

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

На правах рукописи

Никитин Евгений Сергеевич

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

03.03.01 «Физиология»

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Научный консультант:

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

Москва, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	7
1.1. Актуальность работы.....	7
1.2. Цели и задачи исследования.....	10
1.3. Научная новизна работы.....	11
1.4. Теоретическое и научно-практическое значение работы.....	13
1.5. Положения, выносимые на защиту.....	13
1.6. Апробация.....	13
1.7. Структура и объем диссертации.....	14
3. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	15
3.1. Простая нервная система гастропод как основная модель исследований клеточных основ поведения и памяти.....	15
3.1.1. Ведущая сенсорная модальность в контексте обучения моллюсков условному рефлексу.....	15
3.1.2. Осцилляции в сети нейронов обонятельного мозга (процеребрума) моллюсков.....	17
3.1.3. Премоторный контроль оборонительного поведения.....	19
3.2. Субклеточная локализация сайтов пластичности в нейронах беспозвоночных и позвоночных животных.....	21
3.2.1. Виды несинаптической пластичности и их связь с поведением и обучением.....	22
3.2.2. Локализация компартмент-специфической пластичности на субклеточном уровне.....	24
3.2.3. Связь несинаптической пластичности с выходными сигналами нейрона и синаптической пластичностью.....	27
3.3. Современная оптическая регистрация функциональной электрической активности нейронов ЦНС.....	29
3.3.1. Выбор оптимального дизайна установки объектива для оптической регистрации.....	31
3.3.2. Совершенствование источников освещения и оптимальный тип красителя.....	37

3.3.3. Важнейшие современные экспериментальные достижения, полученные с использованием ПЗК.	41
4. МЕТОДЫ.	45
4.1. Животные и экспериментальные препараты.	45
4.2. Электрофизиологическая регистрация.	48
4.2.1. Отведение суммарных потенциалов.	48
4.2.2. Внутриклеточное отведение.	49
4.3. Оптическая регистрация.	49
4.4. Предъявление запаха.	54
4.5. Тактильная стимуляция.	57
4.6. Иммуноцитохимия.	58
4.7. Поведенческие эксперименты.	59
4.7.1. Экспериментальное обучение.	59
4.7.2. Видеорегистрация движений щупальца.	61
5. НЕСИНАПТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ КАК ОСНОВА АССОЦИАТИВНОЙ ПАМЯТИ И УВЕЛИЧЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ.	63
5.1 Постоянный неинактивируемый натриевый ток как мишень для вызванной цАМФ нейрональной пластичности.	64
5.1.1. Активация, деактивация и инактивация $I_{Na(P)}$	66
5.1.2. $I_{Na(P)}$ является тетродотоксин-устойчивым.	72
5.1.3. $I_{Na(P)}$ вносит значительный вклад в мембранный потенциал нейрона CGC.	72
5.1.4. цАМФ увеличивает $I_{Na(P)}$	74
5.2. Роль отставленной несинаптической пластичности в долговременной ассоциативной памяти.	80
5.2.1. Однократное пищевое обуславливание вырабатывает долговременную память и вызывает постоянную деполяризацию во внесетевом внешнем модуляторном нейроне.	84
5.2.2. Постоянная деполяризация в CGC совпадает по времени с проявлением выявляющихся электрофизиологически следов долговременной памяти.	89
5.2.3. Деполяризация в CGG достаточна для усиления фиктивного пищевого ответа в ответ на условный пищевой стимул. ...	91

5.2.4. Деполяризация мембраны CGG приводит к увеличенным постсинаптическим ответам и повышению уровня пресинаптического кальция.	93
5.2.5. Деполяризация мембраны CGG увеличивает ответы на условный стимул командных пищевых нейронах.	99
5.3. Постоянный натриевый ток является несинаптическим субстратом долговременной ассоциативной памяти.	103
5.3.1. Вызванная обучением долговременная деполяризация совпадает по времени с увеличением значения постоянного неинактивируемого натриевого тока в нейронах CGC.	104
5.3.2. Вызванное обучением увеличение $I_{Na(P)}$ полностью соответствует увеличенной деполяризации мембранного потенциала CGC у обученных животных.	113
5.4. Несинаптическая пластичность в основе компартментализованного увеличения синаптической эффективности.	118
5.4.1 Обучение уменьшает аттенюацию вызванного спайком аксонального кальциевого сигнала.	119
5.4.2. Деполяризация CGC и 4-аминопиридин снижают аттенюацию кальциевых сигналов и потенциалов действия.	122
5.4.3. Компартмент-специфическое снижение аттенюации кальциевых сигналов деполяризацией сомы нейрона.	129
5.5 Обсуждение.	132
5.5.1. Вызванная нейрональная пластичность в модуляторном интернейроне, определяющем состояние сети.	132
5.5.2. Роль несинаптической пластичности в ассоциативной памяти.	137
5.5.3. Роль постоянного натриевого тока в несинаптической пластичности.	141
5.5.4. Взаимосвязь между локальной несинаптической пластичностью и эффективностью локальных синапсов.	143
5.6. Выводы.	147
6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСЦИЛЛЯТОРНОЙ НЕЙРОСЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ С ОТДЕЛЬНЫМ НЕЙРОНОМ КАК СУБСТРАТ ОБЯЗАТЕЛЬНОГО ОБУЧЕНИЯ.	148

