

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

На правах рукописи

Симонова Наталья Александровна

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

Специальность 1.5.5 – «Физиология человека и животных»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., проф. РАН Малышев Алексей Юрьевич

Москва 2023

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Общие представления о синаптической пластичности	10
1.2. Гетеросинаптическая пластичность	18
1.2.1 Клеточные и молекулярные механизмы гетеросинаптической пластичности.	28
1.3. Нейрогенез во взрослом возрасте и гетеросинаптическая пластичность	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Объекты и методики исследования.....	41
2.1.1. Объекты исследования	41
2.1.2. In utero электропорация.....	41
2.1.3 Приготовление переживающих срезов головного мозга.....	43
2.1.4. Растворы для приготовления срезов и исследования нейронов методом patch-clamp	45
2.1.5 Экспериментальная установка для исследования нейронов методом patch-clamp	45
2.2. Протоколы экспериментов.....	47
2.2.1 Протокол эксперимента «Гетеросинаптическая пластичность «дальних» и «ближних» входов клетки».....	48
2.2.2. Протокол эксперимента «Оптогенетическая стимуляция пресинаптической сети».....	49
2.2.3. Протокол эксперимента «Гетеросинаптическая пластичность образованных во взрослом возрасте (незрелых) и зрелых гранулярных клеток зубчатой фасции».....	52

3. РЕЗУЛЬТАТЫ	56
3.1 Гетеросинаптическая пластичность «дальних» и «ближних» входов .	56
3.2 Оптогенетический подход к исследованию гетеросинаптической пластичности	70
3.3 Гетеросинаптическая пластичность зрелых и незрелых гранулярных клеток зубчатой фации гиппокампа	78
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	96
4.1. Гетеросинаптическая пластичность «дальних» и «ближних» входов	96
4.2 Оптогенетический подход к изучению гетеросинаптической пластичности	100
4.3. Гетеросинаптическая пластичность зрелых и незрелых гранулярных клеток зубчатой фации гиппокампа	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	110
Список сокращений и условных обозначений.....	112
Список литературы	115

ВВЕДЕНИЕ

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 животным успешно получать необходимое и избегать опасностей, а также предсказывать изменения окружающей среды и принимать решения. Объектом, непосредственно подвергающимся изменениям, признаются нейроны 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 синаптических 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 потенцияция (ДП) и долговременная депрессия (ДД), являются ключевыми для формирования следов памяти в мозге.

Отправной точкой изучения синаптической пластичности считается предложенная Дональдом Олдингом Хеббом в 1949 году концепция установления связей между нейронами в зависимости от их синхронной активации (Hebb, 1949). Принцип Хебба часто кратко формулируется так: нейроны, разряжающиеся вместе, связываются друг с другом. 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 участия 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 нейронной 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 сериями потенциалов действия, приводит к тому, что в части синаптических входов на данный нейрон индуцируется гетеросинаптическая потенциация, в части — депрессия, а в части

не возникает изменений. 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 ГАМКергических 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 сериями 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 каналродопсин-2.

3. Изучить закономерности формирования гетеросинаптической пластичности ГАМКергических синаптических входов в новообразованных и зрелых нейронах зубчатой фации 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 ГАМКергические входы, приходящие как на незрелые, так и на зрелые гранулярные клетки в зубчатой извилине пластичны, что гетеросинаптическая, неассоциативная, пластичность на этих входах может быть индуцирована постсинаптическими спайками без пресинаптической активации и что свойства неассоциативной пластичности изменяются при созревании новообразованных гранулярных клеток. Была выявлена разница в неассоциативной пластичности зрелых и незрелых 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 соматической клетке 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 ГАМКергической передачи от преобладания гетеросинаптической потенциации к сбалансированным изменениям.

Апробация результатов исследования

Результаты исследования неоднократно докладывались на научных конференциях, в том числе: FENS, 2016 г., Копенгаген, Дания; Международная научно-практическая школа «От нейрона к мозгу: расширенный курс по нейрофизиологии – II», 2016 г., Казань; XX научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, 2016 г., Москва; The Brain Conference: Learning, Memory and Synaptic Plasticity 2017 г., Рунгстедгаард, Дания; ENCODS 2017 г., 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 школа по эволюционной физиологии (22 – 24 октября 2020 года), Санкт-Петербург, Россия.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие представления о синаптической пластичности

Синаптическая пластичность рассматривается научным сообществом в качестве основного механизма памяти на уровне как отдельных клеток, так и нейронных микросетей (Magee and Grienberger, 2020). Под синаптической пластичностью понимается изменение эффективности синаптической передачи в синапсах в результате их активности (Barroso-Flores et al., 2017). Эти изменения могут носить как кратковременный характер — порядка минут, так и относительно долговременный — порядка десятков минут, часов и дней. В результате изменения эффективностей синаптических связей может меняться частота и интенсивность генерации спайков в нейроне, размер и количество синапсов (Magee and Grienberger, 2020; Knoblauch et al., 2014). Основой этому служит изменение количества рецепторов на мембране непосредственно в области синапса, активация прежде инактивированных типов рецепторов, синтез белка в клетке (Luscher and Malenka, 2012).

Понимание механизмов возникновения и поддержания синаптической пластичности, а также сочетания разных ее форм, является ключом к пониманию механизмов возникновения памяти (Malenka and Nicoll, 1999; Joshi et al., 2019). Память, в свою очередь, является одной из основных адаптивных черт, позволяющих подстраиваться к окружающей среде и прогнозировать ее изменения, как для человека, так и для животных.

Существует большой пласт ментальных расстройств и болезней, симптоматика которых включает то или иное нарушение памяти (Vitolo et al., 2002; Singh and Abraham, 2017; Zhang et al., 2019). Как показывают модели многих из этих заболеваний, их симптомы коррелируют с нарушениями возможности изменения эффективности синаптической передачи (Pozueta, Lefort and Shelanski, 2013; Singh and Abraham, 2017). Восстановление нормальных паттернов пластичности с помощью генетических или фармакологических манипуляций, наблюдаемое на уровне одного нейрона либо микросети, приводит к

возвращению способности к запоминанию и воспроизведению информации у макроорганизма (Vitolo et al., 2002; Cui et al., 2019).

Разнообразие форм синаптической пластичности не удивительно, учитывая количество связываемых с ней процессов. Эффективность синаптической передачи может как увеличиваться, так и уменьшаться в интервалах от нескольких миллисекунд до, вероятно, многих дней. Считается, что все синапсы в мозге млекопитающих одновременно проявляют несколько форм пластичности.

Кратковременная синаптическая пластичность — пластичность, возникающая во временном интервале от нескольких миллисекунд до нескольких минут. Чаще всего кратковременная пластичность вызывается короткими сериями потенциалов действия (ПД), приводящими к кратковременному накоплению кальция в пресинаптических терминалях, что, в свою очередь приводит к изменению вероятности выбросам медиатора (Zucker and Regehr, 2002).

Когда два стимула приходят к клетке с небольшим промежутком между ними, ответ на второй может усиливаться либо уменьшиться по сравнению с первым. Это явление называется парной фасилитацией либо депрессией. Депрессия может наблюдаться при парной стимуляции с коротким (менее 20 мс) промежутком между стимулами. Это, вероятно, связано с инактивацией потенциал-зависимых натриевых или кальциевых каналов, либо кратковременным истощением пула везикул, связанных в пресинаптической терминали. Более длительный промежуток между стимулами (20 – 500 мс) вызывает парную фасилитацию, что может объясняться концентрацией кальция в пресинапсе, остающейся повышенной после прихода первого стимула (Ravin et al., 1999). Возможно, так же задействованы и другие механизмы, например активация протеинкиназ, изменяющих активность пресинаптических белков (Citri and Malenka, 2008).

Эта форма пластичности является результатом изменения вероятности выброса медиатора. Синапсы с более высокой начальной вероятностью выброса будут более предрасположены к депрессии ответа на второй стимул (Zucker and Regehr, 2002). Синапсы с низкой начальной вероятностью выброса будут склонны

к увеличению амплитуды ответа на второй стимул по сравнению с первым. Манипуляции, уменьшающие вероятность выделения медиатора, например, активация пресинаптических ауторецепторов, почти всегда приводят к усилению парной фасилитации или даже к переходу от парной депрессии к парной фасилитации. Таким образом, одни и те же синапсы могут проявлять и парную депрессию, и фасилитацию в зависимости от паттерна их предшествующей активности.

Более длительно существующие формы краткосрочной пластичности возникают в результате повторяющейся или тетанической стимуляции синапсов высокочастотными последовательностями стимулов (10 – 200 Гц). Такие пластические изменения сохраняются от нескольких секунд (аугментация) до нескольких минут (посттетаническая потенция) (Citri and Malenka, 2008). Их проявление связывают как с увеличением вероятности выделения медиатора, так и с увеличением количества сайтов выделения медиатора (Clements and Silver, 2000). Посттетаническая потенция и аугментация связаны с увеличением концентрации кальция в пресинаптической терминали в результате повторно приходящих потенциалов действия (Zucker and Regehr, 2002).

В некоторых синапсах повторяющаяся активация приводит к снижению эффективности синаптической передачи, длящейся от нескольких секунд до нескольких минут (Zucker and Regehr, 2002; Barroso-Flores et al., 2015). Это явление называется кратковременной депрессией. Так же, как и в случае парной депрессии, синапсы, предрасположенные к кратковременной депрессии, имеют высокую вероятность выброса медиатора. Кратковременная депрессия, по крайней мере частично, объясняется временным истощением пула готовых к связыванию везикул в пресинаптической терминали. Другим механизмом кратковременной депрессии может быть снижение количества входящего в терминаль кальция в результате инактивации кальциевых каналов (Xu and Wu, 2005). К кратковременной депрессии может приводить выделение модуляторов синаптической передачи из пре- или постсинаптической терминали, например, эндоканабиноидов (Freund et al., 2003). Кроме того, постсинаптическим

механизмом кратковременной депрессии может быть десенситизация лигандзависимых рецепторов (Citri and Malenka, 2008).

Считается, что кратковременная пластичность играет важную роль в быстрой адаптации к изменению сенсорных стимулов, в быстрых изменениях поведения и в кратковременной памяти. Существование кратковременной пластичности позволяет синапсам выполнять функции фильтров сигнала с различными характеристиками. Например, синапсы с низкой начальной вероятностью выброса медиатора функционируют как фильтры низкочастотных импульсов. Проведение через них будет фасилитироваться при высокой частоте входящих ПД, тогда как эффективность проведения при низкой частоте серии ПД будет относительно низкой. Наоборот, синапсы с высокой начальной вероятностью выброса могут быть фильтрами высоких частот, так как частое срабатывание будет приводить к их депрессии (Citri and Malenka, 2008).

Основоположителем представления о долговременной синаптической пластичности как об основе памяти считается Дональд Олдинг Хебб, который в своей работе 1949 года «The Organization of Behaviour» («Устройство поведения»), впервые предложил принцип связи нейронов. Согласно принципу Хебба, если нейрон А постоянно или повторно участвует в возбуждении нейрона В, в результате которого нейрон В генерирует спайк, в одной или обеих этих клетках происходят метаболические процессы либо процессы роста. Эти процессы приводят к тому, что эффективность нейрона А как источника возбуждения нейрона В увеличивается. Клетки, связанные таким образом, Хебб называл «нейронными ансамблями», а их комбинации и связи предполагал основой постоянно изменяющегося ответа мозга на внешние стимулы (Hebb, 1949).

С тех пор было выявлено порядка 20 типов только Хеббовской пластичности (Joshi et al., 2019).

Кроме того, выделяют множество подтипов «не Хеббовской» пластичности, относящейся к синапсам клетки, не участвовавшим в индукции Хеббовской пластичности, которая изучена существенно хуже.

Начиная с работы (Scoville, Milner, 1957) появляются представления о гиппокампе как о структуре, поражения которой приводят к тяжелым нарушениям памяти. Закономерно, что модель долговременной синаптической пластичности, впоследствии ставшая классической, была предложена Bliss and Lomo впервые именно на гиппокампе. В этой работе исследовались полевые (популяционные) потенциалы гранулярных клеток зубчатой фации при повторной стимуляции волокон перфорантного пути. Было обнаружено увеличение амплитуды этих потенциалов и количества разрядов клеток после высокочастотной стимуляции (использовалось два типа стимуляции) оканчивающихся на клетках волокон. Это увеличение сохранялось до 10 часов и было названо долговременной потенциацией. На основании разницы в обнаруженных явлениях при разных типах стимуляции было предложено два возможных механизма возникновения потенциации — увеличение эффективности синаптической передачи в волокнах перфорантного пути и увеличение возбудимости гранулярных клеток (Bliss and Lomo, 1973). Это предположение, по сути, положило начало изучения двух больших семейств механизмов синаптической пластичности — постсинаптического и пресинаптического.

Наиболее изученные, и потому считающиеся типичными, формы долговременной пластичности — это ДД и ДП, возникающие в регионе CA1 гиппокампа. Эти формы пластичности связаны с активацией N-метил-D-аспартатных рецепторов (NMDAR) (Citri and Malenka, 2008).

Активация NMDAR возможна только при деполяризации клетки. Магний, блокирующий эти каналы при потенциале покоя, при деполяризации диссоциирует от своего сайта связывания, позволяя ионам входить в клетку через канал (Mayford et al., 1996). Индукция ДП в CA1 требует активации NMDAR в результате сильной постсинаптической деполяризации (Malenka and Nicoll, 1993), что приводит к увеличению концентрации кальция в постсинапсе. В результате происходят биохимические изменения, поддерживающие ДП. Параллельно происходят структурные изменения в синапсе, такие как изменение размера постсинаптического уплотнения, увеличение размера и количества шипиков. В

свою очередь это приводит к увеличению активной постсинаптической зоны, так что потенцированные синапсы длительно остаются увеличенными (Abraham and Williams, 2003). Поддержание этих изменений в течение поздней фазы ДП (после 30 – 60 минут от ее индукции) обеспечивается как локальным синтезом белков в дендрите, так и транскрипцией в ядре, что снабжает потенцированные синапсы белками, необходимыми для поддержания эффективности синаптической передачи (Citri and Malenka, 2008). Существует гипотеза, что при индукции ДП в синапсе синтезируется «синаптическая метка», которая обеспечивает направление в синапс белков, позволяющих поддерживать потенциацию и стабилизировать повышение силы синапса. В качестве такой метки предлагаются такие белки как РКА, САМКII или РКМζ (Young et al., 2006).

NMDAR-зависимая ДД в СА1 гиппокампа вызывается меньшим подъемом концентрации кальция в постсинаптической терминали в результате активации меньшего количества NMDAR. Это приводит к активации фосфатаз и некоторых других сигнальных белков. В результате AMPAR диссоциируют из постсинаптического уплотнения, смещаются латеральнее в зоны эндоцитоза (Hsieh et al., 2006). ДД сопровождается уменьшением размера шипиков дендритов (Zhou et al., 2004). Для длительного поддержания ДД, так же как и для ДП, необходим синтез белков в дендрите (Pfeiffer and Huber, 2006).

Одним из типов Хеббовской пластичности, тесно связанным с гетеросинаптической пластичностью является пластичность, зависящая от времени спайка (ПЗВС). Согласно «правилу обучения» в парадигме ПЗВС, в синаптические входы, которые были активны незадолго до постсинаптического потенциала действия (пре перед пост) индуцируется ДП, а во входах, активных в небольшом промежутке времени после постсинаптического ПД (пост перед пре) — ДД. В расширенном виде это правило включает так же модели, рассматривающие эффекты многих пресинаптических и одного постсинаптического спайка, но общий принцип остается прежним — предшествующая пресинаптическая активация необходима для индукции пластичности. Экспериментально ПЗВС обычно вызывают процедурой

сочетанной стимуляции, активируя и пре- и постсинаптический нейрон в определенной последовательности.

Интересным свойством ПЗВС является ее зависимость от расположения подвергающегося пластическим изменениям входа на дендритном древе. В исследованиях (Sjöström and Häusser, 2006) наблюдался пространственный градиент пластичности ПЗВС вдоль апикального дендрита пирамидного нейрона пятого слоя. Для перисоматических синапсов (не далее 100 мкм от тела нейрона) ПЗВС подчинялась Хеббовским законам — протокол «пре перед пост» вызывал ДП. При увеличении дистанции от тела клетки потенциация постепенно уменьшалась и пропадала, в дистальных частях дендрита (более 500 мкм от тела нейрона) протокол «пре перед пост» вызывал ДД (Froemke, 2010). ДД в этих дистальных входах могла быть изменена на ДП при сочетании постсинаптического потенциала действия с дендритной деполяризацией, которая облегчает обратное распространение ПД. Деполяризация дендрита, результатом которой становилось превращение единственного ПД в разряд высокой частоты в результате генерации дендритного кальциевого спайка (Larkum et al., 1999) приводило к смене ДД на ДП при том же протоколе стимуляции.

Такое «переключение» пластичности, связанное с обратным распространением ПД, является общим механизмом для дендритов, и, в принципе, может проявляться в любом нейроне, для которого характерно затухание ПД при его обратном распространении по дендритам.

В нейронах 2/3 слоя развивающейся зрительной коры амплитуда ПЗВС в более дистальных синапсах (более 100 мкм от сомы) оказывалась приблизительно вдвое меньше амплитуды ПЗВС в проксимальных (менее 50 мкм от сомы). Кроме того, временное окно для индукции ДД ПЗВС для дистальных синапсов пирамидных нейронов 2/3 слоя оказалось заметно шире, чем для проксимальных. Вследствие этого, при стимуляции постсинаптического нейрона перед пресинаптическим с интервалом от 50 до 100 мс, ДД вызывалась в дистальных, но не в проксимальных синапсах (Froemke, 2010).

Различия в правилах индукции пластичности для разных частей апикального дендрита клетки могут иметь несколько функциональных значений. Меньшая степень пластических изменений и отличие временных окон развития ПЗВС в дистальных синапсах пирамидных нейронов может приводить к функциональным различиям дистальных и проксимальных частей дендритного древа при обработке сигналов с разными временными характеристиками. Учитывая, что синаптические веса дистальных входов, получавших быстро изменяющиеся сигналы, значительно увеличивались при включении в модель таких различий, входы на дистальных частях дендрита могут специализироваться на обработке точных временных параметров сигналов (Froemke, 2005).

Различие в проявлениях ПЗВС между дистальными и проксимальными синаптическими входами было выявлено и для пирамидных нейронов CA1 гиппокампа (Kondo et al., 2013).

Долговременная пластичность тормозных ГАМКергических синапсов имеет механизмы, отличающиеся от пластичности возбуждательных синапсов. Длительное изменение эффективности синаптической передачи в ГАМКергических синапсах активируют связанные с G-белками сигнальные системы. Их участие является критическим для развития ДД и ДП.

Для большинства возбуждательных синапсов долговременная пластичность имеет преимущественно постсинаптические механизмы возникновения, а метаботропные рецепторы только модулируют ее проявления. Долговременная пластичность тормозных ГАМКергических синапсов может иметь преимущественно пресинаптический механизм, реализуемый в результате обратной сигнализации через G-белок-связанные рецепторы (Rozov et al., 2017).

ДД ГАМКергических синапсов может быть связана с системой эндоканабиноидов. Их эффект в мозге опосредуется канабиноидными рецепторами типа 1 (CB1), которые экспрессируются на пресинаптической мембране. Эти рецепторы связаны с Gi белками, активация которых ингибирует аденилатциклазу и снижает концентрацию циклического аденозинмонофосфата (сАМР) (Steindel et al., 2013). Кроме того, G $\beta\gamma$ субъединица рецептора может

блокировать потенциалзависимые кальциевые каналы, взаимодействуя с ними (Freund and Katona, 2007). Связанная с эндоканабиноидами ДД требует повышения концентрации кальция в клетке, который приводит к синтезу и выделению из постсинаптического нейрона эндоканабиноидов. Ингибирование аденилатциклазы приводит к подавлению функции протеинкиназы А и смещению баланса фосфорилирования/дефосфорилирования ее мишеней в сторону дефосфорилирования, что приводит к уменьшению выделения ГАМК из пресинапса и снижению эффективности синаптической передачи (Freund et al., 2003).

Как ДП, так и ДД ГАМКергических синапсов может иметь в качестве механизма активацию ГАМКрецепторов типа б. ГАМКб рецепторы связаны с белками Gi/o типа, активация которых уменьшает активность аденилатциклазы, а Gβγ субъединица рецептора может блокировать потенциалзависимые кальциевые каналы и активировать постсинаптические калиевые каналы. В отличии от CB1, ГАМКб рецепторы могут экспрессироваться как на пресинаптической, так и на постсинаптической клетке (Bettler et al., 2004). Один из механизмов, благодаря которому активация ГАМКб может вызывать как ДД так и ДП, связан с разным влиянием фосфорилирования на ГАМКа каналы с разным составом субъединиц. Проводимость каналов, имеющих в составе β1 субъединицу заметно увеличивается при ее дефосфорилировании, что увеличивает амплитуду постсинаптических ответов. Каналы, содержащие β3 субъединицу, наоборот, имеют более высокую проводимость в фосфорилированном состоянии (Rozov et al., 2017).

1.2. Гетеросинаптическая пластичность

Как уже говорилось выше, обучающиеся системы, в которых все пластические изменения подчиняются Хеббовским правилам, имеют два основных недостатка. Во-первых, гомосинаптическая пластичность

подразумевает наличие петли положительной обратной связи. Потенциация увеличивает вероятность входа принять участие в разряде нейрона, и таким образом увеличивает вероятность дальнейшей потенциации. Синапсы, в которых возникнет депрессия, имеют более низкий шанс участвовать в проведении сигнала, что предрасполагает их к дальнейшей депрессии. Это приводит к сверхвозбудимости, либо к молчанию модельного нейрона, что уменьшает вычислительные способности нейрональной сети, нарушая соотношения входящих и исходящих сигналов.

Во-вторых, Хеббовские правила обучения предполагают небольшую степень конкуренции между синапсами. Несмотря на то, что синаптические веса могут изменяться в обоих направлениях, эти изменения требуют повторения специфических паттернов входящей активности. Для изменения эффективности двух групп входов в противоположных направлениях, они должны подвергаться повторяющейся активации разного типа — низкочастотной для возникновения ДД и высокочастотной для возникновения ДП. Либо они должны быть систематически активны в разное (относительно постсинаптической активности) время, чтобы депрессия и потенциация возникала по правилам зависящей от времени спайка пластичности. Хотя это и возможно теоретически, такой сценарий накладывает жесткие ограничения на взаимосвязи между параметрами правил пластичности и входящей активности (Chistiakova et al., 2014).

Необходимость дополнительного механизма, поддерживающего стабильность нейрональной активности и обеспечивающего высокую синаптическую конкуренцию в обучающихся по Хеббовским правилам системах, была обоснована уже в ранних теоретических работах (Von der Malsburg, 1973). Достичь данных эффектов можно с помощью нормализации: после изменения синаптического веса любого синапса все синаптические веса нормализуются таким образом, что их сумма остается постоянной. Нормализация не исключает возможности проявления потенциации или депрессии в отдельном синапсе, эффективно препятствует насыщению активности в целом. Кроме того, она обеспечивает синаптическую конкуренцию, которая не требует наличия

повторяющейся активности, вызывающей депрессию, для снижения веса синапса. В качестве механизма нормализации может быть предложена гетеросинаптическая пластичность — изменение эффективности синаптической передачи в синапсах, которые не были активны во время индукции пластичности.

Для стабилизации систем, обучение в которых основано на пластичности, зависящей от времени спайка, гетеросинаптическая пластичность должна оперировать на той же временной шкале, что и гомосинаптическая пластичность — от минут до секунд (Skorheim, Lonjers and Bazhenov, 2014), что и было показано экспериментально (Field et al., 2020).

Гетеросинаптическая пластичность была открыта практически одновременно с Хеббовской (Lynch et al., 1977), однако исследована в гораздо меньшей степени. Вероятно, это связано с тем, что в основе явления лежит еще большее, чем для Хеббовской пластичности, число механизмов возникновения, причем происходящие изменения могут быть как со- так и противонаправлены гомосинаптической пластичности. Гетеросинаптическая пластичность была впервые выявлена при регистрации популяционных потенциалов в гиппокампе. При возникновении ДП в синапсах апикальных дендритов клеток зоны CA1 гиппокампа, стимулировавшихся через коллатерали Шаффера, параллельно наблюдалась ДД в синапсах базальных дендритов, образованных комиссуральными волокнами, которые не подвергались вызывающему пластичность воздействию (Lynch et al., 1977). Обратное направленное явление так же возникало. Индукция ДП в базальных синапсах с помощью стимуляции комиссуральных входов наблюдалась ДД в апикальных дендритных синапсах, при тестировании через коллатерали Шаффера, которые в таком эксперименте не подвергались вызывающему пластичность воздействию. Благодаря четкому пространственному разделению как синапсов, в которых возникали пластические изменения, так и входов, подвергавшихся и не подвергавшихся высокочастотной стимуляции, этот эксперимент стал убедительным свидетельством существования гетеросинаптической пластичности.

Гетеросинаптическая ДП была впервые зарегистрирована во входах, расположенных близко к входам, в которых возникала гомосинаптическая потенция. Параллельно с ДП, вызванной сочетанной стимуляцией нейрона CA1 и коллатерали Шаффера, ДП проявляли не стимулировавшиеся синапсы этой же клетки, и синапсы соседних клеток. Оказалось, что правило специфичности входа не действует на малых расстояниях: протоколы, вызывающие ДП, вызывают пластичность не только в активированном синапсе, но также и в соседних (Bonhoeffer et al., 1989). Дальнейшие исследования пространственного распределения гетеросинаптической пластичности в структурах, имеющих упорядоченное строение, таких как амигдала и гиппокамп, обнаружили профиль пластичности по типу «Мексиканской шляпы». Индукция ДП в группе синапсов сопровождалась бифазным профилем гетеросинаптических изменений. В соседних синапсах возникала более слабая ДП, слабая ДД в более отдаленных, и еще более отдаленные не подвергались изменениям. Изменения того же типа с обратным направлением пластичности возникали и при изначальной индукции ДД. Пространственные профили пластичности были сбалансированы так, что ни ДД, ни ДП в активированных синапсах не приводила к изменениям в суммарной силе синаптического входа клетки. Таким образом, пластичность, имеющая сбалансированный между потенцией и депрессией профиль может оказаться мощным локальным механизмом как нормализации синаптических весов, так и синаптической конкуренции (Royer and Paré, 2003).

Общепринятой модели для изучения гетеросинаптической пластичности не существует. Гетеросинаптическая пластичность часто регистрируется как побочный продукт изучения Хеббовской пластичности и не всегда при этом принимается во внимание (Chistiakova et al., 2014). Например, при использовании определенной частоты и ритма стимуляции в классической модели на гиппокампе, один из вариантов приводит к увеличению концентрации BDNF, и, в свою очередь, к появлению гетеросинаптической пластичности во входе, используемом как контрольный. К сожалению, целью авторов данной работы

была именно гомосинаптическая пластичность, и этот феномен так и остается на данный момент просто наблюдением (Hardingham et al., 2007).

При использовании сочетанной стимуляции, обычно используемой для индукции ПЗВС, может изменяться эффективность синаптической передачи так же в синапсах, не подвергавшихся сочетанной стимуляции. В работе группы М.А. Волгушева (Chistiakova et al., 2014) вызывалась ПЗВС в нейронах 2/3 слоя неокортекса крысы. Процедура сочетанной стимуляции изменяла амплитуду ответа во входах, которые тестировались в том же эксперименте, но не стимулировались во время сочетанной стимуляции. Эти гетеросинаптические изменения оказывались направлены в обе стороны — амплитуда ответа в 15 из 50 входов увеличивалась, еще в 12 — уменьшалась, в остальных не изменялась. Эти показатели близки к данным тех же авторов для гетеросинаптической пластичности, полученной путем внутриклеточной тетанизации. Амплитуда этих гетеросинаптических изменений так же коррелировала с начальным коэффициентом парной стимуляции (КПС). Не смотря на то, что ответы в отдельных входах оказались потенцированы или депрессированы, изменения средней амплитуды ответа в неподвергавшихся сочетанной стимуляции входах не наблюдалось (Chistiakova et al., 2014).

Таким образом, индукция гомосинаптической пластичности в типичной процедуре получения ПЗВС сопровождается возникновением гетеросинаптических изменений в несочетанных входах. Это наблюдение в определенной степени противоречит утверждению о входоспецифичности пластичности, вызванной сочетанной стимуляцией, и большому количеству публикаций, показывающих отсутствие изменений в несочетанных или контрольных входах. Это противоречие может разрешать тот факт, что гетеросинаптические изменения направлены в обе стороны и сбалансированы. В среднем изменений в контрольных входах действительно не наблюдается. Для проверки этого утверждения группа М.А. Волгушева заново проанализировала данные 8 исследований (35 экспериментальных серий) (Chistiakova et al., 2014). При сравнении этих данных оказалось, что разброс изменений амплитуд ответов в

протоколах, вызывающих ДП и ДД, перекрывается и чаще всего включает оба варианта изменений. Разброс изменения амплитуд ответов во входах, не подвергавшихся сочетанной стимуляции, перекрывается с разбросами амплитуд ответов при ДП и ДД, что указывает на проявление в них гетеросинаптической пластичности. Интересно, что в работе Н.Р. Хардингема (Hardingham et al., 2007) было показано, что ДД и ДП может вызываться одним и тем же протоколом, причем направление этих изменений зависит от начальной вероятности выброса медиатора. Изменения амплитуды возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП), возникающие в результате только постсинаптической стимуляции, обычно более выражены, чем при возникновении гетеросинаптической пластичности во входах, не подвергавшихся сочетанной стимуляции. Вероятно синапсы, подвергающиеся пластическим изменениям, конкурируют за ресурсы. Сочетанная стимуляция может облегчать доступ к ресурсам за счет механизма маркирования синапсов (Fonseca et al., 2004) или подобного ему процесса, что оставит меньше ресурсов для гетеросинаптической пластичности в остальных входах. При использовании только постсинаптических спайков, ресурсов для гетеросинаптической пластичности остается больше, что приводит к большему изменению амплитуды ответов.

