

На правах рукописи

Никитин Евгений Сергеевич

Пространственная организация нервной клетки как основа клеточных и сетевых механизмов пластичности.

03.03.01 «Физиология»

Биологические науки

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Москва, 2015

Работа выполнена в лаборатории Клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (директор – член-корреспондент РАН, Балабан П.М.).

Научный консультант:

член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор Балабан П.М.

Официальные оппоненты:

Гайнутдинов Х.Л. - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Open Lab Нейробиология Института фундаментальной медицины Казанского федерального университета, профессор.

Дьяконова В.Е. - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейробиологии развития ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

Черноризов А.М. - доктор психологических наук, профессор, заведующий кафедрой психофизиологии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук институт физиологии им. И. П. Павлова РАН.

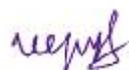
Защита состоится 25 февраля 2015 г. в 14:00 часов на заседании специализированного ученого совета (Д-002.044.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (г. Москва, ул. Бутлерова, 5а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИВНД и НФ РАН и на сайте [www.ihna.ru](http://www.ihna.ru).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук



В.Н. Иерусалимский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

*Актуальность работы.* Настоящая работа направлена на изучение клеточных и молекулярных механизмов нейронной пластичности, связанной с изменением нейронной возбудимости, принимающей участие в формировании долговременной памяти и адаптивного поведения. Изучение электрической активности и пластичности нейронных сетей, отдельных нервных клеток и субклеточных компартментов на современном этапе невозможно без применения оптических методов визуализации электрических сигналов, позволяющих регистрировать электрические события как во многих нейронах одновременно, так и в отдельных дендритах и аксонах, приводя им в соответствие точное морфологическое изображение. Применение оптической регистрации является единственным из малого числа доступных сегодня методов, сочетающим высокое пространственное разрешение (до 1 мкм) с возможностью регистрации сверхбыстрых сигналов ( $<0.1$  мсек) в реальном времени, и обеспечивающим высокое соотношение сигнал/шум.

Общепринятая точка зрения на пластичность в нервной системе уделяет основное внимание синаптическим контактам между нейронами, считая их наиболее важными и многообещающими точками пластических изменений, связанными с памятью. Синаптические механизмы часто представляют как первичный механизм, формирующий память (Giese et al. 2001). Формы несинаптической пластичности, такие как повышенная соматическая и дендритная возбудимость или повышение мембранного потенциала также были отмечены как на беспозвоночных, так и на позвоночных экспериментальных системах (Debanne et al. 2003). Недавние многочисленные свидетельства привели к широкому признанию факта того, что несинаптические изменения функционирования нейрона наряду с модификацией синапсов являются субстратом для долговременной памяти (Zhang & Linden, 2003, Magee et al., 2005).

Нейрофизиологический анализ модельных систем моллюсков внес значительный вклад в наше понимание клеточных механизмов неассоциативных

изменений состояния системы, определяющего поведение, которые эквивалентны роли ориентировочной реакции у позвоночных (Brezina et al., 2003; Kupfermann 1974; Marinesco et al., 2004). К важному типу идентифицируемых модуляторных нейронов, обладающих функцией «устанавливания» поведенческого состояния в сети пищевого поведения, относятся гигантские клетки церебральных ганглиев (CGC) улиток *Lymnaea* (Yeoman et al., 1994). Недавние данные позволили связать нейроны CGC с механизмами ассоциативной долговременной памяти (Kemenes et al., 2001). Хотя есть довольно много доступной информации о проявлении несинаптической пластичности как результата нейрональных процессов при обучении, но гораздо меньше известно о том, как она вызывает постоянное измененное поведение после обучения. Пока остается неизвестным, каким образом несинаптическая пластичность может вносить вклад в изменение состояния нейронных сетей, от которого напрямую зависит память. Объяснение того, как несинаптическая пластичность транслируется в модифицированное состояние нейронной сети и измененное поведение, является одной из важнейших задач современных исследований в области обучения и памяти. Также, без ясной картины устройства клеточной пластичности на уровне всех компартментов нейрона невозможно глубокое понимание клеточных механизмов обучения и памяти.

Осцилляторная нейрональная активность широко распространена в обонятельных системах, как позвоночных, так и беспозвоночных (Gray & Skinner, 1988; Laurent & Davidowitz, 1994). У наземных моллюсков спонтанные осцилляции генерируются в процеребральном (PC) отделе ЦНС, где происходит обработка обонятельной информации (Gelperin & Tank, 1990). Возможность того, что широко распространенные обонятельные осцилляции могут являться частью механизма моторного контроля и влияют на формирование видоизмененного обонятельного поведения при обучении остается пока неизученной.

В дополнение к известным командным нейронам оборонительного поведения, у улиток описана группа серотонин-содержащих модуляторных нейронов сети, также участвующей в оборонительном поведении этих животных (Zakharov et al., 1995). Разряды в этих нейронах не вызывают самостоятельно определенных форм поведения, но изменяют поведенческие ответы в ответ на неприятные раздражители: эти свойства подпадают под описания модуляторных нейронов. Ранее опубликованные результаты показывают необходимость изучения роли серотонинергических нейронов как главных участников реализации поведенческого привыкания и выработки контекстуального аверзивного условного рефлекса на пищу (Balaban et al., 1987).

На современном этапе изучение электрической активности и пластичности нейронных сетей, отдельных нервных клеток и субклеточных компартментов невозможно без применения оптических методов визуализации функциональных сигналов (таких, как, например, визуализация концентрации внутриклеточного кальция), позволяющих регистрировать электрические события как во многих нейронах одновременно, так и в отдельных дендритах и аксонах, приводя им в соответствие точное морфологическое изображение. В последнее десятилетие произошел значительный прогресс в применении потенциал-зависимых красителей (ПЗК), в частности были получены данные о возникновении и кодировании электрических сигналов аксоном и дендритами, которые невозможно получить другим способом (Foust et al., 2010).

На современном уровне знаний исследования проблем пластичности и памяти с применением методов классической электрофизиологии и нейробиологии на модельных системах позволили накопить достаточно большой объем информации. Однако, этого пока недостаточно, чтобы качественно приблизиться к решению этих проблем без методов более высокого уровня, таких, как примененные в этой работе методы оптической регистрации функциональной электрической активности нейронов. Также представляется очень важным, чтобы успешные для простых нервных систем методы были

адаптированы для перспективных исследований клеточных механизмов памяти на более сложных системах млекопитающих.

**Цели и задачи исследования.** Основной целью работы являлось исследование нейронных механизмов поведения и пластических перестроек при обучении с использованием оптической регистрации электрической активности нейронов на разных уровнях. Для каждого уровня организации нейронной сети, начиная от субнейронных компартментов и заканчивая сложными осциллирующими сетями, требовалось разработать специальный оптофизиологический подход с привлечением дополнительных поведенческих, иммуноцитохимических, цитологических и других методик экспериментальной нейробиологии. В соответствии с нашими целями и выбранными модельными системами были поставлены следующие задачи:

1) Продемонстрировать несинаптическую пластичность, связанную с условным пищевым обучением, исследовать ее ионноканальные механизмы, выявить участвующие специфические нейрональные компартменты, а также выявить и объяснить возможную связь этой пластичности с изменением синаптической эффективности, необходимой для реализации видоизмененного поведения.

2) Выявить связь между ответами мотонейрона ретрактора щупальца на запахи с паттернами ритмических осцилляций в мозге улитки, изменяющихся в процессе обучения. Определить механизм, с помощью которого осцилляции в обонятельном мозге могут влиять на ориентировочное ольфакторное поведение до и после обучения.

3) Выяснить структуру сенсорных входов, внутреннюю организацию и механизмы формирования нисходящих влияний модуляторной сети оборонительного поведения улитки, необходимые для реализации оборонительного поведения. Разработать подход к оптическому картированию нейронных популяций в соответствии с функциональными характеристиками и степенью синхронности нейронных подкластеров.

4) Оценить перспективы применения методов оптической регистрации функциональных электрических сигналов, разработанных для изучения клеточных основ обучения и пластичности беспозвоночных, для анализа более сложных систем млекопитающих.

**Научная новизна работы.** Используя парадигму классического обучения вместе с электрофизиологическим и оптофизиологическим анализом, были впервые описаны клеточные механизмы, с помощью которых вызванные обучением несинаптические электрические изменения в нейрональной соме, расположенной далеко от синаптических областей, переходят в эффекты, проявляющиеся на уровне нейронных сетей и синапсов. Было продемонстрировано, что увеличение постоянного натриевого тока в ключевом для поведения модуляторном нейроне стоит за отставленной постоянной деполяризацией, появляющейся в этом нейроне после обучения животного классическому условному рефлексу. Дальнейший анализ показал, что связующим звеном между несинаптическими изменениями в нейроне и компартиментализованными изменениями в синаптической эффективности служит локальная потенциал-зависимая инактивация калиевого тока А-типа.

На модели простой сенсорной и моторной системы было показано, что в обонятельной системе взаимодействие осцилляторной активности и активности отдельного нейрона играет важную роль в тонкой настройке ориентационного поведения к изменяющимся условиям окружающей среды. Согласно нашим данным, тормозная связь между обонятельным мозгом и мотонейроном ретрактора щупальца также может служить субстратом для модификаций нейронных связей, лежащих в основе аверзивного обучения на запахах.

Анализ ответов нейронов серотонинергической группы оптическими и электрофизиологическими методами определил функционирование всей группы как единой сети модуляции оборонительного поведения с одним гигантским «выходным» нейроном, которому остальные нейроны делегируют функцию общения с остальной нервной системой. Эксперименты, проведенные на переживающих срезах мозга млекопитающего, подтвердили возможность и

перспективность адаптации оптических методов регистрации нейронной активности для исследований нейронной пластичности и клеточных механизмов памяти на системах млекопитающих.

На сегодняшний день использованная в нашей работе модельная система наземного моллюска *Lymnaea* – единственный объект, где удалось продемонстрировать участие постоянного натриевого тока в отдельном нейроне в процессах обучения и формирования памяти. В том числе, по материалам основных исследований по несинаптической пластичности было опубликовано 3 экспериментальных статьи в высокоцитируемом международном журнале *Current Biology* (пятилетний импакт ISI = 10.5). Сравнение проведения потенциала по аксону моллюска и млекопитающего выявило общность его механизмов на этих системах. По сравнению с этими работами мы не только смогли продемонстрировать изменение проводимости, но и напрямую связать его с локализацией пресинапсов нейрона, подвергающегося пластической перестройке, а также продемонстрировать связь с обучением в прямом эксперименте, подобный которому на сегодняшний день на млекопитающих пока невозможен. Совершенно новым описанным механизмом является несинаптическая пластичность, позволяющая реализовать увеличение эффективности синаптической передачи на субклеточном уровне путем досинаптической обработки электрических сигналов в специфических нейрональных компартментах.

Благодаря использованию метода оптической регистрации для исследования клеточных механизмов поведения и обучения удалось получить принципиально новые данные, которые невозможно получить другим способом, критически необходимые для понимания процессов пластичности и работы нервной системы. Разработанные подходы позволяют обнаруживать и объяснять явления пластичности на трех уровнях: 1) субклеточном, включая нейрональные отдельные ветви; 2) клеточном, включая электрическую активность отдельных нейронов; 3) на нейросетевом, включая синхронизованные ответы большого числа нейронов или их пространственно-обособленных компартментов во

взаимодействии с управляющими/моторными нейронами, реализующими поведение. Разработанные на системах беспозвоночных методы применимы на млекопитающих и обладают потенциалом для дальнейших исследований.

***Теоретическое и научно-практическое значение работы.*** Совокупность представленных данных о клеточных механизмах обучения и поведении может найти применение при конструировании нейрокибернетических систем и компьютерных моделей мозга. Методы оптической регистрации активности нейрональных компартментов и мультинейронной активности с использованием потенциал-зависимых красителей (ПЗК) являются инновационными, применяются небольшим числом лабораторий в мире, и результаты, полученные таким способом, уникальны, не воспроизводимы другими методами и имеют важнейшее значение для формирования новых теорий о хранении памяти. Внедрение описанных в работе методов оптической регистрации позволит разработать новые подходы в нейрохирургии и более точно оценить эффективность и безопасность воздействий на мозг.

***Положения, выносимые на защиту.***

1. Компартментализация строения нейрона и функциональная специализация его отростков и синапсов являются основой для эффективного хранения и воспроизведения следов долговременной ассоциативной памяти.