6.1. Тонкая настройка обонятельного ориентировочного поведения путем взаимодействия осцилляторной активности с активностью отдельного нейрона.....	149
6.1.1. Вызванные запахом движения щупалец у интактной улитки.....	151
6.1.2. Рекции щупальца и MtC3 на мономолекулярные запахи.....	153
6.1.3. Вызванные запахом движения изолированного щупальца и обонятельной подложки.....	156
6.1.4. Модуляция спайковой активности MtC3 процеребральными осцилляциями.....	156
6.2. Обонятельный опыт модифицирует эффекты запахов на обонятельное пищевое поведение в соответствии с биологической целесообразностью.....	165
6.3. Обсуждение.....	173
6.3.1. Роль взаимодействия осцилляторной активности и активности отдельного нейрона в тонкой настройке ориентационного поведения.....	173
6.3.2. Зависимость реакции щупальца от качества запаха и предыдущего обучения.....	178
6.4. Выводы.....	182
7. АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В СЕТЯХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕАЛИЗАЦИИ ПОДКРЕПЛЕНИЯ И ГЕНЕРАЦИИ РИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ. ...	183
7.1. Отдельный серотонинергический нейрон может обеспечить подкрепление в сети избегательного условного рефлекса оборонительного поведения наземного моллюска.....	183
7.1.1. Условная экстраклеточная активация педальных серотонинергических нейронов может служить подкреплением.....	186
7.1.2. Морфология серотонинергических нейронов.....	192
7.1.3. Участие нейронов Pd4 в контроле оборонительного поведения.....	194
7.2 Структурно-функциональная организация сети серотонинергических нейронов наземной улитки.....	199

7.2.1. Ответы нейронов ростромедиальной группы на электрическую стимуляцию n. cutaneus II	201
7.2.2. Ответы нейронов росто-медиальной группы на тактильную стимуляцию кожи ноги	205
7.2.3. Ответы нейронов росто-медиальной группы на стимуляцию идентифицируемых нейронов Pd2 и Pd4.....	207
7.2.4. Реакция нейронов ростромедиальной группы на серотонин	209
7.3. Фазозависимая координация двух моторных программ в буккальном ганглии крылоногого моллюска.	209
7.3.1. Выявление фаз ритмической активности нейронов буккального ганглия во время генерации пищевого ритма	212
7.4. Обсуждение.	217
7.4.1. Роль серотонина в оборонительном поведении.	217
7.4.2. Педальные серотонинергические нейроны составляют функциональную нейромодуляторную группу.....	218
7.4.3. Отдельный нейрон может быть ответственен за модуляцию поведения.....	220
7.4.4. Динамическая структурно-функциональная организация модуляторных сети в контексте делегирования функции одному нейрону.	222
7.4.5. Ритмическая фазовая активность в нейронной сети пищевого поведения.	225
7.5. Выводы.....	228
8. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ОПТИЧЕСКОЙ РЕГИСТРАЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЛАСТИЧНОСТИ И ПАМЯТИ НА СИСТЕМАХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	229
8.1. Биолистическая доставка потенциал-зависимых красителей в клетки срезов живого мозга млекопитающих для оптической регистрации нейронной активности.....	230
8.1.1. Биолистическая установка для доставки потенциал-зависимых красителей.	235
8.1.2. Окраска нейронов с помощью биолистической доставки красителя.....	235

8.1.3. Оптическая регистрация электрической активности нейронов коры с использованием потенциал-зависимых красителей.	238
8.2. Обсуждение.	240
8.3. Выводы.	241
9. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	243
10. ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.	246
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.	248
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.	249
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	254

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

1.1. 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 адаптативного 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 «установливания» 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 добавление 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.

1.2. 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.

1.3. 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 коме, 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 компартментализованными 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 оптически 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 экспериментальные 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.

1.4. 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.

1.5. Положения, выносимые на защиту.

1. Компарментализация 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.

1.6. 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).

1.7. 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.

3. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

3.1. Простая нервная система гастропод как основная модель исследований клеточных основ поведения и памяти.

Простая нервная система моллюсков часто выбирается в качестве объекта для современных нейробиологических исследований. Она состоит из относительно небольшого числа нейронов, а поведение моллюсков довольно стереотипно и ограничено. Эти особенности позволяют нейробиологам детально исследовать работу нервной системы моллюсков вплоть до уровня клеточных механизмов поведения. 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. Подавляющая часть работы проведена на моллюсках, демонстрирующих простой репертуар поведения с хорошо доступными для изучения нейронными сетями.

3.1.1. Ведущая сенсорная модальность в контексте обучения моллюсков условному рефлексу.