Во многих работах, нацеленных именно на изучение гетеросинаптической пластичности, она легко вызывалась как обычной процедурой сочетанной стимуляции (Arami et al., 2013), так и только постсинаптическими протоколами.

Долговременная гетеросинаптическая пластичность может быть вызвана внутриклеточной тетанизацией — сериями спайков, вызываемых короткими деполяризирующими импульсами, подаваемыми через регистрирующий электрод (Han and Heinemann, 2013; Chistiakova et al., 2015; Field et al., 2020). Эта модель была предложена Л.Л. Ворониным (Volgushev et al., 1994). Возникновение гетеросинаптической пластичности при использовании такого протокола объясняется следующим. Каждый нейрон в неокортексе получает тысячи синаптических входов. Повторяющаяся активация некоторой их группы, от нескольких дюжин до сотен, может приводить к повторяющемуся разряду клетки

и, при определенных обстоятельствах, вызывать синаптическую пластичность. Во время индукции все синапсы, кроме этой активированной группы, будут испытывать постсинаптическую активность без активации соответствующих пресинаптических волокон. Эта ситуация (постсинаптическая активность без пресинаптической активации) имитируется внутриклеточной тетанизацией. Так как во время нее не стимулируется никаких синаптических входов, все возникающие явления пластичности можно считать гетеросинаптическими.

Амплитуды синаптических ответов могут увеличиваться, уменьшаться или оставаться неизменными после тетанизации. Было обнаружено, что индукция ДД или ДП коррелирует с начальным КПС. При тестировании синапса используются два последовательных импульса одинаковой силы. Отношением парной стимуляции называется отношение амплитуды второго ВПСП к первому. Различия в их амплитудах связаны с разной вероятностью выброса медиатора в зависимости от «силы» синапса — его предрасположенности к депрессии либо потенциации (Lee et al., 2012). Синаптические входы с высоким изначальным отношением парной стимуляции и, таким образом, низкой вероятностью выброса медиатора, как правило, проявляли гетеросинаптическую потенциацию. Во входы с низким начальным КПС и высокой вероятностью выброса медиатора, как правило, индуцировалась депрессия или не возникало изменения амплитуды ответов. Предполагается, что связь пластичности и КПС отражает основанную на предыдущей истории синапса предрасположенность к потенциации или депрессии. Так, например, более слабые синаптические входы, вероятно подвергшиеся депрессии в прошлом, имеют более высокую предрасположенность к потенциации. Такую же зависимость от начальной силы синапса (хотя оценивалась она по-другому) проявляла гетеросинаптическая пластичность в неактивных при сочетанной стимуляции синапсах, тестируемых после сочетанной стимуляции (Field et al., 2020).

Близкий способ индукции гетеросинаптической пластичности использовался в статье (Hanes et al., 2020). При использовании в качестве стимуляции только постсинаптических деполяризующих импульсов возникала

ДП спонтанных постинаптических токов (СПСТ) в простимулированном нейроне, которой не наблюдалось при индукции классической пластичности. То есть пластичность, вызванная таким образом, характерна для всей клетки в целом, а не для отдельных синапсов. Более того, эта пластичность имела постсинаптический характер и была связана в том числе с увеличением минимального отдельного ответа в синапсе. Показателем такого ответа являются микроСПСТ (спонтанные постсинаптические токи). При блокаде с помощью тетродотоксина потенциалов действия, что исключало из пула СПСТ те, что вызывались спонтанной активностью афферентных волокон, обнаруживалось долговременное увеличение амплитуды микроСПСТ. Эта потенция имела большие значения для входов, находящихся ближе к соме нейрона (проксимальных входов, расстояние измерялось по скорости нарастания СПСТ), что так же согласуется с нашими данными. Следует отметить, что в этих экспериментах была зарегистрирована только гетеросинаптическая потенция. Не ясно, связано ли это с несколько отличающимся методом индукции пластичности или с тем, что авторы использовали пластичность спонтанных, а не вызванных постсинаптических токов.

Гетеросинаптическая пластичность так же возникает при индукции пластичности тормозных входов. Прежде всего следует отметить работы группы Баччи из Италии, занимающейся изучением механизмов гетеросинаптической пластичности тормозных (ГАМКергических) входов. В одной из своих работ (Lourenço et al., 2014) они показали, что сходная с нашей тетанизация коркового нейрона вызывает потенцию перисоматических (т.е. проксимальных) тормозных синаптических входов, оставляя без изменения дистальные входы. Такая потенция требовала увеличения концентрации ионов Са в постсинаптическом нейроне (через кальциевые каналы L-типа), запуская ретроградный сигналинг оксидом азота (NO), который приводил к увеличению выделения ГАМК. Гетеросинаптическая пластичность тормозных входов была зарегистрирована и в таламусе. Она вызывалась стимуляцией, похожей на используемую нами внутриклеточную тетанизацию, и имела сходный механизм с

пластичностью, описанной группой Бачи (Sieber et al., 2013). Подобная стимуляция вызывает гетеросинаптическую пластичность ингибиторных входов и в клетках CA1 гиппокампа, однако, основным механизмом для них считается выделение эндоканабиноидов (Younts et al., 2013).

Гетеросинаптическая пластичность может играть несколько важных ролей в обучающихся системах, основанных на пластичных синапсах.

Во-первых, стабилизирующую, эффективно противодействуя положительной обратной связи, привносимой Хеббовскими правилами обучения, и таким образом предотвращая стремление системы к экстремумам распределения синаптических весов и активности нейронов. Эта стабилизация делает множество вариантов правил обучения и паттернов активности нейронов совместимыми с нормальной работой обучающихся сетей. Другое следствие состоит в том, что зависящая от синаптических весов гетеросинаптическая пластичность предотвращает любую избыточную активность в системе. Так как только часть синаптических входов клетки необходима для того, чтобы вызвать генерацию спайков, только эта часть будет подвержена позитивной обратной связи по Хеббовскому правилу. Все остальные синапсы, составляющие большинство входов клетки, будут подвержены стабилизирующим эффектам гетеросинаптической пластичности. Наконец, предотвращая насыщение синаптических весов, гетеросинаптическая пластичность поддерживает синапсы в пределах их нормального функционирования, что делает их доступными для дальнейших изменений. Она поддерживает всю систему в состоянии, при котором возможно дальнейшее обучение.

Во-вторых, гетеросинаптическая пластичность может поддерживать и облегчать синаптическую конкуренцию, привнося дополнительную силу, направляющую синаптические веса к равновесию. Вес синапса определяется балансом между гомосинаптической пластичностью, направляющей его к экстремуму, и гетеросинаптической, направляющей его к некому равновесному состоянию. Если гомосинаптическая пластичность не возникает, например, при отсутствии пресинаптической активации, его вес приближается к равновесному

состоянию гетеросинаптической пластичности. В результате возникает более жесткая сегрегация весов конкурирующих синапсов. Этот механизм может лежать в основе уточнения уже выученных паттернов, уменьшая вес ошибочно-потенцированных синапсов, а также может вносить вклад в переобучение.

Так при отсутствии рецептора аденозина типа A1 у мышей изменялась гетеросинаптическая пластичность и ухудшалась способность к обучению сложным задачам. Гетеросинаптическая пластичность пирамидных нейронов зрительной коры у таких мышей была представлена в основном ДД. Доля входов, в которых в результате внутриклеточной тетанизации индуцировалась депрессия, оказывалась значительно больше, чем при такой же стимуляции клеток мышей дикого типа. Мыши, не имевшие рецепторов A1, обучались простому заданию, основанному на зрительном восприятии (получение пищи в ответ на прикосновение к геометрической фигуре на экране), так же успешно, как и мыши дикого типа. Однако, при переучивании, в задании более сложного типа, связанном с необходимостью различать подкрепляемый и не подкрепляемый стимулы, они оказывались менее успешны. Их обучение в основном было связано с уменьшением количества неправильных реакций. Хотя среднее количество правильных ответов и увеличивалось во второй половине периода обучения по сравнению с первой, оно не достигало значений, характерных для мышей дикого типа (Chasse et al., 2021). Аденозин является одним из модуляторов гетеросинаптической пластичности. Его влияние связано с зависимостью параметров гетеросинаптической пластичности от состояния синапса и обеспечением ее гомеостатической функции (Bannon et al., 2017).

Необходимость гетеросинаптической пластичности для переобучения подтверждается модельными исследованиями. В модели нейрона гомосинаптическая пластичность в синапсах подчинялась правилам ПЗВС, а гетеросинаптическая — зависела от веса синапса и подчинялась правилам описанным выше. Оказывалось, что в такой модели оба типа пластичности были связаны с начальным весом синапса, и ни один из синапсов не достигал возможного максимума или минимума активности в процессе стимуляции. Эта

модель была способна выделять наиболее часто и длительно предъявляемый стимул. Веса синапсов, через которые он предъявлялся, оказывались выше, чем веса синапсов, получавших более слабую стимуляцию. При изменении силы и частоты стимуляции веса синапсов в такой модели нейрона могли прераспределяться. При этом в модели, подчиняющейся только правилам ПЗВС, активность синапсов достигала максимума через некоторое время после начала стимуляции и не могла измениться при изменении паттерна стимуляции. В модели нейрональной сети гетеросинаптическая пластичность обеспечивала изменение синаптических весов при изменении паттернов активности (Volgushev et al., 2016).

1.2.1 Клеточные и молекулярные механизмы гетеросинаптической пластичности.

Основным механизмом, обеспечивающим возникновение гетеросинаптической пластичности, является подъем внутриклеточной концентрации кальция и кальций-зависимое высвобождение кальция из внутриклеточных резервуаров.

Сам по себе подъем внутриклеточной концентрации кальция оказался достаточен для того, чтобы вызывать пластичность (Yang et al., 1999). Индукция долговременной гетеросинаптической пластичности с помощью внутриклеточной тетанизации, а также другими способами, оказывалась нарушена или полностью заблокирована при связывании внутриклеточного кальция с помощью ЭГТА (Lee et al., 2012; Han and Heinemann, 2013; Chen et al., 2013). Увеличение концентрации ионов кальция возникает в результате обратного распространения потенциалов действия, которые активируют потенциалзависимые кальциевые каналы. Далее этот кальциевый сигнал усиливается путем высвобождения кальция из внутренних источников (Lee et al., 2016). Это было напрямую подтверждено с помощью измерения кальциевого ответа (двухфотонный кальциевый имиджинг) в дендритах пирамидных клеток 5 слоя коры во время

спайков при сочетанной стимуляции. Как сочетание пре-, затем постсинаптического спайка, так и обратное сочетание приводило к широкому распространению кальциевых токов, вызванных обратным распространением потенциала действия. Такие же данные получены для миндаины (Royer and Paré, 2003) и гиппокампа (Gross, 2000). Опустошение внутриклеточных резервов кальция с помощью внутриклеточной перфузии тапсигаргином уменьшало этот сигнал. Также введение тапсигаргина или рутениевого красного (блокирующего высвобождение кальция из внутренних резервуаров) препятствовало возникновению гетеросинаптических изменений в клетках, оставляя при этом гомосинаптическую пластичность не измененной (Field et al., 2020). При описывавшейся выше индукции гетеросинаптической пластичности в гиппокампе с помощью постсинаптической деполяризации (Hanes et al., 2020) блокатор потенциалзависимых кальциевых каналов медленного (L) типа (нифедипин) достоверно уменьшал амплитуду гетеросинаптической потенциации, однако, не ингибировал ее полностью.

Так как повышение концентрации кальция зависит от обратного распространения спайка, оно может происходить во всей клетке, включая дендриты, на которых нет недавно активированных синапсов. Профиль такого подъема концентрации ионов кальция в неактивных дендритах будет определяться их способностью поддерживать обратное прохождение спайка, а также количеством и частотой потенциалов действия (Hiratani and Fukai, 2017). Возникающий профиль концентрации ионов кальция может способствовать индукции гетеросинаптической потенциации в местах большего подъема концентрации и гетеросинаптической депрессии в местах меньшего подъема. Однако итоговое определение знака вызываемой гетеросинаптической пластичности будет в большой мере зависеть от изначальной предрасположенности синапсов к пластичности.

Сильная локальная активация синаптических входов вызывает подъем внутриклеточной концентрации ионов кальция, который не ограничивается активированными синапсами и способен вызывать локальные

гетеросинаптические изменения в ближайшем окружении. Профиль изменения концентрации кальция вокруг места активации объясняет профиль распространения гетеросинаптической депрессии и потенциации по типу «мексиканской шляпы» (Royer and Paré, 2003).

Вероятно, гетеросинаптическая пластичность имеет общие механизмы с NMDAR-зависимой гомосинаптической пластичностью. При ингибировании Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMK2), фермента, необходимого для проявления NMDAR-зависимой пластичности, гетеросинаптическая пластичность, вызванная постсинаптической деполяризацией (Field et al., 2020), частично блокировалась. Авторы связывают неполную блокировку либо с неполным ингибированием CaMK2, либо с участием других кальций-активируемых ферментов. При индукции NMDAR-зависимой пластичности в том же нейроне получить гетеросинаптическую пластичность по этому протоколу не удавалось. В другой работе (Chistiakova et al., 1999) блокатор NMDAR приводил к ингибированию гетеросинаптической депрессии, вызванной внутриклеточной тетанизацией, но не влиял на гетеросинаптическую потенциацию. Предполагаемый механизм такого влияния — связывающийся с NMDAR остаточный глутамат, находящийся в срезе. При внутриклеточной тетанизации клетка деполяризуется и поступление ионов кальция через NMDAR обеспечивает уровень кальция, необходимый для активации механизмов долговременной депрессии. Небольшое количество доступного глутамата и, соответственно, небольшое количество NMDAR, активирующихся в описанном механизме, недостаточно для проявления NMDAR-зависимой ДП. Большая предрасположенность к гетеросинаптической депрессии входов с более низким начальным КПС хорошо укладывается в предложенную схему. Низкий начальный КПС указывает на более высокую вероятность выброса медиатора в синапсе, которая, в свою очередь, увеличивает вероятность спонтанного выброса и наличия фонового глутамата в этом синапсе.

Гетеросинаптическая пластичность, в том числе вызываемая внутриклеточной тетанизацией, включает пресинаптический компонент, а именно

ретроградную сигнализацию (Volgushev et al., 2000; Lee et al., 2012; Smith et al., 2020). Один из ретроградных мессенджеров, участвующих в индукции и регуляции гетеросинаптической пластичности — оксид азота (NO). Он участвует в обеспечении гетеросинаптической пластичности как возбуждательных, так и тормозных входов (Nugent et al., 2007; Lange et al., 2012). Так, гетеросинаптическая пластичность тормозных синапсов между основными клетками и интернейронами в миндалине полностью исчезала как при использовании блокатора NO-синтазы L-NAME, так и при использовании сквенджера NO. Однако она частично восстанавливалась при добавлении после L-NAME донора оксида азота NOC18 (Lange et al., 2012). Применение ингибиторов NO-синтазы и сквенджеров NO приводило к тому, что вызванная с помощью внутриклеточной тетанизации гетеросинаптическая пластичность переставала зависеть от изначального отношения парной стимуляции. Тем не менее, пресинаптический компонент гетросинаптической пластичности сохранялся (Volgushev et al., 2000). Это позволяет предположить, что NO не единственный ретроградный мессенджер, участвующий в гетеросинаптической пластичности.

Активация метаботропных рецепторов глутамата может приводить к синтезу и высвобождению эндоканнабиноидов, взаимодействие которых с рецепторами типа CB1 является одним из пресинаптических механизмов индукции депрессии в тормозных синапсах. Распространение ретроградного сигнала и его действие на неактивные синапсы может быть связано как со спilloвером глутамата, действующего на локальные рецепторы, так и с диффузией эндоканнабиноидов, образовавшихся в активных синапсах (Chistiakova et al., 2014). Некоторые формы гетеросинаптической депрессии, по крайней мере начальная ее стадия, вероятно связана с эндоканнабиноидами, выделяемыми астроцитами (Smith et al., 2020).

На гетеросинаптическую пластичность влияет выделение таких веществ, как АТФ и аденозин, как нейронами, так и астроцитами (Chen et al., 2013). Вероятно, астроциты довольно сильно влияют на пластичность в целом и на

гетеросинаптическую депрессию в частности, хотя конкретные механизмы не всегда известны (Oliveira et al., 2015). Аденозин же является широко распространенным нейромодулятором, концентрация которого в физиологических условиях увеличивается при бодрствовании и уменьшается при последующем сне. В неокортексе наиболее распространенный рецептор аденозина — G-белок-связанный A1 рецептор (A1). Его активация подавляет синаптическую передачу, уменьшая пресинаптическую вероятность выброса медиатора и гиперполяризуя нейрон (Zhang et al., 2015). Таким образом, зависящее от активности увеличение внеклеточной концентрации аденозина обеспечивает отрицательную обратную связь для синаптической передачи и нейронной активности. Воздействие блокады рецептора аденозина на гетеросинаптическую пластичность оказалось достаточно выраженным. При блокаде A1 DPCPX исчезала зависимость выраженности и направленности гетеросинаптической пластичности от КПС. Это значит, что гетеросинаптическая пластичность при блокаде рецептора аденозина переставала зависеть от «весов» синапсов. Напротив, при добавлении аденозина эта зависимость усиливалась. Эффект наблюдался как для несочетанных входов в модели ПЗВС, так и для внутриклеточной тетанизации. (Vannon et al., 2017).

Таким образом, гетеросинаптическая пластичность обеспечивается и регулируется многими механизмами, большая часть которых пересекается с механизмами гомосинаптической пластичности.

1.3. Нейрогенез во взрослом возрасте и гетеросинаптическая пластичность

Исследования нейрогенеза во взрослом возрасте начались с работ Альтмана (Altman and Das, 1965) и подтверждения существования этого процесса в 1997 – 1999 гг. (Bonfanti, 2016). Тогда научное сообщество было убеждено, что интеграция новых нейронов во взрослый мозг — реально существующий процесс, приводящий к анатомическим и функциональным изменениям (Gross, 2000). Тогда же были обнаружены места локализации стволовых клеток двух

основных ниш нейрогенеза (субвентрикулярной зоны и зубчатой извилины гиппокампа), начала изучаться их структура и механизмы регуляции. Также было показано, что нейрогенез может активироваться в результате травм и болезней (травма-индуцированный, реактивный нейрогенез) либо путем задействования клеток нейрогенных областей. Несмотря на то, что большое количество нейробластов может возникнуть в ответ на инсульт или воспаление, механизм этого ответа, а также дальнейшая судьба этих новообразованных клеток, остается в большой степени неизвестна. Вероятно, такие клетки не могут полноценно встраиваться в существующие нейронные сети, и нейрогенез во взрослом возрасте утратил у млекопитающих репаративные функции (Lindvall and Kokaia, 2015).

Развитие образованных во взрослом возрасте нейронов из стволовых клеток проходит в несколько стадий, включающих пролиферацию, дифференциацию, миграцию, потерю клеток из-за запрограммированной смерти и, наконец, интеграцию в существующие нейронные сети. Стволовые клетки зубчатой извилины находятся в субгранулярной зоне. Образующиеся в результате их деления и последующего созревания клетки мигрируют локально — в гранулярный слой. Основной класс стволовых клеток составляют клетки, подобные радиальной глии (РГ), также называемые РГ-подобные клетки типа 1. Их сома расположена в субгранулярной зоне, а отросток проходит через гранулярный слой и разветвляется во внутреннем молекулярном слое (Abbott and Nigussie, 2020). РГ-подобные клетки типа 1 экспрессируют глиальный кислый фибриллярный протеин (GFAP), нестин (Nestin) и другие специфичные сигнальные молекулы, такие как костные морфогенетические белки (BMP), Notch, Hes5, FoxO и другие. Эти клетки делятся несимметрично, в результате чего образуется клетка, дающая начало астроциту, и промежуточная прогениторная клетка. Промежуточные прогениторные клетки также называют клетками второго типа. Изначально они имеют характеристики, близкие к свойствам клеток глии (клетке типа 2a), затем начинают экспрессировать больше нейрональных факторов (клетки 2b типа) (Jin, 2016). Клетки первого и второго типов живут около двух недель (по данным для мышей). Делятся только клетки типа 2a. Все

клетки второго типа получают ГАМКергические входы от интернейронов. Эти ранние нейроны не способны на синаптический ответ (хотя ГАМК является для них возбуждающим, а не тормозным медиатором), однако, под воздействием ГАМК происходит клеточное деление клеток 2а типа, дифференциация клеток 2б типа, их выживание и дальнейшее созревание. Также на пролиферацию прогениторных клеток влияют дофамин и серотонин (Encinas and Enikolopov, 2008).

Клетки 2б типа не делятся, они начинают экспрессировать факторы, ассоциирующиеся с их дальнейшим созреванием. Одним из характерных маркеров этих клеток является даблкортин (DCX) — ассоциированный с микротрубочками белок, который связан с нейрональной дифференциацией и миграцией. После окончания фазы раннего выживания клетки 2б начинают проходить дальнейшую дифференциацию и становятся нейробластами, клетками третьего типа. Экспрессия генов, морфология и электрофизиология таких клеток изменяется для того, чтобы превратить их в функциональные гранулярные клетки. Ориентация их изменяется, чтобы, в конце концов, стать вертикальной, с дендритами, которые отходят от верха сомы в молекулярный слой, и аксонами, отходящими от основания сомы в зону СА3 пирамидного слоя (Abbott and Nigussie, 2020).

Первыми на молодых гранулярных клетках, как после рождения, так и образованных во взрослом возрасте (Yu et al., 2006), возникают ГАМКергические синапсы. На начальных этапах развития ГАМКергическая передача осуществляется через ГАМК_A рецепторы (Ben-Ari et al., 1989). Они состоят из пяти субъединиц, образующих ионный канал, проницаемый для хлорид-ионов и, в меньшей степени, для бикарбонат-анионов. В состав канала входят две α , две β , и одна γ или δ субъединицы, каждый из этих типов субъединиц имеет несколько подтипов. От состава субъединиц, входящих в конкретный рецептор, зависят его функциональные свойства, такие как кинетическая характеристика канала, и воздействие различных модуляторов активности (Ben-Ari et al., 2007).

Для развивающихся клеток, в том числе образованных во взрослом возрасте, характерна высокая внутренняя концентрация ионов Cl^- , в результате чего ГАМКергические синапсы в этот период оказываются возбуждающими. В процессе развития внутриклеточная концентрация Cl^- снижается, и происходит переход от возбуждательного к тормозному действию ГАМК. По мере созревания клеток происходят изменения в кинетике токов, обеспечиваемых ГАМК-рецепторами. Изменения частоты, амплитуды и скорости нарастания миниатюрных тормозных постсинаптических токов (мТПСТ) показаны для многих регионов мозга (Cohen et al., 2000).

ГАМКергическая передача в гранулярных клетках, образованных во взрослом гиппокампе, проходит стадии развития, сходные с наблюдавшимися в постнатальном развитии как в зубчатой фации, так и в других регионах мозга (Karten et al., 2006). Спонтанные ТПСТ, наблюдавшиеся в незрелых ГК, образовавшихся во взрослом возрасте, имели меньшую частоту и более медленную скорость исчезновения. Это связано с разным субъединичным составом ГАМК-рецепторов в зрелых и незрелых клетках (Karten et al., 2006).

В культуре нейронов гиппокампа в только что образованных синапсах в состав ГАМК-рецепторов входила преимущественно $\alpha 2$ субъединица, тогда как по мере созревания увеличивалось количество рецепторов, содержащих $\alpha 5$ субъединицу (Swanwick et al., 2006). Это, вероятно, влияет на скорость угасания ТПСТ, так как показано, что $\alpha 5$ субъединица является определяющей для кинетики токов через ГАМК (Serafini et al., 1998). На более поздних стадиях развития клеток увеличивалось количество рецепторов, содержащих $\alpha 1$ субъединицу, которая так же влияет на кинетику канала (Swanwick et al., 2006). В постнатальном развитии ГК зубчатой фации содержание $\alpha 1$ так же повышалось (Ben-Ari et al., 2007).

В незрелых гранулярных клетках, образованных во взрослом возрасте, ускорение исчезновения в ТПСТ при созревании так же связано с изменением субъединичного состава ГАМК и увеличением $\alpha 1$ содержащих рецепторов у взрослых клеток (Karten et al., 2006).

Возбудительные синапсы вначале появляются на сформировавшихся дендритных шипиках, которые будут увеличиваться в числе и сложности в течении месяцев (Abbott and Nigussie, 2020). Для более зрелых клеток такого типа характерны такие маркеры, как проопиомеланокортин (POMC) и глутаматдекарбоксилаза (GAD67), которые позволяют выявлять такие клетки при окраске или у трансгенных линий мышей (Enikolopov et al., 2015). Близкие к созреванию гранулярные клетки (ГК) не отличаются по набору экспрессируемых молекул от зрелых, хотя имеют особые электрофизиологические характеристики. Молодые нейроны имеют большее, чем зрелые, входное сопротивление (более 1 ГОм). Подача тока небольшой силы легко вызывает в незрелых ГК ПД, тогда как для его получения у зрелых клеток необходима большая сила тока. Интересно, что незрелые нейроны возрастом 24 – 29 дней разряжаются более активно, чем более молодые или более зрелые нейроны. (Schmidt-Hieber et al., 2004).

При регистрации ГК зубчатой фасции можно выделить два подтипа клеток. Один из них имеет входное сопротивление (BC) порядка 150 – 300 МОм, в таких клетках не обнаруживается полисиалирированная молекула адгезии нервных клеток. Клетки другого типа имеют BC более 1 ГОм, экспрессируют полисиалирированную молекулу адгезии нервных клеток и имеют неразвитое дендритное дерево. Эти клетки находятся исключительно во внутренней части гранулярного слоя и являются незрелыми нейронами, образовавшимися во взрослом возрасте. В отличие от зрелых гранулярных клеток, производящих серии потенциалов действия в ответ на длительную подачу входящего деполяризующего тока, незрелые клетки разряжаются один или два раза. Однако они имеют существенно более низкий порог генерации спайка, чем зрелые клетки. Незрелые гранулярные клетки имеют гораздо более низкую мембранную константу времени. В сумме свойства их мембраны способствуют генерации спайка при открытии около 10 каналов глутаматных рецепторов. Незрелые гранулярные клетки способны продуцировать низкопороговые кальциевые спайки при физиологических условиях, в этом участвуют кальциевые каналы Т-типа. Они имеют уникальный

паттерн возбудимости — при увеличении интенсивности стимуляции кальциевые каналы Т-типа сначала генерируют медленные кальциевые спайки, а затем упрощают генерацию быстрых натриевых потенциалов действия (Schmidt-Hieber et al., 2004).

При стимуляции медиального перфорантного тракта оказалось, что даже слабая стимуляция вызывала ответ в незрелых ГК. Стимуляция, вызывавшая ПД в 5% зрелых ГК, при этом активировала 30% незрелых. При стимуляции медиального перфорантного тракта сериями импульсов с частотой 10 Гц, незрелые ГК генерировали несколько ПД в течение стимуляции, тогда как зрелые выдавали только один спайк. Небольшое число терминалей перфорантного тракта оказывалось достаточно для активации незрелых ГК, что говорит о том, что эта популяция ГК может отвечать на большинство стимулов, действуя как интеграторы приходящей информации. Тогда как зрелые ГК, с более высоким порогом активации, для которой нужны определенные входы, могут использоваться для разделения информации. Такая разница достигается за счет различия в балансе возбуждения/торможения для зрелых и незрелых ГК, сдвинутом в сторону возбуждения для незрелых (Marín-Burgin et al., 2012).

Таким образом, основной ролью нейронов, образованных во взрослом возрасте является участие в процессах пластичности нейрональных сетей и, в конечном итоге, в некоторых формах обучения и памяти (Bonfanti, 2016).

Окончательно специфическая роль появляющихся во взрослом возрасте нейронов не определена, однако за последние годы их место в трехсинаптической системе гиппокампа и в процессах пластичности и памяти в целом стало более понятно (Inokuchi, 2011).

Окно повышенной синаптической пластичности и внутренней возбудимости, наблюдающееся во время созревания образованных во взрослом возрасте гранулярных клеток (Mongiat et al., 2009), послужило мотивацией к изучению, для каких именно физиологических процессов нужны такие характеристики клетки.

Одной из возможных функций таких клеток считается разделение контекстов. Нарушение нейрогенеза с помощью облучения приводило к ухудшению способности различать сходные условия (условия с высокой интерференцией памяти) (Clelland et al., 2009). Также оптогенетическое «выключение» клеток возрастом 5 – 10 недель (но не 14 – 18 недель) приводило к ухудшению выполнения заданий только в условиях высокой интерференции памяти (Zhuo et al., 2016). При использовании в качестве модели обучения модель страха, связанного с обстановкой, разные способы нарушения нейрогенеза или выключения образованных во взрослом возрасте гранулярных клеток также приводили к ухудшению в различении связанного с ударом током и похожего нейтрального контекстов. Генетическое улучшение выживаемости и интеграции новых гранулярных клеток приводили к улучшению различения сходных контекстов, но не сильно различающихся контекстов. Все эти эффекты возникали при воздействии на клетки возрастом от 4 до 8 недель у мышей (Miller and Sahay, 2019). У крыс этот период, вероятно, отличается. Новые нейроны у взрослых крыс имеют зрелый профиль нейрональных маркеров к 4 неделям, что на 1 – 2 недели раньше, чем у мышей (Snyder et al., 2009; Inokuchi, 2011).