2. Несинаптическая долговременная пластичность может реализовываться в изменении эффективности выходных синапсов нейрона путем изменения параметров генерации потенциала действия, что является одним из существенных механизмов хранения следов памяти на уровне отдельного нейрона.

***Апробация.*** Материалы диссертации апробировались как доклады на многочисленных отечественных и международных конференциях и семинарах, включая съезд Физиологического общества имени Павлова (2007), всемирный конгресс IBRO (2003), съезды Общества нейронаук США (2005, 2006, 2008, 2009, 2011, 2013 годы), съезд Европейского общества нейронаук (2004), съезд Британской ассоциации нейронаук (2005), международные конференции

«Простые нервные системы» (2009, 2011, 2012) и др. Проведены доклады и семинары в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (Москва), в Институте биологии гена РАН (Москва), на факультете наук о жизни в университете Сассекса (Великобритания), психологическом факультете университета Коннектикута (США), в медицинской школе университета Техаса (США), в Бостонском университете (США) и университете Гейдельберга (Германия). Часть работы проведена в сотрудничестве с Центром нейронаук беспозвоночных (Сассекс, Великобритания).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, четырех глав с изложением результатов и их обсуждением, заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 1 таблицу и 66 рисунков.

## **МЕТОДЫ.**

**Животные и экспериментальные препараты.** Для работы использовались взрослые виноградные улитки *Helix lucorum* L. крымской популяции, пресноводные улитки *Lymnaea stagnalis* лабораторной популяции. В работе использовали препараты изолированной ЦНС или ЦНС с нервами и периферическими обонятельными структурами, губами, ретракторами щупальца или частью кожи. Серотонинергические нейроны идентифицировали с помощью пигментации 5,7-диокситриптамином. Срезы зрительной коры крыс Wistar P15-P21 (300 мкм) приготавливали на вибраторе.

**Электрофизиологическая регистрация.** Для экстраклеточного отведения активности использовали заполненный физиологическим раствором тонкий присасывающий электрод. Сигнал усиливался в 10000 раз с полосой пропускания усилителя 0.1-50 Гц. Клеточную активность от нервов отводили *en passant*. Внутриклеточное отведение проводили стеклянным микроэлектродом, заполненным раствором 1.5М КСl и 1М КСН<sub>3</sub>СО<sub>2</sub>. Для регистрации методом пэч-кламп использовали стандартные внутриклеточный раствор и искусственную цереброспинальную жидкость. Аппликацию фармакологических

веществ проводили микропипеткой в ванночку до финальной концентрации  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  мМоль/л.

**Оптическая регистрация.** Сигнал, получаемый при регистрации электрической активности нейронных структур оптическими методами, представляет собой суммацию мембранных потенциалов нейронов, проецируемых на фоточувствительные элементы матрицы (Cohen, 1988). Микроскоп крепился к антивибрационному основанию; на микроскопе использовали контактный объектив ЛК x25, 0.4 NA, водноимерсионный объектив Plan x20, 0.50 NA, x30 (N.A. =0.9). До препарата свет проходил через тепловой фильтр и фильтр с необходимой полосой пропускания. Сигнал усиливали и оцифровывали на 12-битном АЦП DAPL 3000A. Пространственное разрешение составляло 0.05 мм на элемент матрицы для ЛК x25, и 0.06 мм для объектива x20. Регистрировали с использованием витальных ПЗК: RH-155, JPW-1131, JPW1114 и JPW1150. Для доставки ПЗК в срезы мозга также использовали биолистическую установку и золотые микропрожектили диаметром 1.6 мкм. Визуализацию окрашивания проводили лазерным сканирующим конфокальным микроскопом LSM 5 live (Zeiss) с лазерами 405, 488 и 532 нм и полосой пропускания 500-540, 550LP или 650LP. Также использовали оптическую регистрацию свободного кальция с флуоресцентным кальций-чувствительным зондом Oregon Green 488 Bapta 1. Для регистрации использовали флуоресцентный микроскоп и систему NeuroCCD (80x80 элементов). Как маркер эндоцитоза использовали флуоресцентный краситель FM4-64.

**Поведенческие эксперименты.** Для изучения биологического значения запаха использовали протокол выработки условного рефлекса в специальной экспериментальной установке (Balaban et al, 1987). Улитку прикрепляли за раковину и позволяли улитке «ползти» по электропроводящему шару, плавающему в 0,01% растворе NaCl. Удары током (~110 мА, 0.5 сек, 10 Гц) наносили металлическим электродом. Обучение проводили в продолжение 16-20 дней, осуществляя по одному сочетанию в день. Улиток *Lymnaea* обучали пищевому рефлексу, сочетая водорастворимые стимулы 0.004% амил-ацетата

(УС) и 0.67% сахарозы (БС) с интервалом 15 с. Контрольной группе предъявляли несочетанные предъявления стимулов, разделенных по времени на 1 час. Сочетания балансировали предъявлением воды. Тестирование условного рефлекса проводили с использованием двойного слепого контроля. Критерием служило число жеваний за период в 2 мин, или «фиктивные жевания», регистрировавшиеся как спайковый разряд в моторных нервах на препарате.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.**

### **НЕСИНАПТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ КАК ОСНОВА АССОЦИАТИВНОЙ ПАМЯТИ И УВЕЛИЧЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ.**

*Постоянный неинактивируемый натриевый ток как мишень для вызванной цАМФ нейрональной пластичности.* В этом разделе исследование проводилось на идентифицированных внешних модуляторных нейронах *Lutpnaea*, известных как гигантские церебральные клетки (CGC). Производя электрофизиологический анализ на полуинтактных препаратах, мы продемонстрировали, что у животных, которым давали единичное сочетание амил-ацетата (условный стимул, УС) с сахарозой (безусловный стимул, БС), нейроны CGC демонстрируют более позитивное значение мембранного потенциала, чем CGC несочетанных контрольных животных. Деполяризации CGC было достаточно, чтобы увеличить ответ нейронной сети на условный стимул, и это увеличение уже появлялось между 16 и 24 часами после процедуры обуславливания, оставаясь столь долго, сколько длилась долговременная память. Деполяризация сомы CGC распространялась на локальные аксональные компартменты и увеличивала силу постсинаптических ответов у CGC. Также, деполяризация CGC приводила к увеличению уровня пресинаптического кальция, что, очевидно, играет роль механизма регуляции, с помощью которого деполяризация может регулировать синаптическую функцию (Awatramani, 2005). На нейросетевом уровне мы продемонстрировали, что

деполяризация CGC повышает спайковый ответ на условный стимул в командных нейронах пищевого поведения, приводя к активации жевания. Мы выбрали нейроны CGC как основной объект для этих экспериментов, потому что они обеспечивают внутреннюю модуляцию пищевой системы. Мы также предположили, что изменения в их электрических свойствах могут обеспечивать поддержание долговременной памяти в изоляции от взаимных синаптических влияний со стороны элементов нейронной сети, напрямую участвующих в генерации приобретенного в ходе обучения поведения.

Одной из тестируемых в работе гипотез было предположение об участии вызванных вторичными посредниками долговременных изменений в ионных токах, приводящих к долговременным изменениям электрических свойств мембраны CGC, затрагивающих входное сопротивление, мембранный потенциал и спонтанную активность, которые являются ключевыми характеристиками, определяющими функцию CGC как модуляторного нейрона. Мы исследовали постоянный натриевый ток, который имеет самый низкий порог активации в CGC (Staras et al., 2002). Этот ток может участвовать в установлении потенциала мембраны нейрона и влиять на подпороговую возбудимость CGC, поэтому потенциально он является важной мишенью пластических изменений, лежащих в основе ассоциативного обучения.

Чтобы изолировать постоянный натриевый ток CGC и охарактеризовать его общие свойства на полной шкале активации от -90 мВ до +30 мВ, использовали бескальциевый раствор, содержащий блокаторы кальциевых и калиевых токов. На мембрану CGC подавали ступеньки потенциала или протоколы медленного нарастания потенциала в режиме фиксации потенциала с уровня удерживаемого потенциала в -110 мВ. Ступенька до потенциала -60 мВ активировала только постоянный входящий ток, в то время как ступенька до значения -30 мВ активировала также и быстрый инактивируемый входящий ток в дополнение к постоянному входящему току  $I_{Na(P)}$ . Оба этих тока были ранее идентифицированы как натриевые (Staras et al., 2002). Мы измеряли значение оценки времени активации (время до полуамплитуды) в ряду потенциалов от -70

до +30 мВ и обнаружили две различные одноэкспоненциальные функции, описывающие зависимость потенциала от латентности полуамплитуды на разных отрезках.

Чтобы исследовать эффект цАМФ на внутренний  $I_{Na(P)}$  нейрона CGC, мы инъецировали цАМФ в культивированные CGC возраста 1 день 10 импульсов цАМФ (концентрация в пипетке 0.1 мМ). Как контроль использовали 5'АМФ, неактивную производную цАМФ, или деполяризующий ток, воспроизводящий прямой эффект цАМФ. Постоянный ток измеряли на изолированных CGC с использованием ступеней потенциала от удерживаемого значения -110 мВ до потенциалов от -85 и до -55 мВ через 10 мин, 1 час, 1.5 часа, 2.5 и 24 часов после инъекции цАМФ или контрольного стимула. Мы обнаружили цАМФ-зависимое увеличение амплитуды  $I_{Na(P)}$ , которое появлялось в интервале между 10 мин и 1 часом после инъекции и длилось  $\leq 24$  часов. Через 1.5 часа после инъекции амплитуда постоянного натриевого тока в клетках, инъецированных цАМФ, была значительно выше, чем у контрольных CGC, инъецированных 5'АМФ, деполяризационного контроля ( $n = 5$  в каждой группе, ANOVA,  $P < 0.05$ , критерий Тьюки,  $P < 0.05$ ) или неинъецированных CGC ( $n = 7$ , критерий Тьюки,  $P < 0.05$ ).

В продолжение одночасового периода после инъекции входное сопротивление достоверно увеличилось в группе CGC, инъецированных цАМФ ( $n = 8$ ) по сравнению с неинъецированными ( $n = 6$ , ANOVA,  $P < 0.05$ ; критерий Тьюки,  $P < 0.05$ ). Одновременно с этим, мембранный потенциал также становился значительно более деполяризованным у CGC, инъецированных цАМФ, по сравнению с клетками, инъецированными 5'АМФ или неинъецированным контролем (ANOVA,  $P < 0.05$ ; критерий Тьюки,  $P < 0.05$ ). Далее, нейрон CGC совместно культивировали с его идентифицированной постсинаптической мишенью, мотонейроном B1 ( $n = 5$ ), и сравнивали амплитуды возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП), вызванных до инъекции цАМФ и через 1 час после инъекции цАМФ в клеточную сому

CGC, и обнаружили значительное увеличение в амплитуде ВПСП, вызываемых CGC в В1 (парный t- критерий,  $P < 0.05$ ).

*Роль отставленной несинаптической пластичности в долговременной ассоциативной памяти.* Мы рассматривали важные проблемы клеточных механизмов формирования памяти, исследуя пример вызванной несинаптической пластичности (деполяризации сомы нейрона), определяющейся изменениями при обучении, также время ее возникновения, длительность сохранения и эффект несинаптической пластичности на синаптически активируемые эфферентные нейронные сети на модельной системе моллюска с хорошо отслеживаемыми свойствами. Наш подход позволяет провести точный временной анализ электрических изменений после обучения и делает возможным соотнесение этих изменений с разнообразными этапами формирования памяти на поведенческом и нейрональном уровнях, что ранее было практически невозможно показать с использованием парадигм многократного предъявления (Brembs et al., 2002; Jones et al., 2003). Мы выделили вызванные обучением изменения в нейроне, который является внешним по отношению к синаптической сети, напрямую обеспечивающей генерацию условного и безусловного поведения. Это позволило исследовать вклад несинаптической пластичности в условный ответ независимо от каких-либо синаптических изменений, которые могли бы появиться в генерирующей поведение сети.

Животных подвергли сочетанному или несочетанному протоколу обучения на пищевой стимул с одного подкрепления (одному из двух; Alexander et al., 1984; Kemenes et al., 2002). Далее, из этих групп в случайном порядке выбирали обученных и контрольных животных и тестировали их ответ на запах амил-ацетата (условный стимул) на 1-ый, 2-ой, 3-ий, 7-ой и 14-ый дни после проведения процедуры обуславливания. В каждый из исследованных моментов времени обученные животные демонстрировали значительно более выраженный ответ (число жеваний на условный стимул,  $p < 0.05$ ) по сравнению с

контрольными животными, что говорило о том, что у животных было выработано условное ассоциативное обучение.

