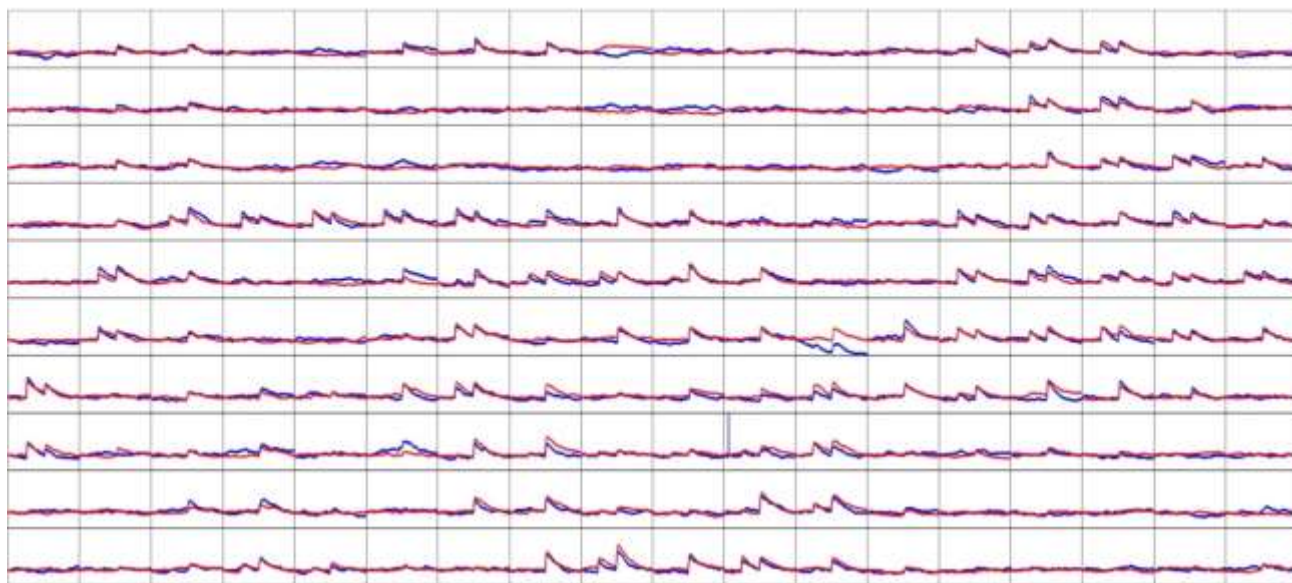
Рисунок 2. Сравнение свойств гомо- и гетеросинаптической пластичности «дальних» и «ближних» входов пирамидного нейрона 2/3 слоя. Круговые диаграммы А, Б, В, Г показывают частоту встречаемости ДП, ДД и отсутствия изменений для дистальных и проксимальных входов при сочетанной и несочетанной внутриклеточной тетанизации. Звездочки обозначают достоверные различия между соединенными линиями типами входов.

Чтобы оценить возможное участие пресинаптических механизмов в наблюдаемых пластических изменениях, мы измерили два показателя пресинаптического высвобождения: КПС и обратный коэффициент вариации ( $CV^{-2}$ ), а также их изменения после индукции пластичности. Изменение обратного коэффициента вариации положительно коррелировало с изменением ответа после индукции гетеросинаптической пластичности для дистальных входов ( $r=0,53$ ,  $p<0,05$ ,  $n=20$ ). Также для дистальных входов наблюдалась отрицательная корреляция изменения КПС и изменения амплитуды ответа клетки после индукции как гетеросинаптической ( $r=-0,64$ ,  $p<0,01$ ,  $n=20$ ), так и гомосинаптической пластичности ( $r=-0,64$ ,  $p<0,01$ ,  $n=19$ ). Для «ближних» входов, как и для пластичности Хеббовского типа, подобных корреляций не наблюдалось. Таким образом, говорить о вкладе пресинаптических механизмов можно для гетеросинаптической пластичности «дальних», но не «ближних» входов.

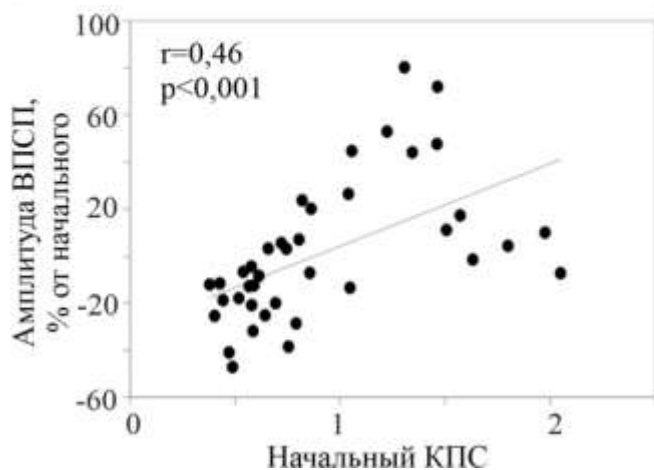
### Оптогенетический подход к исследованию гетеросинаптической пластичности

В этой части работы мы исследовали возможность использования метода оптогенетической стимуляции множества пресинаптических нейронов, конвергирующих на одну постсинаптическую клетку, в экспериментах по изучению механизмов гетеросинаптической пластичности. Оптическая стимуляция области среза, в которой находились ChR2-экспрессирующие нейроны 2/3 слоя, вызывала ВПСП в регистрируемом нейроне 5го слоя при предъявлении оптических стимулов во многих квадратах стимуляционной матрицы, как показано на рисунке 3А. Среднее количество квадратов стимуляционной матрицы 10x18, стимуляция которых