Образованные во взрослом возрасте клетки связывают с поддержанием и воспроизведением долговременной памяти и отдаленных воспоминаний. Оптогенетическое выключение и генетическое удаление гранулярных клеток возрастом 4 – 7 недель после обучения приводило к дефицитам в контекстуальной (боязнь обстановки (Pan et al., 2012)), визуальной и пространственной памяти (Arruda-Carvalho et al., 2011; Burghardt et al., 2012; McAvoy et al., 2016). Увеличение выживаемости этих клеток приводило к улучшению выполнения заданий, связанных с перечисленными выше видами памяти.

Образованные во взрослом возрасте гранулярные клетки, так же как и существующие с рождения, могут регулировать интерференцию памяти в САЗ, обеспечивая консолидацию в гиппокампально-кортикальных сетях и точность отдаленной памяти. Их связь с процессом консолидации также подтверждается многими экспериментами (Epp et al., 2016; Gao et al., 2018; Miller and Sahay, 2019).

Вероятно, гиппокампальный нейрогенез обеспечивает появление зрелых клеток, образовавшихся во взрослом возрасте, которые репрезентируют ранее закодированный опыт. Их комбинации включаются в энграммы новой памяти, которые работают как индексы, обеспечивающие надежное воспроизведение воспоминаний (Teyler and DiScenna, 1986; Miller and Sahay, 2019).

Как уже говорилось, в поздних стадиях своего созревания незрелые гранулярные клетки зубчатой фасции имеют особые электрофизиологические параметры, включающие повышенную внутреннюю возбудимость, сниженный уровень ГАМКергического ингибирования, и, как результат, предрасположенность к зависящей от активности синаптической пластичности (Dieni et al., 2013). Для этих клеток также характерен сдвиг возбuditельно/тормозного баланса в сторону возбуждения, не только из-за их собственных параметров, но также из-за меньшего ингибирования со стороны ГАМКергических интернейронов (Marín-Burgin et al., 2012).

В целом, известно, что ГАМК-ингибирование в нейрональных сетях связано с возбуждением, как во времени, так и по силе. Равновесие между возбуждением и торможением необходимо для правильного развития рецептивных полей сенсорных систем (Err et al., 2016), настройке сетевой нейрональной активности в коре (Lourenço et al., 2014), гиппокампе (Gloveli, 2010; Espinoza et al., 2018), таламусе (Sieber et al., 2013) — практически во всех отделах мозга. Было показано, что несколько разных динамических клеточных механизмов отвечают за компенсацию изменений синаптической возбудимости, обеспечивая сохранение баланса возбуждения и торможения. Например, за счет увеличения возбудимости тормозных интернейронов или уменьшения прямого ингибирования (Marín-Burgin et al., 2012). Предполагается, что изменения этого баланса могут приводить к проявлению неврологических заболеваний, например, некоторые формы эпилепсии оказываются связанными с уменьшением количества ГАМК-рецепторов и ГАМК в гиппокампе (Chandler et al., 2003; Tosetti et al., 2005). Однако для процесса обучения или для реорганизации рецептивных полей этот баланс необходимо изменять. Так, активация пирамид пятого слоя

коры больших полушарий приводит к гетеросинаптической ДП перисоматических ГАМКергических синапсов (образованных парвальбуминовыми корзинчатыми интернейронами). Что в свою очередь приводит к снижению отношения возбуждение/торможение, уменьшает вероятность генерации разряда нейроном и увеличивает точность времени разряда пирамидной клетки (Lourenço et al., 2014). Интернейроны гиппокампа должны играть существенную роль в формировании паттернов активности сети (Wilent and Nitz, 2007; Gloveli, 2010; Espinoza et al., 2018), а также в существенной мере обеспечивать «разреженность» ее ответов (Marín-Burgin et al., 2012). Гетеросинаптическая пластичность регистрируется в гиппокампе с помощью нескольких разных протоколов (Kato et al., 2009). Структурная гомо- и гетеросинаптическая пластичность в ответ на высокочастотную стимуляцию перфорантного пути характерна для образовавшихся во взрослом возрасте созревающих ГК (Jungenitz et al., 2018).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты и методики исследования

Все экспериментальные процедуры, использованные в этом исследовании, проводились в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС для экспериментов на животных и одобрены этическим комитетом Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

2.1.1. Объекты исследования

Работа выполнена на пирамидных нейронах переживающих срезов зрительной коры головного мозга крыс линии Вистар (Wistar) в возрасте 21 – 30 дней и пирамидных нейронах зубчатой фасции переживающих срезов гиппокампа крыс линии Лонг-Эванс (Long-Evans) в возрасте 5 – 9 недель.

В работе были использованы как немодифицированные крысы линии Вистар (Wistar), так и крысы линии Вистар (Wistar), нейроны которых были трансфицированы методом *in-utero* электропорации, описанным далее. Крысы использовались как более удобные для проведения *in-utero* электропорации животные.

Крысы линии Лонг-Эванс (Long-Evans) были выбраны для экспериментов с образованными во взрослом возрасте нейронами, так как уровень нейрогенеза во взрослом возрасте у окрашенных крыс (таких как Лонг-Эванс, Норвей Браун и других) значительно выше такового у белых (альбиносных) линий крыс и не отличается от уровня нейрогенеза во взрослом возрасте у диких крыс (Pannasch et al., 2012).

2.1.2. *In utero* электропорация

Операцию по введению плазмиды в мозг эмбрионов (*in utero* электропорация) проводили на беременных самках крыс линии Вистар на 17 – 19 день эмбрионального развития плода. Операция проводилась по методике, изначально описанной в статье (Tabata and Nakajima, 2001). Ее преимуществом перед использованием вирусных векторов является относительная простота и самой операции, и получения необходимого генного материала. Также она позволяет заражать небольшую область коры и конкретный ее слой (это зависит от дня эмбрионального развития, на котором вводится плазида — чем позднее, тем более верхние слои оказываются трансфицированы). В нашем случае необходима была трансфекция 2/3 слоя неокортекса, в соответствии с этим и выбирались сроки операции — 17 – 19 день развития эмбриона (Miyashita et al., 2010).

Операция выполнялась под изофлюрановым наркозом (поток кислорода 1л/мин, концентрация анестетика 1.5%). В процессе операции животное подогревали с помощью грелки (около 37 – 38° С), глаза смазывали офтальмогелем для предотвращения высыхания. При достижении глубокой анестезии (отсутствие реакции на пощипывание хвоста) обеспечивался доступ в брюшную полость по белой линии живота. Каждый из рогов матки последовательно вынимали из брюшной полости, и сквозь ее стенку вводили раствор плазмид каждому эмбриону (за исключением заметно недоразвитых или резорбирующихся).

Раствор смеси плазмид pCAG-ChR2-Venus и pCAG-mCherry (подарок Дж. Лотурко, Университет Коннектикута, США) в суммарной концентрации 1.5 мкг/мкл в стерильном фосфатном буфере вводили в левый латеральный желудочек эмбриона инъекцией давлением через острую стеклянную микропипетку в объеме 1 – 2 мкл. Для визуализации места введения в раствор добавлялся краситель Fast Green (0.1%; Sigma, США).

После введения раствора каждому из эмбрионов в одном роге производилась электропорация, начиная с первого эмбриона, которому была введена плазида. Электропорацию проводили с помощью электропоратора

NEPA21 Type II (Nera Gene, Япония). Плоские платиновые электроды диаметром 3 мм накладывали на голову эмбриона таким образом, чтобы положительный электрод оказался над левым полушарием коры головного мозга. Электрическая стимуляция включала в себя две последовательности импульсов: 3 пульса по 30 мс с интервалом 450 мс (+32 В, ~25 мА) для образования пор в мембране клетки, и 5 пульсов по 50 мс с интервалом 50 мс (+20 В, ~10 мА) для переноса ДНК внутрь клетки.

Затем обработанный рог матки заправлялся обратно в брюшную полость и второй рог обрабатывался аналогично. В течение всей операции пересыхание стенки матки предотвращалось с помощью орошения стерильным подогретым физиологическим раствором.

После электропорации всех эмбрионов рога матки заправлялись обратно в брюшную полость, и разрез мышц брюшной стенки ушивался резорбирующейся нитью. Разрез кожи закрывался с помощью хирургических скоб, которые удаляли через 2 – 3 дня после родов, под тем же наркозом.

Роды обычно происходили на 22 – 23 день развития плодов, то есть через 4 – 5 дней после операции.

2.1.3 Приготовление переживающих срезов головного мозга

Срезы коры головного мозга. Переживающие срезы головного мозга для экспериментов с нейронами неокортекса готовились по описанной ранее методике (Pin et al., 2013). Для приготовления срезов использовались крысы линии Вистар обоего пола, либо крысы линии Вистар полученные в результате *in utero* электропорации в возрасте 21 – 30 дней. Крыс глубоко анестезировали изофлюрановым наркозом (поток кислорода 1 л/мин, концентрация анестетика 5%), затем декапитировали. Череп вскрывался от затылочного отверстия с правой стороны так, чтобы подрезать его далее шва в районе обонятельных луковиц. Отрезанная часть приподнималась, обрезались остатки мозговых оболочек и мозг вынимался так, чтобы не повредить левое полушарие. Затем мозг помещался в

охлажденную во льду и аэрируемую искусственную цереброспинальную жидкость (ИЦСЖ) с добавлением сахарозы. Вся операция от момента декапитации до помещения мозга в искусственную цереброспинальную жидкость занимала не более минуты, время засекалось по секундомеру, и при его превышении мозг в дальнейшем не использовался, из-за слишком большого количества погибших клеток неокортекса.

Затем мозг вынимали в чашку Петри с положенной на дно фильтровальной бумагой и слоем ИЦСЖ, слегка покрывающим мозг, остатки мозжечка и правое полушарие удалялись. Левое полушарие подрезалось спереди так, чтобы образовалась небольшая ровная площадка, после чего клеилось к агаровой подложке на столике вибратора. При этом по возможности оно располагалось таким образом, что париетальная кора оказывалась на плоскости, перпендикулярной лезвию вибратора, для сохранения максимального количества связей между слоями.

Для приготовления срезов толщиной 350 нм использовали вибратор VT1200S, Leica, Германия. Все время приготовления срезов мозг находился в том же аэрируемом охлажденном растворе ИЦСЖ. Полученные срезы инкубировали при температуре 37°C в течении 35 минут, и при комнатной — до часа суммарного времени инкубации перед началом эксперимента. Во время эксперимента срезы хранились в том же растворе при постоянной аэрации и комнатной температуре до 6 часов от момента приготовления.

Срезы мозга крыс, модифицированных с помощью *in utero* электропорации, просматривались с помощью флуоресцентного микроскопа для выбора наиболее сильно трансфицированных для дальнейшей работы.

Срезы гиппокампа. 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). Для приготовления срезов использовались крысы линии Лонг-Эванс (Long-Evans) обоего пола.

Процедура не отличалась от подготовки мозга для приготовления срезов коры, за исключением того, что череп вскрывался по срединному шву, чтобы сохранить оба полушария. Из каждого полушария выделялся гиппокамп. Для этого остатки ствола мозга отодвигались так, чтобы было видно белую полосу с нижнего края гиппокампа (*fimbria hippocampi*), гиппокамп подцеплялся ниже этой полосы и вынимался как можно менее поврежденным. Такие же манипуляции производились и со вторым полушарием.

Оба гиппокампа располагались на агаровой подложке на столике вибротома зубчатой фасцией вниз, обсушивались для сцепления и подклеивались. Получали срезы обоих гиппокампов толщиной 350 нм.

2.1.4. Растворы для приготовления срезов и исследования нейронов методом patch-clamp

Для приготовления и хранения срезов использовалась искусственная цереброспинальная жидкость с добавлением сахарозы (Maher and LoTurco, 2012), состава (в mM): 83 NaCl, 2,5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 26,2 NaHCO₃, 22 D-глюкоза, 72 сахароза, 0,5 CaCl₂, 3,3 MgCl₂.

Для поддержания жизни клеток во время эксперимента использовалась ИЦСЖ другого состава, содержащая (в mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 25 D-глюкоза.

Patch-пипетки заполняли раствором на основе глюконата калия, содержащим (в mM): 130 глюконата калия, 20 KCl, 4 Mg-АТФ, 0,3 Na₂-GTP, 10 натрийфосфокреатинина, 10 Hepes.

2.1.5 Экспериментальная установка для исследования нейронов методом patch-clamp

Patch-пипетки. Patch-пипетки вытягивали из капилляров диаметром 1,5 мм (Sutter Instruments) при помощи программируемого пуллера Sutter Instruments P-

1000 Flaming/brown micropipette puller. Для нейронов неокортекса использовали пипетки сопротивлением 4 – 6 МΩ (после заполнения внутриклеточным раствором), для нейронов гиппокампа использовались пипетки сопротивлением 6 – 8 МΩ. Patch-пипетки фиксировали в держателях, подсоединенных к дистанционно управляемым манипуляторам с шаговыми двигателями (Luigs&Neumann, Германия). Одна из них, заполненная «внутриклеточным» раствором использовалась для получения конфигурации whole-cell, вторая заполнялась ИЦСЖ и использовалась в качестве стимулирующего внеклеточного электрода.

Электронно-измерительная система. 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.

Электрическая внеклеточная стимуляция производилась с помощью стимулятора, работа которого контролировалась с помощью программного обеспечения pCLAMP (Molecular Devices, США). Стимулирующий электрод устанавливался для каждой клетки отдельно, в зависимости от проводимого эксперимента. При работе с трансфицированными срезами стимулирующий электрод не использовался.

Для оптической стимуляции применялся специализированный фотостимулятор Polygon400 (Mightex, США), представляющий собой управляемую матрицу микрозеркал (DMD-матрица) и оснащенный светодиодом с выходной мощностью 400 мВт и длиной волны излучения 470 нм. Фотостимулятор был установлен на эпифлуоресцентном порту микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Япония). Для световой стимуляции использовался водноиммерсионный объектив 20x Olympus с числовой апертурой 0.8. Область

оптической стимуляции при использовании объектива 20X представляла собой прямоугольник размером 695 на 390 мкм.

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, управляемой программой MicroManager, которая позволяет дополнительно контрастировать изображение для выбора оптимальных для каждой задачи клеток. Нейроны 2/3 слоя, экспрессирующие каналородопсин-2-Venus, выбирались под визуальным контролем с использованием флуоресценции в зеленой области спектра и дифференциальной интерференционно-контрастной (ДИК) видеомикроскопии. Остальные нейроны выбирались для регистрации только на основе ДИК видеоизображения.

Система жизнеобеспечения переживающего среза. Система жизнеобеспечения переживающего среза коры мозга (или гиппокампа) состояла из перфузируемой ванночки, в которую помещали срез, емкости с оксигенируемой ИЦСЖ, баллона с карбогеном (95% O₂ и 5%CO₂), протока и системы обогрева. Проток состоял из приводящей и отводящей трубок, позволявших регулировать уровень жидкости в ванночке, перистальтического насоса, обеспечивающего движение жидкости по протоку, и капельницы, подключенной к приводящей трубке, обеспечивающей разрыв потока жидкости, необходимый для предотвращения электрической наводки от протока. Система обогрева состояла из элемента Пельтье, источника тока и радиатора, между пластинками которого пропусклась приводящая трубка протока, что обеспечивало нагревание ИЦСЖ до температуры 30°C. Система жизнеобеспечения работала на основе открытой системы подачи жидкости.

2.2. Протоколы экспериментов

2.2.1 Протокол эксперимента «Гетеросинаптическая пластичность «дальних» и «ближних» входов клетки»

Для выработки гетеросинаптической пластичности «дальних» и «ближних» входов использовался следующий протокол. Выбиралась клетка для регистрации. Клетка выбиралась на основе ДИК-изображения, на оптимально видимой глубине в срезе, в нижней части 2/3 слоя неокортекса. Выбиралась хорошо видимая, не закрытая другими и выглядящая неповрежденной клетка.

В срез мозга, помещенный в описанную выше установку, 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.

Ранее выбранная или одна из ближайших к ней клеток приводилась в конфигурацию whole-cell с помощью пэтч-пипетки. Клетка использовалась в дальнейшем эксперименте, если ее внутриклеточный потенциал оказывался не выше -55 мВ. Запись происходила в режиме фиксации тока (current clamp).

Подбирался тестовый электрический стимул, подаваемый через стимулирующий электрод, так, чтобы амплитуда постсинаптического потенциала (ПСП) в клетке оказывалась на уровне, примерно равном амплитуде моносинаптического ПСП — 1 – 2 мВ. Затем определялось, возбуждающий или тормозный вход стимулируется. Для этого в режиме фиксации потенциала (voltage-clamp) проводилась запись тока, вызванного этим стимулом при нормальном для данной клетки потенциале и при потенциале в -40 мВ. Если ток реверсировался, это указывало на тормозный вход, и далее клетка не записывалась, либо менялось положение стимулирующего электрода.

Затем записывались (в режиме фиксации тока) ВПСП в ответ на подобранный стимул в течение 8 – 10 минут. При этом клетка стимулировалась парой одинаковых стимулов с временным интервалом 50 мс для оценки вклада

пресинаптических механизмов в вызванную пластичность. Время выбиралось так, чтобы записать максимальное возможное количество ответов и провести внутриклеточную тетанизацию не позднее, чем через 15 минут после достижения конфигурации whole-cell. Как было обнаружено ранее (А.Ю. Малышев, М.А. Волгушев, неопубликованные данные), в наших экспериментальных условиях после установления конфигурации whole-cell существует критическое временное окно (порядка 15 мин), в течение которого возможно вызвать пластические изменения путем внутриклеточной тетанизации нейрона. За это время необходимо закончить тестирование начальных ответов синаптического входа и перейти к тетанизации клетки.

После этого производилась внутриклеточная тетанизация. Она состояла из трех сессий тетанизации по 10 серий ПД в каждой с интервалом между сериями 1 с и интервалом между сессиями 1 мин. Серия состояла из 5 ПД, вызванных внутриклеточными импульсами тока длительностью 5 мс и амплитудой 1 нА.

В течение следующих после тетанизации 25 – 45 минут (в зависимости от состояния клетки) записывались ответы клетки на тестовый стимул.

2.2.2. Протокол эксперимента «Оптогенетическая стимуляция пресинаптической сети»

В этом эксперименте использовались срезы мозга крыс, трансфицированных методом *in utero* электропорации, проводившейся на 17 – 18 день внутриутробного развития. В нейронах 2/3 слоя коры этих крыс был экспрессирован светоактивируемый белок каналородопсин-2.

Мы использовали метод оптогенетической стимуляции множества пресинаптических нейронов, синаптические входы которых конвергируют на одну постсинаптическую клетку. В качестве постсинаптического нейрона мы использовали пирамидный нейрон 5 слоя; в качестве пресинаптической сети была выбрана популяция пирамидных нейронов 2/3 слоя коры крысы.

Подбор параметров светового стимула. Для подбора параметров светового стимула была проведена предварительная серия экспериментов. Клетки, экспрессирующие канальный родопсин, стимулировались при помощи системы оптической стимуляции MighteX Polygon 400. Вся область стимуляции была разбита на квадраты для нанесения световых стимулов в матрицах различной размерности. Нами были протестированы различные параметры световой стимуляции. В частности, нами были протестированы матрицы размерностью 10x6, 12x7, 18x10, 20x11 и 30x17. Выбор матрицы для дальнейшей стимуляции производился по нескольким параметрам. Во-первых, это максимально эффективное пространственное разрешение, такое, чтобы максимально возможное количество клеток было простимулировано в ходе эксперимента, при этом, по возможности, одна клетка должна попадать в один квадрат стимулирующей матрицы для уменьшения количества перекрывающихся ответов на стимуляцию у регистрируемой клетки пятого слоя и повышения, таким образом, качества записи. Во-вторых, необходимо было подобрать такую матрицу стимуляции, чтобы протестировать каждый синаптический вход достаточное количество раз для проведения последующего статистического анализа. В результате проведенных пробных экспериментов мы пришли к выводу, что оптимальным является разбиение поля стимуляции на 180 квадратов с использованием матрицы 10x18.

Помимо подбора оптимального размера стимуляционной матрицы было также произведено определение оптимальных временных параметров световых стимулов. Для этого пирамидный нейрон 2/3 слоя, идентифицированный по наличию зеленой флуоресценции как экспрессирующий каналородопсин-2, регистрировался внутриклеточно методом whole-cell, после чего проводилась оптическая стимуляция области вокруг регистрируемого нейрона. Световая стимуляция квадратов 40x40 мкм вызывала выраженные деполяризационные ответы, переходящие в потенциалы действия в перисоматической области нейрона. Подбор длительности стимула производился таким образом, чтобы получить воспроизводимую активацию нейронов при стимуляции квадратов,

покрывающих соматическую область клетки (в пределах 2 – 4 квадратов стимуляции), при этом минимизируя длительность стимула для предотвращения «выгорания» каналородопсина.

Основная серия экспериментов. Визуально, с использованием флуоресценции в красной области, выбиралась область 2/3 слоя неокортекса с максимальным видимым числом трансфицированных нейронов. Затем, двигаясь параллельно внутренним связям коры, выбирали клетку 5 слоя неокортекса на основе ДИК-изображения так, чтобы она лежала приблизительно на той же глубине, что и наибольшее число флуоресцирующих клеток 2/3 слоя, и выглядела неповрежденной.

Выбранная клетка 5 слоя приводилась в конфигурацию whole-cell для регистрации, после чего поле зрения микроскопа осторожно сдвигали к 2/3 слою, который стимулировали световыми стимулами.

Вся область стимуляции была разбита на квадраты размером приблизительно 40x40 мкм, для нанесения световых стимулов в матрице 10x18. В каждый такой квадрат при помощи системы оптической стимуляции MighteX Polygon 400 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. Таким образом, тестирование всех квадратов матрицы 10x18 занимало 45 с. Тестирование до тетанизации продолжалось до достижения 15 мин от конфигурации whole-cell, в среднем около 15 записей от каждого квадрата стимуляции.

После этого производилась внутриклеточная тетанизация. Она состояла из трех сессий тетанизации по 10 серий ПД в каждой с интервалом между сериями 1 с и интервалом между сессиями 1 мин. Серия состояла из 5 ПД, вызванных внутриклеточными импульсами тока длительностью 5 мс и амплитудой 1 нА (протокол тот же, что и в предыдущем эксперименте).

После тетанизации тестирование продолжалось 25 – 45 мин в зависимости от состояния клетки.

2.2.3. Протокол эксперимента «Гетеросинаптическая пластичность образованных во взрослом возрасте (незрелых) и зрелых гранулярных клеток зубчатой фасции»

Эксперимент проводился на переживающих срезах гиппокампа. Незрелые гранулярные клетки выбирались визуально, на основе их месторасположения (нижняя часть гранулярного слоя) и формы. Такие клетки чаще всего мельче зрелых, слегка изогнуты, и часть их находится вне слоя. Выбор проводился по информации из статьи (Schmidt-Hieber et al., 2004). Зрелые гранулярные клетки выбирались также в нижней части гранулярного слоя.

Стимулирующий электрод устанавливался близ верхней границы гранулярного слоя для зрелых клеток. Для незрелых клеток стимулирующий электрод так же изначально устанавливался на верхней границе гранулярного слоя, а затем, после получения конфигурации whole-cell с незрелой клеткой, осторожно подвигался ближе, до получения стабильных ответов.

После получения конфигурации whole-cell с гранулярной клеткой записывалась вольт-амперная характеристика клетки, для определения ее ВС. Дальнейший протокол для зрелых и незрелых клеток не различался, вся запись проводилась в режиме фиксированного тока.

Производился подбор тестирующего стимула для получения ВПСП амплитудой оклок 1 мВ (соответствует амплитуде моносинаптических ВПСП) и запись ВПСП в ответ на подобранный стимул в течение 8 – 10 мин.

После записи базовой амплитуды ВПСП производилась внутриклеточная тетанизация. Она состояла из трех сессий тетанизации по 10 серий ПД в каждой с интервалом между сериями 1 с и интервалом между сессиями 1 мин. Серия состояла из 5 ПД, вызванных внутриклеточными импульсами тока длительностью 5 мс и амплитудой 1 нА.

В течение следующих после тетанизации 25 – 45 мин (в зависимости от состояния клетки) записывались ответы клетки на тестовый стимул.

Подтверждение ГАМКергической природы записанных ВПСП. Для определения, возбуждательные или тормозные входы стимулировались в экспериментах с индукцией гетеросинаптической пластичности, были проведены две дополнительные серии экспериментов. В первой использовался селективный блокатор ГАМКА рецепторов — бикуккуллин. При этом, так же как в экспериментах с индукцией гетеросинаптической пластичности, выбиралась ГК в нижней части гранулярного слоя зубчатой фасции, незрелая ($n = 6$) либо зрелая ($n = 6$), и записывалась вольт-амперная характеристика нейрона. Далее подбирался тестовый стимул таким же образом, как и в эксперименте с гетеросинаптической пластичностью: для получения ВПСП амплитудой 1 – 2 мВ стимулирующий электрод, заполненный ИЦСЖ, устанавливался на верхней границе гранулярного слоя. После этого ответ на тестовый стимул записывался в течение 10 – 15 минут, затем в ИЦСЖ добавлялся бикуккуллин (bicuculline methiodide, Sigma-Aldrich, USA) до концентрации 10 μM . После этого ответы записывались еще в течение 20 – 25 минут.

Во второй серии экспериментов использовался блокатор АМПА-рецепторов — CNQX (водорастворимая форма, disodium salt; Sigma-Aldrich, USA) с конечной концентрацией 10 μM , который добавлялся в систему протока. Дальнейшая схема эксперимента не отличалась от экспериментов с бикуккуллином.

Окрашивание гранулярных клеток. Для определения морфологии незрелых и зрелых гранулярных клеток производилось их окрашивание нейробиотином. Также проводилось иммунохимическое окрашивание срезов антителами к полисиалированной молекуле адгезии нервных клеток (PSA-NCAM).

Для этого в части описанных в предыдущем пункте экспериментов кончик пэтч-пипетки заполнялся внутриклеточным раствором (2 мкл). Затем добавлялось 8 мкл внутриклеточного раствора с нейробиотином. Концентрация нейробиотина составляла 0,2%. После окончания записи (30 – 60 мин) пипетка осторожно отводилась от клетки так, чтобы мембрана клетки закрылась, восстанавливая ее

целостность, после чего пипетка вынималась из среза. После отведения пипетки срез оставался в ИЦСЖ в течение 5–20 минут. После этого срез сразу же фиксировался в параформальдегиде (PFA, 4%) в течении 6–8 часов при комнатной температуре либо 12–14 часов при 4°C, после чего хранился в растворе фосфатного буфера с добавлением азида натрия и Triton (РТА, 0.5% Triton X-100 и 0.01% азида натрия в PBS) либо сразу же окрашивался:

1. Срез отмывался в РТА. Для этого его помещали в 1 мл жидкости и оставляли на 10 минут, затем перемещали в 1 мл чистого РТА также на 10 минут, всего три раза.

2. Срез помещали в 500 мкл блокирующего раствора (10% нормальная козья сыворотка с добавлением 0,5% раствора Triton X-100 и 0.01% азида натрия в растворе фосфатного буфера) на 2 часа.

3. Срез инкубировали с первичными антителами к PSA-NCAM (анти-полисиаловая кислота — NCAM моноклональные мышинные антитела, 1:100, Millipore, USA), с 0,3% раствором Triton X-100 и 3% блокирующим раствором в течении 48–72 часов при температуре +4°C.

4. Срез отмывался в растворе фосфатного буфера таким же образом, как в пункте 1, пять смен раствора.

5. Срез инкубировался со стрептавидином, конъюгированным с красным красителем (Texas red, 1:100, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA), с 0,3% раствором Triton X-100 и 3% блокирующим раствором, а также вторичными антителами (поликлональные антитела козы к антителам мыши, 1:50, Invitrogen, USA), связанными с флуоресцирующим зеленым красителем Alexa-488 в течение 48–72 часов при температуре 4°C в темноте (контейнер со срезами оборачивали фольгой).

6. Срез отмывался в растворе фосфатного буфера так же, как в пункте 1.

7. Срез инкубировался с голубым флуоресцентным красителем, окрашивающим двухцепочечную ДНК (DAPI), для выявления отдельных клеток в срезе.

8. Срез монтировался на стекло с помощью AquaPolymount (Polysciences, USA).

9. Срезы просматривались и снимались на эпифлуорисцентом микроскопе Zeiss Axioscop2 либо на сканирующем лазерном конфокальном микроскопе на основе Cerna (ThorLabs, USA).

Часть срезов окрашивалась только для выявления нейробиотина:

1. Срез отмывался в РТА. Для этого его помещали в 1 мл жидкости и оставляли на 10 минут, затем перемещали в 1 мл чистого РТА также на 10 минут, всего три раза.

2. Срез инкубировался со стрептавидином, конъюгированным с красным красителем (Texas red, 1:100, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) в течение 48 – 72 часов, затем снова отмывался в РТА, как в п.1.

Классификация клеток на зрелые и незрелые. Для более точного разделения всех зарегистрированных гранулярных клеток на зрелые и незрелые проводилась их классификация с помощью квадратичного дискриминантного анализа (скрипты на языке R, функции `qda.fit` и `qda.pred` из библиотеки MASS), которая затем проверялась экспертной оценкой. Алгоритм классификации обучался с использованием электрофизиологических данных клеток, морфологически и иммунохимически идентифицированных как незрелые и зрелые. Затем обученный алгоритм применялся для классификации всех зарегистрированных ГК. Отнесение клеток к одной из групп проверялось экспертной оценкой с использованием диаграмм рассеяния пар по нескольким электрофизиологическим параметрам. Только классифицированные клетки были использованы для окончательного анализа.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

В нашей работе мы изучали особенности и закономерности формирования гетеросинаптической пластичности, индуцированной несочетанной внутриклеточной тетанизацией постсинаптического нейрона.