Вместе с тем, у CGC не наблюдалось разницы в усредненной форме спайка и порогах генерации спайка между препаратами, приготовленными из обученных и контрольных животных. Кроме того, мы регистрировали мембранный потенциал CGC в каждый из указанных выше моментов времени на полуинтактных препаратах (губы- ЦНС). Мембранный потенциал CGC отличался у обученных животных по сравнению с контрольными животными ( $p < 0.05$ ) в каждый день в протяжении всего эксперимента. При тестировании животных в моменты времени, соответствующие 2, 4, 6, и 12-16 часам после обучения ( $n = 17-23$  улиток) достоверных различий между препаратами контрольных и обученных животных обнаружено не было. Таким образом, долговременная деполяризация появляется в период, соответствующий отрезку между 16 и 24 часами после обучения, и поэтому она не связана с проявлениями ранней памяти на начальных этапах формирования следа обучения.

Чтобы выяснить, достаточны ли изменения в мембранном потенциале CGC для формирования условного ответа, мы искусственно деполяризовали мембрану нейрона CGC у наивных животных. Когда нейроны CGC были деполяризованы до уровня  $-53$  мВ, препараты наивных животных ( $n = 12$ ) демонстрировали увеличенный ответ на амил-ацетат. Фиктивный пищевой ответ был достоверно ( $p < 0.01$ ) более сильным (по разнице в числе жеваний,  $-0.25 \pm 0.3$ ). Эти результаты свидетельствуют о том, что одной лишь деполяризации CGC достаточно для того, чтобы вызвать значительное увеличение пищевой реакции в ответ на условный стимул. Очевидно, что продемонстрированное повышение уровня деполяризации мембраны после обучения способно внести значительный вклад в долговременную память, обеспечивая проявление условной реакции в ответ на условный стимул.

Используя методы клеточного культивирования нейронов в комбинации с электрофизиологией, проводили исследование того, может ли искусственная деполяризация соматической мембраны CGC привести к изменениям силы

синаптических выходов CGC в реконструированной *in situ* синаптической связи. Для выявления этих изменений мы выращивали нейрон CGC вместе с мотонейроном V1, которые связаны моносинаптически в интактной ЦНС (McCrohan and Benjamin, 1980). Обе эти клетки были помещены в культуральную чашку на расстоянии около 400 мкм друг от друга. Это позволило нейронам CGC и V1 образовать химическую моносинаптическую связь примерно на том же расстоянии от CGC, как при предположительном расположении аксональных ветвей CGC, образующих контакты на центральных нейронах пути условного стимула в церебральной ганглии (Styles, 2004). Хотя форма спайков CGC и не изменялась в зависимости от деполяризации, возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) на совместно культивированном мотонейроне V1 значительно увеличились в размере, демонстрируя повышенные значения постсинаптической деполяризации. В другом эксперименте мы проверяли, может ли деполяризация клеточного тела CGC влиять на препаратах интактной ЦНС на синаптическую передачу CGC на V1 (дистанция между клеточным телом CGC и его аксональными терминалями, пресинаптическими по отношению к V1, составляет около 2 мм). Регистрировали CGC и V1 одновременно на 11 препаратах интактной ЦНС (расстояние между клеточным телом CGC и аксональными пресинаптическими терминалями по отношению к V1 порядка ~2 мм). В отличие от эксперимента на культуре (расстояние между клеточным телом CGC и аксональными пресинаптическими терминалями по отношению к V1 порядка ~400 мкм), где деполяризации на 5 мВ было достаточно для усиления ВПСП в V1, клеточное тело CGC на интактной ЦНС было необходимо деполяризовать на 20 мВ для того, чтобы увидеть значительное увеличение ВПСП в V1 (от значения  $3.8 \pm 1.1$  мВ при мембранном потенциале CGC около -65 мВ, до  $6.4 \pm 1.2$  мВ при мембранном потенциале CGC около -45 мВ, парный t-критерий,  $df = 10$ ,  $p < 0.05$ ). Разница в уровне деполяризации, необходимой для того, чтобы усилить синаптический выход, предположительно отражает аттенюацию деполяризации

по ходу распространения ее на большие расстояния в интактной ЦНС по сравнению с моделью моносинаптической связи на клеточной культуре.

Далее, мы разработали способ проверки существования связи между соматической деполяризацией CGC и изменениями на уровне нейронных сетей. Мы исследовали эффект искусственной деполяризации мембранного потенциала CGC на ответы интернейронов СВИ на условный раздражитель, регистрируя их аксональные спайки в церебро-буккальной коннективе, используя присасываемые электроды по методу «en passant». Когда нейрон CGC был деполяризован, среднее увеличение спайковой активности нейронов СВИ во время первых 10 секунд после предъявления условного стимула (УС) и до проявления фиктивного жевания было достоверно ( $p < 0.04$ ) выше ( $18 \pm 5$  спайков/интервал) по сравнению с экспериментами, когда CGC записывали при «зарегистрированном» мембранном потенциале ( $2 \pm 3$  спайка/интервал). То же самое было справедливо для вызванной условным стимулом активности СВИ, которую регистрировали в течение всего времени аппликации условного стимула (30 сек;  $df = 4$ ,  $t = 3.2$ ,  $p < 0.03$ ). Фоновая активность интернейронов СВИ достоверно не отличалась при двух экспериментальных значениях мембранного потенциала CGC ( $32 \pm 3$  спайков/интервал при «зарегистрированном» мембранном потенциале), в сравнении с деполяризованным мембранным потенциалом,  $26 \pm 5$  спайков/интервал (парный t-критерий,  $df = 4$ ,  $t = 1.68$ ,  $p = 0.17$ ). Фоновая активность интернейронов СВИ была сходна при обоих уровнях мембранного потенциала в CGC, однако, когда CGC был деполяризован, появлялось быстрое заметное увеличение числа спайков интернейронов СВИ, регистрируемых экстраклеточно в церебро-буккальной коннективе, чего не наблюдалось, когда мембранный потенциал находился на «зарегистрированном» уровне. Эти результаты свидетельствуют о том, что деполяризация CGC увеличивает ответы нейронов СВИ на условный стимул, обеспечивая на уровне нейронных сетей механизм запуска пищевого поведения условным стимулом после пищевого подкрепления.

*Постоянный натриевый ток является несинаптическим субстратом долговременной ассоциативной памяти.* Ранее мы продемонстрировали, что соматическая деполяризация CGC достаточна для того, чтобы условный ответ мог быть вызван соответствующим адекватным внешним стимулом. Здесь мы исследуем индуцированные обучением ионные механизмы, которые обеспечивают эту деполяризацию. Мы сравнивали электрические свойства и низкопороговый постоянный натриевый ток в CGC ( $I_{Na(P)}$ ; Staras et al., 2002) в группах обученных классическому условному рефлексу (сочетанный УС и БС) и явно несочетанных (УС и БС) и наивных контрольных животных. Мы рассматривали этот ток потому, что, как и подобные типы постоянных натриевых токов в нейронах млекопитающих (Crill, 1996; Kay et al., 1998; Cummins et al., 1999; Herzog et al., 2001), он вносит значительный вклад в поддержание мембранного потенциала CGC у наивных животных (Staras et al., 2002). Таким образом,  $I_{Na(P)}$  представляется подходящим субстратом для вызванных обучением изменений, проявляющихся в постоянно поддерживаемом деполяризационном сдвиге мембранного потенциала. В приложении к нашей задаче, эту гипотезу тестировали как связь между  $I_{Na(P)}$  и ранее описанной мембранной деполяризацией CGC, вызванной обучением. Первая серия физиологических экспериментов была проведена между 6 и 12 часами после того, как животных подвергли обучению классическому условному рефлексу с одного подкрепления, и вторая серия после того, как прошли 24 часа после обучения (между 26 и 32 часами). Выбор времени тестирования базировался на предыдущих наблюдениях, показавших, что после обучения с однократного предъявления до 12 часов CGC не проявляют вызванную обучением деполяризацию, которая появляется через 24 часа после обучения.

Вызванное условным стимулом количество жеваний в группе животных, получавших сочетанное предъявление УС/БС ( $n = 30$  животных), составило  $10.8 \pm 1.6$  жеваний/2 мин, что достоверно выше, чем количество жеваний в группе несочетанных предъявлений УС/БС ( $1.8 \pm 0.9$  жеваний/2 мин,  $n = 30$  животных) или в группе наивных необученных животных ( $2.9 \pm 0.7$  жеваний/2 мин,  $n = 30$

животных; ANOVA,  $F[2, 89] = 19.3$ ;  $p < 0.0001$ ; критерий Тьюки,  $p < 0.001$ ). В том же самом эксперименте, число жеваний между группой УС/БС несочетанных предъявлений и наивной контрольной группой достоверно не различалось (критерий Тьюки,  $p < 0.05$ ). Через  $>24$  часа после обучения, мембранный потенциал CGC у препаратов животных, получавших сочетанные предъявления УС/БС ( $-55.8 \pm 0.8$  мВ,  $n = 10$ ) был значительно более деполяризован по сравнению как с группой несочетанных предъявлений УС/БС, так и с группой наивных необученных животных ( $-59.3 \pm 1.1$  мВ и  $-58.3 \pm 1.1$  мВ соответственно,  $n = 10$  препаратов, ANOVA,  $F[2, 29] = 11.0$ ;  $p < 0.0003$ ; критерий Тьюки,  $p < 0.05$ ).

Постоянный неактивируемый натриевый ток  $I_{Na(P)}$  активируется при более негативных значениях мембранного потенциала, чем любые другие токи CGC, и это единственный входящий ток, который остается неинактивированным при очень длинных ( $\sim 1$  сек) ступеньках потенциала в режиме фиксации потенциала (Staras et al., 2002). Эти характеристики  $I_{Na(P)}$  представляют уникальную возможность регистрировать этот ток на интервале потенциалов от  $-90$  до  $-50$  мВ без его интерференции с другими токами и, значит, без использования специальных фармакологических блокаторов для изоляции  $I_{Na(P)}$  от других токов. Используя эту особенность, мы сравнивали  $I_{Na(P)}$  в группах УС/БС сочетанных предъявлений с контрольной группой с несочетанными предъявлениями, и с группой наивных необученных животных, измеряя ответ при достижении стационарного (равновесного) тока, вызываемого деполяризующей ступенькой от  $-110$  мВ до  $-55$  мВ. Через 24 часа, но не ранее 12 часов после обучения, у нейронов CGC в группе сочетанных предъявлений УС/БС  $I_{Na(P)}$  был значительно увеличен по сравнению с группой несочетанных предъявлений УС/БС, а также с группой наивных животных (ANOVA,  $F[2,19] = 7.7$ ;  $p < 0.002$ ; критерий Тьюки,  $p < 0.001$ ). Тот же вид анализа показал, что, значения  $I_{Na(P)}$  у групп несочетанных предъявлений УС/БС и наивной групп достоверно не различаются, также как и поведенческие пищевые ответы (критерий Тьюки,  $p < 0.05$ ). Взятые вместе, данные по измерению мембранного потенциала до 12 часов, и  $>24$  часов после

обучения с измерениями  $I_{Na(P)}$  продемонстрировали, что у группы сочетанных предъявлений УС/БС вызванная обучением деполяризация мембранного потенциала совпадала по времени с вызванным повышением  $I_{Na(P)}$ , то есть как до 12 часов, так и после 24 часов после обучения. В то же время, тогда как в группах, регистрировавшихся <12 часов после обучения, не было найдено значимой корреляции между значениями мембранного потенциала и  $I_{Na(P)}$ , по данным от всех препаратов, протестированных в этих экспериментах, в группах, зарегистрированных после 24 часов, между этими двумя переменными была обнаружена значительная корреляция (Тест корреляции Пирсмана,  $R^2 = 21$ ,  $p < 0.01$ ). В опытах, проведенных через 24 часа, большинство полученных значений  $I_{Na(P)}$  в группе сочетанных предъявлений УС/БС были кластеризованы в более деполяризованном диапазоне значений мембранного потенциала, а большинство данных от наивных препаратов и несочетанной группы предъявлений УС/БС были кластеризованы в области меньшего  $I_{Na(P)}$  и менее деполяризованного потенциала мембраны, Это указывало на то, что главный фактор, определяющий вклад в корреляцию, которая появляется >24 часов после обучения, представлен параллельными изменениями как мембранного потенциала, так и  $I_{Na(P)}$ .