А



Б



В

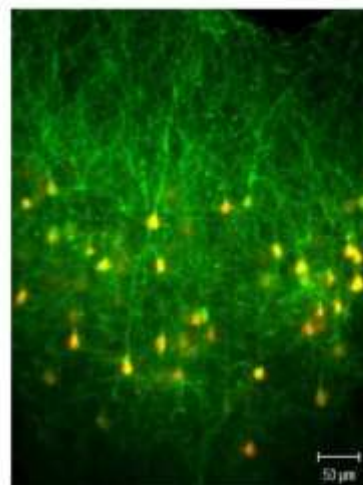


Рисунок 3. Синаптические ответы пирамидного нейрона пятого слоя коры в ответ на парную оптическую стимуляцию ChR2-экспрессирующих нейронов 2/3 слоя. А: стимуляционная матрица, в каждой ячейке которой приведен ответ постсинаптического нейрона, вызванный оптической стимуляцией данного квадрата матрицы световым стимулом, представляющим собой квадрат размером 38x38 мкм и вспыхивающий два раза на 1 мс с интервалом 50 мс. Синим цветом показаны ВПСП, усредненные за весь период регистрации до внутриклеточной тетанизации, красным цветом — усредненные ВПСП после тетанизации. Б: Зависимость величины изменения средней амплитуды ВПСП после внутриклеточной тетанизации от начального КПС. Приведены результаты одного репрезентативного

эксперимента. В: Сопоставление микрофотографий экспрессии ChR2-Venus и mCherry снятых с одной и той же области среза. Калибровка 50 мкм.

вызывала появление ВПСП в пирамидном нейроне пятого слоя составляло,  $46,6 \pm 15,7$  (N=10). При этом средняя амплитуда первого ВПСП составляла  $0,47 \pm 0,11$  мВ (N=10).

Практически в каждом эксперименте удавалось зарегистрировать входы, подвергшиеся как потенциации, так и депрессии после внутриклеточной тетанизации постсинаптического нейрона. Ни в одном из экспериментов не было зафиксировано появления синаптических ответов после внутриклеточной тетанизации в квадратах стимуляции, в которых ответов не было до тетанизации. В 9,4% от всех зарегистрированных синаптических входов, (44 из 466) наблюдалась потенциация, в 21,2% (99 из 466) — депрессия, в то время как большинство входов (69,4%, 323 из 466) не продемонстрировали статистически значимых изменений.

Мы подсчитали для каждого синаптического входа начальный КПС (по ответам, усредненным за весь период стимуляции до тетанизации) и общее изменение амплитуды ВПСП после тетанизации. В большинстве экспериментов (в 7 из 10) наблюдалась достоверная корреляция между начальным КПС и общим направлением изменений амплитуды ВПСП после тетанизации (рисунок 2Б). В среднем данный коэффициент корреляции по Пирсону составил  $0,56 \pm 0,08$  (N=7).

### **Гетеросинаптическая пластичность зрелых и незрелых гранулярных клеток зубчатой фации гиппокампа**

Известно, что нейроны, возникшие в результате нейрогенеза у взрослых животных в зубчатой фации гиппокампа, демонстрируют сниженный порог и увеличенную амплитуду долговременной потенциации при использовании Хеббовской парадигмы выработки пластичности (Schmidt-Hieber et al. 2004; Ge et al. 2007). Однако свойства гетеросинаптической пластичности в новообразованных нейронах совершенно не изучены. В этой части работы мы провели серию экспериментов по сравнению закономерностей формирования гетеросинаптической пластичности в новообразованных и зрелых нейронах зубчатой фации гиппокампа.

В предварительной серии экспериментов мы провели сопоставление морфологических и электрофизиологических характеристик зрелых и незрелых нейронов гиппокампа. Зрелые гранулярные клетки имели развитое дендритное дерево характерной формы и были иммунонегативными к PSA-NCAM (рисунок 4Б). Напротив, незрелые клетки имели рудиментарное, неразвитое дендритное дерево и были иммуноположительны к PSA-NCAM (рисунок 4А). Расстояние от самого дистального дендрита до сомы, которое мы использовали в качестве количественной меры морфологического различия между нейронами на разных стадиях развития, было заметно больше у зрелых PSA-NCAM-отрицательных клеток, чем у незрелых PSA-NCAM-положительных клеток ( $394 \pm 49$  мкм  $n=6$  против  $207 \pm 50$  мкм  $n=6$ ,  $p < 0,001$ ). В этой подгруппе морфологически идентифицированных клеток незрелые клетки имели более высокое входное сопротивление (BC) ( $1074 \pm 492$  МОм против  $284 \pm 82$  МОм в зрелых клетках,  $p=0,003$ ) и более деполяризованный мембранный потенциал покоя ( $-60,7 \pm 3,9$  мВ против  $-70,4 \pm 9,2$  мВ в зрелых клетках,  $p=0,0393$ ). Более высокое BC и более деполяризованный мембранный потенциал покоя у незрелых гранулярных клеток были также отмечены в предыдущих исследованиях (Schmidt-Hieber et al., 2004; Markwardt et al., 2009; Mongiat et al., 2009; Trinchero et al., 2019).