3.1 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). Так, синапсы, расположенные близко к телу клетки четко следуют Хеббовским законам, в то время как в удаленных синапсах классический протокол «пре перед пост» может вызывать не потенциацию, а депрессию. Для гетеросинаптической пластичности подобные закономерности являются абсолютно не изученными. При этом понятно, что основным индуцирующим фактором при выработке пластичности, индуцированной внутриклеточной тетанизацией в нашей модели, являются потенциалы действия, которые обратно распространяются по дендритам до синаптических контактов, которые они модифицируют. Известно, что потенциалы действия распространяются по дендритам с некоторым затуханием, обусловленным изменением плотности потенциал-зависимых ионных каналов при удалении от сомы. Таким образом, степень удаленности синапса от тела клетки может являться важным фактором для модификации данного синапса. Для изучения закономерностей формирования неассоциативной синаптической пластичности при разном расположении синаптического входа 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). ВПСР регистрировались методом whole-cell patch clamp. В начале эксперимента для всех ВПСР определялся потенциал реверсии, чтобы исключить возможность стимуляции тормозных входов.

Всего было получено 39 записей со стимуляцией дистальных входов и 29 со стимуляцией проксимальных, пригодных к дальнейшей обработке. ВПСП, вызванные стимуляцией в первом слое, имели более медленное начало, в отличие от ВПСП, вызванных стимуляцией во втором слое коры (рисунок 1Б). Также ВПСП, вызванные стимуляцией «дальних» входов имели большую латентность возникновения после стимуляции (время между подачей стимула и началом ответа) по сравнению с ответами на стимуляцию «ближних» входов. Средняя латентность начала ответа, измеренная для «дальних» входов составляла $2,54 \pm 0,1$ мс и достоверно отличалась от латентности ВПСП «ближних» входов, которая составляла $1,44 \pm 0,07$ мс (тест Манна–Уитни, $p < 0,001$). Для оценки скорости инициации ВПСП мы аппроксимировали передний фронт ВПСП на участке от 10% до 90% процентов максимальной амплитуды линейной функцией вида $y=ax+b$ и затем использовали коэффициент a в качестве показателя скорости нарастания ВПСП. Оказалось, что средняя скорость нарастания ВПСП, индуцированных стимуляцией «дальних» входов составляла $0,035 \pm 0,003$ условных единиц, в то время как ответы на стимуляцию ближних входов развивались значительно и достоверно быстрее. Усредненный коэффициент наклона для этих входов составлял $0,045 \pm 0,003$ (тест Манна–Уитни, $p < 0,01$). Таким образом, скорости нарастания и латентности ВПСП, вызванных стимуляцией «дальних» и «ближних» входов значительно и достоверно различались, что говорит о том, что при нашей схеме локальной стимуляции действительно активировались синапсы, расположенные на разном расстоянии от тела клетки.

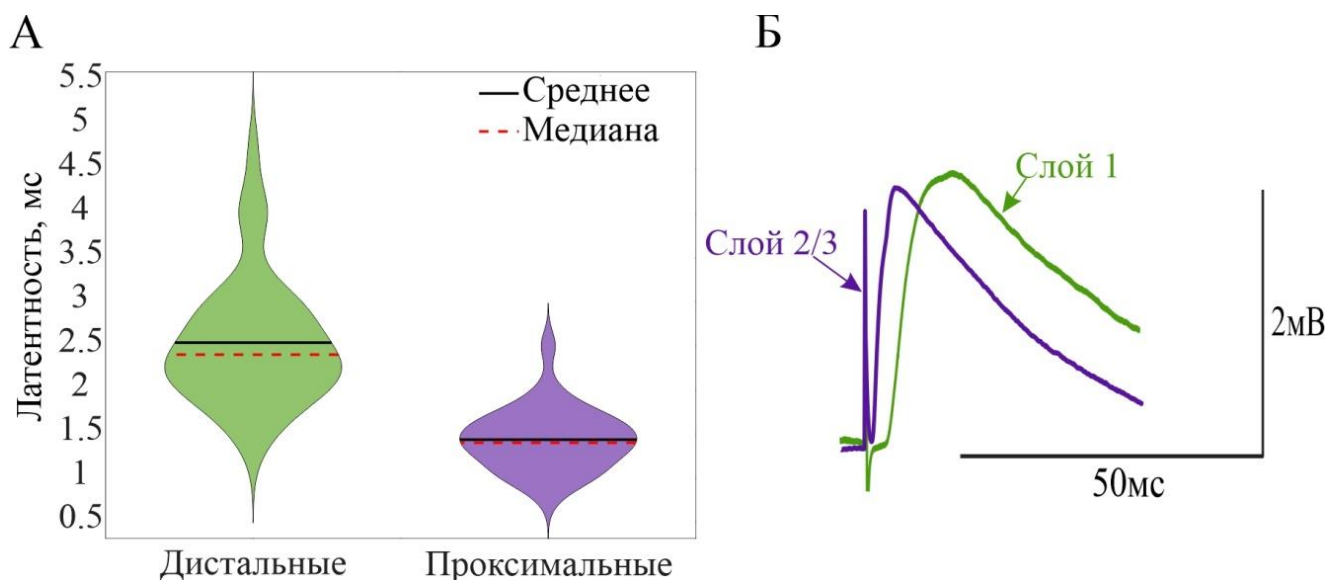


Рисунок 1. Различия в динамике ответов на стимуляцию «дальних» и «ближних» входов. А: Виолин-плот, показывающий распределения латентностей ответов на стимуляцию дистальных и проксимальных входов. Форма фигур отражает распределение величин. Б: примеры усреднения ВПСП до тетанизации для дальнего и ближнего входа, представленные в одном масштабе. На всех графиках фиолетовым цветом обозначены ближние входы, зеленым — дальние.

Внутриклеточная тетанизация нейрона вызывала в части экспериментов ДД, в части — ДП стимулировавшихся входов, в части входов достоверных пластических изменений выявлено не было. Для отнесения отдельного эксперимента к ДД или ДП мы использовали следующий метод. Амплитуды ВПСП, полученных в период до тетанизации (данный период составлял 10-15 мин, стимуляция каждые 20 сек) сравнивались с амплитудами ВПСП после тетанизации (30-45 мин записи), используя t-критерий Стьюдента. Если средняя амплитуда ВПСП после тетанизации была достоверно выше, чем до, такой эксперимент относился к ДП, если меньше — к ДД. Если разница была недостоверной, то мы считали, что в данном эксперименте пластических модификаций входов не произошло.

При стимуляции дистальных входов ($n = 20$) преобладающим типом пластичности, вызванной внутриклеточной тетанизацией, оказалась ДД (40%

входов), ДП наблюдалась в 30% входов, в остальных достоверных пластических изменениях выявлено не было (30% входов). Примеры пластичности каждого типа для дистальных входов представлены на рисунке 2. При этом, если просуммировать все эксперименты с внутриклеточной тетанизацией и стимуляцией «дальних» входов, то среднее изменение амплитуд ВПСП составит $104,9 \pm 13,1\%$, то есть гетеросинаптические изменения, вызванные тетанизацией в дистальных входах, были сбалансированными.

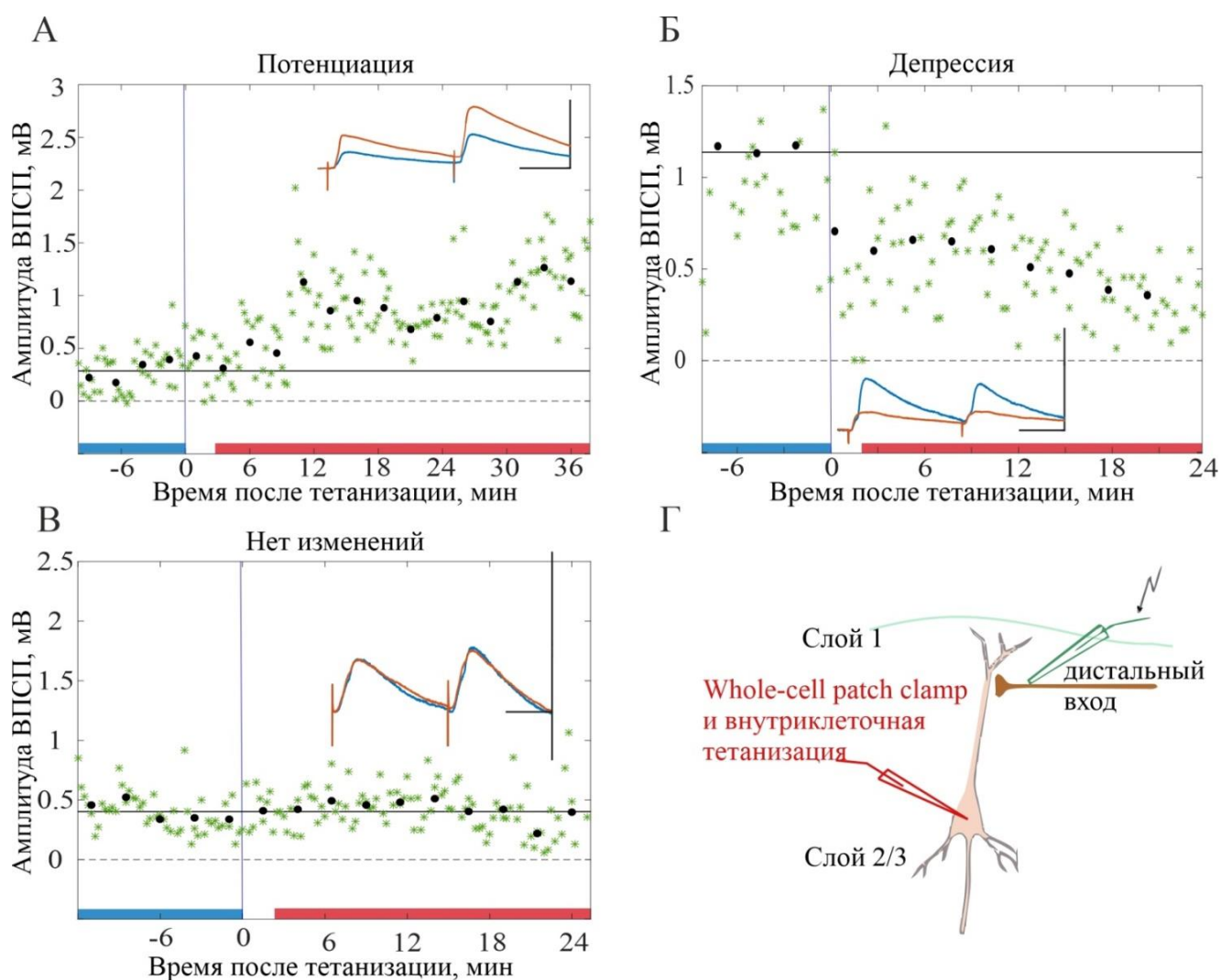


Рисунок 2. Долговременные изменения эффективности дистальных синаптических входов, вызванные внутриклеточной тетанизацией. А,Б,В: три примера экспериментов, в которых внутриклеточная тетанизация индуцировала ДП (А), ДД (Б) или не приводила к изменениям синаптических ответов

(В). Зелеными звездочками на каждом графике обозначены амплитуды индивидуальных ВПСП, черными точками — амплитуды ВПСП, усредненные по 10, сплошная горизонтальная линия показывает среднюю амплитуду ВПСП до внутриклеточной тетанизации (синяя вертикальная линия). ВПСП над графиками представляют собой ответы, усредненные за периоды, обозначенные горизонтальными полосами соответствующего цвета, до и после внутриклеточной тетанизации. Шкала: 20 мс, 3 мВ. Г: Схема записи ответов при стимуляции дистального входа и расположение стимулирующего электрода.

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) (рисунок 5). Примеры пластичности каждого типа для проксимальных входов представлены на рисунке 3. При этом если просуммировать результаты всех экспериментов со стимуляцией проксимальных входов, то оказывается, что тетанизация вызывала гетеросинаптическую потенцию 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 «дальних» входов ($p < 0,01$, критерий Манна-Уитни). Таким образом, внутриклеточная тетанизация вызывала гетеросинаптическую потенцию «ближних» входов.

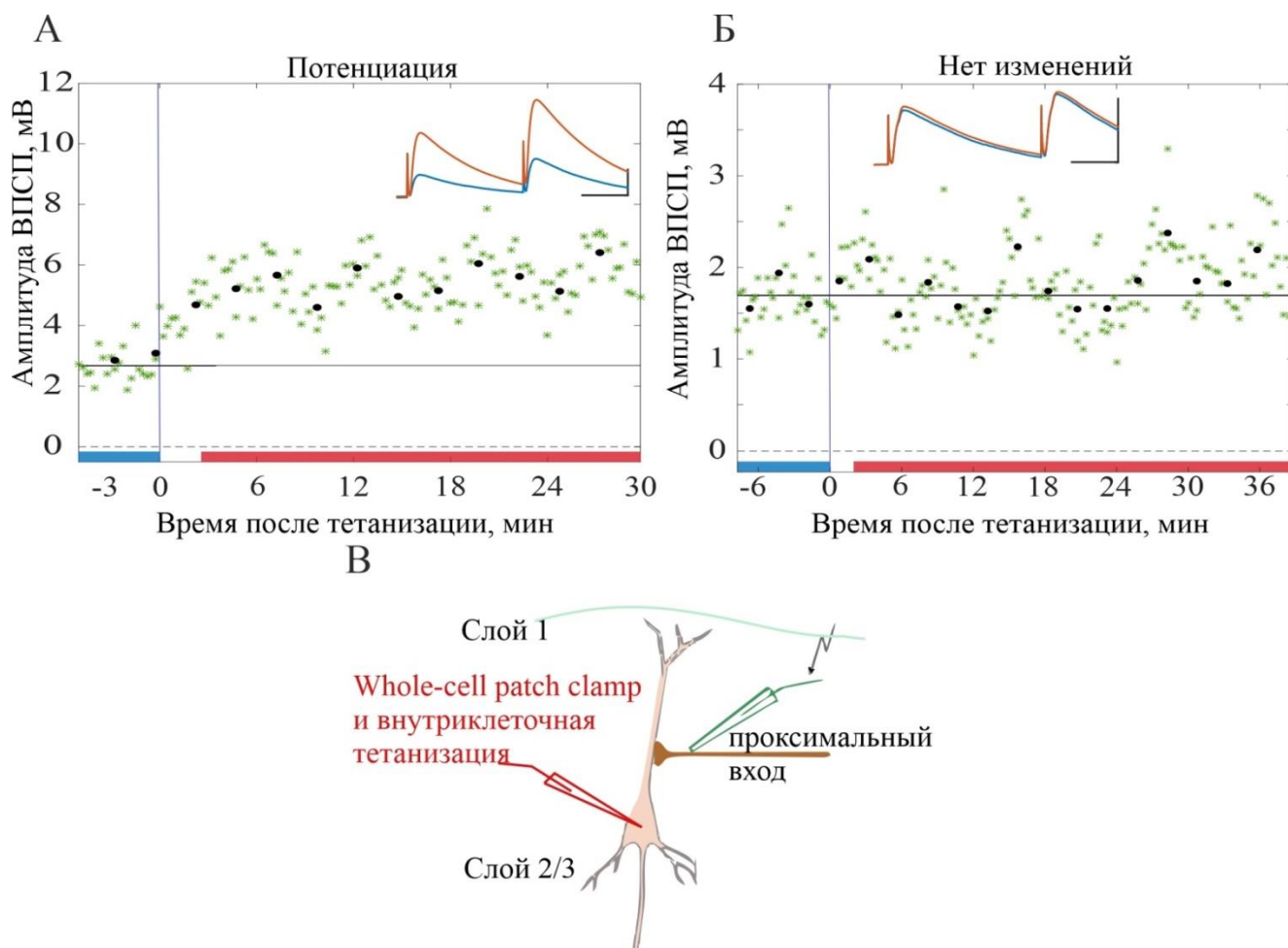


Рисунок 3. Пластические изменения проксимальных синаптических входов клеток 2/3 слоя зрительной коры, вызванные внутриклеточной тетанизацией. А,Б: примеры экспериментов, в которых внутриклеточная тетанизация индуцировала ДП (А) или не приводила к изменениям синаптических ответов (Б). Зелеными звездочками на каждом графике обозначены амплитуды отдельных ВПСП, черными точками — амплитуды ВПСП усредненные по 10, сплошная горизонтальная линия показывает среднюю амплитуду ВПСП до внутриклеточной тетанизации (синяя вертикальная линия). ВПСП над графиками представляют собой ответы, усредненные за периоды, обозначенные горизонтальными полосами соответствующего цвета, до и после внутриклеточной тетанизации. Шкала: 20 мс, 3 мВ. В: Схема записи ответов при стимуляции проксимального входа и расположение стимулирующего электрода.

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 потенциалов действия (рисунок 4Д). Как и в серии экспериментов с выработкой гетеросинаптической пластичности всего подавалось 30 таких пачек. 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, $n = 12$), хотя для части входов достоверных отличий в амплитуде ВПСП до и после тетанизации не выявлялось. Примеры ДП и отсутствия изменений при гомосинаптической пластичности представлены на рисунке 4. При этом амплитуда ВПСП, усредненная по всем экспериментам, после сочетанной тетанизации возрастала до $185,5 \pm 33,9\%$ в дистальных и до $177,4 \pm 25\%$ в проксимальных входах (различия недостоверны, $p=0,503$, критерий Манна-Уитни).

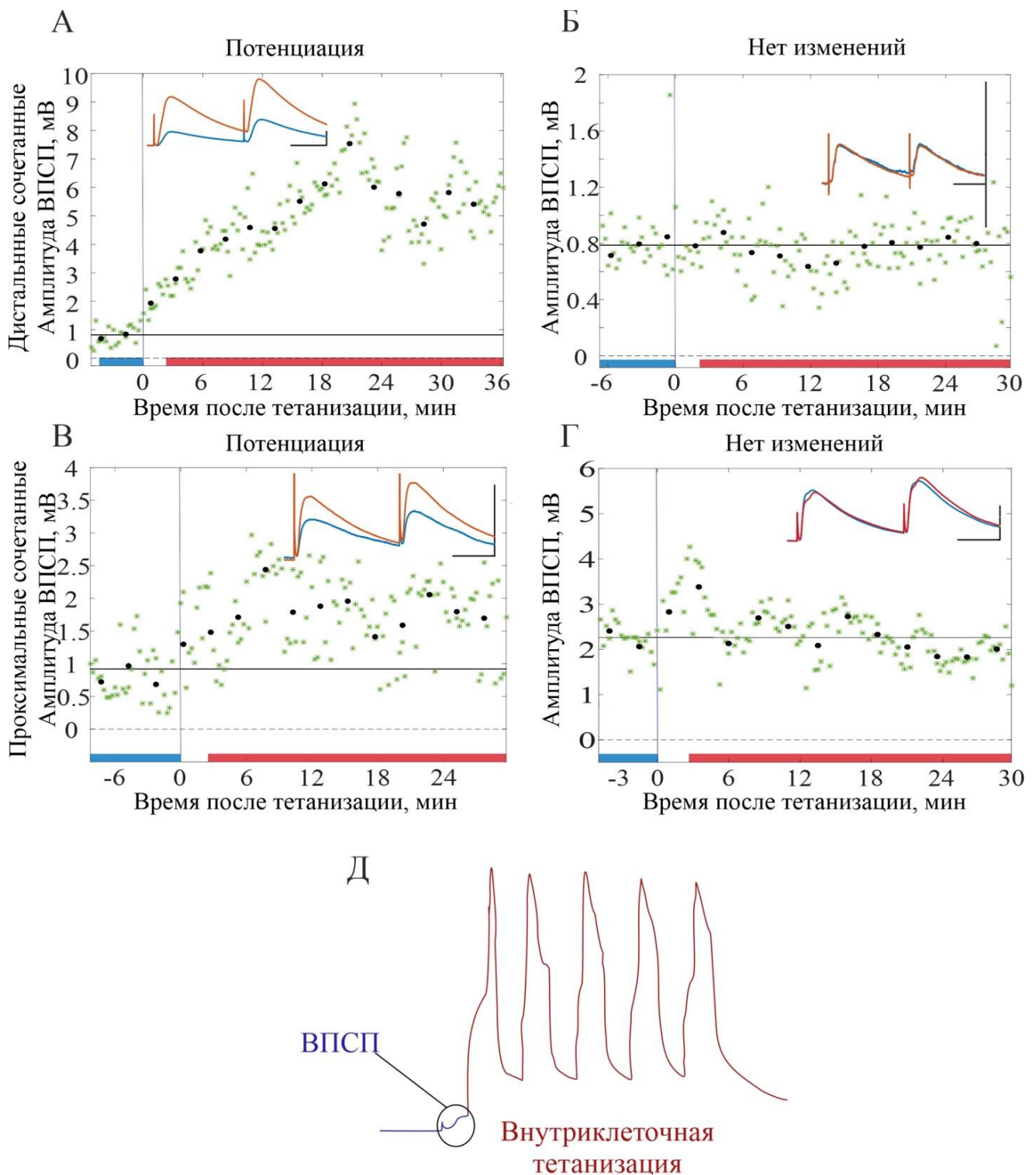


Рисунок 4. Долговременные пластические изменения амплитуды дистальных и проксимальных синаптических входов клеток 2/3 слоя зрительной коры после сочетанной стимуляции (Хеббовская парадигма).

А,Б: примеры экспериментов, в которых сочетанная стимуляция дистальных входов вызывала ДП (А), или не вызывала изменений (Б). В,Г: примеры экспериментов, в которых сочетанная стимуляция проксимальных

входов вызывала ДП (В), или не вызывала изменений (Г). Зелеными звездочками на каждом графике обозначены амплитуды ВПСР, черными точками — амплитуды ВПСР усредненные по 10, сплошная горизонтальная линия показывает среднюю амплитуду ВПСР до внутриклеточной тетанизации (синяя вертикальная линия). ВПСР над графиками представляют собой ответы, усредненные за периоды, обозначенные указанные горизонтальными полосами соответствующего цвета, до и после внутриклеточной тетанизации. Шкала: 20 мс, 3 мВ.

Д: схема сочетанной стимуляции.

Рисунок 5 суммирует распределение разных типов пластические изменения для «дальних» и «ближних» входов после внутриклеточной тетанизации. Таким образом, направленность гетеросинаптической пластичности имеет зависимость от расположения синаптического входа на дендритном древе — она достоверно различается для «дальних» и «ближних» входов (критерий Хи-квадрат, $\chi = 6,17$, $p = 0,041$), причем «дальние» входы более склонны к гетеросинаптической ДД, а «ближние» — к гетеросинаптической ДП. Для гомосинаптической пластичности, записанной в тех же условиях, такой разницы не выявляется (критерий Хи-квадрат, $\chi = 0,52$, $p = 0,87$). При этом разницы между количеством ДП «ближних» входов при гетеросинаптической пластичности, вызванной несочетанной тетанизацией, и при гомосинаптической, вызванной сочетанной тетанизацией также не выявляется, тогда как для дистальных входов такое различие есть (критерий Хи-квадрат, $\chi = 8,09$, $p = 0,003$).

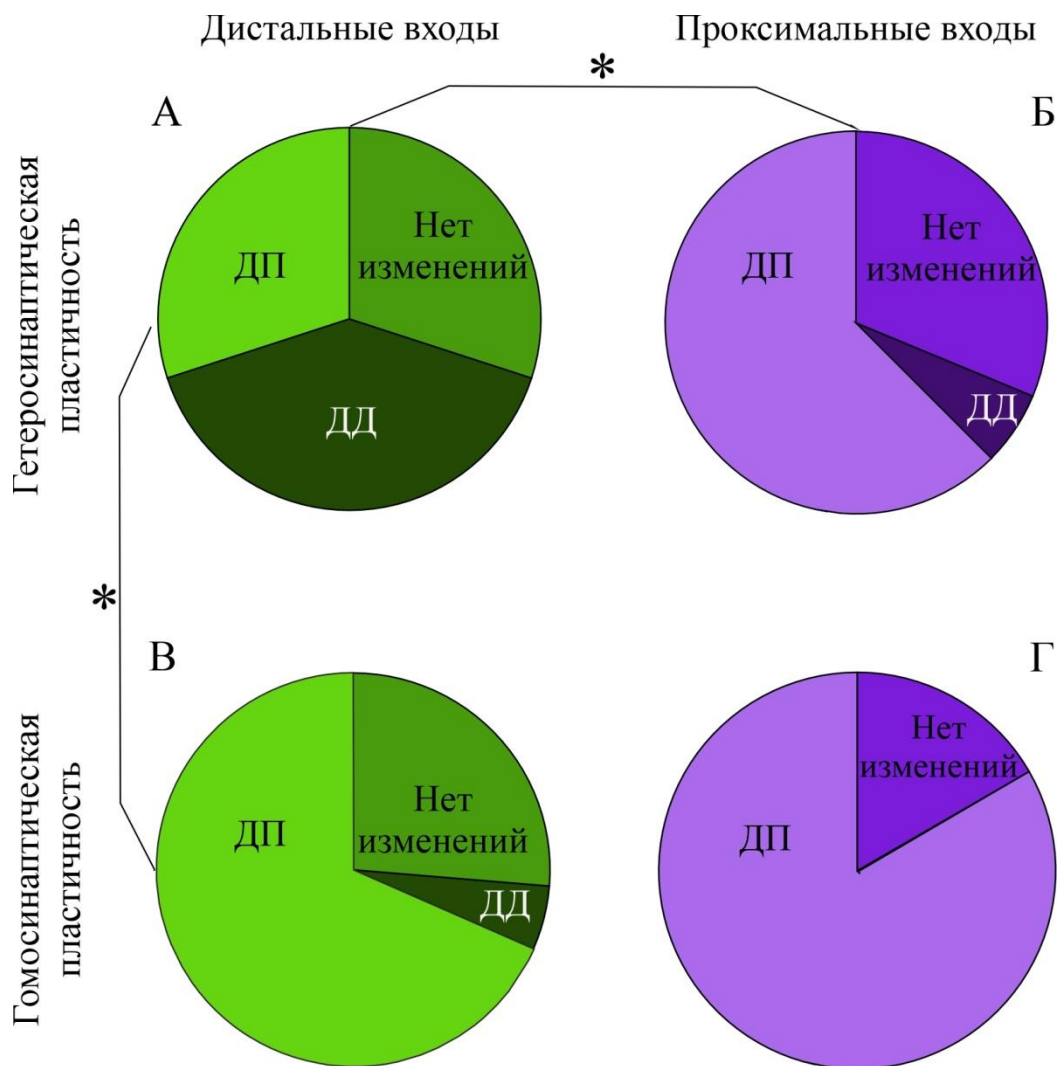


Рисунок 5. Сравнение свойств гомо- и гетеросинаптической пластичности «дальних» и «ближних» входов пирамидного нейрона 2/3 слоя. Круговые диаграммы А, Б, В, Г показывают частоту встречаемости ДП, ДД и отсутствия изменений для дистальных и проксимальных входов при сочетанной и несочетанной внутриклеточной тетанизации. Звездочки обозначают достоверные различия между соединенными линиями типами входов.

Согласно литературным данным, полученным в экспериментах с неселективной стимуляцией синаптических входов, направление и величина изменений ВПСП после внутриклеточной тетанизации значимо коррелировали с начальным КПС (Volgushev et al., 2000; Volgushev et al., 2016; Bannon et al., 2017; Chistiakova et al., 2019). В нашей работе направление и сила пластических изменений после тетанизации также прямо коррелировали с начальным КПС как

для «дальних» (рисунок 6А) ($r = 0,81$, $p < 0,001$, $n = 20$), так и для «ближних» входов (рисунок 6Б) ($r = 0,79$, $p < 0,001$, $n = 16$ входов). Очевидно, корреляция сохранялась и для объединенных «дальних» и «ближних» входов (рисунок 6В) ($r = 0,69$, $p < 0,001$, $n = 36$). Как хорошо видно на панели В рисунка 6, дальние входы более склонны к ДД, а ближние — к ДП при сохранении общего правила, согласно которому входы с меньшим начальным КПС склонны к депрессии, а с большим — к потенциации. Интересно, что для сочетанной стимуляции (гомосинаптическая пластичность) достоверная корреляция между начальным КПС и направленностью пластических изменений после тетанизации наблюдалась только для дальних входов ($r=0,65$, $p<0,01$, $n = 20$ входов), тогда как для ближних входов такой корреляции не наблюдалось ($r=0,43$, $p=0,16$, $n = 13$ входов) (данные не показаны).