Обоняние для наземных моллюсков (улиток и слизней) – важнейшая сенсорная модальность, обеспечивающая им чувство объекта на расстоянии. Специализированные органы слуха отсутствуют, а слабо развитые глаза не позволяют улиткам ориентироваться в пространстве. Обоняние наземных моллюсков очень чувствительно к химическим веществам. Например, пороговая чувствительность улиток к изоамилацетату составляет примерно 10^{-7} М, что сравнимо с чувствительностью человека к этому веществу – 10^{-9} М (Chase and Tolloczko, 1993). Обоняние наземных моллюсков играет центральную роль в решении задач поиска пищи (Balaban, 1993). Голодная улитка *Achatina fulica* замечает запах пищи с расстояния 20-50 см (Croll and Chase 1980). Улитки и слизни локализуют источник запаха с помощью пары задних щупалец головы. Удаление обоих задних щупалец лишает улитку *Achatina fulica* способности находить пищу по запаху. Голодная улитка с

отсутствием одного (удалённого) заднего щупальца, будучи помещена в градиент аппетитного (приятного, привлекательного) запаха, начинает блуждать по окружности, заворачивая в сторону второго (интактного) заднего щупальца (Chase and Croll, 1981). Удаление одного или обоих передних щупалец заметно не сказывается на способности улитки двигаться в направлении запаха пищи. Передние щупальца могут служить улиткам для прослеживания следов пищи на опорной поверхности (например, на грунте, по которому ползёт улитка). Роль задних щупалец в этом прослеживании гораздо менее значительна (Chase and Croll, 1981). Также улитка ощупывает передними щупальцами аппетитно пахнущие предметы с целью определения их съедобности (Balaban, 1991).

Для выработки у улитки *Helix* пищевого предпочтения обязательно, чтобы чувствительный эпителий ее ринофоров контактировал с пищей, т. е. эпителий должен быть интактным и функциональным (Friedrich and Teuyke, 1998). Если сочетать предъявление пищи с ударом электрического тока, то у улитки *Helix* вырабатывается негативная реакция на вкус и запах пищи. Тогда голодная улитка, подвергнутая такому обучению, не возьмёт предложенную ей пищу, несмотря на пищевую мотивацию (Balaban, 1993). Аналогичным образом можно выработать пищевую аверсию у слизней. После нескольких нанесений на чувствительную область головы капли горького сульфата хинидина в сочетании с запахами картофеля или моркови слизни начинают избегать областей открытого поля, где концентрация этих запахов высока (Sahley et al, 1981a). Используя эту схему обучения и сочетания двух различных запахов можно выработать у слизней условный рефлекс второго порядка. Кроме этого, при выработке условного рефлекса при определенных условиях у слизней также проявляется феномен блокировки (blocking; Sahley et al, 1981b). Также было показано, что одного сочетания запаха и сульфата хинидина уже достаточно для появления статистически значимой реакции избегания (Sahley et al, 1981a).

3.1.2. Осцилляции в сети нейронов обонятельного мозга (процеребрума) моллюсков.

Сначала в сети интернейронов процеребрума слизней *Limax maximus* (Gelperin, 1989), а затем также в процеребруме слизней *Incillaria bilineata* и *Limax marginatus* (Kawahara et al, 1997) были описаны спонтанные ритмические осцилляции локальных потенциалов. Частота осцилляций в процеребруме *Limax maximus* в отсутствие внешних раздражителей стабильна и составляет 0.69 ± 0.12 Гц. Осцилляции сохраняются при перерезке обонятельного нерва. Колебания локальных потенциалов во всех участках процеребрума подчиняются общей частоте (Gelperin and Tank, 1990). Осцилляторная активность в процеребруме демонстрирует NO-синтазную зависимость - частота и амплитуда ритмических осцилляций значительно снижаются при аппликации специфических блокаторов синтеза монооксида азота (Gelperin, 1994; Gelperin et al, 2000). Монооксид углерода (CO) вызывает сходное с эффектом аппликации NO дозозависимое увеличение частоты осцилляций (Gelperin et al, 2001). Оптическая регистрация с использованием флуоресцентного потенциал-зависимого красителя di-4-ANEPPS показывает, что фаза осцилляций смещается от апекса к основанию процеребрума, т. е. присутствуют распространяющиеся от апекса к основанию волны (Kleinfeld et al, 1994). Скорость движения волны оценивают как 1 мм/сек (Gelperin, 1998). Распространяющаяся волна представляет собой узкую полосу деполяризации, за которой следует более широкая (и большая по амплитуде) полоса гиперполяризации (Delaney et al, 1994). Направление движения волны может быть изменено путём создания очага хронического возбуждения. Тогда начало волны переместится вместо созданного очага. Это значит, что в сети осциллирующих клеток процеребрума присутствует градиент возбудимости (Delaney et al, 1994). Запах изменяет параметры осцилляций, причем наиболее четко изменения проявляются в частоте. Gervais et al (1996) описал характерный паттерн изменения осцилляций в процеребруме *Limax* в ответ на неприятные для животного запахи – сначала угнетение частоты и амплитуды, затем через 5-10 сек обратное повышение частоты и амплитуды до уровня выше исходного (своего рода посттормозная отдача). Вариабельность осцилляций,