В основной серии экспериментов по выработке пластичности входное сопротивление и потенциал покоя нейронов использовались нами как критерии для деления клеток на зрелые



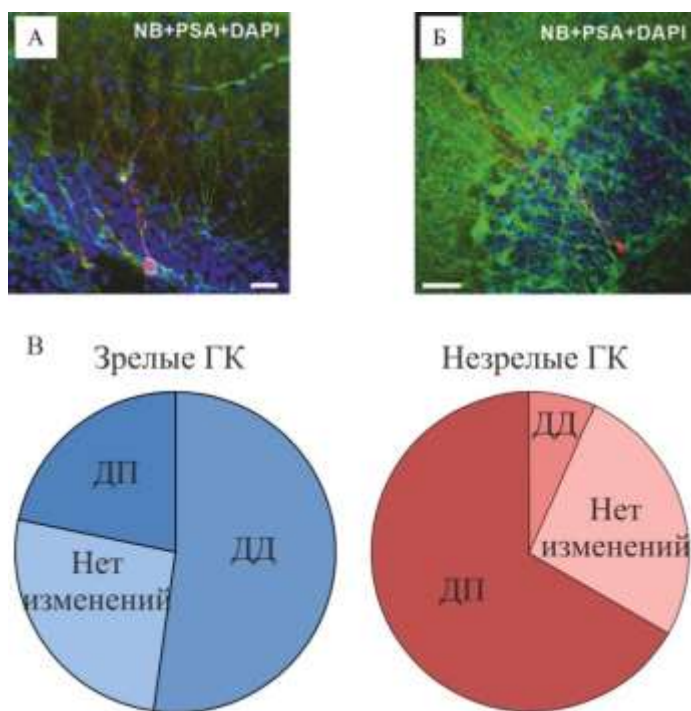


Рисунок 4. Гетеросинаптическая пластичность ГАМК-ергических входов зрелых и незрелых гранулярных клеток зубчатой фасции гиппокампа. А, Б: Наложение изображений окрашивания нейробиотином (красный цвет), иммуногистохимического окрашивания антителами против PSA-NCAM (зеленый) и окрашивания DAPI (синий). Незрелая гранулярная клетка является PSA-NCAM-положительной (панель А), в то время как зрелая гранулярная клетка является PSA-NCAM-отрицательной (панель Б). Масштабная линейка 50 мкм. В: Соотношение случаев ДП, ДД и отсутствия изменений в ГАМК-ергических входах после внутриклеточной тетанизации зрелых и незрелых нейронов гиппокампа.

и незрелые. Ранее было показано, что при расположении стимулирующего электрода на границе молекулярного слоя стимуляция вызывает преимущественно ГАМК-ергические ответы как в зрелых, так и в незрелых гранулярных клетках (Markwardt et al., 2009). Для проверки ГАМК-ергической природы регистрируемого ПСП в наших экспериментах мы использовали селективный антагонист ГАМК-рецепторов бикикуллин. Добавление в систему жизнеобеспечения срезов 10 мкМ бикикуллина приводило к сильному, часто полному подавлению ПСП во всех экспериментах.

В зрелых гранулярных клетках внутриклеточная тетанизация индуцировала двунаправленную пластичность. Из 13 экспериментов со зрелыми нейронами ДП наблюдалась в 3 случаях (амплитуда ВПСП увеличилась до  $156 \pm 29\%$  от начальной), ДД — в 6 случаях (амплитуда ПСП снизилась до  $59 \pm 21\%$  от начальной), в остальных 4 экспериментах амплитуда ПСП не изменилась (рисунок 4В).

Дополнительно была проведена серия экспериментов с добавлением в систему жизнеобеспечения срезов 10 мкМ CNQX, чтобы гарантировать, что AMPA-опосредованные компоненты не участвуют в наблюдаемых эффектах. В этих опытах ( $n=10$ ) ДП наблюдалась в 2 случаях, ДД — в 6, а в остальных 2 экспериментах амплитуда ПСП не менялась. Поскольку различий между эффектами внутриклеточной тетанизации в опытных сериях с и без CNQX не наблюдалось ни в общих изменениях амплитуды ПСП ( $93 \pm 43\%$  контроля против  $105 \pm 82\%$  контроля,  $p=0,66$ ), ни в частоте встречаемости ДП, ДД и отсутствия изменений (3–6–4 и 2–6–2, критерий Хи квадрат  $p=0,51$ ), результаты этих двух серий были объединены.

В 8 опытах мы регистрировали ПСП по тому же протоколу, что описан выше, но не применяли внутриклеточную тетанизацию. Никаких существенных изменений не наблюдалось в 7 из этих экспериментов, в 1 случае амплитуда ответа увеличилась. Частота появления изменений ВПСП достоверно отличается в опытах с и без тетанизации (критерий Хи квадрат  $p < 0,001$ ).

В целом, пластические изменения в зрелых нейронах были сбалансированными, и общее среднее значение амплитуд ответа после внутриклеточной тетанизации не отличалось от контроля ( $93 \pm 43\%$  контроля,  $N=13$ ,  $p > 0,1$ ). Дисперсия изменения амплитуды ПСП после

внутриклеточной тетанизации была достоверно выше, чем в опытах без тетанизации (62%  $n=23$  против 17%  $n=12$ ,  $f$ -критерий  $p < 0,001$ ), что подтверждает, что пластические изменения после внутриклеточной тетанизации не могут быть объяснены спонтанными колебаниями амплитуды синаптических ответов. В совокупности эти результаты показывают, что в зрелых нейронах внутриклеточная тетанизация индуцирует двунаправленную (как ДП, так и ДД) уравновешенную пластичность ГАМК-ергических входов, которая не зависит от функции AMPA-рецепторов.