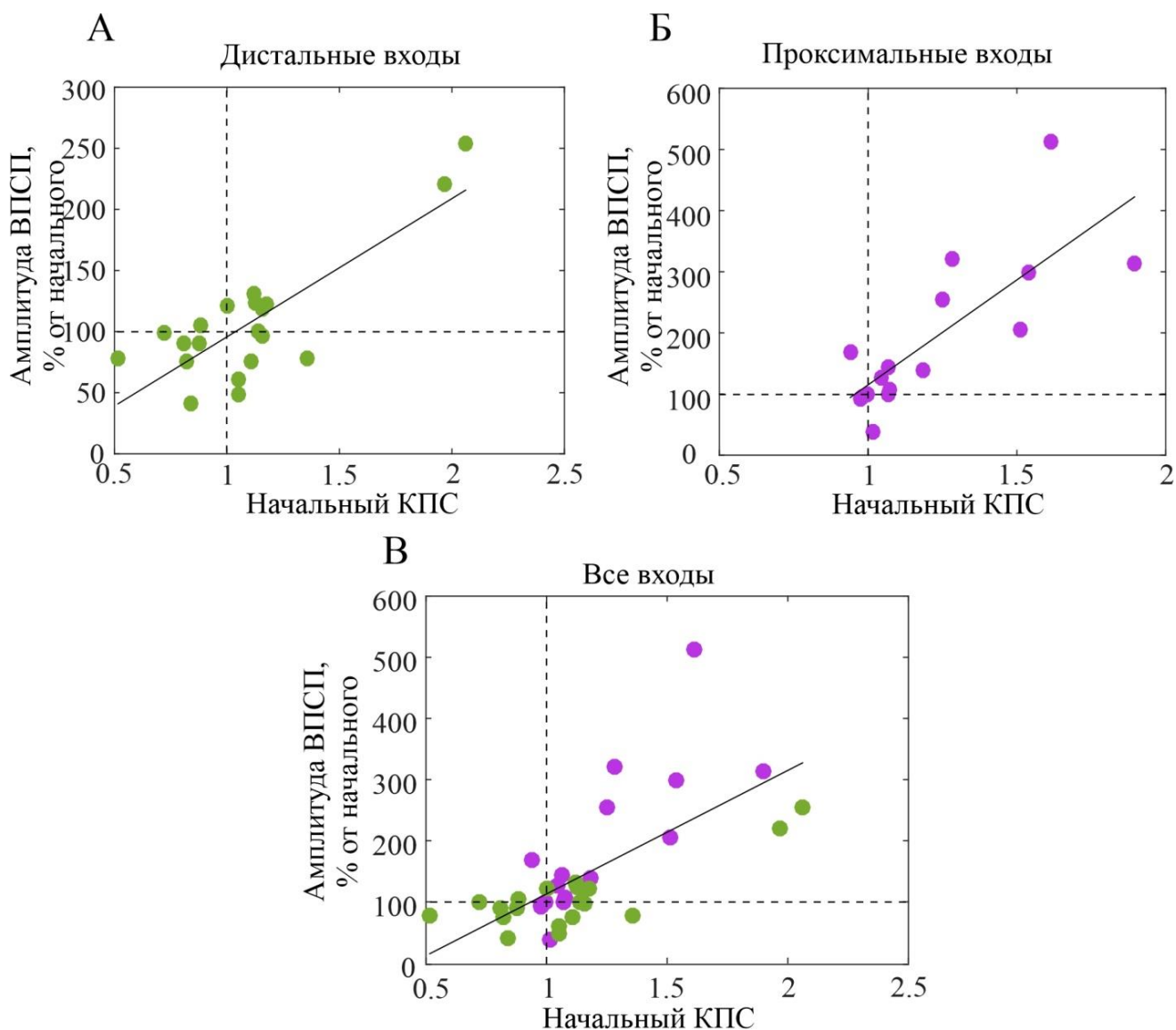


Рисунок 6. Связь начального КПС, связанного с вероятностью выброса медиатора («силой» синапса), с направленностью и амплитудой гетеросинаптических пластических изменений. А: Направление и сила пластических изменений в дистальных входах, вызванных внутриклеточной тетанизацией, в зависимости от начального КПС. Б: То же для проксимальных входов. В: Амплитуда пластических гетеросинаптических изменений проксимальных (фиолетовые круги) и дистальных (зеленые круги) входов относительно начального КПС, показанная на одном графике.

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.

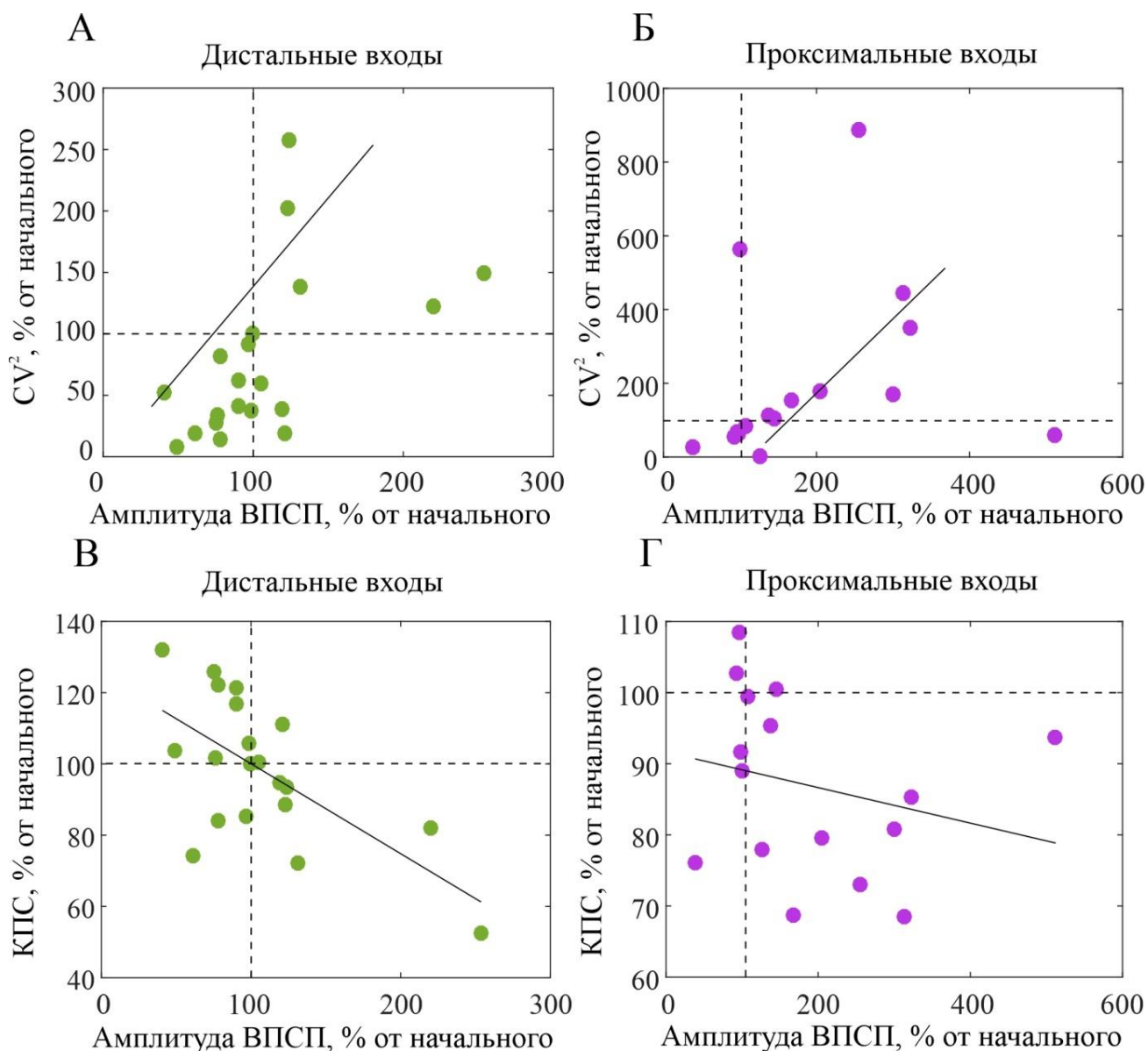


Рисунок 7. Изменение показателей, связанных с вероятностью высвобождения медиатора, после внутриклеточной тетанизации постсинаптического нейрона, для «дальних» и «ближних» входов. А – Г: Изменения обратного коэффициента вариации (CV^{-2} ; А, Б) и КПС (В, Г) в зависимости от изменений амплитуды ВПСП после внутриклеточной тетанизации при стимуляции $n = 17$ «дальних» (А, В) и $n = 11$ «ближних» (Б, Г) входов. Все изменения рассчитывались в процентах от соответствующих значений в контроле до внутриклеточной тетанизации.

3.2 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. Для селективной активации пресинаптических нейронов 2/3 слоя светоактивируемый белок каналородопсин-2 был экспрессирован в этих клетках методом *in utero* электропорации, проводившейся на 17–19 день внутриутробного развития. Поскольку в этот период закладываются пирамидные нейроны 2/3 слоя, электропорация на этом сроке приводит к селективной экспрессии целевых генов практически исключительно в этих клетках (рисунок 8). Использование двух плазмид давало высокий уровень ко-трансфекции двумя целевыми генами: каналородопсином-2 и mCherry. Красная флуоресценция mCherry использовалась для нахождения области среза с максимально высокой плотностью трансфицированных нейронов. При этом зеленый свет, используемый для возбуждения mCherry (530 нм), в гораздо меньшей степени активирует каналородопсин-2, что позволяло предотвратить сильное возбуждение каналородопсин-2-экспрессирующих пресинаптических нейронов перед началом проведения экспериментов с синаптической стимуляцией.

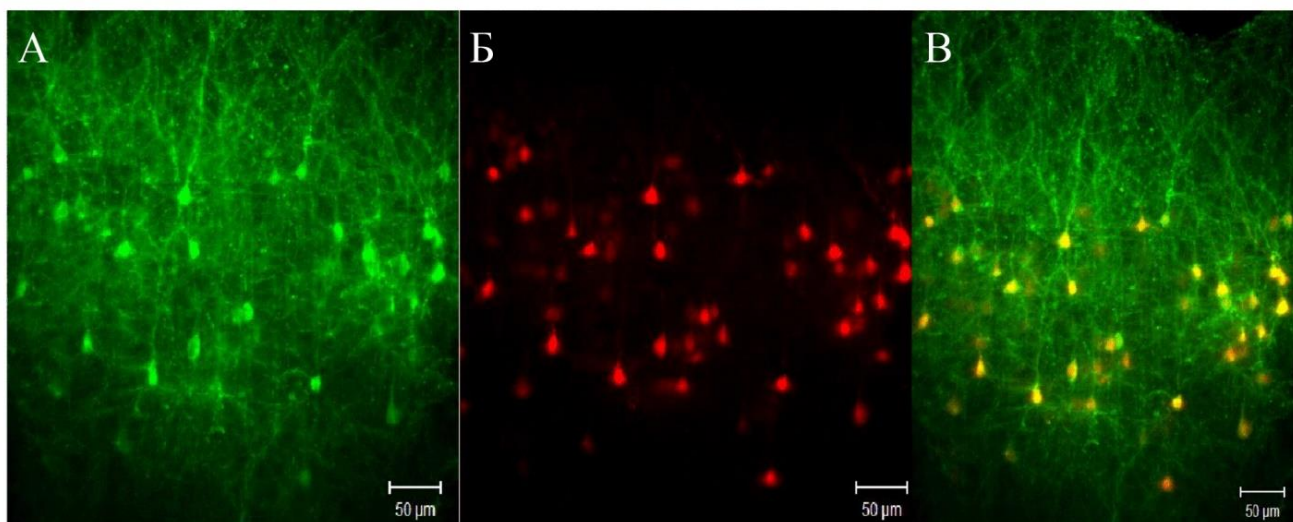


Рисунок 8. Конфокальная микрофотография среза коры головного мозга крысы, электропорированной смесью плазмид, несущих гены каналородопсина-2 и красного флуоресцентного белка mCherry. А: экспрессия каналородопсина-2, соединенного с флуоресцентным белком Venus. Связанный с мембраной комплекс каналородопсин-2-Venus создает значительную флуоресценцию дендритного дерева нейронов. Б: mCherry, флуоресцирующий в красной области спектра и содержащийся во второй плазмиде, обеспечивает преимущественно соматическое окрашивание нейронов. В: наложение микрофотографий А и Б (снятых с одной и той же области среза) показывает значительную степень котрансфекции нейронов. Калибровка 50 мкм.

В предварительной серии экспериментов нами были протестированы различные параметры световой стимуляции. В частности, нами были протестированы матрицы размерностью 10x6, 12x7, 18x10, 20x11 и 30x17. Применение любой из опробованных матриц позволяло получить множественные ВПСП в пирамидных нейронах пятого слоя. Однако, хотя использование матрицы 30x17 дает максимальное пространственное разрешение, полное картирование всей области стимуляции с использованием такой матрицы требует максимального времени (127 с). Кроме того, при стимуляции квадратов размером меньше 40x40 мкм одна и та же пресинаптическая клетка 2/3 слоя генерирует потенциалы действия при стимуляции нескольких соседних квадратов, что

понижает полезный выход эксперимента. В результате проведенных пробных экспериментов мы пришли к выводу, что оптимальным является разбиение поля стимуляции на 180 квадратов с использованием матрицы 10x18. При этом удается простимулировать каждый из квадратов 10 – 15 раз до тетанизации, что позволяет получить достаточное количество ВПСП для оценки его амплитуды до индукции пластичности.

Помимо подбора оптимального размера стимуляционной матрицы было также произведено определение оптимальных временных параметров световых стимулов. Для этого мы регистрировали внутриклеточно нейрон 2/3 слоя зрительной коры, экспрессирующий канальный родопсин2. В наших экспериментальных условиях использование стимулов длительностью 0.8 – 2 мс позволяло получить надежную воспроизводимую активацию нейронов при оптической стимуляции квадратов, покрывающих преимущественно соматическую область клетки (не выходящую за пределы 2 – 4 квадратов стимуляции). В остальных зонах стимуляции при этом регистрировались выраженные подпороговые ответы, что видно на рисунке 9. Использование более длительных стимулов приводило к значительному увеличению зон, стимуляция которых приводила к генерации потенциалов действия в регистрируемом каналородопсин-2 экспрессирующем нейроне.

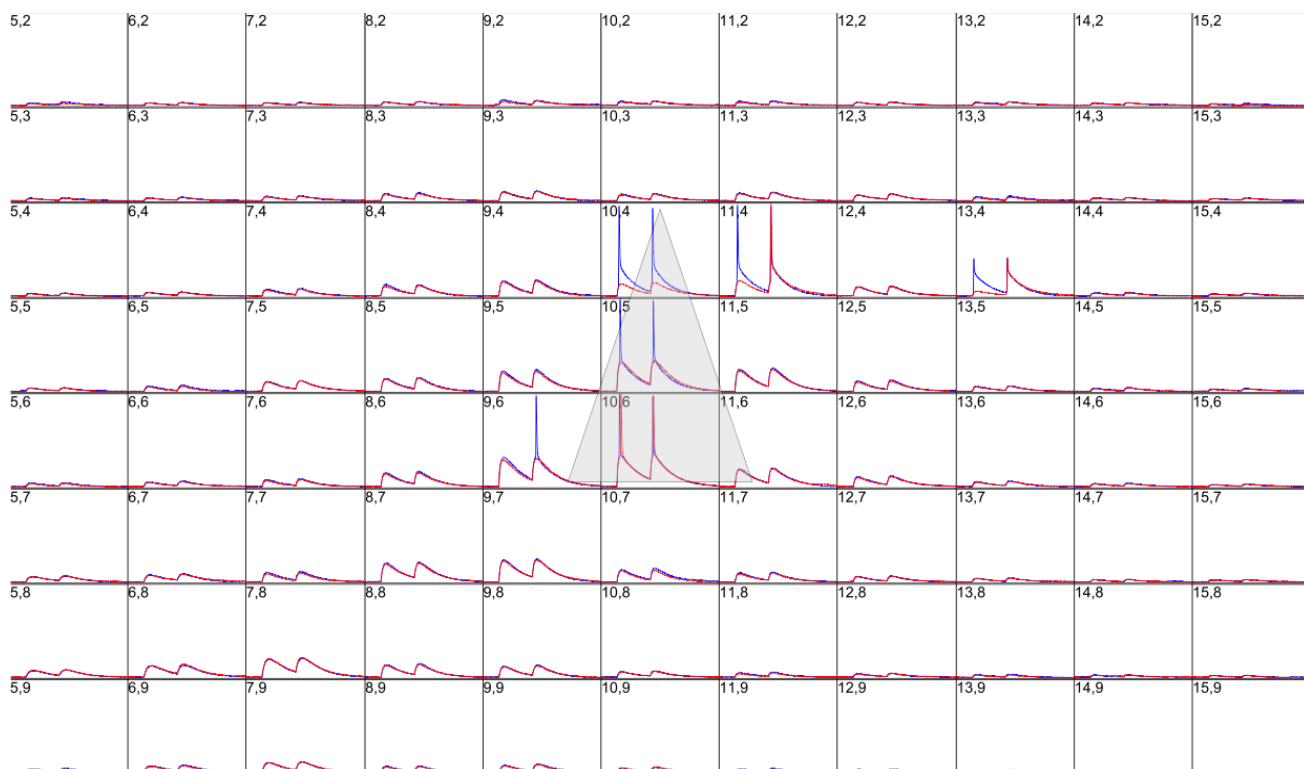


Рисунок 9. Пример ответов пирамидного нейрона 2/3 слоя, экспрессирующего каналородопсин-2, на локальную оптическую стимуляцию двойными световыми стимулами, по форме представляющими собой квадраты размером 38x38 мкм. Длительность каждого стимула на данном рисунке составляла 1,5 мс (ответ обозначен синей линией) или 1 мс (ответ обозначен красной линией). Интервал между стимулами — 50 мс. В каждой ячейке рисунка представлен ответ нейрона на стимул, нанесенный в соответствующее место стимуляционной матрицы. Позиция тела клетки отмечена серым треугольником. Стимуляция других ячеек приводила к возникновению подпороговых деполяризационных ответов, амплитуда которых снижалась по мере удаления от тела клетки.

В ходе основной серии экспериментов постинаптический нейрон, являющийся пирамидой пятого слоя, регистрировался методом whole-cell patch clamp. Стимуляционная матрица при этом размещалась в области проекции 2/3 слоя таким образом, чтобы апикальный дендрит постсинаптического нейрона располагался предположительно по центру матрицы. Оптическая стимуляция с

вышеописанными параметрами вызывала ВПСП в регистрируемом нейроне при предъявлении оптических стимулов во многих квадратах стимуляционной матрицы, как показано на рисунке 10. Для анализа изменений амплитуд синаптических ответов при оптогенетической стимуляции нами было создано специализированное программное обеспечение в среде Matlab (MathWorks, США). Созданная программа по выставленным временным окнам производила измерение амплитуд ВПСП для каждого места оптической стимуляции. Ответы с амплитудой меньше определенного порога (0.15 – 0.2 мВ, подбирались индивидуально для каждого эксперимента) исключались из обработки. Ответы, в которых парная стимуляция вызывала появление только одного (как правило, второго) ВПСП также исключались из анализа. Среднее количество квадратов стимуляционной матрицы 10x18, стимуляция которых вызывала появление ВПСП в пирамидном нейроне пятого слоя, составляло, в среднем, 46.6 ± 15.7 ($n = 10$). При этом средняя амплитуда первого ВПСП составляла 0.47 ± 0.11 мВ ($n = 10$; ВПСП сначала были усреднены внутри одного эксперимента, после чего производилось усреднение полученных на предыдущем шаге средних величин ответов с определением ошибки среднего).

А

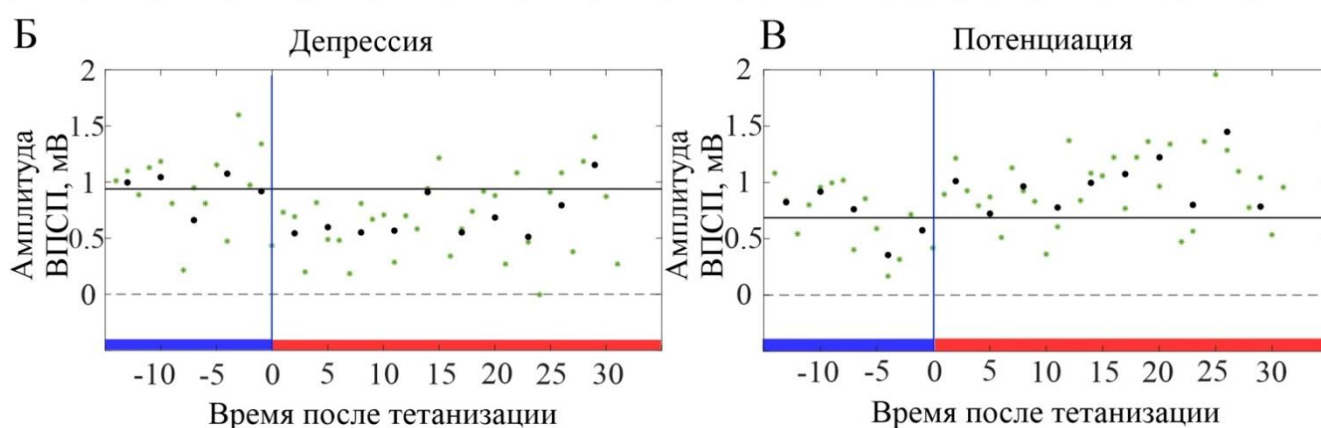
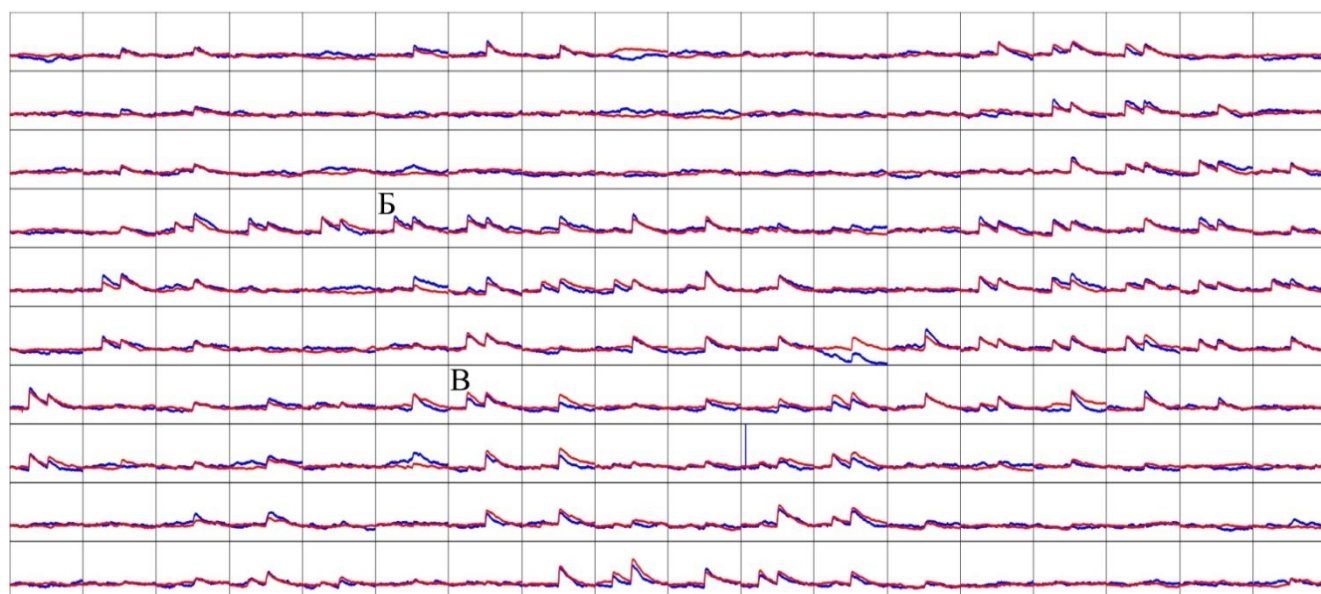


Рисунок 10. Синаптические ответы пирамидного нейрона пятого слоя коры в ответ на парную оптическую стимуляцию каналородопсин-2-экспрессирующих нейронов 2/3 слоя до и после внутриклеточной тетанизации постсинаптического нейрона. А: стимуляционная матрица, в каждой ячейке которой приведен ответ постсинаптического 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. Приведены результаты одного репрезентативного эксперимента. Б, В: изменение амплитуды ВПСП от синаптических входов, продемонстрировавших ДД (Б) и ДП (В) после внутриклеточной тетанизации. Расположение соответствующих зон, стимуляция которых вызывала данные ответы, обозначено буквами Б и В на

панели А. Точками обозначены амплитуды отдельных ВПСП, сплошная горизонтальная линия показывает среднюю амплитуду ВПСП до внутриклеточной тетанизации (синяя вертикальная линия). Цветными прямоугольниками обозначены ВПСП, усреднявшиеся для получения соответствующих по цвету усредненных ВПСП из зон Б и В на панели А.

После проведения 10 – 15 сессий оптической стимуляции (то есть получения 10 – 15 ВПСП от каждого входа), тестирование синаптических входов прекращалось и проводилась внутриклеточная тетанизация постсинаптического нейрона. После внутриклеточной тетанизации тестирование синаптических входов возобновлялось и продолжалось в течение 25 – 45 мин. Подробный анализ изменений, происходящих одновременно во многих синаптическими входах на одну клетку, показал, что практически в каждом эксперименте удается зарегистрировать входы, подвергшиеся как ДП, так и ДД. Интересно, что ни в одном из экспериментов не было зафиксировано появления синаптических ответов после внутриклеточной тетанизации в квадратах стимуляции, в которых ответов не было до тетанизации. Для определения достоверности изменений, произошедших с данным синаптическим входом, ответы до тетанизации сравнивались с ответами после тетанизации, используя t-критерий Стьюдента. Если изменения были достоверными, то, в зависимости от направления изменений, данный вход определялся как подвергшийся ДП или ДД. В десяти экспериментах в 9,4% от всех зарегистрированных синаптических входов (44 из 466) наблюдалась ДП, в 21,2% (99 из 466) — ДД, в то время как большинство входов (69,4%, 323 из 466) не продемонстрировали статистически значимых изменений.

Для выяснения того, наблюдается ли зависимость направления изменений, вызванных внутриклеточной тетанизацией, от начального КПС, такая же, как и при локальной стимуляции входов внеклеточным электродом (глава 3.1) в наших экспериментах с фотостимуляцией пресинаптических нейронов, мы подсчитали для каждого синаптического входа (для каждого квадрата стимуляции) начальный

КПС (по ответам, усредненным за весь период стимуляции до тетанизации) и общее изменение амплитуды ВПСП после тетанизации (отношение амплитуды первого в паре ВПСП, усредненного за весь период стимуляции после тетанизации, к амплитуде ВПСП, усредненного за период до тетанизации). В большинстве экспериментов (в 7 из 10) наблюдалась достоверная корреляция между начальным КПС и общим направлением изменений амплитуды ВПСП после тетанизации. В среднем данный коэффициент корреляции по Пирсону составил 0.56 ± 0.08 ($n = 7$). Таким образом, анализ результатов экспериментов с фотостимуляцией пресинаптической нейрональной сети показал, что в большинстве случаев результаты одного эксперимента достаточны для определения достоверной корреляции между КПС и амплитудой изменения синаптических ответов после тетанизации.

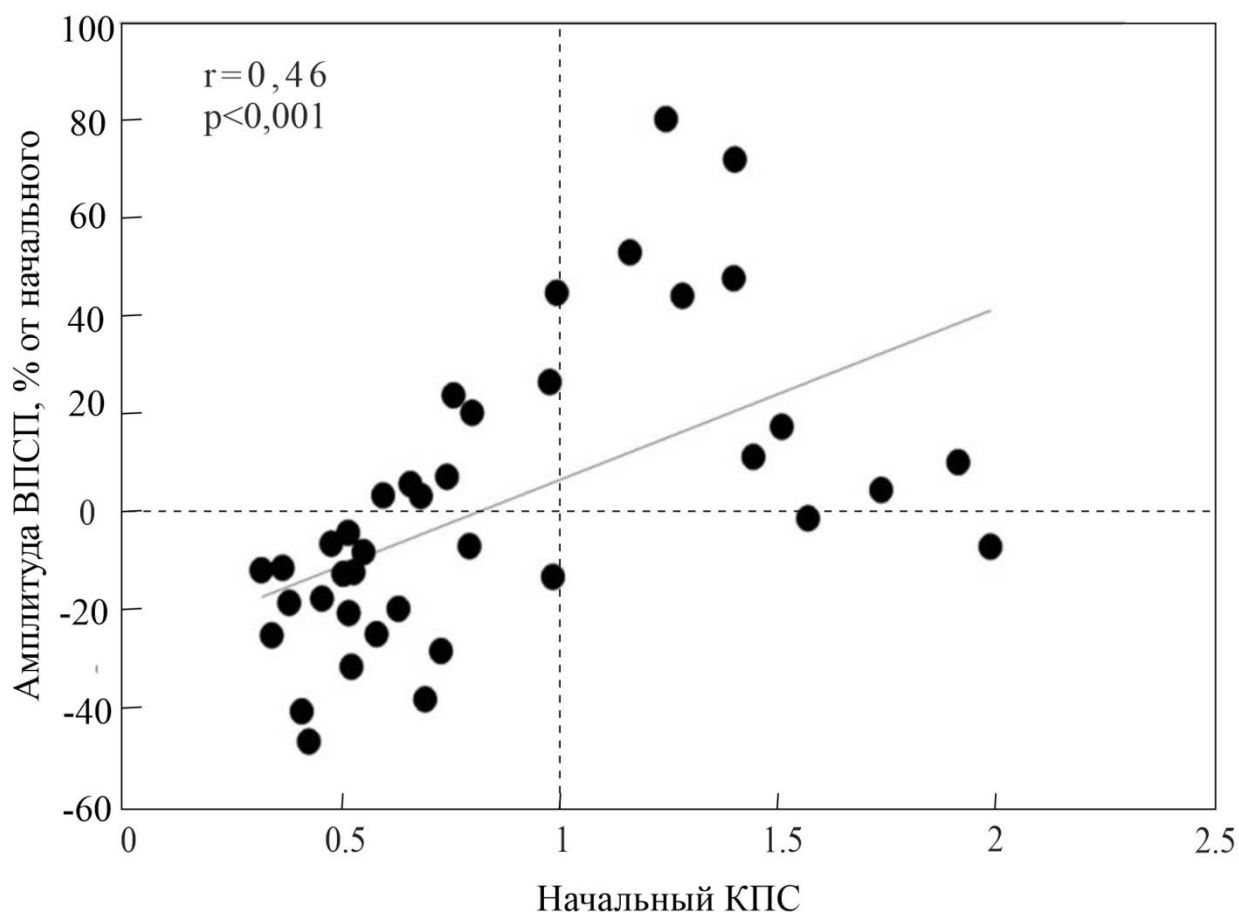


Рисунок 11. Зависимость величины изменения средней амплитуды ВПСП после внутриклеточной тетанизации от начального КПС. Каждая точка на графике рассчитывалась по синаптическим ответам, вызванным стимуляцией

одного квадрата стимуляционной матрицы (рисунок 10). Сплошная линия представляет собой линейную регрессию; r — коэффициент корреляции по Пирсону. Показаны данные из того же эксперимента, что и на рисунке 10. $n = 38$ входов.