регистрируемых в свободном поведении *in vivo* значительно выше, чем при регистрации на препарате (Cooke and Gelperin, 2001). Также имеются данные о том, что под воздействием запаха происходит коллапс фазового сдвига распространяющейся волны, т. е. резко возрастает скорость движения волны (в три раза или более, Delaney et al, 1994). Осцилляции локальных потенциалов, когерентные процеребральными осцилляциями обнаружены в педальном ганглии. Полагают, что это отражение электрической активности процеребрума, определяющей выбор моторной программы поведения в ответ на запах (Schutt et al., 1999a-1999b).

Интернейроны процеребрума по активности во время фаз осцилляций локальных потенциалов разделяют на два типа (Delaney et al, 1994): В-клетки (bursting cells), дают серию потенциалов действия в начальной фазе волны обонятельного ритма, NB-клетки (non-bursting cells) получают ТПСП амплитуды 5-7 мВ через несколько миллисекунд после разряда в В-клетках. Наиболее апикальные В-клетки имеют самый короткий интервал между разрядами. В-клетки имеют связи между собой, и поэтому активность клеток апикальной группы определяет период активности остальной сети В-клеток. NB-клетки составляют ~98% от числа клеток процеребрума (Gelperin and Tank 1990; Gelperin, 1998). В отсутствие запаха NB-клетки сильно гиперполяризованы и не разряжаются. Предполагают, что этот тип клеток связан с распознаванием запаха (Ermentrout et al, 1998, 2001). Аппликация серотонина оказывает прямое воздействие на В-нейроны, увеличивая амплитуду медленных периодических осцилляций мембранного потенциала, тем самым, увеличивая число спайков в серии, а аппликация NO изменяет частоту осцилляций, не увеличивая при этом число спайков в цикле осцилляций (Inoue et al, 2001). Аппликация ацетилхолина оказывает прямое возбуждающее действие на В-нейроны и подавляет спайковую активность в NB-нейронах, возможно через активацию В-нейронов (Watanabe et al, 2001).

Исследования, проведённые на культуре клеток процеребрума (Rhines et al, 1993), показали, что около 90% нейронов культуры спонтанно генерируют потенциалы действия со средней частотой 0.8 ± 0.07 Гц. Паттерн активности нерегулярный. Измерение внутриклеточного кальция в активных клетках методом оптической регистрации с применением кальций-связывающего, проникающего через мембрану флуоресцентного зонда *fura-*

2 показывает нарастание концентрации свободного кальция во время генерации потенциала действия. Аппликация дофамина увеличивает спонтанную активность клеток культуры процеребрума и вызывает кластеризацию спайковой активности. Аппликация серотонина вызывает обычно длительный разряд клетки культуры процеребрума. Аппликация FMRF-амида или SCPb иногда вызывает низкоамплитудную деполяризацию или гиперполяризацию. Аппликация глутамата вызывает торможение спонтанной активности (0.5 сек аппликации, торможение на 5-8 сек) без заметной посттормозной отдачи (Rhines et al, 1993).

Недавно группой исследователей была опубликована серия сообщений о найденных в процеребруме физиологических коррелятах обучения запахам. По данным (Kimura et al, 1998a), системное введение флуоресцентного красителя Lucifer yellow наземным моллюскам позволяет выявить активно пиноцитирующие нейроны. Во время выработки аверзивной реакции на запах пищи у животных зарегистрировали повышенное включение метки в нейроны основания процеребрума, предположительно участвующие в процессе обучения. Эти животные достоверно отличаются от контрольных по картам включения метки (Kimura et al, 1998c). Авторы также сообщают о появлении особой полосы деполяризации (belt-shaped region) во время прохождения волны осцилляций под действием неприятного (после обучения) запаха (Kimura et al, 1998b), и об уменьшении относительного изменения частоты осцилляций в процеребруме при стимуляции негативным запахом обонятельного органа обученных улиток по сравнению с контрольными (Kimura et al, 1998c).

3.1.3. Премоторный контроль оборонительного поведения.

Изменения в поведении, соответствующие активации отдельного нейрона беспозвоночного были описаны в литературе достаточно давно (Wiersma, 1938; Willows, 1967; Nolen & Hoy, 1984). Широко известными примерами являются латеральные гигантские нейроны рака (Wiersma & Ikeda, 1964), маутнеровские клетки рыбок (Eaton, 1984) и нейроны, контролирующие оборонительное поведение у моллюсков (Balaban, 1979). Эти клетки были названы командными нейронами, принадлежащими к