Чтобы зарегистрировать постоянство изменений, вызванных обучением в значениях постоянного входящего тока CGC на всем диапазоне активации, мы строили график вольт-амперной характеристики для командных потенциалов, использованных в ступенчатом протоколе, по которым рассчитывали интегральное значение входящего тока. В экспериментах, проведенных <12 часов после обучения, мы не наблюдали достоверно значимой разницы между группой сочетанных предъявлений УС/БС и контрольной группой несочетанных предъявлений УС/БС, а также в сравнении с контрольными необученными животными. Однако, как и при анализе ответов на отдельную ступеньку потенциала до уровня -55 мВ, отмечали достоверно значимую разницу между тремя группами в интеграле кривой I-V, рассчитанной по значениям данных, измеренным >24 часа после обучения (ANOVA,  $F[2,29] = 15.4$ ,  $p < 0.0001$ ), со значениями достоверно выше (критерий Тьюки,  $p < 0.05$ ) у группы сочетанных

предъявлений УС/БС по сравнению с группами несочетанных предъявлений и наивных необученных животных.

***Несинаптическая пластичность в основе компартиментализованного увеличения синаптической эффективности.*** Мы предположили, что вызванные обучением несинаптические изменения в CGC связаны с механизмом, который усиливает синаптическую эффективность в церебральной аксональной ветви. Она играет «разрешающую» роль в классическом условном рефлексе (Рис. 1), не оказывая при этом влияния на модуляторную роль нейрона в безусловном поведении (Yeoman et al. 1996). Однако, природа этого механизма оставалась неизвестной и была подробно исследована в нашей работе.

Мы инъецировали в CGC морфологический краситель Alexa Fluor 488 для визуализации его аксональных ветвлений с последующей аппликацией синаптического маркера FM4-64 для окраски активных синапсов во всем ганглии. Конфокальное лазерное сканирование выявило FM4-64-позитивные красные включения в виде ярких флуоресцентных пятнышек размером 1-4 мкм, колокализованных с зеленым сигналом Alexa Fluor 488, присутствующем в дистальных ветвлениях церебральной ветви CGC (Рис. 1). Эти эксперименты подтвердили, что компартменты церебральной ветви CGC несут аксональную функцию у наивных препаратов и являются потенциальными локусами пластичности.

Мы напрямую тестировали гипотезу о том, что обучение классическому условному рефлексу наивных животных уменьшает аттенюацию вызванного спайком аксонального кальциевого сигнала в боковой ветви аксона CGC. Животных обучали классическому пищевому условному рефлексу в группе сочетанных предъявлений (обученная группа,  $n = 18$ ) и явно несочетанных (контрольная группа,  $n = 15$ ), предъявляя им амил-ацетат как условный стимул и сахарозу как безусловный стимул. Эксперименты с одновременными оптофизиологической и электрофизиологической регистрациями производили через 24 часа после обучения. Кроме того, независимые контрольная и обученная группы животных подвергались поведенческим тестам через 24

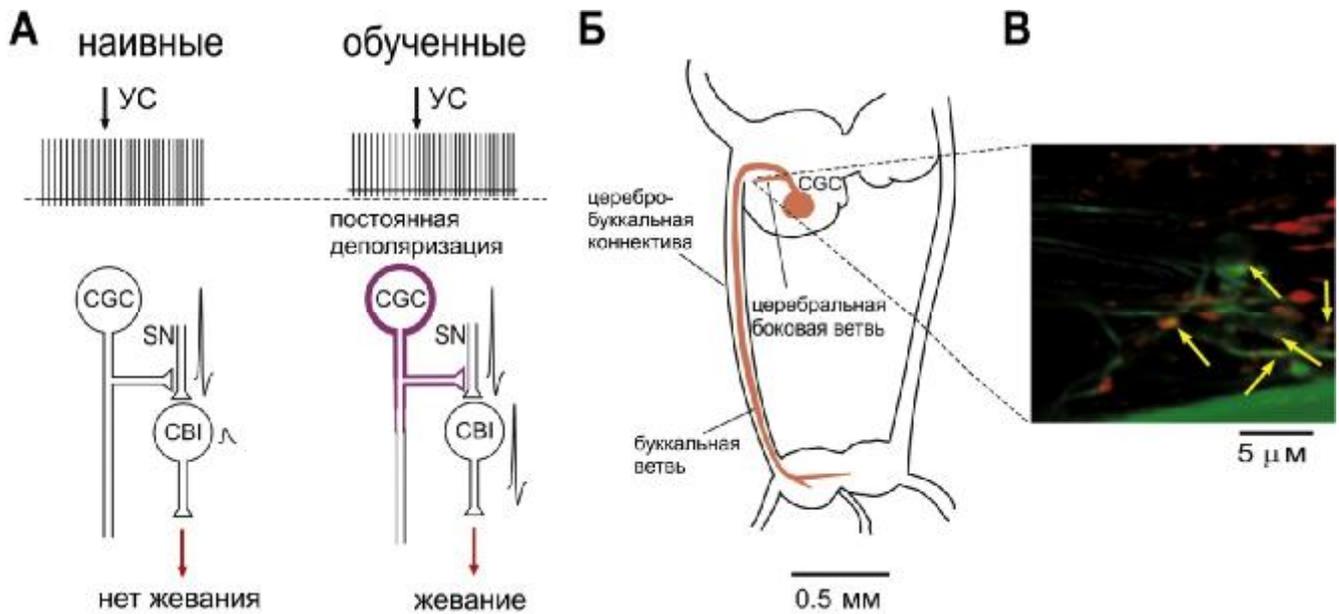


Рис. 1. Терминали боковой церебральной ветви аксона CGC являются пресинаптической зоной, на которую предположительно оказывает воздействие вызванная обучением несинаптическая пластичность. (А) Механизм «дистанционного управления», увеличивающий синаптическую эффективность после обучения классическому пищевому условному рефлексу на *Lyttaea*. У необученных животных УС во время обучения приводит к небольшому увеличению в тоническом медленном разряде у гигантских церебральных нейронов CGC. Спайки, вызванные УС в сенсорных нейронах (SN) губ вызывают слабый ответ в командно-подобных церебро-буккальных интернейронах (CBI) пищевого поведения. У обученных животных, сома CGC и сегменты проксимального аксона находятся под воздействием долговременной деполяризации (схематически показано сдвигом электрофизиологической регистрации, и толстой линией, обводящей CGC), и УС вызывает такое же слабое усиление медленного разряда у обученных животных как у необученных. Однако, из-за увеличенного внутриклеточного кальция в боковой ветви у обученных животных активность CGC обеспечивает пресинаптическую фасилитацию выходных сигналов сенсорных нейронов SN, что приводит к потенциалам действия в интернейронах CBI, которые активируют нейроны сети центрального генератора пищевого ритма (CPG), обеспечивая условный пищевой ответ на УС. (Б) Анатомические особенности аксонального ветвления CGC. Основная проекция аксона следует в буккальный ганглий. Боковая церебральная ветвь начинается на расстоянии ~50 мкм от тела клетки. (В) Взаимоотношение между сигналом красной флуоресценции синаптического маркера FM4-64 и дистального конца церебральной боковой ветви CGC, который был внутриклеточно покрашен флуорисцирующим красителем Alexa Fluor 488. Стрелки указывают на яркие FM4-64-положительные включения.

часа после обучения. В этих экспериментах обученные животные ( $n = 8$ ) продемонстрировали значительно более выраженный пищевой ответ на УС по сравнению с контрольными животными ( $n = 7$ ; различия в ответах  $3.5 \pm 0.5$  против  $-2.7 \pm 1.2$  жеваний/мин; независимый t-критерий Стьюдента:  $df = 13$ ,  $t = 4.3$ ,  $p < 0.0008$ ).

На препаратах изолированной ЦНС зарегистрированные кальциевые сигналы в основном аксоне не были изменены классическим условным рефлексом, и поэтому их использовали как константу для нормализации зарегистрированных сигналов в боковых ветвях на разных препаратах. Вызванные спонтанно возникающими в соме спайками аксональные кальциевые сигналы в CGC демонстрировали значительную аттенюацию дистально-проксимального отношения в группе контрольных животных, снизившись на ~36%. В противоположность этому, аттенюация в обученной группе составляла только ~17% и не достигала уровня достоверности. В наиболее удаленной области боковой ветви кальциевый сигнал был значительно больше в препаратах обученных животных по сравнению с контрольными, демонстрируя вызванное обучением уменьшение аттенюации. Дистально-проксимальное отношение амплитуд кальциевых сигналов также было достоверно выше в обученной группе животных ( $0.58 \pm 0.03$ , независимый t-критерий Стюдента:  $df = 16$ ;  $t = 2.66$ ,  $p < 0.02$ ), таким образом, демонстрируя значительное снижение после обучения.

Чтобы напрямую проверить, может ли деполяризация CGC (которой достаточно, чтобы воспроизводить эффекты сетевой активности, вызывающие условное поведение) также снизить аттенюацию кальциевых сигналов в коллатеральных аксонах, мы производили их регистрацию на препаратах наивных животных ( $n = 8$ ) сначала при нормальном зарегистрированном значении мембранного потенциала CGC, и потом инъецируя положительный ток для деполяризации соматической мембраны на 5 мВ. Известно, что такая деполяризация также распространяется в церебральные боковые ветви (см. выше). Эти эксперименты практически воспроизвели результаты с обучением. Чтобы сравнить возможную степень инактивации калиевого тока  $I_A$  у обученных и контрольных животных, мы нанесли экспериментальные значения мембранного потенциала CGC, полученные от обученной и контрольной групп, на график кривой инактивации калиевого тока  $I_A$  в CGC, восстановленной из измерений тока, полученных ранее в экспериментах с фиксацией потенциала

(Staras et al. 2002). Оцененный уровень инактивации был примерно в два раза выше в обученной группе по сравнению с контрольной необученной группой. Чтобы экспериментально выявить возможную роль снижения калиевого тока  $I_A$  в снижении аттенюации вызванного спайком кальциевого сигнала в боковой аксональной ветви, мы апплицировали низкую концентрацию 4-аминопиридина (0.2 мМ, одна двадцатая от концентрации подавления тока на 85%) на наивные контрольные препараты. Аттенюация кальциевого сигнала была достоверно ниже в растворе с 4-АП, демонстрируя эффект, очень похожий как на обучение, так и на эффект, вызываемый деполяризацией сомы CGC.

Мы использовали ПЗК JPW1114 для того, чтобы проверить, что 4-АП влияет на аттенюацию амплитуды аксонального спайка независимо от его влияния на увеличение уровня внутриклеточного кальция. Эффекты 4-АП на аксональные спайки и кальциевый сигнал были очень похожи. Использование JPW1114 также позволило нам установить, что, подобно деполяризации, 4-АП значительно снижает аттенюацию амплитуды аксональных спайков, но не вызывает заметного расширения спайка. Вместе, эти эксперименты поддерживают утверждение о том, что вызванная деполяризацией инактивация  $I_A$  уменьшает аттенюацию аксональных спайков и соответствующих им по времени кальциевых сигналов, и поэтому может служить механизмом, лежащим в основе обучения и обеспечивающимся долговременной деполяризацией CGC, вызванной процессами классического обуславливания.

Чтобы напрямую проверить гипотезу о том, что на разные компартменты CGC оказывается разное влияние соматической деполяризации, мы напрямую сравнивали вызванные спайком кальциевые сигналы в церебральной боковой ветви (участвующей в формировании следов памяти) с буккальной ветвью (участвующей в модуляции сетей пищевого жевательного ритма; Yeoman et al. 1996), при нормальном потенциале и когда сома CGC была деполяризована инъекцией тока на  $\sim 10$  мВ. Амплитуда кальциевых сигналов в боковой церебральной ветви была достоверно больше в деполяризованных нейронах CGC по сравнению с нейронами CGC, записанными при нормальном значении

потенциала. Мы не обнаружили никаких достоверных различий в кальциевых сигналах, вызванных отдельными потенциалами действия, в основной аксональной ветви CGC при входе ее в буккальные ганглии при нормальных и деполяризованных значениях мембранного потенциала. Эти данные напрямую свидетельствуют о том, деполяризация уменьшает аттенюацию вызванных спайками кальциевых сигналов в церебральной боковой ветви, но не в основном аксоне CGC, проецирующимся в буккальные ганглии.