3.3 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 ходе работы регистрировались ответы гранулярных клеток методом whole-cell patch clamp во внутренней части слоя гранулярных клеток зубчатой извилины. Эта область содержит незрелые клетки, которые вновь образовались из нервных стволовых клеток, расположенных в прилегающей субгранулярной зоне (Gage, 2000; van Praag et al., 2002). Незрелые клетки имеют неразвитое дендритное дерево, меньшие сомы и получают меньше синаптических контактов, чем зрелые нейроны. Характерной чертой незрелых клеток является высокое ВС (Schmidt-Hieber et al., 2004; Mongiat et al., 2009). Мы использовали ВС, измеренное по ответам на ступени гиперполяризующего тока небольшой амплитуды, в качестве начального критерия для различения незрелых и зрелых клеток. Окончательно клетки разделялись на зрелые и незрелые для использования при дальнейшем анализе с помощью формального критерия разделения (функции квадратичного дискриминантного анализа `qda.fit` и `qda.pred` в R). Для этого алгоритм

дискриминации был обучен с использованием электрофизиологических данных клеток, окрашенных нейробиотином и обработанных для морфологического анализа и иммуногистохимически окрашенных антителами против PSA-NCAM, который является маркером незрелых клеток. Результаты такого окрашивания показаны на рисунке 12.

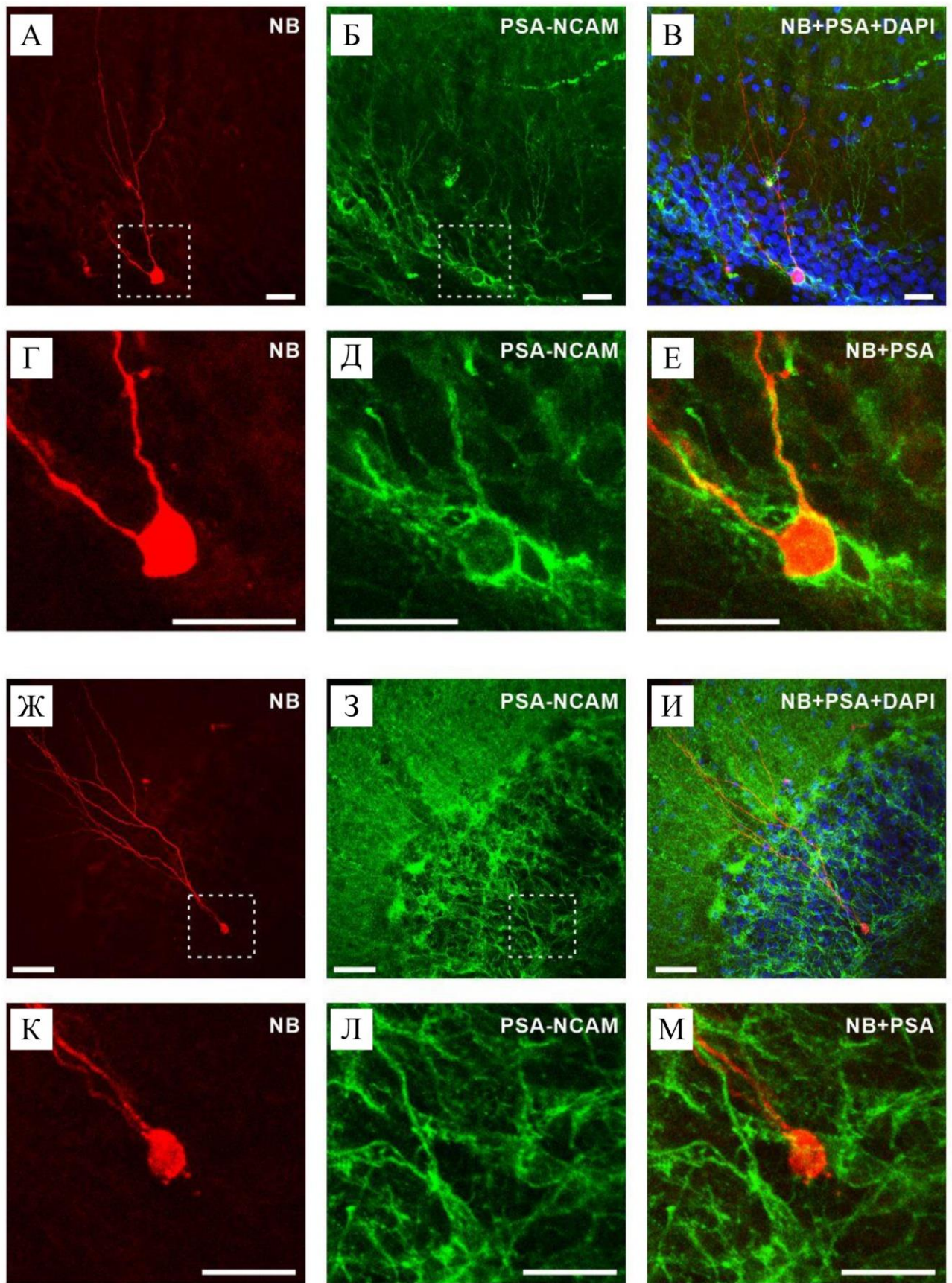


Рисунок 12. Морфологическая и иммунохимическая идентификация незрелых и зрелых гранулярных клеток в зубчатой извилине. Левый столбец

(А, Г, Ж, К): флуоресцентные изображения меченой нейробиотином незрелой гранулярной клетки с неразвитым дендритным деревом (А, Г) и зрелой гранулярной клетки с характерным развитым дендритным деревом (Ж, К). Г – Е и К – М показывают увеличение областей, обозначенных пунктирными линиями в А – В и Ж – И соответственно. Средний столбец (Б, Д, З, Л): иммуногистохимическое окрашивание антителами против PSA-NCAM тех же препаратов, что и в левом столбце. Правый столбец (В, Е, И, М): наложение изображений из левого столбца (морфология), среднего столбца (иммуногистохимическое окрашивание антителами против PSA-NCAM) и окрашивание DAPI (В, И). Обратите внимание, что незрелая гранулярная клетка является PSA-NCAM-положительной (панель Е), в то время как зрелая гранулярная клетка является PSA-NCAM-отрицательной (панель М). Масштабные линейки составляют 25 мкм в А – Е и К – М; 50 мкм в Ж – И.

Зрелые гранулярные клетки имели развитое дендритное дерево характерной формы (рисунок 12 Ж, К) и были иммунонегативными к PSA-NCAM (рисунок 12 И, М). Напротив, незрелые клетки имели рудиментарное неразвитое дендритное дерево (рисунок 12 А, Г) и были иммуноположительны к PSA-NCAM (рисунок 12 В, Е). Расстояние от самого дистального дендрита до сомы, измерявшееся по микрофотографии, использовалось в качестве количественной меры морфологического различия между развитым дендритным деревом зрелых клеток и неразвитым дендритным деревом незрелых клеток. Это расстояние оказывалось больше у зрелых PSA-NCAM-отрицательных клеток, чем у незрелых PSA-NCAM-положительных клеток (394 ± 49 мкм $n = 6$ против 207 ± 50 мкм $n = 6$, $p < 0,001$). Примечательно, что в этой подгруппе морфологически идентифицированных клеток незрелые клетки имели более высокое ВС (рисунок 13, 1074 ± 492 МОм против 284 ± 82 МОм в зрелых клетках, $p = 0,003$) и более деполяризованный мембранный потенциал покоя (рисунок 12А, $-60,7 \pm 3,9$ мВ против $-70,4 \pm 9,2$ мВ в зрелых клетках, $p = 0,0393$). Более высокое ВС и более деполяризованный мембранный потенциал покоя у незрелых гранулярных клеток последовательно

отмечены в предыдущих исследованиях (Schmidt-Hieber et al., 2004; Markwardt et al., 2009; Mongiat et al., 2009; Trincherо et al., 2019). Мы использовали это четкое различие между идентифицированными незрелыми и зрелыми клетками для формальной классификации регистрируемых нейронов.

Для проверки правильности определения незрелых или зрелых клеток для окончательного анализа формальная классификация дополнялась экспертной оценкой по совокупности признаков. Использовались попарные графики рассеяния электрофизиологических параметров, таких как мембранная константа времени, ВС, мембранный потенциал покоя, КПС и скорость развития ПСП (например, рисунок 13 Г – Ж). По совокупности признаков две клетки из 22 формально отнесены к незрелым, но попали в облако точек для зрелых клеток; одна клетка из 52, классифицированных как зрелые, попала в облако точек для незрелых клеток. Эти 3 клетки (из 74, подлежащих классификации по электрофизиологическим параметрам) мы исключили из окончательного анализа.

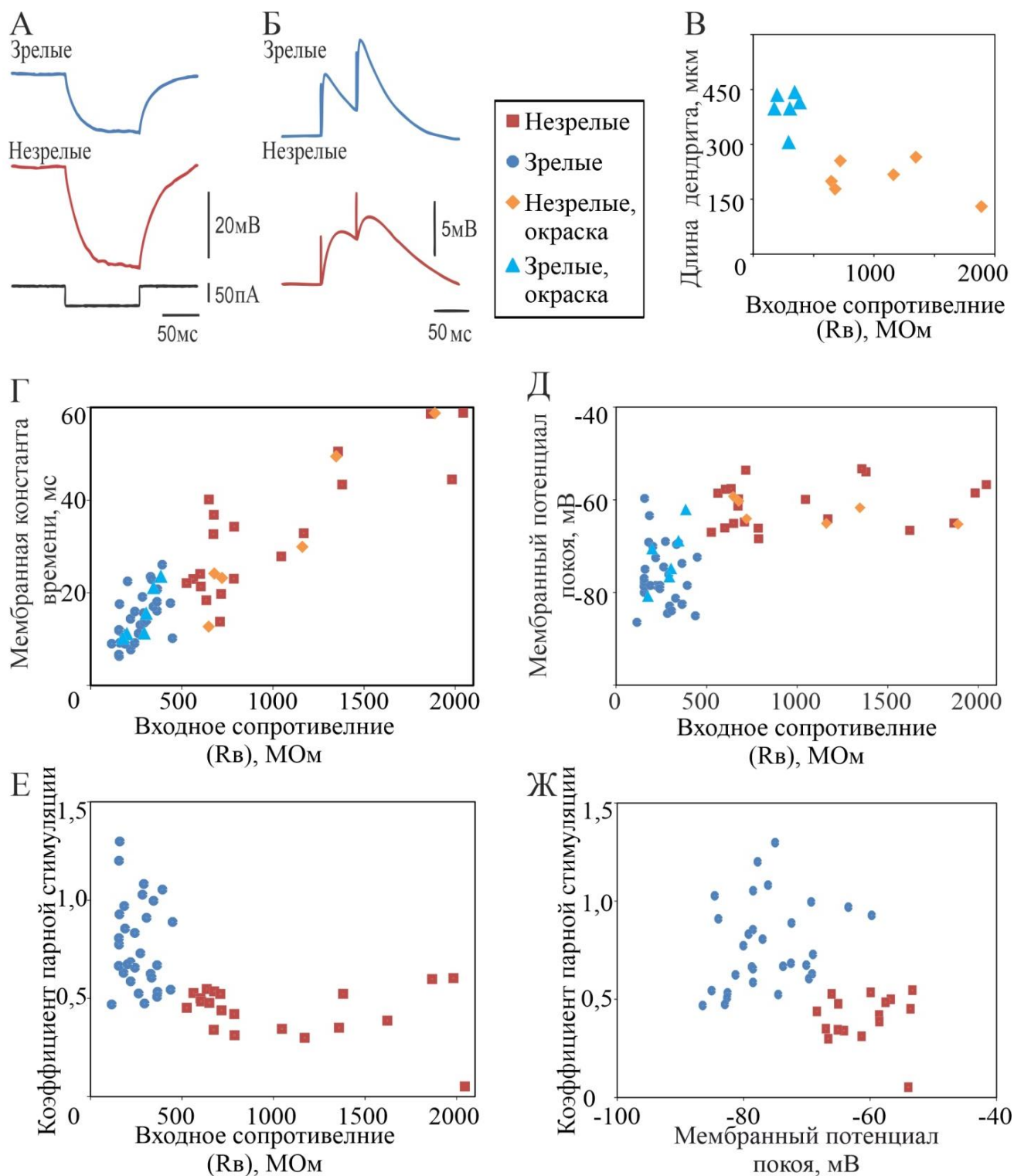


Рисунок 13. Электрофизиологические свойства зрелых и незрелых гранулярных клеток зубчатой фации. А: Пример ответа зрелой и незрелой ГК на подачу ступени гиперполяризующего тока 50 пА. Б: Пример ответа зрелой и незрелой клетки на два последовательных стимула при локальной стимуляции. В: Длина дендрита клеток, окрашивавшихся нейробиотином, нанесенная на график относительно входного сопротивления клетки. Г: мембранная константа

времени, нанесенная на график, в зависимости от входного сопротивления для всех ГК – использовавшихся в экспериментах с внутриклеточной тетанизацией, а также окрашивавшихся нейробиотином. Д: Потенциал покоя клетки до начала стимуляции, нанесенный на график относительно входного сопротивления для всех ГК. Е: КПС ГК в экспериментах с внутриклеточной тетанизацией относительно входного сопротивления клетки. Ж: КПС ГК в экспериментах с внутриклеточной тетанизацией относительно потенциала покоя клетки до начала стимуляции.

В сравнении со зрелыми гранулярными клетками, незрелые имели более высокое ВС (1032 ± 496 МОм (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 26$) против 236 ± 83 МОм в зрелых клетках ($n = 57$), $p < 0,001$), более высокую мембранную константу времени ($33,3 \pm 14,7$ мс, $n = 26$ незрелых против $12,9 \pm 4,8$ мс зрелых, $p < 0,001$) и мембранный потенциал покоя ($-61,2 \pm 4,9$ мВ незрелых против $-74,9 \pm 6,6$ мВ зрелых, $p < 0,001$) (рисунок 13), а также меньшую емкость ($34,6 \pm 10,1$ пФ незрелых против $56,9 \pm 17$ пФ зрелых, $p < 0,001$).

Чтобы вызвать синаптические ответы, мы использовали локальную стимуляцию во внешней части слоя гранулярных клеток. Стимулы применялись с использованием парадигмы парных импульсов как описано в главе «Методика». Синаптические ответы в незрелых нейронах имели более медленную динамику начала, при этом скорость развития ПСП от 10 до 90% амплитуды составляла $0,31 \pm 0,22$ мВ/мс у незрелых клеток ($n = 20$) против $3,1 \pm 3,3$ мВ/мс у зрелых ($n = 51$) нейронов ($p < 0,001$). КПС был значительно ниже у незрелых, чем у зрелых нейронов ($0,44 \pm 0,13$ $n = 20$ незрелых против $0,73 \pm 0,27$ $n = 51$ зрелых, $p < 0,001$) (рисунок 13 Е, Ж).

Наблюдаемые различия в электрофизиологии незрелых и зрелых клеток, подтвержденные морфологическими и иммунохимическими данными, согласуются с результатами предыдущих исследований на крысах (Schmidt-Hieber et al., 2004) и мышах (Markwardt et al., 2009; Mongiat et al., 2009; Tricheiro et al., 2019). Вместе эти результаты показывают, что при использовании предложенных

критериев классификации было достигнуто надежное разделение клеток на зрелые и незрелые.

Предыдущие исследования показали, что при расположении стимулирующего электрода на границе молекулярного слоя стимуляция вызывает преимущественно ГАМКергические ответы как в зрелых, так и в незрелых гранулярных клетках (Markwardt et al., 2009). Для проверки ГАМКергической природы ПСП в наших экспериментах мы использовали селективный антагонист ГАМК рецепторов бикикуллин. Добавление в ИЦСЖ 10 мкМ бикикуллина почти полностью подавляло ответы клеток на стимуляцию в экспериментах, что показано на рисунке 14А для зрелой и на рисунке 14Б для незрелой гранулярной клетки. Сильное, часто полное, подавление ПСП бикикуллином наблюдалось во всех экспериментах, как показано на рисунке 14В, на котором амплитуда ответа, остающегося после применения бикикуллина, нанесена на график в зависимости от ВС для $n = 16$ зрелых и $n = 5$ незрелых нейронов. В среднем, 10 мкМ бикикуллина подавляло ответ зрелых клеток на стимуляцию до $12 \pm 9\%$ от начального ответа, а у незрелых клеток до $5 \pm 7\%$ от начального. Существенной разницы между степенью подавления ответа зрелых и незрелых клеток не наблюдалось ($p = 0,088$).

Таким образом, в соответствии с предыдущими исследованиями (Markwardt et al., 2009), синаптические ответы, вызванные как в зрелых, так и в незрелых гранулярных клетках локальной стимуляцией во внешней части слоя гранулярных клеток, были в основном ГАМКергическими, с незначительным или отсутствующим вкладом других медиаторов. По этой причине и поскольку недавние данные показывают участие глутаматергических механизмов в регуляции синаптической пластичности в ГАМКергических синапсах (Chiu et al., 2018), мы не блокировали возбуждающую передачу в экспериментах по индукции пластичности.

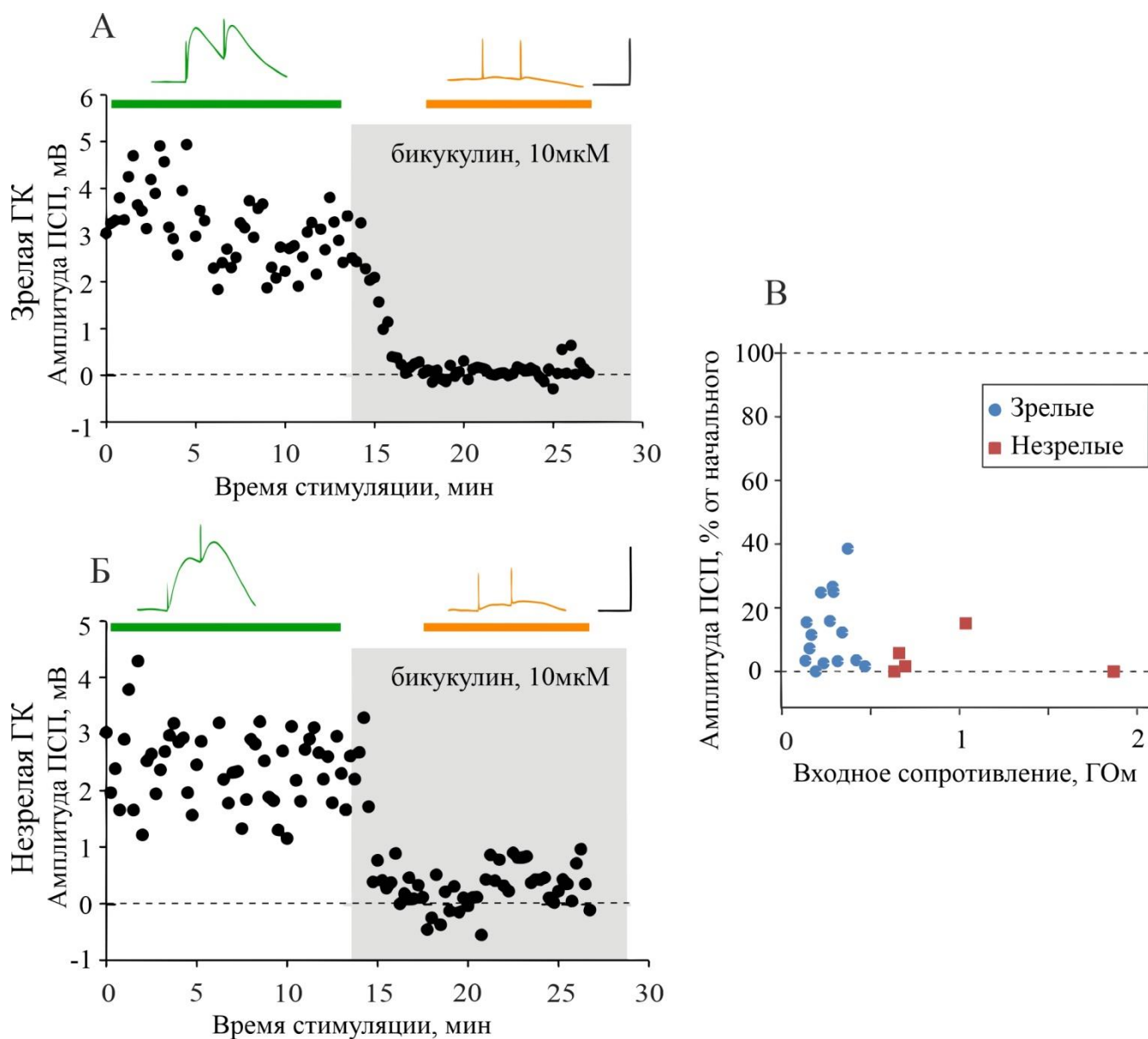


Рисунок 14. Синаптические ответы, вызванные локальной стимуляцией в зернистом слое, являются ГАМКергическими как в зрелых, так и в незрелых нейронах. А, Б: Подавление синаптических ответов в зрелых (А) и незрелых (Б) нейронах бикукуллином. Точки показывают амплитуды отдельных ПСП, время аппликации бикукуллина обозначено серым прямоугольником. ПСП над графиками представляют собой усреднения за периоды, обозначенные горизонтальными полосами соответствующего цвета, до и после добавления лина. Шкала: 50 мс, 3 мВ. В: Усредненная амплитуда ПСП после применения бикукуллина в процентах от начального значения, нанесенная на график в зависимости от входного сопротивления для зрелых ($n = 16$, синие кружки) и незрелых ($n = 5$, темно-красные квадраты) ГК.

Для изучения гетеросинаптической пластичности синаптической передачи к зрелым и незрелым гранулярным клеткам мы использовали установленный протокол внутриклеточной тетанизации. Подобные протоколы, состоящие из постсинаптических спайков без пресинаптической активации, могут индуцировать пластичность тормозной передачи в зрительной (Kurotani et al., 2008, 2003) и соматосенсорной (Lourenço et al., 2014) коре. Поскольку такие протоколы могут вызывать двунаправленные пластические изменения, они позволяют изучать баланс потенциации и депрессии и сравнивать его между экспериментальными группами.

В зрелых гранулярных клетках (рисунок 15Д) внутриклеточная тетанизация индуцировала двунаправленную пластичность. Пример эксперимента, в котором ответы гранулярной клетки на стимуляцию показывали долговременную потенциацию — рисунок 15А, долговременную депрессию — рисунок 15В, не изменялись после внутриклеточной тетанизации— рисунок 15Б.

Из 13 экспериментов со зрелыми нейронами ДП наблюдалась в 3 случаях (амплитуда ПСП увеличилась до $156 \pm 29\%$ от контроля), ДД — в 6 случаях (амплитуда ПСП снизилась до $59 \pm 21\%$ от контроля), в остальных 4 экспериментах амплитуда ПСП не изменилась.

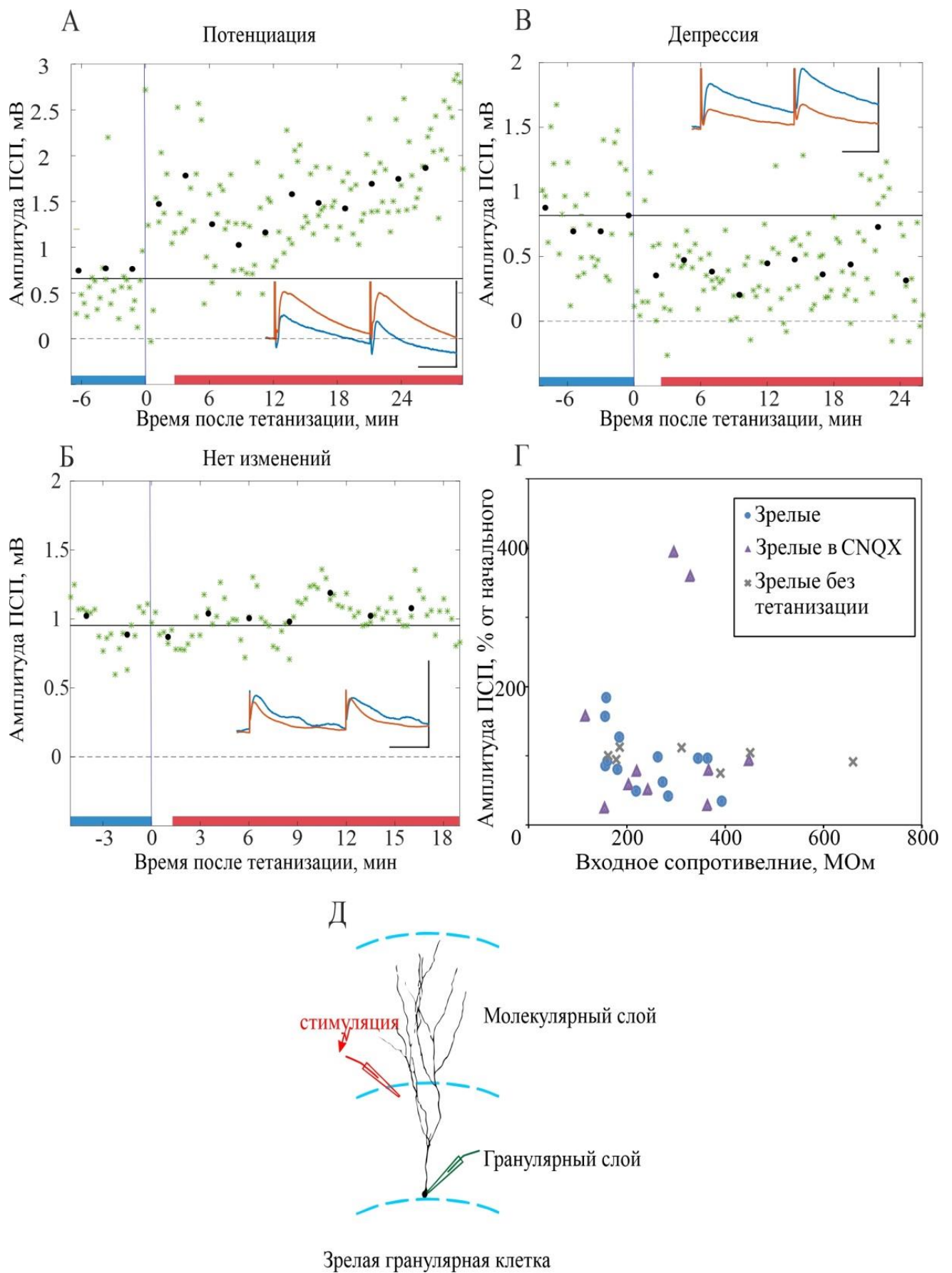


Рисунок 15. Пластичность, вызванная внутриклеточной тетанизацией зрелых нейронов. А, Б, В: Три примера экспериментов, в которых

внутриклеточная тетанизация индуцировала ДП (А), ДД (В) или не приводила к изменениям синаптических ответов в зрелых нейронах (Б). Зелеными звездочками на каждом графике обозначены амплитуды ПСП, черными точками — амплитуды ПСП усредненные по 10, сплошная горизонтальная линия показывает среднюю амплитуду ПСП до внутриклеточной тетанизации (синяя вертикальная линия). ПСП над графиками представляют собой средние значения за периоды, указанные горизонтальными полосами соответствующего цвета, до и после внутриклеточной тетанизации. Шкала: 20 мс, 3 мВ. Г: Амплитуда ПСП после внутриклеточной тетанизации в процентах от контроля, нанесенная на график относительно входного сопротивления для $n = 13$ зрелых нейронов в экспериментах без блокаторов (синие круги), $n = 10$ зрелых нейронов при добавлении в систему жизнеобеспечения срезов 10 мкм CNQX (фиолетовые треугольники) и $n = 8$ зрелых нейронов без внутриклеточной тетанизации (серые крестики). Д: Схема записи зрелого нейрона и расположение стимулирующего электрода.

Несмотря на то, что синаптические ответы в таких условиях записи в основном опосредованы рецепторами ГАМК, как показало применение бикуккуллина, была проведена еще одна серия экспериментов с добавлением в систему жизнеобеспечения срезов 10 мкм CNQX, чтобы гарантировать, что AMPA-опосредованные компоненты не способствуют наблюдаемым эффектам. В этих опытах ($n = 10$) ДП наблюдалась в 2 случаях, ДД — в 6, а в остальных 2 экспериментах амплитуда ПСП не менялась (рисунок 14Г). 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 дополнительной серии опытов проверялось, действительно ли наблюдаемые изменения синаптической передачи вызваны внутриклеточной тетанизацией. В 8 опытах мы регистрировали ПСП по

описанному выше протоколу, но не применяли внутриклеточную тетанизацию. Никаких существенных изменений не наблюдалось в 7 из этих экспериментов, в 1 случае амплитуда ответа увеличилась (рисунок 15Г). Частота появления изменений ПСП достоверно отличается в опытах с и без тетанизации (критерий Хи-квадрат $p < 0,001$).