классу премоторных нейронов, искусственная активация которых способна вызвать элемент целенаправленного поведения, подобного тому, которое вызывается соответствующими сенсорными стимулами (Wiersma & Ikeda, 1964). Девять гигантских премоторных нейронов (Balaban, 1979, 1983), локализованных в плевральном и париетальном ганглиях улитки *Helix* подходят по трем критериям командных нейронов, установленных Kupfermann & Weiss (1978). Во-первых, они отвечают на предъявление негативного тактильного стимула разрядом, предшествующим поведенческой реакции (критерий «участия»). Во-вторых, внутриклеточная активация одного из таких нейронов вызывает часть поведенческого ответа (критерий «достаточности»). И последнее, критерий «необходимости», выполняется для компонента оборонительного поведения, вызываемого внутриклеточной стимуляцией – этот компонент избегательного поведения (withdrawal) нарушается после искусственной гиперполяризации запускающих нейронов этого типа поведения. Таким образом, оборонительные ответы у улиток определяются в значительной степени девятью запускающими командными нейронами плеврального и париетального ганглиев, которые включают реакции втягивания головы, тела, закрытие пневмостома и при этом получают полисинаптические входы общей полимодальной сенсорной чувствительности (Balaban, 1979, 1983; Balaban & Zakharov, 1992).

В дополнение к известным командным нейронам оборонительного поведения, у *Helix* 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 описание модуляторных нейронов. Экстраклеточная стимуляция этих серотонинергических нейронов вызывает кратковременную фасилитацию синаптических ответов и генерирующихся потенциалов действия в запускающих нейронах оборонительного поведения, вызываемых неприятными раздражителями. Индивидуальные серотонинергические клетки отвечают более сильным ответом на ипсилатеральную чем на контралатеральную стимуляцию и обладают различающимися

рецептивными полями (Zakharov et al., 1995). Иммуногистохимические исследования продемонстрировали присутствие серотонинергических терминалей в нейропиле и слое клеточных тел окружающих запускаящие командные нейроны в париетальной ганглии для контроля оборонительной реакции (Vehovszky et al., 1993), что подразумевает прямое взаимодействие между серотонинергическими нейронами и командными нейронами.

3.2. Субклеточная локализация сайтов пластичности в нейронах беспозвоночных и позвоночных животных.

Одним из эффективных способов ответа нервной системы на разнообразие внешних и внутренних сигналов является повышение возбудимости отдельных нейронов, приобретаемое, например, в процессе обучения. На сегодняшний день достоверно установлено, что наравне с синаптической пластичностью, постоянная несинаптическая нейрональная пластичность возникает после обучения и может служить субстратом для долговременной памяти. Хотя, пока остается неизвестным, как несинаптическая пластичность вносит свой 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, кроме синапсов, очень мало информации имеется о других специфических нейрональных компартментах аксона и дендритного дерева, несущих пластические изменения в контексте морфологических особенностей конкретного нейрона и эффективности его входных и выходных синапсов, подвергающихся опосредованной модификации при несинаптических изменениях. В данном разделе рассматриваются важнейшие проблемы компартиментализации пластичности и влияния несинаптических пластических изменений на эффективность синапсов нейрона.

3.2.1. Виды несинаптической пластичности и их связь с поведением и обучением.

Уже достаточно широко признано, что несинаптическая пластичность наравне с синаптической пластичностью может служить субстратом для долговременной памяти (Giese et al., 2001; Debanne et al., 2003; Zhang & Linden, 2003; Magee et al., 2005). 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; Magee & Johnston 2005; Nikitin 2007). Однако по сравнению с синаптической пластичностью доступно гораздо меньше информации по механизмам специфических типов несинаптической пластичности, задействованных в четко определенных примерах памяти, идентифицируемой поведенческими методами. Без получения ясной картины устройства пластичности на уровне всех компартментов нейрона невозможно глубокое понимание клеточных механизмов обучения и памяти.

Нейрофизиологический анализ модельных нервных систем моллюсков внес неоспоримый вклад в наше понимание нейронных механизмов неассоциативных изменений в поведенческих состояниях, эквивалентных ориентировочному поведению у высших позвоночных (Kupfermann, 1974; Kupfermann and Weiss, 1982; Teyke et al., 1990; Brezina et al., 2003; Marinesco et al., 2004). Гигантские метациеребральные клетки (cerebral giant cells: CGC), играют установочную роль в определении состояния пищевой сети, сходную с их гомологами в других системах моллюсков (Yeoman et al., 1994). Недавно было показано, что вызванная обучением соматическая деполяризация идентифицируемого модуляторного нейрона (гигантской церебральной клетки, cerebral giant cell, CGC) пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* хранит информацию, которая необходима для извлечения и проявления в поведении следа долговременной ассоциативной памяти. Также было продемонстрировано, что нейроны CGC проявляют вызванную обучением долговременную

деполяризацию (Kemenes et al. 2001). Экспериментально показанные феномены несинаптической пластичности позволяют далее поставить вопрос о том, как длительная деполяризация, возникающая после обучения, может воздействовать на проведение потенциалов действия по нейрональным компартментам нейронов?