**Обсуждение.** В этой части были описаны характеристики активации, инактивации и деактивации у цАМФ-чувствительного тетродотоксин-устойчивого постоянного натриевого тока ( $I_{Na(P)}$ ) в важном модуляторном нейроне, устанавливающем состояние системы.  $I_{Na(P)}$  вносит деполяризационный вклад в мембранный потенциал у CGC и также демонстрирует продолжительный ответ на быстрые короткие изменения уровня внутриклеточного цАМФ в соме CGC. Зависящий от величины потенциала CGC ток  $I_{Na, \text{ цАМФ}}$  длится около 5 секунд после инъекции цАМФ (McCrohan and Gillette, 1988), тогда как эффект цАМФ на потенциал-чувствительный  $I_{Na(P)}$  длится более  $\leq 24$  часов, указывая на то, что цАМФ может участвовать не только в кратковременной, но и в долговременной пластичности в нейроне CGC.

Мы продемонстрировали, что короткое повышение уровня внутриклеточного цАМФ приводит к продолжительному повышению  $I_{Na(P)}$ .  $I_{Na(P)}$  у CGC *Lyttaea* обладает значительным сходством с тетродотоксин-устойчивым натриевым током нейронов спинальных ганглиев. Постоянный натриевый ток мелкоклеточных нейронов спинальных ганглиев увеличивается в ответ на активацию пути цАМФ/протеинкиназы A (England et al., 1996; Gold et al., 1996), что предположительно участвует в повышении возбудимости при воспалении (Hu et al., 2001) и является одной из важных форм проявления нейрональной пластичности. В нашей работе мы одновременно продемонстрировали, что цАМФ увеличивает  $I_{Na(P)}$ , а также что некоторые изменения в электрических свойствах мембраны сомы CGC, например мембранная деполяризация, могут быть напрямую связаны с увеличением  $I_{Na(P)}$ . Кроме вызванного цАМФ

увеличения  $I_{Na(P)}$  мы также обнаружили вызванное цАМФ увеличение вызванных постсинаптических потенциалов CGC на V1 в клеточной культуре.

Мы показали, что мембрана внешнего модуляторного интернейрона пищевой системы моллюска в процессе обучения переходит в постоянное деполяризованное состояние, отставленное во времени. Продолжительная по времени регистрация мембранного потенциала одновременно с регистрацией других пищевых нейронов (Jones et al., 2003; McCrohan and Benjamin, 1980; Straub and Benjamin, 2001) исключает вероятность того, что деполяризация CGC опосредована электротоническим сопряжением какого либо рода. Мы также продемонстрировали, что эта зависящая от приобретенного опыта несинаптическая пластичность кодирует информацию, которая обеспечивает экспрессию долговременной ассоциативной памяти, а также описали механизм, с помощью которого пластичность может транслироваться в модифицированный выходной сигнал нейронной сети и измененное поведение.

Использование протокола обучения с одного подкрепления позволило нам отследить начало, продолжительность и постоянство нейрональных изменений, которые развиваются параллельно во времени вместе с долговременной памятью, таким образом становясь одной из ее особенностей. Отставленная деполяризация в CGC появлялась между 16 и 24 часами после обучения и длилась столь долго, сколько удалось отслеживать физиологические и поведенческие следы долговременной памяти. Отставленное возникновение деполяризации в CGC говорит о том, деполяризация не участвует в ранних проявлениях памяти или в каком-либо процессе консолидации, происходящем между 2 и 16 часами после обучения. То есть эта отставленная несинаптическая пластичность участвует только в обеспечении долговременной памяти. На вклад деполяризации CGC в долговременную память также указывает тот факт, что искусственная деполяризация в CGC у наивных необученных животных фасилитировала реакцию пищевой нейронной сети на условный стимул.

Мы показали, что соматическая деполяризация на 10 mV (или даже 5 mV) может также увеличить вход кальция в аксональные компартменты CGC, таким

образом увеличивая постсинаптические ответы на спайки CGC. Результаты нашего исследования вызванных деполяризацией изменений в уровне кальция и синаптического выхода, тем не менее, только предполагают постоянные клеточные изменения как результат условного обучения.

Мы также продемонстрировали, что аттенюация вызванных спайком кальциевых сигналов вдоль специфической аксональной ветви у модуляторного нейрона моллюска значительно снижается после обучения. Этот эффект демонстрировал положительную корреляцию с вызванной обучением долговременной деполяризацией идентифицированного нейрона CGC, роль которой в формировании ассоциативного обучения была показана выше. Важно, что деполяризация CGC путем инъекции тока также снижает аттенюацию кальциевого сигнала (вызванного аксональными спайками) в церебральной ветви аксона. Однако подобный уровень деполяризации не смог изменить амплитуду вызванного спайком кальциевого сигнала в буккальной ветви аксона. Таким образом, именно церебральная ветвь представляется селективным участком, на который воздействует несинаптическая пластичность. Она ветвится в области наибольшего ветвления церебро-буккальных интернейронов (McCrohan & Kyriakides 1989) рядом с местом вхождения губных нервов в церебральный ганглий, что обеспечивает анатомический контекст для известной способности CGC облегчать активацию амил-ацетатом выходов с хемосенсорных нейронов на церебробуккальные интернейроны.

Хотя механизмы, которые мы описываем, и сходны с калиевыми и кальциевыми ионноканальными механизмами внутренней дендритной пластичности в нейронах млекопитающих (Frick et al. 2004; Losonczy et al. 2008), наша работа является значительным шагом вперед по сравнению с предыдущими. В отличие от протоколов индукции долговременной потенциации LTP *in vitro* на переживающих срезах мозга, используемых в работах на млекопитающих, в нашей работе впервые было применено поведенческое обучение с последующей оптической регистрацией функциональных сигналов и электрофизиологическими экспериментами на

препаратах целого мозга для выявления связи долговременной деполяризации с компарментализованными изменениями в синапсах. В наших экспериментах сравнения были проведены через 24 часа после процедуры обучения для изучения механизмов, лежащих в основе долговременной памяти. Еще одно важное отличие состоит в том, что вызванная LTP модификация тока  $I_A$  в дендритах нейронов млекопитающих определяется каскадами внутриклеточной сигнализации вторичных посредников (Frick et al. 2004), тогда как в CGC вызванная обучением постоянная деполяризация распространяется из сомы в аксональные компартменты и инактивирует ток  $I_A$ . Внутренняя дендритная пластичность предполагает селективное усиление определенных входов, что увеличивает их роль в последующей генерации потенциала действия этим нейроном. В противоположность этому, синаптические выходы деполяризованного центрального нейрона должны селективно регулироваться с помощью механизма, который по-разному влияет на распространение и затухание спайков в различных аксональных ветвях независимо от входов, которые вызывают спайковую активность и генерацию потенциалов действия в самом нейроне. Наше исследование впервые описывает подобный механизм, по аналогии с «дистанционным управлением» пресинаптических регуляторных процессов у нативных препаратов животных, обученных классическому условному рефлексу.

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСЦИЛЛЯТОРНОЙ НЕЙРОСЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ С ОТДЕЛЬНЫМ НЕЙРОНОМ КАК СУБСТРАТ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ОБУЧЕНИЯ.**

*Тонкая настройка обонятельного ориентировочного поведения путем взаимодействия осцилляторной активности с активностью отдельного нейрона.* У наземных улиток обонятельные органы (эпителиальные сенсорные выстилки, «носы») расположены на кончиках щупалец (Chase & Croll, 1981) и напрямую контактируют с воздушными потоками. Большой идентифицированный нейрон церебрального ганглия, MtC3, производит

порядка 85% от центрального рефлекса втягивания щупальца в ответ на неприятные раздражители (Prescott et al., 1997), и также реагирует на некоторые нейтральные запахи (Chase & Hall, 1996). В этой главе мы изучили сенсорную и моторную системы улитки *Helix lucorum* чтобы выяснить, как активные движения периферической обонятельной структуры помогают организовать ориентацию в запаховом пространстве, и как это может быть связано с осцилляторной активностью в процеребральном отделе.

Как в отсутствии запаха, так и в ответ на его предъявление мы наблюдали медленные сканирующие движения вытянутых щупалец улитки. Сканирующие движения представляли собой медленные изменения ориентации щупалец, которые могли быть описаны как синусоидальные изменения координат единичного направляющего вектора. Построение траектории движения щупальца выявило практически непрерывные движения щупалец из стороны в сторону. Аппликация запаха вызывала два вида ответов: быстрое смещение кончика щупальца, подобное избеганию (кивок, длительность ~0.5 с), и относительно медленное сокращение или вытягивание щупальца, длившееся десятки секунд. Мы отделяли кивок от сокращения по скачку координат направляющего вектора, показывающего быстрый сдвиг кончика щупальца. Кивок временно прерывал сканирование, тогда как сокращение или вытягивание этого не делали. Мономолекулярные запахи высокой концентрации (10 и 30%) прекращали сканирование, поскольку происходило полное втягивание щупальца. Сравнение длины щупальца (модуль вектора) и данных о координатах направляющего вектора выявило, что пика одной из координат направляющего вектора достаточно для определения кивка, поэтому далее будет представлена только одна координата направляющего вектора.

Чтобы проанализировать сгибания и втягивания щупалец на полной шкале амплитуд и сравнить их вызванными запахом ответами в MtC3, мы регистрировали поведенческие ответы на мономолекулярные запахи цинеола и бензальдегида (1%, 3%, 10% и 30%). Сокращение в ответ на 1% цинеола было очень слабым с отставленным пиком амплитуды, тогда как запахи 10% и 30%

концентрации вызывали полное длительное сокращение щупальца менее чем за секунду. Кросскорреляционный коэффициент между значениями сокращения щупальца и концентрации запаха составил 0.85 для ответов на цинеол ( $n = 24$ ) и 0.76 для ответов на бензальдегид ( $n = 20$ ). Амплитуда сокращения щупальца в ответ на предъявление цинеола и бензальдегида находилась в прямой зависимости от концентрации запаха и не зависела от длины щупальца до аппликации. В наших экспериментах амплитуда кивка, нормализованная по длине щупальца до аппликации запаха, была практически константна для предъявлений различной концентрации ( $n = 6$ , парный  $t$ -критерий). Кросскорреляционный коэффициент между амплитудой кивка и концентрацией запаха был 0.014 для ответов на цинеол ( $n = 22$ ) и 0.056 для ответов на бензальдегид ( $n = 19$ ). Кросскорреляционный коэффициент между амплитудой кивка и начальной длиной щупальца составлял 0.85 для ответов на цинеол и 0.74 для ответов на бензальдегид.

Далее мы регистрировали активность MtC3 в ответ на мономолекулярные запахи на препарате нос-мозг и сравнивали его динамику с тентакулярными движениями, зарегистрированными на животных в свободном поведении. Мотонейроны MtC3 также демонстрировали концентрационно-зависимые ответы. Длительный (до 15 сек) разряд MtC3 был однофазным с одним максимумом. Латентность ответа MtC3 (за вычетом времени диффузии) на 3%, 10% и 30% цинеола или бензальдегида варьировала в пределах 150-350 мс. Латентность до пика разряда MtC3 уменьшалась с увеличением концентрации и была около 500 мс для 10% и 30% запахов. Концентрационная зависимость, латентность и длительность позволяют связать ответ MtC3 только со второй фазой ретракции щупальца в ответ на запах у интактных улиток, соответствующей сокращению щупальца.

Внутриклеточная инъекция нейробиотина выявила основной отросток MtC3, который образовывал петлю в мезоцеребруме, возвращался назад к коме и делился на три основные ветви, проецирующиеся в мышцы через ольфакторный, внутренний перитентакулярный и внешний перитентакулярный нервы. Также

MtC3 посылал большое число тонких отростков в область внутреннего нейропиля процеребрума. Эти отростки MtC3 были доступны для оптической регистрации с использованием флуоресцентных красителей. Для того, чтобы оценить функциональную специализацию тонких отростков MtC3 в области внутреннего нейропиля, мы инъецировали MtC3 флуоресцентным кальций-чувствительным красителем Oregon Green 488 BAPTA 1 и регистрировали вход кальция в его отростки одновременно с внутриклеточной электрофизиологической регистрацией потенциала. В отсутствие стимуляции в MtC3 регистрировались спонтанные ВПСП и потенциалы действия, которые сопровождалась входом кальция во все отростки MtC3 вблизи сомы, включая проксимальную часть петли и моторные ветви. С другой стороны, гигантские спонтанные ВПСП сопровождалась локальным входом кальция только в проксимальные тонкие ветви из области внутреннего нейропиля, но не в другие отростки. Сравнение амплитуды кальциевого входа после ВПСП в нескольких точках отростков выявило, что амплитуда кальциевого входа убывала в участках ближе к соме MtC3 и не детектировалась в моторных ветвях MtC3. Результаты этих экспериментов подтвердили предположение, что ветвление нейритов MtC3 во внутреннем нейропиле процеребрума является важной мишенью для осцилляторного выхода процеребральной нейросети, которая может потенциально влиять на активность MtC3.