В незрелых гранулярных клетках внутриклеточная тетанизация также вызывала двунаправленные изменения. Однако общая картина пластичности сильно отличалась от зрелых нейронов: потенциация наблюдалась в 10 из 15 экспериментов (до  $156 \pm 26\%$  контроля), депрессия только в 1 случае и в 4 экспериментах амплитуда ПСП не изменилась (рисунок 3В). Вследствие высокой частоты встречаемости ДП, общее среднее значение по всем экспериментам выявило значительное увеличение амплитуды ПСП после внутриклеточной тетанизации — до  $135 \pm 38\%$  от контроля ( $n=15$ ,  $p=0,008$ ).

Для объединенных данных экспериментов по пластичности ВС положительно коррелировало с изменением амплитуды ВПСП ( $r=0,31$ ,  $p=0,054$ ,  $n=38$ ; все клетки, зрелые и незрелые). Таким образом, общее преобладание ДП в незрелых нейронах было связано с более высокой частотой встречаемости ДП, в то время как амплитуда ДП в индивидуальных входах была сходной в зрелых и незрелых нейронах.

Чтобы оценить возможное участие пресинаптических механизмов в наблюдаемых пластических изменениях, мы измерили два показателя пресинаптического высвобождения: КПС и обратный коэффициент вариации ( $CV^{-2}$ ), а также их изменения после индукции пластичности. В незрелых нейронах изменения КПС были обратно коррелированы с изменениями амплитуды ПСП после внутриклеточной тетанизации ( $r=-0,54$ ,  $p=0,039$ ,  $n=15$ ), а изменения  $CV^{-2}$  имели тенденцию положительно коррелировать с изменениями амплитуды ВПСП ( $r=0,49$ ,  $p=0,062$ ,  $N=15$ ). Эти корреляции указывают на участие пресинаптических механизмов в гетеросинаптической пластичности незрелых нейронов. В зрелых нейронах корреляции не достигли уровня значимости ( $r=-0,24$ ,  $p>0,1$  для изменений КПС и  $r=0,24$ ,  $p>0,1$  для изменений  $CV^{-2}$ ,  $n=23$ ).

В отличие от входов нейронов неокортекса, где направление и величина гетеросинаптических изменений значимо коррелировали с начальным КПС, для нейронов зубчатой фасции такой корреляции не было обнаружено ни для зрелых нейронов ( $r=0,1$ ;  $ns$   $p>0,1$ ), ни для незрелых нейронов ( $r=0,09$ ;  $ns$   $p>0,1$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Гомо- и гетеросинаптическая пластичность «дальних» и «ближних» входов

Результаты наших экспериментов показывают, что гетеросинаптическая пластичность входов пирамидной клетки 2/3 слоя коры, расположенных в первом слое («дальние» входы) отличается по своим характеристикам и, вероятно механизмам, от гетеросинаптической пластичности «ближних» входов, расположенных во втором слое коры, и, также от гомосинаптической пластичности как ближних, так и «дальних» входов.

Степень выраженности и направленность пластических изменений, вызванных внутриклеточной тетанизацией, в наших экспериментах коррелировала с начальным КПС как для «ближних», так и для «дальних» входов, что согласуется с данными, полученными в экспериментах с неселективной экстраклеточной стимуляцией синаптических входов

(Volgushev et al., 2000; Volgushev et al., 2016; Bannon et al., 2017; Chistiakova et al., 2019; Chasse et al., 2021). Синапсы с высоким КПС (с низкой вероятностью выброса медиатора, «слабые» синапсы) были более склонны к потенциации, тогда как синапсы с низким КПС (с высокой вероятностью выброса, «сильные» синапсы) были более склонны к депрессии после тетанизации, что может свидетельствовать о нормализующем эффекте, который оказывает гетеросинаптическая пластичность на работу нейронных сетей. Таким образом, гетеросинаптическая пластичность, описанная в нашей работе для входов с известной локализацией (как проксимальных, так и дистальных), имеет сходную зависимость от начальной вероятности выброса медиатора, как и пластичность такого типа, изученная ранее на пирамидных нейронах зрительной коры при неселективной стимуляции синаптических входов.