Общепринятая точка зрения уделяет основное внимание синаптическим контактам между нейронами, считая их наиболее важными и многообещающими точками пластических изменений, связанными с памятью. Совсем недавно, многочисленные свидетельства привели к широкому признанию факта того, что несинаптические внутренние изменения наряду с модификацией синапсов являются субстратом для долговременной памяти (Zhang & Linden, 2003, Magee et al., 2005; Mozzachiodi & Byrne, 2010). Внутренние пластические изменения могут реализовываться через видоизменение состава, плотности и распределения ионных каналов нейрональной мембраны, активируемых сдвигом потенциала, тогда как расположение и природа видоизмененных каналов являются ключом, определяющим селективность и вклад в изменение возбудимости нервной клетки (Gründemann & Häusser, 2010). С другой стороны можно предположить, что генерация видоизмененного выходного тока ионными каналами нуждается во взаимодействии с остальными токами, мембраной и фундаментальными электрическими составляющими, где изменения выражены гораздо слабее, такими, как, например, цитоплазматическое сопротивление или основная геометрия клеточных компартментов. В предыдущей работе с использованием фиксации потенциала (Staras et al., 2002). Деполяризующие ступени потенциала с варьируемого начального потенциала фиксации не выявили калиевого А-тока при значении начального потенциала -40 мВ что свидетельствует о полной инактивации А-тока при стационарном значении потенциала -40 мВ. Таким образом, зарегистрированные в опытах значения мембранного потенциала CGC между -55 и 58 мВ в контрольной группе находятся в очень чувствительном диапазоне, и дальнейшее повышение мембранного потенциала могло бы повысить инактивацию А-тока и облегчить распространение ПД по боковой церебральной ветви аксона.

На системном уровне, ранее известные формы патологической пластичности, такие как гипералгезия, нейропатическая боль и эпилепсия, как было показано недавно, имеют связь с повышением $I_{Na(P)}$ (Amaya et al., 2006, Dib-Hajj et al., 1999, Gold et al., 1996, Stafstrom et al., 2007), тогда как на моллюске *Lymnaea* впервые была показана важная роль этого типа тока в непатологических формах пластичности, долговременной памяти, приобретаемой в ходе ассоциативного обучения.

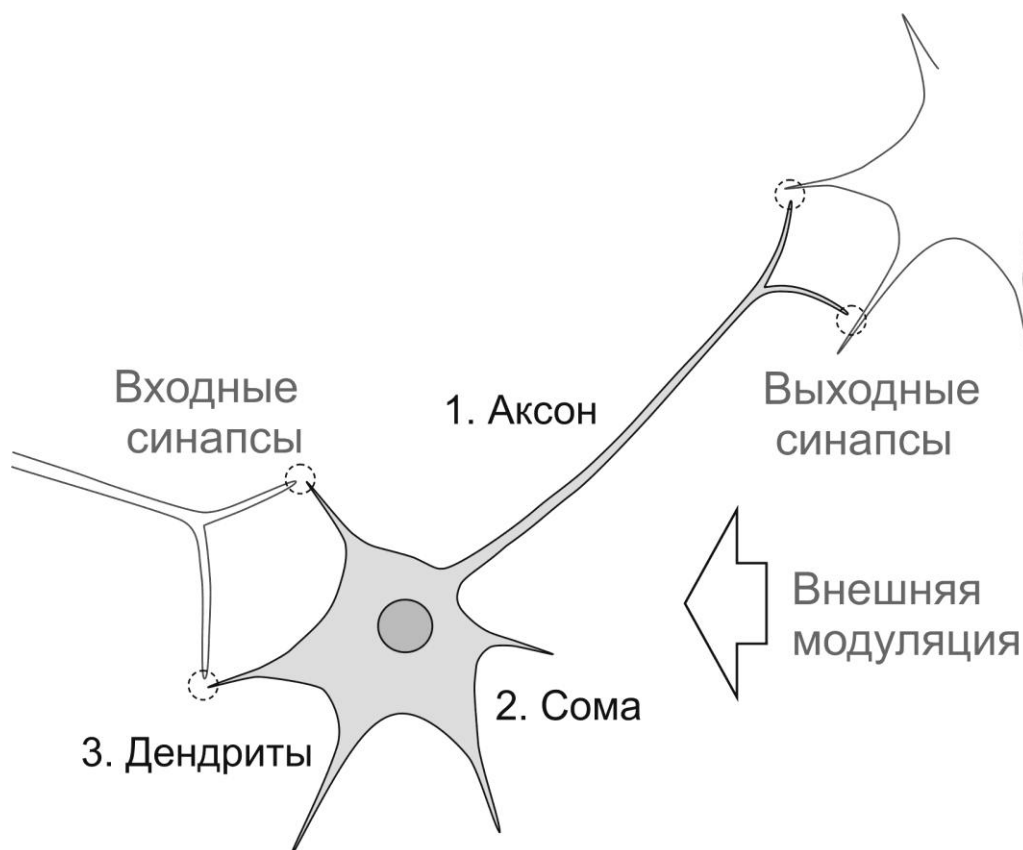
3.2.2. Локализация компартмент-специфической пластичности на субклеточном уровне.