Чтобы выявить функциональную основу потенциального осцилляторного влияния вызванных процеребрумом осцилляций во внутреннем нейропиле, мы использовали оптическую регистрацию электрических событий в мозге, окрашенном потенциал-зависимым красителем. Используя водноимерсионный объектив x20, мы регистрировали низкочастотные осцилляции 1-0.2 Гц в процеребральном слое клеточных тел и во внутреннем нейропиле процеребрума. Осцилляции возникали в апикальной части клеточного слоя и распространялись во внутренний нейропиле через  $42 \pm 31$  мс ( $n = 6$ ). Амплитуда гиперполяризационной фазы осцилляций составляла  $21.5 \pm 2.9\%$  от общей амплитуды в клеточном слое, тогда как она составляла  $53 \pm 5.7\%$  во внутреннем

нейропиле процеребрума. Гиперполяризация в дистальных отростках процеребральных клеток и других гиперполяризованных волокнах могла внести вклад в относительно высокую гиперполяризационную фазу спонтанных осцилляций, зарегистрированную оптически. На слабо покрашенных препаратах во внутреннем нейропиле регистрировалась только гиперполяризационная фаза осцилляций (1 x 5 мин, 11 препаратов), тогда как при более интенсивном окрашивании (2 x 5 мин, 9 препаратов) выявлялись как гиперполяризационная, так и гиперполяризационная фазы. Чтобы установить более прямую связь между активностью процеребрума в во внутреннем нейропиле и спайкованием MtC3 во время стимуляцией запахом, мы проводили комбинированное электрофизиологическое и оптическое исследование взаимоотношений между процеребральными осцилляциями и спайковой активностью MtC3 на препаратах нос-мозг. Мы апплицировали мономолекулярные запахи цинеола и бензальдегида на обонятельную подложку в концентрациях, достаточных чтобы вызвать разряд в MtC3, и регистрировали его спайковую активность одновременно с оптической регистрацией осцилляций во внутреннем нейропиле процеребрума. Чтобы проанализировать полученные данные, мы использовали усреднение потенциалов действия по интервалам, синхронизированным по максимальному уровню гиперполяризации осцилляций в процеребруме. Этот способ усреднения продемонстрировал, что во время каждого цикла осцилляций число спайков в MtC3 достоверно уменьшается как при аппликации цинеола ( $1.44 \pm 0.09$  спайков/100 мс до осцилляции,  $1.16 \pm 0.09$  спайков/100 мс во время осцилляции,  $n = 7$ ; парный t-критерий,  $P < 0.05$ ), так и бензальдегида ( $1.47 \pm 0.10$  спайков/100 мс до осцилляции,  $1.19 \pm 0.09$  спайков/100 мс после осцилляции,  $n = 6$ ; парный t-критерий,  $P < 0.05$ ). Эти наблюдения заставляют полагать, что во время вызванного осцилляциями разряда в MtC3 частота спайкового разряда модулируется осцилляторной активностью в процеребруме.

Чтобы напрямую проверить гипотезу о том, что спайковая активность MtC3 подавляется входами с процеребрума, мы изучали влияние электрической

стимуляции процеребрума на число спайков в разряде MtC3, подвергнутого небольшой деполяризации. Чтобы провести этот эксперимент, мы использовали стимуляцию трейном (train 50 Гц, импульсы 2 мс) апекса процеребрального клеточного слоя, содержащего спонтанно разряжающиеся нейроны. Это вызывало падение спайковой активности MtC3 в  $1.78 \pm 0.35$  раз по сравнению с частотой до стимуляции ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$  препаратов). Чтобы выяснить, являются ли связи MtC3 и процеребрума моносинаптическими, сравнивали реакцию MtC3 на стимуляцию процеребрума в нормальном растворе и модифицированном с повышенной концентрацией кальция и магния, который способен отсечь полисинаптические входы на MtC3. Стимуляция процеребрума в этом растворе не изменяла частоту спайкования MtC3 ( $P = 0.89$ ,  $n = 3$ ), что заставляет полагать, что дисинаптические или полисинаптические связи между процеребрумом и MtC3 обеспечивают основной тормозной ответ, регистрируемый в нормальном растворе. Вместе, результаты описанных выше экспериментов подтверждают, что активность процеребрума, как вызванная запахом, так и прямой стимуляцией, оказывает модулирующее тормозное влияние на MtC3, однако активность MtC3 не оказывает влияния на осцилляторную активность процеребрума.

***Обонятельный опыт модифицирует эффекты запахов на обонятельное пищевое поведение в соответствии с биологической целесообразностью.*** В поведенческих экспериментах мы продемонстрировали, что улитка реагирует втягиванием и изгибанием щупалец в ответ на запах огурца, что указывает на попытку животного избежать контакта с источником этого запаха. Если запах огурца будет сочетаться с положительным подкреплением (т.е. с поеданием огурца), животное могло бы выучить, что этот запах принадлежит пище и не является опасным. Чтобы проверить эту гипотезу, мы попытались инвертировать втягивание щупальца на запах огурца высокой насыщенности в вытягивание щупальца (аналогично реакции на запах моркови) путем выдерживания экспериментальной группы улиток на диете из огурца в течение одного месяца. Затем мы сравнивали ответы в группе обученных

животных (8 улиток) с ответами контрольной группы (8 улиток), содержащейся в тех же условиях, но питавшейся капустой. Ответы щупалец на запах огурца в концентрации 10, 50 и 2% в группах контрольных и обученных животных достоверно не различались ни на одном из рассматриваемых двухсекундных интервалов ( $n = 8$ , независимый  $t$ -критерий,  $P > 0.1$ ). Таким образом, втягивание щупальца в ответ на запах огурца представляется безусловным рефлексом, и этот запах можно рассматривать как негативный фактор сенсорного окружения. Если запах огурца будет сочетаться с положительным подкреплением (т.е. поедание огурца), животное могло бы выучить стабильный ответ, зависимый от концентрации этого запаха и независимый от приобретенного опыта. Далее мы предъявляли улиткам кусочки огурца и измеряли латентность первого укуса огурца до обучения и после того, как улитка съела небольшое количество этой пищи, а затем сравнивали полученные латентности с контрольной группой. Мы проверяли наше предположение в экспериментах с единичным предъявлением подкрепления на трех группах улиток: первой группе предъявляли огурец и позволяли его поедать (обученная группа), второй группе предъявляли только запах огурца и не позволяли его есть или трогать (кондиционированная группа), и третьей группе запах огурца не предъявлялся совсем (наивная группа). Такой подход позволил нам исследовать возможность того, что изменение латентности первого укуса действительно обуславливается опытом, возникшим после употребления пищи, а не только отражает привыкание улитки к ранее незнакомому запаху. Выявленные в ходе экспериментов различия в значениях медианы между тремя группами (обученной, кондиционированной и наивной) оказались большими, чем вызванные случайными стечением (критерий Краскел-Уоллиса, однофакторный анализ дисперсии суммы рангов,  $n = 11, 10, 10$  соответственно;  $p < 0.001$ ). Последующая процедура попарного сравнения (Метод Данна) выявила, что обученная группа достоверно отличалась как от кондиционированной, так и от наивной группы ( $p < 0.05$ ), тогда как кондиционированная и наивная группы достоверно одна от другой не отличались.

Улиткам последовательно предъявляли одинаковые кусочки моркови и огурца и измеряли латентность первого укуса до поедания и после того, как улитка съедала небольшую порцию этой еды. Каждую улитку обучали и на морковь и на огурец. 50% улиток получали сначала огурец и потом морковь через 2 часа. Другие 50% улиток получали сначала морковь, а потом огурец через 2 часа для нивелирования эффекта порядка предъявления на результаты экспериментов. Для использования критерия латентности в парадигме обучения отбрасывали из выборки те случаи, когда улитка не брала пищу. В группе из 23 улиток латентность укуса огурца уменьшилась после того, как животные употребили в пищу огурец, когда они были протестированы на следующий день после этого ( $53.7 \pm 4.0$  сек до обучения,  $37.6 \pm 2.5$  сек после обучения, критерий суммы рангов Манна-Уитни,  $p < 0.002$ ,  $n = 23$ ). Те же улитки продемонстрировали достоверное снижение латентности укуса моркови после того, как получили подкрепление в виде кусочка моркови ( $42.8 \pm 2.8$  сек до обучения,  $34.0 \pm 3.0$  сек после обучения, критерий суммы рангов Манна-Уитни,  $p < 0.02$ ,  $n = 23$ ). До приобретения опыта потребления пищи улитки соглашались откусить как морковь, так и огурец, однако латентность взятия огурца была достоверно больше по сравнению с предъявлениями моркови (критерий суммы рангов Манна-Уитни,  $p < 0.03$ ,  $n = 23$ ). После обучения достоверных различий между латентностями взятия огурца по сравнению с латентностями взятия моркови не наблюдали (критерий суммы рангов Манна-Уитни,  $P = 0.34$ ,  $n = 23$ ).

**Обсуждение.** В этой работе мы впервые продемонстрировали количественный анализ обонятельного поведения моллюска, базирующийся на 3D реконструкции движений щупалец, и идентифицировали механизм, который связывает их с осцилляторной активностью в ЦНС. Мы показали, что активные движения щупальца улитки играют важную роль во взаимодействии сенсорного эпителия с запахами. Мы также установили, что основная часть обонятельного мозга улиток – процеребрум - может модулировать моторный контроль позиционирования обонятельного органа. Тонкая настройка сканирования, по-видимому, требует участия как минимум трех процессов: локально вызываемого

кивка, более длительного сокращения щупалец, управляемых MtC3, и тормозной модуляции последнего осцилляторной активностью в процеребруме.

Мы проводили сравнения ответов щупалец улиток, получавших парные предъявления электрического тока и запаха, с контрольной явно несочетанной группой. Улитки, подвергнутые аверзивному обучению, научились втягивать щупальца в ответ на условный запах, и мы также продемонстрировали, что осцилляции в процеребруме подвергаются специфически сочетанному уменьшению разрядов локальной нейросети, вызванному процедурой обучения. Поскольку процеребрум подавляет спайковую активность в MtC3, подавление процеребральной активности после обучения может быть важным для усиления вызываемой MtC3 реакции втягивания щупальца в ответ на условный запаховый стимул. В противоположность этому, активация процеребрума запахами пищи у наивных животных может быть важна для подавления активности MtC3, что усиливает втягивание щупальца, облегчая ориентацию по следам запаха в пространстве.

В ситуации, когда два новых вида пищи (огурец и морковь) были предъявлены улитке, наивные животные демонстрировали более длинную латентность укуса и большее число отказов в ответ на запах огурца. После того, как животные попробовали огурец, латентность укуса значительно снизилась, так же как снизилось и число отказов, что говорит о формировании стабильной долговременной памяти в группе обученных улиток. Аппликация запаха огурца в концентрации 2, 10 и 50% вызывала изгибания и сокращения, не инвертируясь или как-то изменяясь после того, как животные продолжительное время находились на диете из огурца. Очевидно, запах огурца был репеллентом и обладал отталкивающими свойствами до обучения, и поменял свое биологическое значение после получения животным пищевого подкрепления и приобретения новой памяти.