В целом, пластические изменения в зрелых нейронах были сбалансированными. Под сбалансированностью пластических изменений мы понимаем следующее: в отдельных входах может индуцироваться ДД или ДП, но при усреднении ответов для всех записей зрелых клеток амплитуда ПСП после тетанизации не отличается от амплитуды ПСП до тетанизации. Общее среднее значение амплитуд ответа после внутриклеточной тетанизации не отличалось от контроля ($93 \pm 43\%$ контроля, $n = 13$, $p > 0,1$). Однако ожидается, что дисперсия изменений амплитуды после тетанизации будет высокой из-за встречаемости как ДП, так и ДД (Chistiakova et al., 2014, 2015). Действительно, дисперсия изменения амплитуды ПСП после внутриклеточной тетанизации была достоверно выше, чем в опытах без тетанизации (62%, $n = 23$ против 17% $n = 12$, f -критерий $p < 0,001$). Это 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, которая не зависит от функции AMPA-рецепторов.

В незрелых гранулярных клетках, схематично изображенных на рисунке 16Г, внутриклеточная тетанизация вызывала двунаправленные изменения — ДП (рисунок 16А), ДД (рисунок 16В), или не вызывала изменений амплитуд ПСП (рисунок 16Б). Общая картина пластичности сильно отличалась от зрелых нейронов: ДП наблюдалась в 10 из 15 экспериментов (до $156 \pm 26\%$ контроля), ДД только в 1 случае, и в 4 экспериментах амплитуда ПСП не изменилась. 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 ($n = 15$, $p = 0,008$).

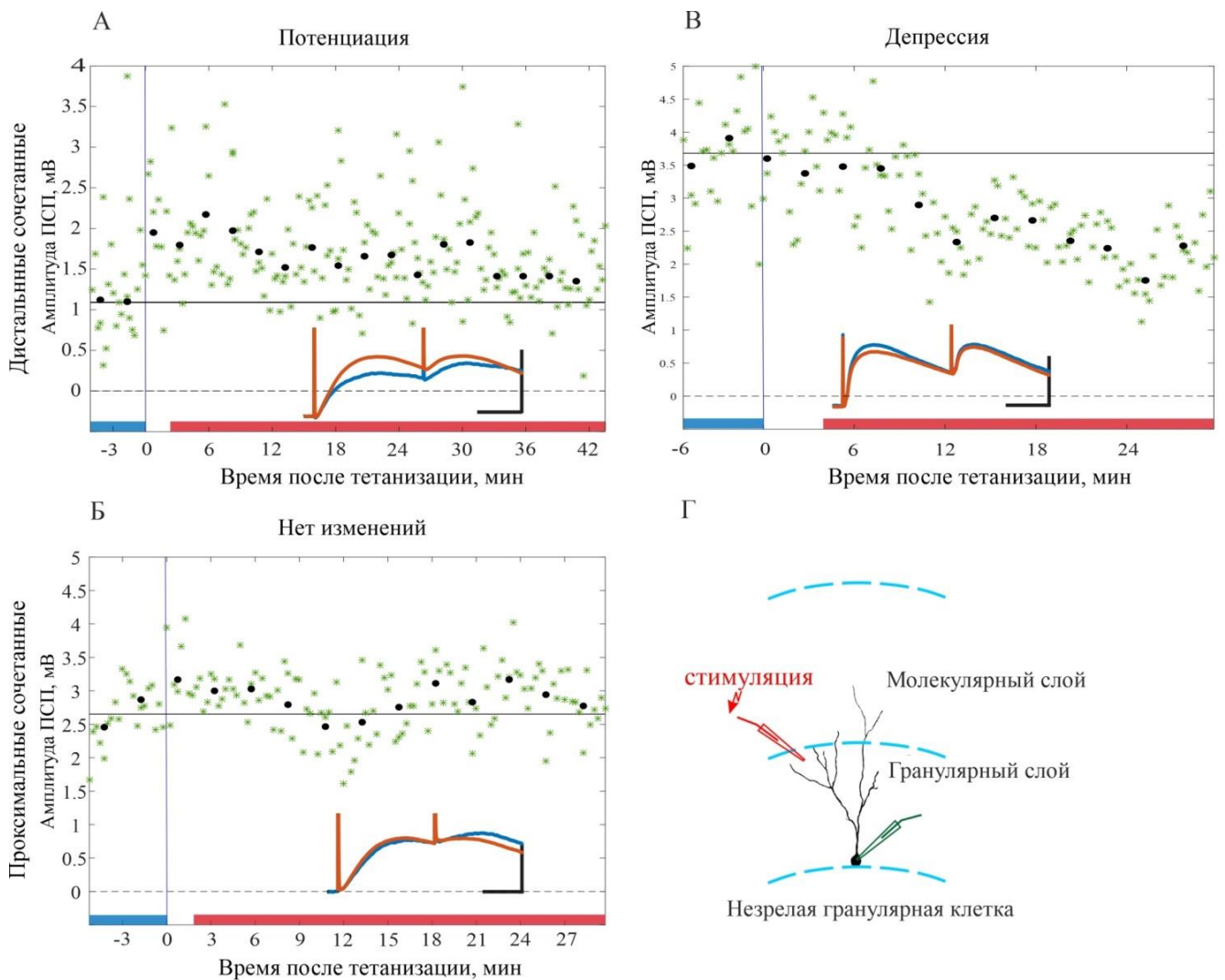


Рисунок 16. Пластичность, вызванная внутриклеточной тетанизацией незрелых нейронов. А, Б, В: три примера эксперимента, в которых внутриклеточная тетанизация индуцировала долговременную потенциацию (А), долговременную депрессию (В) или не приводила к изменениям синаптических ответов в незрелых нейронах (Б). Зелеными звездочками на каждом графике обозначены амплитуды ПСП, черными точками — амплитуды ПСП усредненные по 10, сплошная горизонтальная линия показывает среднюю амплитуду ПСП до внутриклеточной тетанизации (синяя вертикальная линия). ПСП над графиками представляют собой средние значения за периоды, обозначенные горизонтальными полосами соответствующего цвета, до и после внутриклеточной

тетанизации. Шкала: 200 мс; 3 мВ Г: Схема записи с незрелого нейрона и расположение стимулирующего электрода.

Рисунок 17 суммирует разницу в пластичности между зрелыми и незрелыми нейронами. На рисунке 17А представлен график зависимости амплитуды ПСП после внутриклеточной тетанизации от ВС; точки данных, представляющие зрелые нейроны (синие кружки), распределены как выше (ДД), так и ниже (ДП) 100% контрольной амплитуды (горизонтальная пунктирная линия на рисунке А). Напротив, точки данных, представляющие незрелые нейроны (красные квадраты), расположены в основном выше линии 100% контрольной амплитуды, что свидетельствует о преобладании ДП. Примечательно, что для объединенных данных экспериментов по пластичности ВС положительно коррелировала с изменением амплитуды ПСП ($r = 0,31$, $p = 0,054$, $n = 38$; все клетки, зрелые и незрелые). Круговые диаграммы на рисунке Б отражают более высокую частоту ДП в незрелых нейронах по сравнению со зрелыми нейронами ($p < 0,001$, критерий Хи-квадрат). 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.

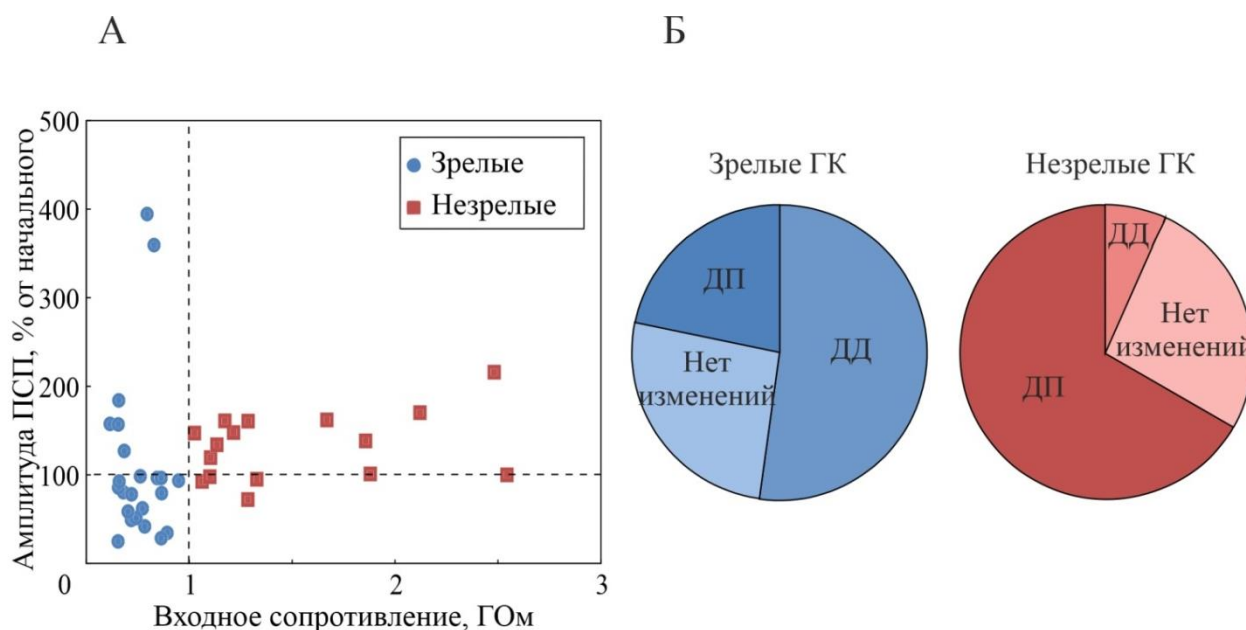


Рисунок 17. Сравнение пластичности зрелых и незрелых нейронов. А: Амплитуда ПСП после внутриклеточной тетанизации в процентах от контроля, нанесенная на график в зависимости от входного сопротивления для зрелых (n = 23, синие кружки) и незрелых (n = 15, темно-красные квадратики) ГК. Б: Круговые диаграммы, показывающие частоту встречаемости ДП, ДД и отсутствия изменений после внутриклеточной тетанизации в зрелых (слева, голубоватые цвета) и незрелых (справа, красноватые цвета) ГК.

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 ($r = -0,54$, $p = 0,039$, $n = 15$; рисунок 18В), а изменения CV^{-2} имели тенденцию положительно коррелировать с изменениями амплитуды ПСП ($r = 0,49$, $p = 0,062$, $n = 15$; рисунок 18Г). 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} , $n = 23$; рисунок 18 А, Б).

В отличие от гетеросинаптической пластичности нейронов коры, описанной выше, направление и величина изменения амплитуды которой 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 $p > 0,1$).

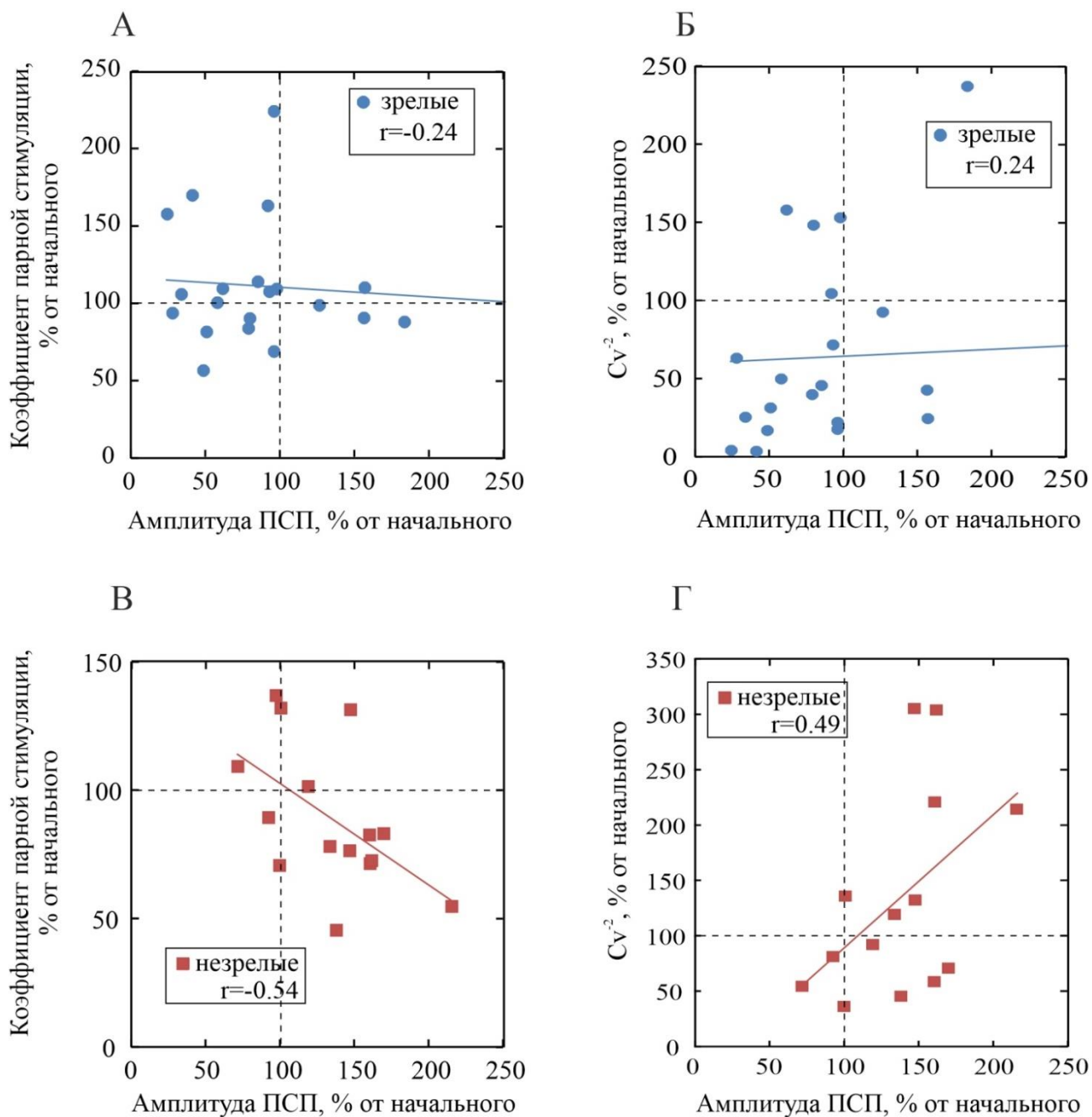


Рисунок 18. Изменение показателей вероятности высвобождения, связанных с пластичностью в зрелых и незрелых ГК. А – Г: Изменения КПС (А, В) и обратного коэффициента вариации (Б, Г) в зависимости от изменений амплитуды ПСП после внутриклеточной тетанизации у $n = 23$ зрелых (А, Б) и $n = 15$ незрелых (В, Г) ГК. Все изменения рассчитываются в процентах от соответствующих значений в контроле до внутриклеточной тетанизации.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Гомо- и гетеросинаптическая пластичность «дальних» и «ближних» входов

Результаты экспериментов, описанных в главе 3.1, 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.

Внутриклеточная тетанизация вызывала двунаправленную пластичность (ДД или ДП) в части входов, в части же амплитуда ВПСИ не изменялась, 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). 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 также хорошо согласуется с цитированными выше работами. Было найдено, что синапсы с высоким КПС (с низкой вероятностью выброса медиатора, «слабые» синапсы) более склонны к потенциации, тогда как синапсы с низким КПС (с высокой вероятностью выброса, «сильные» синапсы) 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 ВПСР, вызванных стимуляцией дистальных входов, после тетанизации носили сбалансированный характер, т.е. количество ДР примерно равнялось количеству ДД и суммарно по всем экспериментам общий эффект тетанизации был равен нулю (средняя амплитуда ВПСР после тетанизации составляла 104,9% от амплитуды ВПСР до тетанизации). Абсолютно те же закономерности были выявлены ранее при исследовании эффектов внутриклеточной тетанизации при неселективной стимуляции синаптических входов (Volgushev et al., 2000; Volgushev et al., 2016; Bannon et al., 2017; Chistiakova et al., 2019; Chasse et al., 2021). Также похожим оказался вклад пресинаптических механизмов: и в наших экспериментах со стимуляцией «дальних» входов и в опытах с неселективной стимуляцией изменения амплитуд ВПСР после тетанизации значимо коррелировали с изменениями обратного коэффициента вариации и КРС. 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 ВПСР после тетанизации составляла 185,5% от амплитуды ВПСР до тетанизации). И, во-вторых, изменения амплитуд ВПСР 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 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 и является запускающим фактором для развития гетеросинаптических изменений (Larkum et al., 1999; Volgushev et al., 2000; Lee et al., 2016). Мы предполагаем, что в нашем случае этот механизм также являлся основным механизмом индукции гетеросинаптической пластичности. Было высказано предположение, которое впоследствии было подтверждено экспериментально, 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 (Lisman J., 1989; Yang et al., 1999; Cho et al., 2001; Lisman J., 2002). 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 наблюдается гетеросинаптическая потенциация. Добавление ВПСП к тетанизации (сочетания) ничего принципиально не меняют, потому что уровень кальция и так превышает порог для потенциации. При этом до дальних синапсов потенциалы действия доходят с затуханием, поэтому внутриклеточная концентрация кальция в удаленных дендритах 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 уровень максимальные значения возрастания уровня кальция увеличиваются и баланс пластичности сдвигается в сторону потенциации.

В нашей работе гомосинаптическая пластичность, возникавшая в результате сочетания стимуляции дистальных входов с внутриклеточной тетанизацией, не отличалась от возникавшей в проксимальных входах и была представлена

преимущественно ДП. В работе (Sjöström and Häusser, 2006) было показано, что гомосинаптическая пластичность дистальных входов, а именно ПЗВС, может изменять правила индукции на анти-Хеббовские, при определенных условиях. В цитируемой работе наблюдался пространственный градиент пластичности ПЗВС вдоль апикального дендрита пирамидного нейрона пятого слоя. Для перисоматических синапсов (не далее 100 мкм от тела нейрона) ПЗВС подчинялась Хеббовским законам – протокол «пре перед пост» вызывал ДП. Но при увеличении дистанции от тела клетки потенциация постепенно уменьшалась и пропадала, а в более отдаленных частях дендрита (более 500 мкм от тела нейрона) протокол «пре перед пост» вызывал уже долговременную депрессию. Однако в наших экспериментах сочетанная Хеббовская стимуляция дистальных входов приводила к развитию ДП. Мы предполагаем, что разные результаты, полученные в наших экспериментах с гомосинаптической пластичностью и в экспериментах (Sjöström and Häusser, 2006), можно объяснить следующим образом. Работа (Sjöström and Häusser, 2006) была выполнена на пирамидных нейронах пятого слоя, отличающихся от использованных в данной части нашей работы нейронов 2/3 слоя. Пирамидные клетки 5 слоя имеют значительно более длинный апикальный дендрит, обратное распространение потенциалов действия по которому сопровождается их значительной аттенуацией. В этой связи к дальним входам «подкрепляющие» потенциалы действия доходят со значительно сниженной амплитудой, в результате чего пластические изменения в удаленных синапсах не развиваются. В наших же экспериментах более короткий апикальный дендрит нейронов 2/3 слоя обеспечивал распространение серии потенциалов действия до удаленных синапсов с сохранением большей амплитуды.

Гетеросинаптические изменения в дистальных входах в наших экспериментах были сбалансированны (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 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 описать работу реальных нейронных сетей в мозге.

4.2 Оптогенетический подход к изучению гетеросинаптической пластичности

Результаты экспериментов, описанных в главе 3.2, 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.

Средняя амплитуда ВПСП, вызываемых фотостимуляцией каналородопсин-2-экспрессирующих нейронов 2/3 слоя коры в пирамидных нейронах пятого слоя составляла 0.47 ± 0.11 мВ. Эта цифра входит в диапазон значений, полученных на моносинаптически связанных парах нейронов 2/3 и пятого слоев на срезах коры крыс, которые варьируют в разных работах от 0.1 ± 0.1 мВ (Reyes and Sakmann,

1999) до 0.8 ± 0.6 мВ (Thomson and Bannister, 1998; Letzkus et al., 2006; Sjöström and Häusser, 2006). Таким образом, наиболее вероятно, что записываемые в наших экспериментах ВПСП в нейронах пятого слоя являлись моносинаптическими входами от пирамидных клеток 2/3 слоев. Следует отметить, что уровень спонтанной активности нейронов в срезах в наших экспериментальных условиях был минимальным, в результате чего количество спонтанных ВПСП, возникающих в нейронах пятого слоя, было пренебрежимо мало. Если такие ВПСП и приходили во время оптической стимуляции, то они, в силу своей малочисленности, не оказывали существенного влияния на статистически выявляемые изменения в амплитуде ВПСП после внутриклеточной тетанизации постсинаптического нейрона.

Пластические изменения в синапсах после несочетанной внутриклеточной тетанизации постсинаптического нейрона показаны во многих работах, включая и эту, что обсуждается в параграфе 1 данной главы. Однако оптогенетический подход позволил впервые показать, что внутриклеточная тетанизация пирамидного нейрона пятого слоя коры может приводить к выработке долговременной пластичности (потенциации или депрессии) синаптических входов от пирамид 2/3 слоя. Направление пластических изменений, как и для рассмотренной выше гетеросинаптической пластичности нейронов 2/3 слоя коры, достоверно коррелирует со значениями КПС. При этом в результате одного эксперимента с оптогенетической стимуляцией удается получить статистически значимую корреляцию между силой синапса и амплитудой изменений ВПСП.

Количество входов, подвергшихся пластическим изменениям в наших экспериментах, было заметно ниже (9,4% ДП и 21,2%, ДД), чем в работах на нейронах второго слоя слуховой коры (27.6% ДП и 42.1% ДД) (Lee et al., 2012) и зрительной (42% ДП и 33% ДД (Volgushev et al. 2000), 35.3% ДП и 41.2% ДД для дистальных входов в данной работе) коры. Такое несоответствие может быть связано со спецификой синаптических связей между пирамидными нейронами 2/3 и 5 слоев, которые изучались в настоящем исследовании. Однако более вероятным объяснением нам представляется значительно меньшее количество

ВПСП из каждого отдельного входа, записываемых до и после тетанизации с использованием матрицы оптической стимуляции. В наших экспериментах каждый вход был протестирован 10–25 раз до тетанизации, тогда как в предыдущих работах (Volgushev et al., 1994, 1997, 2000; Lee et al., 2012) и при локальной стимуляции «ближних» и «дальних» входов в этой работе этот параметр составлял 30–50 ответов. Таким образом, мы предполагаем, что количество тестирований каждого входа в наших экспериментах было недостаточным для достижения статистической значимости изменений амплитуды ВПСП. Вполне возможно, что при увеличении выборки процент ДП и депрессий при оптогенетической стимуляции был бы выше и соответствовал бы данным, полученным при экстраклеточной электрической стимуляции.

Одной из гипотез, проверяемых в ходе нашей работы, являлось возможное вовлечение так называемых «молчащих синапсов» при развитии потенциации, по аналогии с тем, как это происходит при развитии ДП 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 ДП после несочетанной тетанизации, постсинаптического нейрона не происходит активации «молчащих» синапсов.

4.3. Гетеросинаптическая пластичность зрелых и незрелых гранулярных клеток зубчатой фации гиппокампа

Результаты экспериментов, описанные в главе 3.3, показывают, что ГАМКергические 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.

Как незрелые, так и зрелые нейроны могли экспрессировать либо ДП, либо ДД на отдельных входах, однако наблюдалось явное преобладание ДП в незрелых клетках, тогда как изменения в зрелых нейронах оказывались сбалансированными.

Эти данные добавляют несколько важных деталей к общей картине пластичности нейронов зубчатой фасции, образованных во взрослом возрасте. 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 тетрапаттерном 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 ГАМКергические входы на незрелые и зрелые ГК могут подвергаться неассоциативной двунаправленной пластичности, и эти особенности неассоциативной пластичности в ГАМКергических синапсах изменяются по мере созревания ГК. Эти изменения проявляются совсем иначе, чем изменения пластичности в возбуждающих синапсах. В то время как процент ГАМКергических входов, которые проявляли пластичность, не различались между незрелыми (ДП или ДД в 73% экспериментов) и зрелыми клетками (ДП или ДД в 74% опытов, 17 из 23 клеток), баланс между потенциацией и депрессией резко отличался. В незрелых нейронах после эпизода сильной только постсинаптической активации сильно преобладает ДП. В зрелых нейронах неассоциативные изменения были уравновешены. Для объединенных данных по незрелым и зрелым клеткам была тенденция к положительной корреляции между ВС и изменением амплитуды ПСП. 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 отражают 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 ГАМКергической передачи в пирамидных клетках пятого слоя (Kurotani et al., 2008) или экспрессии других рецепторов, регулирующих баланс гетеросинаптических изменений, таких как рецепторы аденозина A1 в возбуждающих синапсах корковых нейронов (Bannon et al., 2017; Chasse et al., 2021).

Повышение уровня кальция предлагается в качестве триггера ассоциативной пластичности в возбуждающих синапсах для зрелых и незрелых гранулярных клеток в зубчатой извилине (Schmidt-Hieber et al., 2004). Увеличение внутриклеточного кальция может также быть триггером неассоциативной пластичности в ГАМКергических синапсах, которая наблюдается в настоящем исследовании. Роль повышения концентрации внутриклеточного кальция, вызванного постсинаптической активацией без пресинаптической стимуляции, при запуске гетеросинаптической пластичности в гранулярных клетках согласуется с результатами предшествующих исследований гетеросинаптической пластичности на возбуждающих входах пирамидных нейронов и тормозных клетках зрительной и слуховой коры (Volgushev et al., 2000; Balaban et al., 2004; Lee et al., 2012; Chistiakova et al., 2019) и в тормозных входах на пирамиды L5 в зрительной и соматосенсорной коре (Kurotani et al., 2003, 2008; Lourenco et al., 2014). Действительно, внутриклеточная тетанизация вызывала увеличение концентрации внутриклеточного кальция в пирамидных нейронах слоя 2/3 (Balaban et al., 2004). Блокирование повышения уровня кальция за счет блокады рецепторов НМДА (Balaban et al., 2004) сместили баланс гетеросинаптической пластичности в сторону потенциации (Chistiakova et al., 1999), а частичная

буферизация внутриклеточного кальция с помощью EGTA препятствовала индукции гетеросинаптической пластичности, что приводило как к более низкой частоте возникновения, так и к более низкой величине ДП и ДД (Lee et al., 2012).

Неассоциативная пластичность ГАМКергических 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.

Важным вопросом является то, в каком возрасте у новообразованных нейронов происходит сдвиг неассоциативной пластичности от преобладания 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 ГАМКергическая 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; Trincherо 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 ГАМКергической передачи в сторону потенциации все еще присутствует на третьей и четвертой неделе созревания новообразованных гранулярных клеток, а 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 каналродопсином-2 и регистрацию ответов от пирамидной клетки 5 слоя коры; 3) локальная стимуляция ГАМКергических 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 ГАМКергических 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 ГАМКергических 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, ГАМКергических) 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 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 (Chauvette et al., 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 забывании или подготовке синапсов к участию в формировании 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 внести 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. ГАМКергические входы как в незрелые, так и в зрелые гранулярные клетки в зубчатой извилине гиппокампа способны к формированию гетеросинаптической пластичности.

6. ГАМКергические синаптические входы 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 в 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 фации происходит около четвертой недели развития гранулярной клетки.

Список сокращений и условных обозначений

CaMK2 — Ca²⁺/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II

ВПСП — возбуждающий постсинаптический потенциал

ПСП — постсинаптический потенциал

BC — входное сопротивление

ГК — гранулярная клетка

ДД — долговременная депрессия

ДП — долговременная потенция

ИЦСЖ — искусственная цереброспинальная жидкость

КПС — коэффициент парной стимуляции

ПД — потенциал действия

ПЗВС — пластичность, зависящая от времени спайка

СПСТ — спонтанный постсинаптический ток

ТПСТ — тормозный постсинаптический ток

РГ — радиальная глия

Список работ 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. Оптигенетический 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.

Список литературы

1. Abbott L.C., Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus // *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2020, Vol. 49, No. 1, P. 3-16.
2. Abraham W.C., Williams J.M. Properties and Mechanisms of LTP Maintenance // *The Neuroscientist*, 2003, Vol. 9, No. 6, P. 463-474.
3. Altman J., Das G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats // *The Journal of Comparative Neurology*, 1965, Vol. 124, No. 3, P. 319-335.
4. Arami M.K., Sohya K., Sarihi A., Jiang B., Yanagawa Y., Tsumoto T. Reciprocal Homosynaptic and Heterosynaptic Long-Term Plasticity of Corticogeniculate Projection Neurons in Layer VI of the Mouse Visual Cortex // *Journal of Neuroscience*, 2013, Vol. 33, No. 18, P. 7787-7798.
5. Arruda-Carvalho M., Sakaguchi M., Akers K.G., Josselyn S.A., Frankland P.W. Posttraining Ablation of Adult-Generated Neurons Degrades Previously Acquired Memories // *Journal of Neuroscience*, 2011, Vol. 31, No. 42, P. 15113-15127.
6. Balaban P., Chistiakova M., Malyshev A., Volgushev M. Dependence of calcium influx in neocortical cells on temporal structure of depolarization, number of spikes, and blockade of NMDA receptors // *Journal of Neuroscience Research*, 2004, Vol. 76, No. 4, P. 481-487.
7. Bannon N.M., Chistiakova M., Chen J.-Y., Bazhenov M., Volgushev M. Adenosine Shifts Plasticity Regimes between Associative and Homeostatic by Modulating Heterosynaptic Changes // *The Journal of Neuroscience*, 2017, Vol. 37, No. 6, P. 1439-1452.
8. Barroso-Flores J., Herrera-Valdez M.A., Galarraga E., Bargas J. Models of Short-Term Synaptic Plasticity // *The Plastic Brain / : Advances in Experimental Medicine and Biology / eds. R. von Bernhardi, J. Eugénín, K.J. Muller. – Cham: Springer International Publishing, 2017. – Vol. 1015. – P. 41-57.*
9. Barroso-Flores J., Herrera-Valdez M.A., Lopez-Huerta V.G., Galarraga E., Bargas J. Diverse Short-Term Dynamics of Inhibitory Synapses Converging on Striatum

Projection Neurons: Differential Changes in a Rodent Model of Parkinson's Disease // Neural Plasticity, 2015, Vol. 2015, Diverse Short-Term Dynamics of Inhibitory Synapses Converging on Striatal Projection Neurons, P. 1-13.