Хотя имеется информация, подтверждающая, что несинаптическая пластичность может возникать в ходе активных процессов обучения (Zhang & Linden, 2003), гораздо меньше известно про то, как она локализуется на субклеточном уровне. Недавние исследования выявили важный факт, что несинаптическая пластичность может быть связана со специфическими компартментами нейрональных дендритов и аксона (Losonczy et al., 2008; Grubb&Burrone 2010; Kuba et al., 2010). Дальнейший детальный анализ компартментализации несинаптической пластичности (Рис. 3.2.1) поможет преодолеть разрыв между феноменом долговременных электрических изменений и его механистической физиологической интерпретацией, необходимой для нашего понимания того, как возбудимость отдельных нейронов способна лежать в основе хранения и извлечения памяти в головном мозге.

В работе Grubb& Burrone (2010) исследовался особый участок аксона – его начальный сегмент – высокоорганизованная структура, содержащая повышенную плотность натриевых каналов (Garrido et al., 2003; Kole et al., 2008; Fedelvish 2010), где, по последним представлениям происходит первичная генерация ПД (Palmer&Stuart 2006; Foust et al., 2010). Возможность пластичности в этом компартменте нейрона позволяет напрямую влиять на интегративную функцию и способность генерировать ПД в ответ на внешние сигналы, приходящие на дендриты. На культуре

нейронов гиппокампа было показано, что при повышении уровня экстраклеточного калия, являющегося триггером повышенной нейрональной активности, начальный сегмент аксона и формирующих его белковых молекул сдвигается в направлении от сомы нейрона, а протяженность менее возбудимого участка между начальным сегментом аксона и сомой увеличивается, что служит механизмом регуляции возбудимости нейрона (Grubb & Burgone 2010). Блокада каналов Т- и L-типов предотвращает перемещение начального сегмента аксона и повышение возбудимости.

Рис. 3.2.1. Схема расположения синаптических и несинаптических (соча, дендриты, аксон) компартментов клетки, которые могут нести внутренние пластические



изменения и являться субклеточным субстратом для процессов хранения памяти в центральной нервной системе. Цифрами обозначены несинаптические компартменты. Внешняя модуляция, способная имитировать пластичность при отсутствии долговременных изменений в самой клетке, отмечена стрелкой.

В другой недавней работе Kuba et al. (2010) анализировали, как слуховая сенсорная депривация влияет на начальные сегменты аксонов клеток ядра nucleus magnocellularis цыплят. Было установлено, что депривация вызывает увеличение протяженности начального сегмента аксона (до 70%),

сопровожаемое одновременным увеличением возбудимости нейронов ядра (Kuba et al., 2010). У нейронов этого ядра отсутствуют аксоны, поэтому изменения возбудимости возможно объяснить только изменением аксональной возбудимости.

Кроме аксона, известно также о локальной пластичности тонких ветвей (второго и выше уровня) дендритов гиппокампа (Losonsy et al., 2008), выражающейся в различной проводимости осциллирующий потенциала по разным ветвям, причем с их проводимостью можно манипулировать с помощью тета-протокола потенциации, а процесс зависит от активности каналов быстрого инактивируемого потенциал-зависимого калиевого А-тока. Также ранее Frick et al. (2004) показали, что при начальной фазе долговременной потенциации, вызванной сочетанной стимуляцией входов на нейрон, может происходить сдвиг кривой инактивации А-тока, связанный, по-видимому, с модификацией каналов в процессах, зависимых от арахидоновой кислоты. В подобных работах в качестве средства воздействия на калиевые каналы и демонстрации участия А-тока рутинно применяется блокатор 4-аминопиридин (4-АП) в сочетании с методами функциональной визуализации локальных нейритов. Согласно одной из недавних работ (Wu et al., 2010), проведенной на культуре трансфицированных клеток НЕК, 4-АП может также оказывать влияние на бета-3 субъединицу каналов НVA-потенциал зависимых кальциевых каналов изнутри клетки. Однако хотя и известно, что 4-АП может вызывать небольшой вход кальция независимо от концентрации, по литературным данным (Grimaldi et al., 2001) 4-АП не влияет на амплитуду локально вызванного кальциевого сигнала.

Интересно, что не всегда долговременные изменения возбудимости нейрона в ходе обучения являются подлинной несинаптической пластичностью. Например, известно, что связанные с пищевым обучением изменения в возбудимости церебральных модуляторных нейронов CV1a моллюска *Lymnaea* хотя и являются стабильными и воспроизводимыми, на самом деле обеспечиваются постоянной внешней модуляцией (Jones et al., 2003).

3.2.3. Связь несинаптической пластичности с выходными сигналами нейрона и синаптической пластичностью.