## **АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В СЕТЯХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕАЛИЗАЦИИ ПОДКРЕПЛЕНИЯ И ГЕНЕРАЦИИ РИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.**

*Отдельный серотонинергический нейрон обеспечивает подкрепление в сети избегательного условного рефлекса оборонительного поведения наземного моллюска.* Широко известными примерами отдельных командных нейронов являются латеральные гигантские нейроны рака (Wiersma & Ikeda, 1964), маутнеровские клетки рыбок (Eaton, 1984) и нейроны, контролирующие оборонительное поведение у моллюсков (Balaban, 1979). Эти клетки, принадлежащие к классу премоторных нейронов, были названы командными нейронами, поскольку их искусственная активация способна вызвать элемент целенаправленного поведения, подобного тому, которое вызывается соответствующими сенсорными стимулами (Wiersma & Ikeda, 1964). Девять гигантских премоторных нейронов (Balaban, 1979, 1983), в плевральном и париетальном ганглиях улитки *Helix* соответствуют трем критериям командных нейронов, установленных Kupfermann & Weiss (1978). Присутствие серотонинергических волокон, окружающих клеточные тела премоторных оборонительных нейронов в виде плотной сети без четко выраженной пресинаптической специализации, подразумевающей модуляторное влияние, было продемонстрировано иммуногистохимически (Vehovzsky et al., 1993). Клетки, расположенные в медиорастральной части pedalного ганглия содержат серотонин (Sakharov, 1974; Balaban et al., 1985). Мы проверяли предположение о том, что серотонинергические нейроны могут обеспечивать подкрепление. Проводились эксперименты, в которых ВПСП, вызванные в нейронах оборонительного поведения стимуляцией нервов, сочетались с локальной экстраклеточной стимуляцией серотонинергических нейронов, расположенных в ростральной части ипсилатерального pedalного ганглия.

Тестовые стимулы по интестинальному нерву подавались с интервалом в 20 минут. Такой интервал был выбран для того, чтобы свести к минимуму привыкание комплексных ВПСП в премоторных нейронах. В течение 5 часов в

эксперименте амплитуда ВПСП обычно уменьшалась до 85-90% от начального уровня в течении межстимульного интервала в 20 минут. После первых трех тестовых стимулов (претестовых) предъявляли сочетанные или явно несочетанные предъявления, за которыми следовали пять посттестовых стимулов в начале экстраклеточной стимуляции (длительность стимула 5 с, регулярные 3-мс импульсы с частотой 5 Гц) серотонинергических клеток во время сочетанных предъявлений, соответствующих началу тестовых стимулов, тогда как при явно несочетанных предъявлениях (на других препаратах) подобная экстраклеточная стимуляция происходила в середине межстимульных интервалов и отстояла от стимулов на 10 мин. Данные от 38 экспериментов показывают наличие достоверной разницы ( $p < 0.01$ , 100 мин после последнего стимула подкрепления, критерий суммы рангов Манна-Уитни) между амплитудами ВПСП в ответ на тестовые стимулы в командных нейронах у сочетанной и несочетанной групп через 60-100 мин после начала подкрепляющей экстраклеточной стимуляции.

Использование экстраклеточной стимуляции не позволяло точно идентифицировать индивидуальные нейроны, вовлеченные в нейромодуляцию. Мы также использовали внутриклеточную стимуляцию индивидуальных нейронов в ростральной области педального ганглия. Тестовые стимулы подавались с 5-ти минутными интервалами до и после сочетания. Увеличение частоты тестового стимула в норме увеличивает уровень привыкания (Balaban & Zakharov, 1992). Сессия сочетанного предъявления состояла из пяти тестовых стимулов с 2-минутными интервалами и пятью «подкрепляющими» внутриклеточными пачками (трейнами) в педальных нейронах, что обеспечило одновременные тестовые стимулы (сочетанная процедура) или стимуляцию в промежутке между стимулами (явно несочетанные предъявления). Амплитуда ВПСП не анализировалась во время сессии обучения потому, что артефакты тетанизации при сочетанном предъявлении маскировали форму ВПСП. «Подкрепление» в виде внутриклеточной тетанизации состояло из одной 10-ти секундной пачки импульсов длительности 25-33 мс с частотой 15-20 Гц. Сила

тока (5-10 нА) имела надпороговое значение. Гигантские париетальные нейроны оборонительного поведения (в основном LPa3 и RPa3) и один из педальных серотонинергических нейронов регистрировали одним или двумя острыми электродами. Второй электрод в педальном нейроне использовался для внутриклеточной тетанизации или инъекции биоцитина. У экспериментальных животных серотонинергические нейроны были предварительно помечены 5,7-дигидрокситриптаном, что позволяло определять и использовать для экспериментов только серотонинергические нейроны. После опыта в нейрон инъецировали биоцитин для последующей реконструкции морфологии зарегистрированной клетки (в соавторстве с Иерусалимским В.Н.). Покрашенные отростки только одного нейрона, Pd4 (из 46), были замечены в нейропиле париетального ганглия, где также находятся протяженные ветвления премоторных нейронов оборонительного поведения (Arakelov et al., 1991).

Внутриклеточная стимуляция нейрона Pd4 на полуинтактном препарате во время регулярного предъявления (1/20 с) тактильного раздражителя кожи вызывала фасилитацию ответов командных нейронов оборонительного поведения на семи препаратах из девяти. Например, в оборонительных интернейронах генерировались потенциалы действия в ответ на регулярное предъявление тактильных стимулов одновременно с внутриклеточной активацией нейрона Pd4 вместо обычных подпороговых ВПСП, которые регистрировались до начала внутриклеточной стимуляции в ответ на этот же стимул. Прекращение гиперполяризации нейрона Pd4 вызывало появление спайков в нейронах оборонительного поведения, а деполяризация вызывала дополнительные спайки как в нейроне Pd4, так и в плевральных оборонительных нейронах.

***Структурно-функциональная организация сети серотонинергических нейронов наземной улитки.*** Активация серотонинергических нейронов группы не запускает ясно выраженных форм поведения, однако модулирует поведенческие ответы на болевые раздражители. На изолированной ЦНС большинство серотонинергических нейронов ростромедиальной группы

демонстрировали спонтанную активность. Средняя частота спайков в отсутствие стимуляции варьирует в пределах 0-3 Гц. Стимуляция кожного нерва вызывала изменение активности в более чем половине нейронов ростромедиальной группы. По ответу нейроны группы можно было разбить на следующие кластеры: реагирующие фазической реакцией, демонстрирующие разряд, длящийся 2-10 сек после начала стимуляции, заканчивающийся через 5-10 сек (располагаются преимущественно медиально, вблизи Pd2); тоническая реакция (нейроны располагаются латерально); смешанная фазно-тоническая реакция.

Стимуляция кожи ноги на препарате вызывала реакцию в небольшой части нейронов педального ганглия. На 5 препаратах от 3 до 8 нейронов фазически разряжались в ответ на нанесение тактильного стимула на кожу полуинтактного препарата с латентностью 2-4 сек и разряд длился не менее 5 сек. На препарате ЦНС с интактной кожей и иннервацией фоновая активность во многих нейронах была слабой. На повторное нанесение стимула наблюдали активацию одного и того же числа клеток ( $n = 5$  препаратов). В двух опытах (из 4) в ответ на стимуляцию кожи кроме фазической реакции в массе неидентифицируемых нейронов наблюдали тоническую активацию крупного нейрона (диаметр сомы  $>100$  мкм) на протяжении более 20 сек, который идентифицировали как Pd4. В ответ на стимуляцию нейрона Pd4 на препарате изолированной ЦНС не наблюдали каких-либо изменений в спонтанной активности других нейронов группы на протяжении 20-30 секунд записи ( $n = 4$  препарата, всего 84 нейрона, в каждом опыте регистрировали примерно 15-30 нейронов одновременно). В ответ на стимуляцию нейрона Pd2 спонтанная активность группы увеличивалась на протяжении первых 10-25 секунд после стимуляции, иногда длящаяся до 60-65 секунд ( $n = 5$  препаратов, 102 нейрона).

Аппликация серотонина на препарате вызывала учащение фоновой спайковой активности, или появление активности ранее не регистрировавшихся нейронов. В ответ на серотонин наблюдали в части медиально расположенных нейронов группы расширение спайка в  $1.51 \pm 0.23$  раза, пропадавшее после

отмыва серотонина. В группе с расширением спайка наблюдали учащение частоты спонтанной спайковой активности в  $1.41 \pm 0.12$  раза (118 нейронов, 6 препаратов). В группе с отсутствием расширения спайка не наблюдали учащения (изменение частоты в  $0.98 \pm 0.11$  раз, 87 нейронов (6 препаратов)).

**Обсуждение.** Серотонин играет важнейшую роль в модуляции оборонительных реакций моллюсков (Kandel & Schwartz 1982; Glanzman et al., 1989). Увеличение концентрации серотонина до уровня  $5 \times 10^{-5}$  М на препаратах вызывает сенситизацию поведенческих ответов на негативные раздражители и усиление синаптических ответов в нейронах оборонительного поведения (Balaban et al., 1986; Zakharov & Balaban, 1991). Это позволяют полагать, что серотонин играет роль облегчающего, фасилитирующего модуляторного трансмиттера оборонительного поведения.

Каждая группа серотонинергических нейронов имеет области-мишени, в районе которых отростки этих нейронов претерпевают значительные ветвления. Морфология педальных серотонинергических клеток заставляет полагать, что эти нейроны формируют несколько гетерогенных популяций. Только нейрон Pd4 из всей группы посылает ветвящийся нейрит в нейропил париеального ганглия. Неприятные тактильные стимулы вызывают увеличение фонового спайкования в серотонинергических модуляторных нейронах и соответствующее увеличение вызванного стимулом спайкового разряда в интернейронах оборонительного поведения. Ответ на стимул должен длиться как минимум десятки секунд, так как поведенческая фасилитация занимает такое время. Ответы изученной группы педальных нейронов на неприятные тактильные раздражители соответствуют этим требованиям. Эти нейроны могут быть активированы стимуляцией любой части кожи животного, но только достаточно сильными стимулами, которые также вызывают поведенческую сенситизацию.

Нейромодуляторная серотонинергическая клетка Pd4 у *Helix* иннервирует нейропил педального, париеального и висцерального ганглиев. Она отвечает долговременной деполяризацией на кратковременные неприятные

раздражители, которые служат подкреплением в аверзивном обучении (Balaban et al., 1987; Zakharov et al., 1995). Внутриклеточная деполяризация этого нейрона изменяет эффективность синаптического входа на интернейроны оборонительного поведения, тогда как гиперполяризация нейрона Pd4 вызывает парно-специфическое увеличение амплитуды синаптических входов на премоторные оборонительные интернейроны, подразумевая усиление поведенческого ответа. Если у улиток *Helix* селективно подавлять функцию серотониновых нейронов токсинами, то у них будет невозможно выработать обстановочный условный рефлекс и условную аверсию на предъявляемый вид пищи (Zakharov & Balaban 1991). Регистрация последовательности ответов в ростромедиальной группе на тактильное раздражение ноги показала, что нейрон Pd4 реагирует после того, как разрядилась основная масса прореагировавших на этот стимул нейронов группы, а также разряд нейрона Pd4 является более продолжительным. Наши данные о последовательности активации нейронов группы, а также пример активации других нейронов в ответ на спайковый разряд второго гигантского нейрона Pd2, принадлежащего к этой же группе, подтверждают концепцию о различной функциональной специализации нейронов группы. Внутри группы, активируемые внешними стимулами нейроны могут вызывать далее активацию других нейронов этой группы, которые, в свою очередь, включают в себя выходные элементы сети, модулирующие последующие нейроны, в том числе командные нейроны оборонительного поведения плевропариетальной группы, и, возможно, другие неизвестные нам премоторные нейроны.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ОПТИЧЕСКОЙ РЕГИСТРАЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЛАСТИЧНОСТИ И ПАМЯТИ НА СИСТЕМАХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ.**

Модельные системы позвоночных животных гораздо ближе к человеку, поэтому к ним закономерен большой интерес и справедлив вопрос о применимости методов, успешно показавших себя на модельных системах

беспозвоночных. Основные методы оптической регистрации мембранного потенциала и внутриклеточного кальция практически полностью применимы к нейронам переживающих срезов крыс (Canepari et al. 2008). Обычно для доставки красителя в нейрон используют пассивную диффузию из пэч-пипетки, при этом нейрон подвергается перфузии. В таких условиях эксперименты с нейрональной потенциацией ограничиваются десятками минут и через определенное время пластичность в нейроне пропадает (Frick et al. 2004). Для исследований долговременных изменений при обучении необходимо разработать оптимальный способ доставки, не наносящий ущерба пластичности и позволяющий исследовать клеточные и субклеточные ответы на протяженном временном интервале. Для этой цели мы разработали специальный метод биолиственной доставки потенциал-зависимых красителей в нейроны помощью адаптированной генной пушки, выстреливающей микрочастицы золота, покрытые красителем. Реконструкция флуоресцентного свечения нервной ткани на конфокальном микроскопе показала, что при таком способе доставки краситель распространяется по клеточной мембране, окрашивая клетку-мишень и практически не распространяясь на окружающие клетки. Разработанный метод окрашивания нейронов может быть применен для дистанционного считывания оптической аппаратурой информации об электрической активности отдельных нейронов и распространении электрического потенциала в нейроне.