Однако ряд других параметров гетеросинаптической пластичности кардинально различался для «ближних» и «дальних» входов. Так, изменения амплитуд ВПСП, вызванных стимуляцией дистальных входов, после тетанизации носили сбалансированный характер, т.е. количество ДП примерно равнялось количеству ДД и суммарно по всем экспериментам общий эффект тетанизации был равен нулю (средняя амплитуда ВПСП после тетанизации составляла 104,9% от амплитуды ВПСП до тетанизации). Абсолютно те же закономерности были выявлены ранее при исследовании эффектов внутриклеточной тетанизации при неселективной стимуляции синаптических входов. Также похожим оказался вклад пресинаптических механизмов: и в наших экспериментах со стимуляцией «дальних» входов и в опытах с неселективной стимуляцией изменения амплитуд ВПСП после тетанизации значимо коррелировали с изменениями обратного коэффициента вариации и КПС. Это указывает на возможную роль ретроградной сигнализации как одного из механизмов развития гетеросинаптической пластичности (Volgushev et al., 2000; Lee et al., 2012; Smith et al., 2020). При этом свойства гетеросинаптической пластичности «ближних» входов кардинально отличались от свойств пластичности «дальних» и входов с неизвестной локализацией. Во-первых, у проксимальных входов внутриклеточная тетанизация, если суммировать все эксперименты вместе, выражалась в потенциации (средняя амплитуда ВПСП после тетанизации составляла 185,5% от амплитуды ВПСП до тетанизации). И, во-вторых, изменения амплитуд ВПСП после тетанизации не коррелировали с изменениями индексов высвобождения медиатора. Таким образом, по всей видимости, в экспериментах с неселективной стимуляцией пресинаптических входов, многократно описанных в литературе, были задействованы преимущественно входы, расположенные на некотором удалении от тела клетки. Одним из возможных физиологических значений гетеросинаптической потенциации проксимальных глутаматергических входов, найденной в нашей работе, может состоять в уравнивании гетеросинаптической потенциации тормозных перисоматических входов, которая, как было показано, возникает после внутриклеточной тетанизации пирамидного нейрона (Lourenço et al., 2014).

Потенциалы действия, вызванные внутриклеточной тетанизацией обратно распространяются по апикальному дендриту и вызывают повышение внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  непосредственно в области синаптических контактов, что является запускающим фактором для развития гетеросинаптических изменений (Larkum et al., 1999; Volgushev et al., 2000; Lee et al., 2016). Было экспериментально показано, что направление пластических модификаций синапса зависит от уровня повышения внутриклеточной концентрации кальция, который достигается в результате пластифицирующего воздействия: при умеренном повышении развивается синаптическая депрессия, при более высоком — потенциация (Yang et al., 1999; Cho et al., 2001). Поскольку потенциалы действия при

тетанизации распространяются по дендритам с затуханием, то в ближних синапсах их амплитуда максимальна и соответственно повышение концентрации кальция тоже максимально — поэтому в проксимальных входах после внутриклеточной тетанизации наблюдается гетеросинаптическая потенция. Добавление ВПСП к тетанизации (сочетания) ничего принципиально не меняет, потому что уровень кальция и так превышает порог для потенции. При этом до дальних синапсов потенциалы действия доходят с затуханием, поэтому внутриклеточная концентрация кальция в удаленных дендритах при прохождении пачки потенциалов действия повышается до меньших значений, что приводит к тому, что в этих входах может развиваться как ДД, так и ДП. Добавление ВПСП к пачке потенциалов действия (сочетания) приводит к тому, что достигаемый максимальный уровень концентрации кальция увеличивается и баланс пластичности сдвигается в сторону потенции.

Гетеросинаптические изменения в дистальных входах в наших экспериментах были сбалансированы (приблизительно равное количество случаев ДД и ДП). Учитывая корреляцию степени выраженности гетеросинаптических изменений с КПС, такие сбалансированные изменения могут оказывать стабилизирующее действие на работу сети. Как было показано в модельных экспериментах, при включении в сетевую нейронную модель правил гетеросинаптической пластичности, сходных с теми, что были обнаружены нами для дистальных входов, происходила значительная стабилизация работы модельной сети. При этом сеть, работающая исключительно на Хеббовских принципах, неустойчива и стремится к дисбалансу (Chen et al., 2013). В работе (Froemke, 2010) была создана биофизическая модель нейрона, учитывающая различные правила индукции ПЗВС для «дальних» и «ближних» входов при выработке синаптической пластичности. Интересно было бы совместить в одной модельной нейронной сети общие правила индукции гетеросинаптической пластичности, как в работе (Chen et al., 2013), и зависимость закономерностей индукции пластичности от места расположения входа на дендритном древе нейрона, как в (Froemke, 2010). Возможно, модельная нейронная сеть, построенная по таким принципам, смогла бы наиболее точно описать работу реальных нейронных сетей в мозге.

### **Оптогенетический подход к исследованию гетеросинаптической пластичности**

Полученные нами результаты показывают, что оптогенетические методы могут быть эффективно и надежно использованы для изучения пластических эффектов внутриклеточной тетанизации на разные синапсы одной постсинаптической клетки, дополняя данные, получаемые с помощью локальной стимуляции. Этот метод позволяет проводить тестирование множества синаптических входов на один нейрон в одном эксперименте, что практически невозможно при использовании экстраклеточной или внутриклеточной стимуляции пресинаптических клеток. При этом в результате одного эксперимента с оптогенетической стимуляцией удастся получить статистически значимую корреляцию между силой синапса, оцениваемой по КПС, и амплитудой изменений ВПСП.

Одной из гипотез, проверяемых в ходе нашей работы, являлось возможное вовлечение так называемых «молчащих синапсов» при развитии потенции, по аналогии с тем, как это происходит при развитии долговременной потенции в гиппокампе (Kerchner and Nicoll, 2008). Однако ни в одном из опытов с оптогенетической стимуляцией мы не наблюдали активации синаптических входов, которые были бы неактивны до тетанизации (в контроле). Таким образом, с большой долей вероятности можно утверждать, что, при развитии долговременной потенции после несочетанной тетанизации постсинаптического нейрона не происходит активации «молчащих» синапсов.