10. Ben-Ari Y., Cherubini E., Corradetti R., Gaiarsa J.L. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. // The Journal of Physiology, 1989, Vol. 416, No. 1, P. 303-325.

11. Ben-Ari Y., Gaiarsa J.-L., Tyzio R., Khazipov R. GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations // Physiological Reviews, 2007, Vol. 87, GABA, No. 4, P. 1215-1284.

12. Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J., Gassmann M. Molecular Structure and Physiological Functions of GABA_B Receptors // Physiological Reviews, 2004, Vol. 84, No. 3, P. 835-867.

13. Bliss T.V.P., Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path // The Journal of Physiology, 1973, Vol. 232, No. 2, P. 331-356.

14. Bonfanti L. Adult Neurogenesis 50 Years Later: Limits and Opportunities in Mammals // Frontiers in Neuroscience, 2016, Vol. 10, Adult Neurogenesis 50 Years Later.

15. Bonhoeffer T., Staiger V., Aertsen A. Synaptic plasticity in rat hippocampal slice cultures: local "Hebbian" conjunction of pre- and postsynaptic stimulation leads to distributed synaptic enhancement. // Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989, Vol. 86, Synaptic plasticity in rat hippocampal slice cultures, No. 20, P. 8113-8117.

16. Burghardt N.S., Park E.H., Hen R., Fenton A.A. Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice // Hippocampus, 2012, Vol. 22, No. 9, P. 1795-1808.

17. Chandler K.E., Princivalle A.P., Fabian-Fine R., Bowery N.G., Kullmann D.M., Walker M.C. Plasticity of GABA_B Receptor-Mediated Heterosynaptic Interactions at Mossy Fibers After Status Epilepticus // The Journal of Neuroscience, 2003, Vol. 23, No. 36, P. 11382-11391.

18. Chasse R., Malyshev A., Fitch R.H., Volgushev M. Altered Heterosynaptic Plasticity Impairs Visual Discrimination Learning in Adenosine A1 Receptor Knock-Out Mice // *The Journal of Neuroscience*, 2021, Vol. 41, No. 21, P. 4631-4640.
19. Chauvette S., Crochet S., Volgushev M., Timofeev I. Properties of Slow Oscillation during Slow-Wave Sleep and Anesthesia in Cats // *Journal of Neuroscience*, 2011, Vol. 31, No. 42, P. 14998-15008.
20. Chen J.-Y., Lonjers P., Lee C., Chistiakova M., Volgushev M., Bazhenov M. Heterosynaptic Plasticity Prevents Runaway Synaptic Dynamics // *Journal of Neuroscience*, 2013, Vol. 33, No. 40, P. 15915-15929.
21. Chen J., Tan Z., Zeng L., Zhang X., He Y., Gao W., Wu X., Li Y., Bu B., Wang W., Duan S. Heterosynaptic long-term depression mediated by ATP released from astrocytes // *Glia*, 2013, Vol. 61, No. 2, P. 178-191.
22. Chistiakova M., Balaban P., Eysel U.T., Volgushev M. NMDA receptor blockade prevents LTD, but not LTP induction by intracellular tetanization: // *NeuroReport*, 1999, Vol. 10, NMDA receptor blockade prevents LTD, but not LTP induction by intracellular tetanization, No. 18, P. 3869-3874.
23. Chistiakova M., Bannon N.M., Bazhenov M., Volgushev M. Heterosynaptic Plasticity: Multiple Mechanisms and Multiple Roles // *The Neuroscientist*, 2014, Vol. 20, Heterosynaptic Plasticity, No. 5, P. 483-498.
24. Chistiakova M., Bannon N.M., Chen J.-Y., Bazhenov M., Volgushev M. Homeostatic role of heterosynaptic plasticity: models and experiments // *Frontiers in Computational Neuroscience*, 2015, Vol. 9, Homeostatic role of heterosynaptic plasticity.
25. Chistiakova M., Ilin V., Roshchin M., Bannon N., Malyshev A., Kisvárdy Z., Volgushev M. Distinct Heterosynaptic Plasticity in Fast Spiking and Non-Fast-Spiking Inhibitory Neurons in Rat Visual Cortex // *The Journal of Neuroscience*, 2019, Vol. 39, No. 35, P. 6865-6878.
26. Chiu C.Q., Martenson J.S., Yamazaki M., Natsume R., Sakimura K., Tomita S., Tavalin S.J., Higley M.J. Input-Specific NMDAR-Dependent Potentiation of Dendritic GABAergic Inhibition // *Neuron*, 2018, Vol. 97, No. 2, P. 368-377.e3.

27. Cho K., Aggleton J.P., Brown M.W., Bashir Z.I. An experimental test of the role of postsynaptic calcium levels in determining synaptic strength using perirhinal cortex of rat // *The Journal of Physiology*, 2001, Vol. 532, No. 2, P. 459-466.

28. Citri A., Malenka R.C. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms // *Neuropsychopharmacology*, 2008, Vol. 33, Synaptic Plasticity, No. 1, P. 18-41.

29. Clelland C.D., Choi M., Romberg C., Clemenson G.D., Fragniere A., Tyers P., Jessberger S., Saksida L.M., Barker R.A., Gage F.H., Bussey T.J. A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation // *Science*, 2009, Vol. 325, No. 5937, P. 210-213.

30. Cohen A.S., Lin D.D., Coulter D.A. Protracted Postnatal Development of Inhibitory Synaptic Transmission in Rat Hippocampal Area CA1 Neurons // *Journal of Neurophysiology*, 2000, Vol. 84, No. 5, P. 2465-2476.

31. Cui S.-Y., Yang M.-X., Zhang Y.-H., Zheng V., Zhang H.-T., Gurney M.E., Xu Y., O'Donnell J.M. Protection from Amyloid β Peptide-Induced Memory, Biochemical, and Morphological Deficits by a Phosphodiesterase-4D Allosteric Inhibitor // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2019, Vol. 371, No. 2, P. 250-259.

32. Dieni C.V., Chancey J.H., Overstreet-Wadiche L.S. Dynamic functions of GABA signaling during granule cell maturation // *Frontiers in Neural Circuits*, 2013, Vol. 6.

33. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain // *Methods in Cell Biology* /. – Elsevier, 2008. – Vol. 85. – P. 243-272.

34. Enikolopov G., Overstreet-Wadiche L., Ge S. Viral and Transgenic Reporters and Genetic Analysis of Adult Neurogenesis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2015, Vol. 7, No. 8, P. a018804.

35. Epp J.R., Silva Mera R., Köhler S., Josselyn S.A., Frankland P.W. Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference // *Nature Communications*, 2016, Vol. 7, No. 1, P. 10838.

36. Espinoza C., Guzman S.J., Zhang X., Jonas P. Parvalbumin+ interneurons obey unique connectivity rules and establish a powerful lateral-inhibition microcircuit in dentate gyrus // *Nature Communications*, 2018, Vol. 9, No. 1, P. 4605.
37. Field R.E., D'amour J.A., Tremblay R., Miehl C., Rudy B., Gjorgjieva J., Froemke R.C. Heterosynaptic Plasticity Determines the Set Point for Cortical Excitatory-Inhibitory Balance // *Neuron*, 2020, Vol. 106, No. 5, P. 842-854.e4.
38. Fonseca R., Nagerl U., Morris R., Bonhoeffer T. Competing for MemoryHippocampal LTP under Regimes of Reduced Protein Synthesis // *Neuron*, 2004, Vol. 44, No. 6, P. 1011-1020.
39. Freund T.F., Katona I. Perisomatic Inhibition // *Neuron*, 2007, Vol. 56, No. 1, P. 33-42.
40. Freund T.F., Katona I., Piomelli D. Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling // *Physiological Reviews*, 2003, Vol. 83, No. 3, P. 1017-1066.
41. Froemke Dendritic synapse location and neocortical spike-timing-dependent plasticity // *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2010.
42. Froemke R.C., Poo M., Dan Y. Spike-timing-dependent synaptic plasticity depends on dendritic location, 2005, Vol. 434, P. 5.
43. Gage F.H. Mammalian Neural Stem Cells // *Science*, 2000, Vol. 287, No. 5457, P. 1433-1438.
44. Gao A., Xia F., Guskjolen A.J., Ramsaran A.I., Santoro A., Josselyn S.A., Frankland P.W. Elevation of Hippocampal Neurogenesis Induces a Temporally Graded Pattern of Forgetting of Contextual Fear Memories // *The Journal of Neuroscience*, 2018, Vol. 38, No. 13, P. 3190-3198.
45. Ge S., Yang C., Hsu K., Ming G., Song H. A Critical Period for Enhanced Synaptic Plasticity in Newly Generated Neurons of the Adult Brain // *Neuron*, 2007, Vol. 54, No. 4, P. 559-566.
46. Gloveli T. Hippocampal spatial navigation: interneurons take responsibility // *The Journal of Physiology*, 2010, Vol. 588, Hippocampal spatial navigation, No. 23, P. 4609-4610.

47. Gross C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma // Nature Reviews Neuroscience, 2000, Vol. 1, Neurogenesis in the adult brain, No. 1, P. 67-73.

48. Han E.B., Heinemann S.F. Distal Dendritic Inputs Control Neuronal Activity by Heterosynaptic Potentiation of Proximal Inputs // Journal of Neuroscience, 2013, Vol. 33, No. 4, P. 1314-1325.

49. Hanes A.L., Koesters A.G., Fong M., Altimimi H.F., Stellwagen D., Wenner P., Engisch K.L. Divergent Synaptic Scaling of Miniature EPSCs following Activity Blockade in Dissociated Neuronal Cultures // The Journal of Neuroscience, 2020, Vol. 40, No. 21, P. 4090-4102.

50. Hardingham N.R., Hardingham G.E., Fox K.D., Jack J.J.B. Presynaptic Efficacy Directs Normalization of Synaptic Strength in Layer 2/3 Rat Neocortex After Paired Activity // Journal of Neurophysiology, 2007, Vol. 97, No. 4, P. 2965-2975.

51. Hebb D.O. The organization of behavior: A neuropsychological theory. – New York: John Wiley and Sons, Inc., 1949. – 335 p.

52. Hiratani N., Fukai T. Detailed Dendritic Excitatory/Inhibitory Balance through Heterosynaptic Spike-Timing-Dependent Plasticity // The Journal of Neuroscience, 2017, Vol. 37, No. 50, P. 12106-12122.

53. Hsieh H., Boehm J., Sato C., Iwatsubo T., Tomita T., Sisodia S., Malinow R. AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss // Neuron, 2006, Vol. 52, No. 5, P. 831-843.

54. Ilin V., Malyshev A., Wolf F., Volgushev M. Fast Computations in Cortical Ensembles Require Rapid Initiation of Action Potentials // Journal of Neuroscience, 2013, Vol. 33, No. 6, P. 2281-2292.

55. Inagaki T., Begum T., Reza F., Horibe S., Inaba M., Yoshimura Y., Komatsu Y. Brain-derived neurotrophic factor-mediated retrograde signaling required for the induction of long-term potentiation at inhibitory synapses of visual cortical pyramidal neurons // Neuroscience Research, 2008, Vol. 61, No. 2, P. 192-200.

56. Inokuchi K. Adult neurogenesis and modulation of neural circuit function // Current Opinion in Neurobiology, 2011, Vol. 21, No. 2, P. 360-364.

57. Jin X. The role of neurogenesis during development and in the adult brain // *European Journal of Neuroscience*, 2016, Vol. 44, No. 6, P. 2291-2299.
58. Joshi V.V., Patel N.D., Rehan M.A., Kuppa A. Mysterious Mechanisms of Memory Formation: Are the Answers Hidden in Synapses? // *Cureus*, 2019, Mysterious Mechanisms of Memory Formation.
59. Jungenitz T., Beining M., Radic T., Deller T., Cuntz H., Jedlicka P., Schwarzacher S.W. Structural homo- and heterosynaptic plasticity in mature and adult newborn rat hippocampal granule cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, Vol. 115, No. 20, P. E4670-E4679.
60. Karten Y.J.G., Jones M.A., Jeurling S.I., Cameron H.A. GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus // *Hippocampus*, 2006, Vol. 16, No. 3, P. 312-320.
61. Kato H.K., Watabe A.M., Manabe T. Non-Hebbian Synaptic Plasticity Induced by Repetitive Postsynaptic Action Potentials // *Journal of Neuroscience*, 2009, Vol. 29, No. 36, P. 11153-11160.
62. Kerchner G.A., Nicoll R.A. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP // *Nature Reviews Neuroscience*, 2008, Vol. 9, No. 11, P. 813-825.
63. Knoblauch A., Körner E., Körner U., Sommer F.T. Structural Synaptic Plasticity Has High Memory Capacity and Can Explain Graded Amnesia, Catastrophic Forgetting, and the Spacing Effect // *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, No. 5, P. e96485.
64. Kondo M., Kitajima T., Fujii S., Tsukada M., Aihara T. Modulation of synaptic plasticity by the coactivation of spatially distinct synaptic inputs in rat hippocampal CA1 apical dendrites // *Brain Research*, 2013, Vol. 1526, P. 1-14.
65. Kuczewski N., Langlois A., Fiorentino H., Bonnet S., Marissal T., Diabira D., Ferrand N., Porcher C., Gaiarsa J.-L. Spontaneous glutamatergic activity induces a BDNF-dependent potentiation of GABAergic synapses in the newborn rat hippocampus: Activity and GABAergic synaptic plasticity // *The Journal of Physiology*, 2008, Vol. 586, Spontaneous glutamatergic activity induces a BDNF-

dependent potentiation of GABAergic synapses in the newborn rat hippocampus, No. 21, P. 5119-5128.

66. Kurotani T., Yamada K., Yoshimura Y., Crair M.C., Komatsu Y. State-Dependent Bidirectional Modification of Somatic Inhibition in Neocortical Pyramidal Cells // *Neuron*, 2008, Vol. 57, No. 6, P. 905-916.

67. Kurotani T., Yoshimura Y., Komatsu Y. Postsynaptic firing produces long-term depression at inhibitory synapses of rat visual cortex // *Neuroscience Letters*, 2003, Vol. 337, No. 1, P. 1-4.

68. Lange M.D., Doengi M., Lesting J., Pape H.C., Jüngling K. Heterosynaptic long-term potentiation at interneuron-principal neuron synapses in the amygdala requires nitric oxide signalling: GABAergic long-term potentiation // *The Journal of Physiology*, 2012, Vol. 590, Heterosynaptic long-term potentiation at interneuron-principal neuron synapses in the amygdala requires nitric oxide signalling, No. 1, P. 131-143.

69. Larkum M.E., Zhu J.J., Sakmann B. A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers // *Nature*, 1999, Vol. 398, No. 6725, P. 338-341.

70. Lee C.M., Stoelzel C., Chistiakova M., Volgushev M. Heterosynaptic plasticity induced by intracellular tetanization in layer 2/3 pyramidal neurons in rat auditory cortex: Heterosynaptic plasticity in auditory cortex // *The Journal of Physiology*, 2012, Vol. 590, Heterosynaptic plasticity induced by intracellular tetanization in layer 2/3 pyramidal neurons in rat auditory cortex, No. 10, P. 2253-2271.

71. Lee K.F.H., Soares C., Thivierge J.-P., Béique J.-C. Correlated Synaptic Inputs Drive Dendritic Calcium Amplification and Cooperative Plasticity during Clustered Synapse Development // *Neuron*, 2016, Vol. 89, No. 4, P. 784-799.

72. Letzkus J.J., Kampa B.M., Stuart G.J. Learning Rules for Spike Timing-Dependent Plasticity Depend on Dendritic Synapse Location // *Journal of Neuroscience*, 2006, Vol. 26, No. 41, P. 10420-10429.

73. Lindvall O., Kokaia Z. Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2015, Vol. 7, No. 11, P. a019034.

74. Lisman J. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. // Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989, Vol. 86, No. 23, P. 9574-9578.

75. Lisman J.E. Three Ca²⁺ levels affect plasticity differently: the LTP zone, the LTD zone and no man's land // The Journal of Physiology, 2001, Vol. 532, Three Ca²⁺ levels affect plasticity differently, No. 2, P. 285-285.

76. Lourenço J., Pacioni S., Rebola N., Woerden G.M. van, Marinelli S., DiGregorio D., Bacci A. Non-associative Potentiation of Perisomatic Inhibition Alters the Temporal Coding of Neocortical Layer 5 Pyramidal Neurons // PLoS Biology, 2014, Vol. 12, No. 7, P. e1001903.

77. Luscher C., Malenka R.C. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD) // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012, Vol. 4, No. 6, P. a005710-a005710.

78. Lynch G.S., Dunwiddie T., Gribkoff V. Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation // Nature, 1977, Vol. 266, Heterosynaptic depression, No. 5604, P. 737-739.

79. Magee J.C., Grienberger C. Synaptic Plasticity Forms and Functions // Annual Review of Neuroscience, 2020, Vol. 43, No. 1, P. 95-117.

80. Maher B.J., LoTurco J.J. Disrupted-in-Schizophrenia (DISC1) Functions Presynaptically at Glutamatergic Synapses // PLoS ONE, 2012, Vol. 7, No. 3, P. e34053.

81. Malenka R.C., Nicoll and R.A. Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? // Science, 1999, Vol. 285, No. 5435, P. 1870-1874.

82. Malenka R.C., Nicoll R.A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms // Trends in Neurosciences, 1993, Vol. 16, NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity, No. 12, P. 521-527.

83. Marín-Burgin A., Mongiat L.A., Pardi M.B., Schinder A.F. Unique Processing During a Period of High Excitation/Inhibition Balance in Adult-Born Neurons // *Science*, 2012, Vol. 335, No. 6073, P. 1238-1242.

84. Markwardt S.J., Wadiche J.I., Overstreet-Wadiche L.S. Input-Specific GABAergic Signaling to Newborn Neurons in Adult Dentate Gyrus // *Journal of Neuroscience*, 2009, Vol. 29, No. 48, P. 15063-15072.

85. Mayford M., Baranes D., Podsypanina K., Kandel E.R. The 3'-untranslated region of CaMKII α is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, P. 6.

86. McAvoy K.M., Scobie K.N., Berger S., Russo C., Guo N., Decharatanachart P., Vega-Ramirez H., Miake-Lye S., Whalen M., Nelson M., Bergami M., Bartsch D., Hen R., Berninger B., Sahay A. Modulating Neuronal Competition Dynamics in the Dentate Gyrus to Rejuvenate Aging Memory Circuits // *Neuron*, 2016, Vol. 91, No. 6, P. 1356-1373.

87. Miller S.M., Sahay A. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing // *Nature Neuroscience*, 2019, Vol. 22, No. 10, P. 1565-1575.

88. Miyashita T., Wintzer M., Kurotani T., Konishi T., Ichinohe N., Rockland K.S. Neurotrophin-3 Is Involved in the Formation of Apical Dendritic Bundles in Cortical Layer 2 of the Rat // *Cerebral Cortex*, 2010, Vol. 20, No. 1, P. 229-240.

89. Mongiat L.A., Espósito M.S., Lombardi G., Schinder A.F. Reliable Activation of Immature Neurons in the Adult Hippocampus // *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, No. 4, P. e5320.

90. Nugent F.S., Penick E.C., Kauer J.A. Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses // *Nature*, 2007, Vol. 446, No. 7139, P. 1086-1090.

91. Oliveira J.F., Sardinha V.M., Guerra-Gomes S., Araque A., Sousa N. Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior // *Trends in Neurosciences*, 2015, Vol. 38, Do stars govern our actions?, No. 9, P. 535-549.

92. Pan Y.-W., Chan G.C.K., Kuo C.T., Storm D.R., Xia Z. Inhibition of Adult Neurogenesis by Inducible and Targeted Deletion of ERK5 Mitogen-Activated Protein Kinase Specifically in Adult Neurogenic Regions Impairs Contextual Fear Extinction and Remote Fear Memory // *Journal of Neuroscience*, 2012, Vol. 32, No. 19, P. 6444-6455.
93. Pannasch U., Sibille J., Rouach N. Dual Electrophysiological Recordings of Synaptically-evoked Astroglial and Neuronal Responses in Acute Hippocampal Slices // *Journal of Visualized Experiments*, 2012, No. 69, P. 4418.
94. Pfeiffer B.E., Huber K.M. Current Advances in Local Protein Synthesis and Synaptic Plasticity // *Journal of Neuroscience*, 2006, Vol. 26, No. 27, P. 7147-7150.
95. Pozueta J., Lefort R., Shelanski M.L. Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models // *Neuroscience*, 2013, Vol. 251, P. 51-65.
96. Ravin R., Parnas H., Spira M.E., Volfovsky N., Parnas I. Simultaneous Measurement of Evoked Release and $[Ca^{2+}]_i$ in a Crayfish Release Bouton Reveals High Affinity of Release to Ca^{2+} // *Journal of Neurophysiology*, 1999, Vol. 81, No. 2, P. 634-642.
97. Reyes A., Sakmann B. Developmental Switch in the Short-Term Modification of Unitary EPSPs Evoked in Layer 2/3 and Layer 5 Pyramidal Neurons of Rat Neocortex // *The Journal of Neuroscience*, 1999, Vol. 19, No. 10, P. 3827-3835.
98. Royer S., Paré D. Conservation of total synaptic weight through balanced synaptic depression and potentiation // *Nature*, 2003, Vol. 422, No. 6931, P. 518-522.
99. Rozov A.V., Valiullina F.F., Bolshakov A.P. Mechanisms of long-term plasticity of hippocampal GABAergic synapses // *Biochemistry (Moscow)*, 2017, Vol. 82, No. 3, P. 257-263.
100. Schmidt-Hieber C., Jonas P., Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus, 2004, Vol. 429, P. 4.
101. Scoville W., Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions, 1957, Vol. 20, P. 11-21.

102. Seki T. Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents // *Journal of Neuroscience Research*, 2002, Vol. 70, No. 3, P. 327-334.
103. Serafini R., Ma W., Maric D., Maric I., Lahjouji F., Sieghart W., Barker J.L. Rat embryonic GABAA receptor heterogeneous channel properties // *European Journal of Neuroscience*, 1998, P. 13.
104. Sieber A.R., Min R., Nevian T. Non-Hebbian Long-Term Potentiation of Inhibitory Synapses in the Thalamus // *Journal of Neuroscience*, 2013, Vol. 33, No. 40, P. 15675-15685.
105. Singh A., Abraham W.C. Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease // *Experimental Brain Research*, 2017, Vol. 235, No. 6, P. 1645-1655.
106. Sjöström P.J., Häusser M. A Cooperative Switch Determines the Sign of Synaptic Plasticity in Distal Dendrites of Neocortical Pyramidal Neurons // *Neuron*, 2006, Vol. 51, No. 2, P. 227-238.
107. Skorheim S., Lonjers P., Bazhenov M. A Spiking Network Model of Decision Making Employing Rewarded STDP // *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, No. 3, P. e90821.
108. Smith N.A., Bekar L.K., Nedergaard M. Astrocytic Endocannabinoids Mediate Hippocampal Transient Heterosynaptic Depression // *Neurochemical Research*, 2020, Vol. 45, No. 1, P. 100-108.
109. Snyder J.S., Choe J.S., Clifford M.A., Jeurling S.I., Hurley P., Brown A., Kamhi J.F., Cameron H.A. Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice // *Journal of Neuroscience*, 2009, Vol. 29, No. 46, P. 14484-14495.
110. Steindel F., Lerner R., Häring M., Ruehle S., Marsicano G., Lutz B., Monory K. Neuron-type specific cannabinoid-mediated G protein signalling in mouse hippocampus // *Journal of Neurochemistry*, 2013, Vol. 124, No. 6, P. 795-807.
111. Swanwick C.C., Murthy N.R., Mchedlishvili Z., Sieghart W., Kapur J. Development of γ -aminobutyric acidergic synapses in cultured hippocampal neurons // *The Journal of Comparative Neurology*, 2006, Vol. 495, No. 5, P. 497-510.

112. Tabata H., Nakajima K. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex // *Neuroscience*, 2001, Vol. 103, Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation, No. 4, P. 865-872.

113. Teyler T.J., DiScenna P. The Hippocampal Memory Indexing Theory, P. 8.

114. Thomson A.M., Bannister A.P. Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex, 1998, Vol. 84, No. 3, P. 669-683.

115. Tosetti P., Ferrand N., Brun I.C.-L., Gaiarsa J.L. Epileptiform activity triggers long-term plasticity of GABA_B receptor signalling in the developing rat hippocampus: Long-term plasticity of GABA_B receptor signalling // *The Journal of Physiology*, 2005, Vol. 568, Epileptiform activity triggers long-term plasticity of GABA_B receptor signalling in the developing rat hippocampus, No. 3, P. 951-966.

116. Trincherro M.F., Herrero M., Monzón-Salinas M.C., Schinder A.F. Experience-Dependent Structural Plasticity of Adult-Born Neurons in the Aging Hippocampus // *Frontiers in Neuroscience*, 2019, Vol. 13, P. 739.

117. Praag H. van, Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus // *Nature*, 2002, Vol. 415, No. 6875, P. 1030-1034.

118. Vitolo O.V., Sant'Angelo A., Costanzo V., Battaglia F., Arancio O., Shelanski M. Amyloid β -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: Reversibility by drugs that enhance cAMP signaling // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, Vol. 99, Amyloid β -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation, No. 20, P. 13217-13221.

119. Volgushev M., Balaban P., Chistiakova M., Eysel U.T. Retrograde signalling with nitric oxide at neocortical synapses: Retrograde signalling in the neocortex // *European Journal of Neuroscience*, 2000, Vol. 12, Retrograde signalling with nitric oxide at neocortical synapses, No. 12, P. 4255-4267.

120. Volgushev M., Chen J.-Y., Ilin V., Goz R., Chistiakova M., Bazhenov M. Partial Breakdown of Input Specificity of STDP at Individual Synapses Promotes New Learning // *The Journal of Neuroscience*, 2016, Vol. 36, No. 34, P. 8842-8855.
121. Volgushev M., Voronin L.L., Chistiakova M., Singer W. Relations between long-term synaptic modifications and paired-pulse interactions in the rat neocortex, 1997, Vol. 9, No. 8, P. 1656-1665.
122. Volgushev M., Voronin L.L., Chistiakova M., Singer W. Induction of LTP and LTD in visual cortex neurones by intracellular tetanization // *NeuroReport*, 1994, Vol. 5, No. 16.
123. Von der Malsburg C. Self-organization of orientation sensitive cells in the striate cortex, 1973, P. 16.
124. Wilent W.B., Nitz D.A. Discrete Place Fields of Hippocampal Formation Interneurons // *Journal of Neurophysiology*, 2007, Vol. 97, No. 6, P. 4152-4161.
125. Xu J., Wu L.-G. The Decrease in the Presynaptic Calcium Current Is a Major Cause of Short-Term Depression at a Calyx-Type Synapse // *Neuron*, 2005, Vol. 46, No. 4, P. 633-645.
126. Yang S.-N., Tang Y.-G., Zucker R.S. Selective Induction of LTP and LTD by Postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ Elevation // *Journal of Neurophysiology*, 1999, Vol. 81, No. 2, P. 781-787.
127. Young J.Z., Isiegas C., Abel T., Nguyen P.V. Metaplasticity of the late-phase of long-term potentiation: a critical role for protein kinase A in synaptic tagging: PKA and metaplasticity of synaptic tagging // *European Journal of Neuroscience*, 2006, Vol. 23, Metaplasticity of the late-phase of long-term potentiation, No. 7, P. 1784-1794.
128. Younts T.J., Chevaleyre V., Castillo P.E. CA1 Pyramidal Cell Theta-Burst Firing Triggers Endocannabinoid-Mediated Long-Term Depression at Both Somatic and Dendritic Inhibitory Synapses // *Journal of Neuroscience*, 2013, Vol. 33, No. 34, P. 13743-13757.

129. Yu Z.-Y., Wang W., Fritschy J.-M., Witte O.W., Redecker C. Changes in neocortical and hippocampal GABAA receptor subunit distribution during brain maturation and aging // *Brain Research*, 2006, Vol. 1099, No. 1, P. 73-81.

130. Zhang P., Bannon N.M., Ilin V., Volgushev M., Chistiakova M. Adenosine effects on inhibitory synaptic transmission and excitation-inhibition balance in the rat neocortex: Adenosine modulates inhibition in the neocortex // *The Journal of Physiology*, 2015, Vol. 593, Adenosine effects on inhibitory synaptic transmission and excitation-inhibition balance in the rat neocortex, No. 4, P. 825-841.

131. Zhang Y., Guo O., Huo Y., Wang G., Man H.-Y. Amyloid- β Induces AMPA Receptor Ubiquitination and Degradation in Primary Neurons and Human Brains of Alzheimer's Disease, 2019, P. 18.

132. Zhou Q., Homma K.J., Poo M. Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses // *Neuron*, 2004, Vol. 44, No. 5, P. 749-757.

133. Zhuo J.-M., Tseng H., Desai M., Bucklin M.E., Mohammed A.I., Robinson N.T., Boyden E.S., Rangel L.M., Jasanoff A.P., Gritton H.J., Han X. Young adult born neurons enhance hippocampal dependent performance via influences on bilateral networks // *eLife*, 2016, Vol. 5, P. e22429.

134. Zucker R.S., Regehr W.G. Short-Term Synaptic Plasticity // *Annual Review of Physiology*, 2002, Vol. 64, No. 1, P. 355-405.