## **ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.**

В настоящей работе было впервые продемонстрировано, что несинаптические изменения, лежащие в основе следов памяти, могут вызывать локальные компарментализованные пресинаптические изменения в нейроне, оставляя остальные нейрональные сетевые функции этого нейрона незатронутыми. Используя комбинацию поведенческих, электрофизиологических и оптофизиологических подходов мы показали, что вызванная обучением деполяризация в идентифицируемом модуляторном нейроне CGC водного моллюска *Lymnaea* воздействует на ветви этого нейрона в

пространственно-сегрегированной манере. В боковой коллатерали аксона CGC приобретенная после обучения классическому условному рефлексу деполяризация вызывает снижение аттенюации кальциевого сигнала, соответствующее пробегающему по этой коллатерали потенциалу действия, что обеспечивает крайне эффективный механизм компарментализованного усиления синаптической эффективности. Деполяризация, вызываемая инъекцией тока в CGC необученных животных и распространяющаяся в боковую аксональную ветвь, также как и аппликация блокатора калиевого тока 4-АП вызывали сходный с обучением эффект и уменьшали аттенюацию спайка. Эти результаты заставляют полагать, что потенциал-зависимая инактивация калиевого тока А-типа является связующим звеном между глобальной несинаптической пластичностью и специфически компарментализованными синаптическими изменениями, приобретаемыми в процессе обучения. Полученные результаты объясняют не описанный ранее механизм несинаптической пластичности и деполяризации, играющий важную роль в хранении этого вида долговременной памяти, и свидетельствуют о том, что ветвления аксона нейрона могут иметь специализацию, связанную с хранением и извлечением памяти этим нейроном на уровне несинаптической пластичности. Исследования локализации пластичности на уровне частей одного нейрона продемонстрировали ранее не рассматривавшиеся механизмы ее хранения, связанные с фундаментальными морфологическими особенностями строения нейронов.

С использованием методов оптической регистрации и ПЗК мы продемонстрировали, что в обонятельной системе взаимодействие осцилляторной активности и активности отдельного нейрона играет важную роль в тонкой настройке ориентационного поведения к изменяющимся условиям окружающей среды. В ходе обучения животного запах или его компоненты, который ранее был репеллентом и обладал отталкивающими свойствами, способен поменять свое биологическое значение после получения пищевого подкрепления, то есть запах может стать более привлекательным после того, как животное приобрело новую память о пище. С другой стороны, не все

вызываемые запахом реакции зависят от пищевого обуславливания. Улитки, подвергнутые аверзивному обучению, научились втягивать щупальца в ответ на условный запах, а осцилляции в их обонятельном мозге (процеребруме) после обучения подвергаются специфически сочетанному уменьшению разрядов локальной нейросети. Поскольку активность процеребрума подавляет спайковую активность в мотонейроне ретрактора щупальца, подавление процеребральной активности после обучения определенно является ключевым для усиления потенцированной после обучения реакции втягивания щупальца в ответ на условный запаховый стимул.

Анализ ответов нейронов серотонинергической группы педального ганглия *Helix* внутриклеточными методами поставил ряд вопросов о функционировании группы как единой сети модуляции оборонительного поведения с идентифицируемым нейроном, обеспечивающим выходной сигнал, и которому остальные нейроны делегируют функцию нисходящих влияний на оборонительное поведение. Исследование множественной активности нейронов этой группы оптическими методами показало, что последовательность активации нейронов группы, а также пример активации других идентифицируемых нейронов группы подтверждают концепцию о различной функциональной специализации нейронов группы. Активируемые внешними стимулами нейроны группы способствуют активации других нейронов, включая выходные, модулирующие командные премоторные нейроны оборонительного поведения. Детализация активности групп нейронов, выявление общих характеристик ответов и синхронных осцилляций в ответ на внутренние и внешние раздражители позволила получить более точные представления о взаимодействии групп нейронов как модели анатомически компактной функционально связанной нейронной сети.

Одним из важнейших достижений данной работы являлось то, что на примерах трех идентифицируемых нейронов моллюсков: CGC, MtC3 и Pd4 – была продемонстрирована функциональная роль специфических пространственных компартментов этих нейронов в прямом или опосредованном

участи в хранении, воспроизведении следов долговременной ассоциативной памяти и в реализации адаптивного поведения. При этом, ключевую роль играло не только морфологическое строение самого нейрона, но также паттерны и направление проекций нейрона во внешние нейронные сети.

## **ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.**

1. Ключевые модуляторные нейроны пищевого поведения, являющиеся внешними по отношению к нейронной сети генератора пищевого ритма, после обучения животного и выработки долговременной памяти могут демонстрировать внутреннюю несинаптическую пластичность в виде постоянной деполяризацию мембраны и увеличении постоянного неинактивируемого натриевого тока, сохраняющуюся вместе с приобретенной реакцией.
2. Искусственная деполяризация ключевого модуляторного нейрона пищевого поведения может воспроизводить эффект обучения у наивных препаратов и увеличивает уровень кальция в проксимальных аксональных ветвях. Соматическая деполяризация, появляющаяся после обучения, может увеличивать вероятность выброса медиатора путем локального увеличения входа пресинаптического внутриклеточного кальция, вызванного потенциалом действия.
3. Мотонейрон, градуально регулирующий длину щупальца улитки, отвечает на запахи в концентрационно-зависимой манере, и находится под тормозным контролем осциллирующего обонятельного мозга (процеребрума). Эта тормозная связь создает нейросетевой субстрат для адаптивного изменения движений щупальца, связанных с обучением и пластичностью в процеребруме.
4. Серотонинергическая ростромедиальная группа нейронов pedalного ганглия улитки функционально едина и необходима для сенситизации оборонительного поведения. Только один идентифицированный нейрон этой группы обладает необходимыми внешними проекциями в премоторные отделы ЦНС и может при активации всей группы естественными сильными

оборонительными стимулами в качестве выходного элемента группы обеспечивать подкрепление в ассоциативном обучении.

5. Биолистическая доставка позволяет быстро и с высокой точностью доставить потенциал-зависимый краситель (ПЗК) в нужный участок ткани мозга млекопитающего без классического перфузирования нейрона через пэтч-пипетку. Это открывает новые возможности ее применения для исследования клеточных основ обучения и пластичности на системах млекопитающих на субклеточном уровне.

**Список сокращений:** ЦНС (CNS) – центральная нервная система; SEM – стандартная ошибка среднего; AP (action potential) – потенциал действия; 4-AP (4-АП) – 4-аминопиридин; РС – процеребрум; ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал; 5,7-DHT – 5,7-дигидрокситриптамиин; 5-НТ – серотонин; NMDG – N-метил-D-глюкамин; CGC (cerebral giant cell) – гигантская церебральная клетка; МtС3– третья метацеребральная клетка; Pd2 – второй педальный нейрон; Pd4 – четвертый педальный нейрон; 3D – трехмерный; CCD (charge-coupled device) – видеокамера с серийным опросом детекторов; LSM – лазерный сканирующий микроскоп; ACSF– искусственная цереброспинальная жидкость; ПЗК – потенциал-зависимый краситель; НVA – высокопороговые кальциевые каналы; INa(P) – медленно инактивируемый натриевый ток; цАМФ – циклический аденозин-монофосфат; УС / БС – условный стимул / безусловный стимул.

## **ПУБЛИКАЦИИ В РЕФЕРИРУЕМЫХ ЖУРНАЛАХ ИЗ СПИСКА ВАК ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.**

1. Асеев Н. А., Никитин Е. С., Рошин М. В., Иерусалимский В. Н., Балабан П. М. (2012) Биолистическая доставка потенциалзависимых красителей в клетки срезов живого мозга млекопитающих для оптической регистрации нейронной активности. Журн. Высш. Нерв. Деят. им. И.П.Павлова. 62(1):100-7

2. Асеев Н.А., Ушаков В.Л., Никитин Е.С., Рощин М.В., Иерусалимский В.Н., Балабан П.М. Разработка метода биолиственной доставки потенциалзависимых красителей в клетки срезов живого мозга млекопитающих для оптической регистрации нейронной активности. Ядерная физика и инжиниринг. Москва: МАИК “Наука/Интерпериодика”, 2011. 2(5): 472-478.

3. Никитин Е. С., Н. А. Асеев, П. М. Балабан. (2013) Усовершенствованная оптическая регистрация нейрональной активности с использованием потенциалзависимых красителей. Журн. Высш. Нерв. Деят. им. И.П.Павлова. 6 (63): 656-66.

4. Никитин Е.С. Балабан П.М. (2011) структурно-функциональная организация сети серотонинэргических нейронов наземной улитки. Журн. Высш. Нерв. Деят. им. И.П.Павлова. 2011, 61(6): 750–762.

5. Норемян Т.П., Никитин Е.С., Браваренко Н.И., Малышев А.Ю., Балабан П.М. (2001) Фазозависимая координация двух моторных программ в буккальном ганглии крылоногого моллюска. Журн. Высш. Нерв. Деят. Т. 51(6):717-22. Переведено на английский: Neurosci Behav Physiol. 2003 Feb; 33 (2):107-11.

6. Aseyev N, Roshchin M, Ierusalimsky VN, Balaban PM, Nikitin ES. (2013) Biolistic delivery of voltage-sensitive dyes for fast recording of membrane potential changes in individual neurons in rat brain slices. J Neurosci Methods. Sep 13;212(1):17-27.

7. Balaban PM, Bravarenko NI, Maksimova OA, Nikitin E, Ierusalimsky VN, Zakharov IS (2001) A single serotonergic modulatory cell can mediate reinforcement in the withdrawal network of the terrestrial snail. Neurobiol Learn Mem. 2001 Jan; 75(1):30-50.

8. Никитин Е.С., Захаров И.С. Балабан П.М. (2004) Регуляция длины щупальца в зависимости от концентрации запаха. Журн. Высш. Нерв. Деят. Т. 54(5):655-65. Переведено на английский: Neurosci Behav Physiol. 2006 Jan;36(1):63-72.

9. Nikitin ES, Zakharov IS, Samarova EI, Kemenes G, Balaban PM. (2005) Fine Tuning of Olfactory Orientation Behaviour by the Interaction of Oscillatory and Single Neuronal Activity. *Eur J Neurosci*. 2005 Dec;22(11):2833-44.

10. Nikitin ES, Kiss T, Staras K, O'shea M, Benjamin PR, Kemenes G (2006) A persistent sodium current is a target for cAMP-induced neuronal plasticity in a state-setting modulatory interneuron. *J Neurophysiol*. 2006 Jan;95(1):453-63. Epub 2005 Sep 14.

11. Kemenes I, Straub VA, Nikitin ES, Staras K, O'Shea M, Kemenes G, Benjamin PR (2006) Role of delayed nonsynaptic neuronal plasticity in long-term associative memory. *Curr Biol* 2006 Jul; 16:1269-79.

12. Nikitin ES, Korshunova TA, Zakharov IS, Balaban PM (2008) Olfactory experience modifies the effect of odour on feeding behaviour in a goal-related manner. *J Comp Physiol A*. Jan;194(1):19-26.

13. Nikitin ES, Balaban, PM, Kemenes, G (2013) Nonsynaptic plasticity underlies a compartmentalized increase in synaptic efficacy after classical conditioning. *Curr Biol*. 23 (7): 614-619.

#### **ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА В РЕФЕРИРУЕМЫХ ЖУРНАЛАХ ИЗ СПИСКА ВАК.**

1. НИКИТИН Е.С., Балабан П.М. (1999) Оптическая регистрация событий вызванных запахом в высших обонятельных структурах наземного моллюска *Helix*. *Журн. Высш. Нерв. Деят.* Т. 49(5): 817-29. Переведено на английский: *Neurosci Behav Physiol*. 2001 Jan-Feb;31(1):21-30.

2. Nikitin ES, Balaban PM (2000) Optical recording of odor-evoked responses in the olfactory brain of the naïve and aversively trained terrestrial snails. *Learn Mem*. 2000 Nov-Dec; 7(6):422-32.