## Гетеросинаптическая пластичность зрелых и незрелых гранулярных клеток зубчатой фации гиппокампа

Результаты наших экспериментов на нейронах гиппокампа показывают, что ГАМК-ергические входы, приходящие как на незрелые, так и на зрелые гранулярные клетки в зубчатой извилине пластичны. Гетеросинаптическая неассоциативная пластичность в этих входах может быть индуцирована постсинаптическими спайками без пресинаптической активации. Свойства гетеросинаптической пластичности, вызываемой внутриклеточной тетанизацией в этих входах, меняются по мере созревания клетки.

В предыдущих работах было показано, что ассоциативная пластичность возбуждающих входов более выражена у новообразованных незрелых гранулярных клеток по сравнению со зрелыми нейронами. В незрелых нейронах порог индукции пластичности при стимуляции возбуждающих входов тетра-паттерном ниже (Schmidt-Hieber et al., 2004; Ge et al., 2007), а в нейронах 1–1,5-месячного возраста величина ДП выше, чем в зрелых клетках (Ge et al., 2007). Мы показали, что ГАМК-ергические входы на незрелые и зрелые ГК могут подвергаться неассоциативной двунаправленной пластичности, и эти особенности неассоциативной пластичности в ГАМК-ергических синапсах изменяются по мере созревания ГК. Эти изменения проявляются совсем иначе, чем изменения пластичности в возбуждающих синапсах. В то время как процент ГАМК-ергических входов, которые проявляли пластичность, не различались между незрелыми (ДП или ДД в 73% экспериментов), и зрелыми клетками (ДП или ДД в 74% опытов, 17/23 клеток), баланс между потенциацией и депрессией резко отличался. В незрелых нейронах сильно преобладает ДП, что приводит к общему преобладанию потенциации после эпизода сильной только постсинаптической активации. В зрелых нейронах такие неассоциативные изменения были уравновешены. Для объединенных данных по незрелым и зрелым клеткам была отмечена тенденция к положительной корреляции между ВС и изменением амплитуды ВПСП. Поскольку ВС является установленным коррелятом созревания новообразованных гранулярных клеток, эта корреляция указывает на то, что переход от преобладания потенциации в незрелых клетках к уравновешенной неассоциативной пластичности в зрелых нейронах отражает внутреннее свойство процесса созревания клеток. Это также предполагает, что сдвиг может происходить постепенно во время созревания новых клеток и их интеграции в существующие сети. Следует также отметить, что результирующая потенциация в незрелых нейронах была обусловлена более частым возникновением ДП, в то время как величина ДП у потенцированных входов не отличалась у незрелых и зрелых клеток. Исходя из этого можно предположить, что лежащим в основе механизмом может быть происходящее по мере развития изменение в триггере и/или пороге для индукции ДД и ДП. Например изменение соотношения между кальциевыми каналами R-типа, опосредующими потенциацию, и каналами L-типа, опосредующими депрессию ГАМК-ергической передачи в пирамидных клетках пятого слоя (Kurotani et al., 2008) или экспрессии других рецепторов, регулирующих баланс потенциации и депрессии гетеросинаптических изменений, таких как рецепторы аденозина A1 в возбуждающих синапсах корковых нейронов (Bannon et al., 2017; Chasse et al., 2021).

Неассоциативная пластичность ГАМК-ергических входов незрелых ГК сопровождалась изменениями показателей, связанных с пресинаптическим выбросом медиатора (КПС и  $CV^{-2}$ ), что указывает на участие пресинаптических механизмов в проявлении этого типа пластичности. Поскольку протокол индукции пластичности был чисто постсинаптическим, это подразумевает ретроградную сигнализацию. Механизмы ретроградной передачи сигналов, предложенные предыдущими исследованиями гетеросинаптической пластичности, включает передачу

сигналов с использованием оксида азота NO (Volgushev et al., 2000; Kurotani et al., 2008; Lee et al., 2012; Lourenco et al., 2014), BDNF (Inagaki et al., 2008; Kuczewski et al., 2008) и выделяемый астроцитами АТФ (Chen et al., 2013).

Важным вопросом является то, в каком возрасте у новообразованных нейронов происходит сдвиг неассоциативной пластичности от преимущественно потенциации к уравновешенным изменениям, и таким образом, каков был возраст молодых нейронов в наших экспериментах. Наличие дендритов, идущих от внутренней части зернистого клеточного слоя (место записи, расположение сомы) на молекулярный слой, а также четкая ГАМК-ергическая природа ПСП, вызванных электрической стимуляцией, указывают на то, что незрелые нейроны в наших экспериментах были старше 14 дней, а значения внутреннего сопротивления предполагают возрастной диапазон 19–24 дня (Ge et al., 2006; Mongiat et al., 2009; Dieni et al., 2013; Trinchero et al., 2019). Этот возрастной диапазон также согласуется с результатами иммуноокрашивания против PSA-NCAM. Нейроны, которые были отнесены в нашем исследовании к незрелым клеткам, были иммуноположительны к PSA-NCAM, в то время как зрелые клетки были иммуноотрицательны к этому антигену. Действительно, хотя многие исследования сообщают, что экспрессия PSA-NCAM в незрелых нейронах прекращается к концу второй недели, есть данные о том, что трех- или четырехнедельные клетки в зубчатой извилине крыс могут быть иммуноположительными к PSA-NCAM (Seki, 2002). Можно предположить, что смещение баланса неассоциативной пластичности ГАМК-ергической передачи в сторону потенциации все еще присутствует на третьей и четвертой неделе созревания новообразованных гранулярных клеток и переход к сбалансированному, зрелому типу гетеросинаптической пластичности имеет место после четвертой недели созревания нейронов.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Для изучения особенностей и закономерностей формирования неассоциативной синаптической пластичности в настоящей работе мы использовали три методических подхода: 1) локальная стимуляция синаптических входов пирамидной клетки 2/3 слоя коры крысы внеклеточным электродом, расположенным во 2 слое (ближние входы) либо в 1 слое (дальние входы); 2) стимуляция направленным оптическим стимулом пирамидных клеток 2/3 слоя коры крысы с предварительно экспрессированным в них светочувствительным белком ChR2 и регистрацию ответов от пирамидной клетки 5 слоя коры; 3) локальная стимуляция ГАМК-ергических синаптических входов гранулярных клеток зубчатой фасции гиппокампа крысы, как зрелых, так и незрелых, образовавшихся во взрослом возрасте.

Мы обнаружили, что параметры и свойства гетеросинаптической пластичности существенно различались в исследованных синапсах. Так, степень и направленность гетеросинаптических изменений, индуцированных внутриклеточной тетанизацией во входах пирамидного нейрона 2/3 слоя неокортекса, коррелировали с начальным КПС. То есть, пластические перестройки были обратным образом связаны с начальной силой синапса, что согласуется с предыдущими исследованиями с неселективной стимуляцией синаптических входов. Схожая корреляция была также обнаружена в наших экспериментах с оптогенетической стимуляцией и для входов на пирамиды пятого слоя от нейронов 2/3 слоя. Однако для тормозных ГАМК-ергических входов гранулярных клеток зубчатой фасции гиппокампа связь гетеросинаптической пластичности с КПС не была выявлена ни для зрелых, ни для развивающихся клеток, что может указывать на различный механизм развития гетеросинаптической пластичности в нейронах неокортекса и гиппокампа.

Мы обнаружили, что правила индукции гетеросинаптической пластичности для синапсов, расположенных на апикальном дендрите клеток 2/3 слоя на разном удалении от сомы клетки, не являются одинаковыми. В проксимальных синапсах преобладала гетеросинаптическая ДП, а для дистальных были более характерны сбалансированные изменения. Также сбалансированные изменения после внутриклеточной тетанизации были типичны для синапсов между нейронами 2/3 и 5 слоев неокортекса, которые можно считать дистальными, как было показано в наших экспериментах с оптогенетической стимуляцией. Однако для ГАМК-ергических синапсов зрелых гранулярных клеток наоборот было характерно преобладание гетеросинаптической ДД, хотя входы стимулировались на том же расстоянии, что и проксимальные входы у пирамидных клеток неокортекса. Таким образом, наши результаты говорят о том, что правила гетеросинаптических перестроек не являются универсальными даже в пределах одной постсинаптической клетки, не говоря уже о разных структурах мозга, и их необходимо определять для каждой синаптической связи отдельно.

Обнаруженные нами различия в проявлениях гетеросинаптической пластичности в разных связях ожидаемы, поскольку механизмы долговременной гомосинаптической пластичности также различаются у возбуждающих и тормозных (в частности, ГАМК-ергических) синапсов. Тем не менее, гетеросинаптическая пластичность, вызванная внутриклеточной тетанизацией во всех исследованных типах клеток, имела общие черты. Она развивалась в похожих временных рамках, возникая сразу после тетанизации, и являлась долговременной пластичностью, поскольку изменения эффективности синаптической передачи сохранялись в течение получаса и дольше. Во всех случаях пресинаптические механизмы развития пластичности играли существенную роль в ее проявлении. Вероятно, основным запускающим фактором гетеросинаптической пластичности является повышение концентрации внутриклеточного кальция, вызванное постсинаптической активацией без сопутствующей пресинаптической стимуляции, что ранее было показано как для тормозных (Kurotani et al., 2003, 2008; Lourenco et al., 2014), так и для возбуждающих входов (Balaban et al., 2004).

Все наблюдавшиеся нами паттерны проявления гетеросинаптической пластичности свидетельствуют в пользу концепции о ее важной роли в стабилизации активности нейронной сети, наряду с долговременной гомосинаптической пластичностью, работающей в тех же временных рамках. Важно отметить, что протокол индукции гетеросинаптических пластических перестроек, который был использован нами, схож с активностью нейронов, возникающей в медленную фазу сна (Timofeev, 2011), что дает основания полагать, что особенности гетеросинаптических изменений, которые мы обнаружили в нашей работе, могут играть важную роль в работе нейронных сетей *in vivo*. Поскольку индукция гомосинаптической пластичности является основой для формирования памяти и обучения, сложно ожидать, что гетеросинаптическая пластичность имеет то же функциональное значение. Возможно, гетеросинаптические изменения, обнаруженные нами, играют важную роль в процессе забывания или подготовке синапсов к формированию нового памятного следа, как это было недавно предложено (Chasse et al., 2021). Таким образом, дальнейшие исследования, направленные на выяснение роли гетеросинаптических перестроек в разных отделах мозга, могут приподнять завесу тайны над процессами, происходящими во время сна, и дать вклад в понимание процессов формирования памяти, забывания, и изменения памятного следа.

## **ВЫВОДЫ**

1. Проксимальные глутаматергические входы на пирамидные нейроны 2/3 слоя зрительной коры более склонны к гетеросинаптической потенциации по сравнению с дистальными входами после внутриклеточной тетанизации постсинаптического нейрона.

2. Неассоциативная пластичность «дальних» и «ближних» входов подчиняется правилам индукции пластичности, сходным с выявленными для ассоциативной пластичности, что, вероятно, связано с зависимостью проявления обоих типов пластичности от особенностей обратного распространения потенциала действия по дендритам.

3. Гетеросинаптическая пластичность связей между нейронами 2/3 и 5 слоев неокортекса имеет те же свойства и паттерн проявления, что и гетеросинаптическая пластичность неклассифицированных входов, стимулируемых методом локальной стимуляции.

4. При развитии гетеросинаптической пластичности связей в результате внутриклеточной тетанизации не происходит активации ранее неактивных («молчащих») синапсов.

5. ГАМК-ергические входы как в незрелые, так и в зрелые гранулярные клетки в зубчатой извилине гиппокампа способны к формированию гетеросинаптической пластичности.

6. ГАМК-ергические синаптические входы, приходящие на незрелые нейроны зубчатой фасции, более склонны к гетеросинаптической потенциации после внутриклеточной тетанизации, в то время как тормозные входы на зрелые гранулярные клетки демонстрируют сбалансированные гетеросинаптические изменения, проявляющиеся в потенциации и депрессии или отсутствии изменений после аналогичного воздействия.

7. Переход от паттерна преобладания потенциации, свойственного для незрелых гранулярных нейронов, к сбалансированному проявлению потенциации и депрессии у зрелых нейронов зубчатой фасции происходит около четвертой недели развития гранулярной клетки.

## **Список сокращений**

ВПСП — возбуждающий постсинаптический потенциал

ПСП — постсинаптический потенциал

ВС — входное сопротивление

ГК — гранулярная клетка

ДД — долговременная депрессия

ДП — долговременная потенциация

ИЦСЖ — искусственная цереброспинальная жидкость

КПС — коэффициент парной стимуляции

ПД — потенциал действия

ПЗВС — пластичность, зависящая от времени спайка (STDP)

ChR2 — канальный родопсин 2

## **Список публикаций по теме диссертации:**

### **Статьи**

1. Симонова Н.А., Баль Н.В., Балабан П.М., Волгушев М.А., Малышев А.Ю. Оптогенетический подход к изучению механизмов гетеросинаптической пластичности в нейронах неокортекса // Журнал высшей нервной деятельности им И.П. Павлова, 2017, No. 5, P. 75-85.
2. Смирнова Г.Р., Рошин М.В., Винарская А.Х., Колотова Д.Е., Симонова Н.А., Балабан П.М., Малышев А.Ю. Использование заякоривающих мотивов для обеспечения центральной или периферической локализации опсинов в оптогенетике // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2018, No. 6, P. 630-634.
3. Simonova N.A., Volgushev M.A., Malyshev A.Y. Enhanced Non-Associative Long-Term Potentiation in Immature Granule Cells in the Dentate Gyrus of Adult Rats // *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2022, Vol. 14, P. 889947.

### **Тезисы конференций**

1. Malyshev A., Simonova N., Volgushev M. Heterosynaptic plasticity induced by intracellular tetanization in layer 2/3 pyramidal neurons depends on dendritic synapse location // FENS 2016, 02-06.07.2016, Copenhagen, Denmark.
2. Симонова Н.А., Малышев А.Ю. Гетеросинаптическая пластичность, вызванная внутриклеточной тетанизацией пирамидных нейронов неокортекса зависит от расположения синапсов на дендритном древе // Международная научно-практическая школа «От нейрона к мозгу: расширенный курс по нейрофизиологии – II», 19–25.10.2016, НИЛ Нейробиологии КФУ, г. Казань.
3. Симонова Н.А., Малышев А.Ю. Гетеросинаптическая пластичность, вызванная внутриклеточной тетанизацией пирамидных нейронов неокортекса зависит от расположения синапсов на дендритном древе // XX научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, 31.10–01.11.2016, ИВНДиНФ РАН, г. Москва.
4. Simonova N., Malyshev A., Volgushev M. Heterosynaptic plasticity induced by intracellular tetanization in layer 2/3 pyramidal neurons depends on dendritic synapse location // The Brain Conference: Learning, Memory and Synaptic Plasticity, 23–26.04.2017, Rungstedgaard, Denmark.
5. Simonova N., Malyshev A. Heterosynaptic plasticity induced by intracellular tetanization in layer 2/3 pyramidal neurons depends on dendritic synapse location // ENCODS, 04–06.05.2017, Alicante, Spain.
6. Симонова Н.А., Малышев А.Ю. Оптогенетический подход к изучению механизмов гетеросинаптической пластичности в нейронах неокортекса // XXI научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, 31.10–01.11.2017, ИВНДиНФ РАН, г. Москва.
7. Симонова Н.А., Малышев А.Ю. Гетеросинаптическая пластичность, вызванная внутриклеточной тетанизацией пирамидных нейронов неокортекса, зависит от расположения синапсов на дендритном древе // Конференция «ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ», 23–25.10.2018, ИБР РАН, г. Москва.
8. Симонова Н.А., Малышев А.Ю. Гетеросинаптическая пластичность, вызванная внутриклеточной тетанизацией пирамидных нейронов неокортекса, зависит от расположения синапсов на дендритном древе // XXII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии., 31.10–01.11.2016, ИВНДиНФ РАН, г. Москва.
9. Симонова Н.А., Малышев А.Ю. Гетеросинаптическая пластичность в новообразованных нейронах гиппокампа // Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2020, Vol. 56, No. 7, P. 688–688.