Хотя и считается, что несинаптическая пластичность, лежащая в основе обучения и памяти наряду с синаптической пластичностью, поддерживается самостоятельно и имеет собственные механизмы, ее связь с синаптической пластичностью в этом же нейроне остается практически неисследованной. Хотя известно, что разные формы синаптической и несинаптической пластичности могут сосуществовать в одном нейроне, взаимосвязь и взаимозависимость этих двух форм пластичности остаются практически неизвестными. Ключевую роль в установлении связи между пресинаптической и несинаптической пластичностями может играть определение связующей роли регулируемого постоянного медленно инактивируемого натриевого тока, лежащего в основе длительных изменений в функциональном состоянии нейрона, и способного определять частоту генерации потенциалов действия (Kole 2011). Недавно было показано, что вызванные изменения в мембранном потенциале модуляторного нейрона моллюска и участвующие в долговременной памяти возникают через >24 часов после обучения. Таким образом, впервые была продемонстрирована связь между вызванными обучением изменениями в мембранном потенциале у моллюска (Kemenes et al., 2001).

Предыдущие работы, исследовавшие ионные механизмы вызванной обучением несинаптической пластичности, продемонстрировали основные типы токов, которые вносят вклад в повышенную возбудимость мембраны, которые переносятся кальциевыми и калиевыми ионами или через активируемые гиперполяризацией катионные каналы (Zhang & Linden 2003). Не было показано наличие вызванного обучением уменьшения отставленного выпрямляющего калиевого тока, которое, в теории, могло бы внести вклад в повышенную деполяризацию мембраны. Идентифицированные ранее в CGC кальциевые токи (Staras et al, 2002) инактивируются слишком быстро, чтобы поддерживать долго длящийся эффект на мембранный потенциал. Анализ не выявил никаких доказательств того, что подобного рода повышение нейрональной возбудимости может быть индикатором изменения калиевого тока А-типа или присутствия тока

гиперполяризационно-активируемого типа (Staras et al., 2002). Таким образом, в отличие от других известных на сегодняшний день примеров несинаптической пластичности, вызванная обучением деполяризация мембранного потенциала CGC является особым случаем и базируется исключительно на постоянном натриевом токе. Выше описанные экспериментальные данные позволили сформулировать концепцию удаленного контроля собственных пресинаптических терминалей нейрона уровнем собственной соматической деполяризации. Эта концепция подразумевает, что от деполяризации в соме зависит, насколько сильно будут активированы собственные пресинаптические терминали нейрона потенциалом действия, и вообще насколько хорошо потенциал действия распространяется до дистальных аксональных компартментов. Ниже будут обобщены современные данные, поддерживающие эту концепцию и полученные как на моллюсках, так и на центральных нейронах млекопитающих.

Постоянный натриевый ток также присутствует в гиппокампе млекопитающих (French, 1990, Vervaeke 2006), однако возможная связь между $I_{Na(P)}$ и известными примерами вызываемой обучением несинаптической пластичности (Debanne 2003, Magee 2005, Zhang, Linden 2003) в этой ключевой области мозга до сих пор не исследованы. В свете наших представленных данных, исследование того, какой вклад вызванные обучением изменения в $I_{Na(P)}$ могут вносить в уже известные и еще не открытые формы ассоциативной несинаптической пластичности, могло бы иметь большой интерес и важное значение. Интересно, что в недавней работе с применением потенциал-зависимых красителей на пирамидах L5 зрительной коры крысы (Foust et al 2011) было показано, что подпороговая деполяризация в соме может оказывать влияние на ширину потенциала действия на мембране пресинаптических бутонов первой аксональной коллатерали, что может служить механизмом реализации несинаптических изменений в соме на уровне собственных терминалей нейрона. Известно также, что даже небольшая деполяризация в соме нейрона способна повлиять на выходные сигналы пирамидных нейронов зрительной коры (Shu et al., 2006) и гиппокампа (Alle et al, 2006), что также было ранее найдено на культуре нейронов (Debane et al., 1997). Также, недавнее открытие показало,

что источником медленно инактивируемого натриевого тока $I_{Na(P)}$, регистрируемого в соме корковой пирамиды L5, являются аксон и первый перехват Ранвье (Fleiderovich et al., 2010), от которого отходит первая коллатераль, и активация этого тока напрямую связана со способностью этого нейрона генерировать разряды высокой частоты ($>200\text{Hz}$; Kole, 2011).

Несинаптическая пластичность остается одним из наиболее интригующих и важных открытий последнего времени, способным заполнить недостающие фрагменты наших представлений о целостном нейроне как о компартментализованной системе, способной хранить и извлекать следы долговременной памяти. Дальнейшее изучение этой проблемы должно сыграть ключевую роль в объяснении того, как нейронные сети их отдельные элементы реализуют биологические функции нервной системы адекватно отвечать и предсказывать изменяющиеся условия внешней среды.

3.3. Современная оптическая регистрация функциональной электрической активности нейронов ЦНС.

Изучение электрической активности и пластичности нейронных сетей, отдельных нервных клеток и их субклеточных компартментов на современном этапе невозможно без применения оптических методов визуализации функциональных сигналов, таких, как концентрация 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. Гораздо более интересной и менее известной является регистрация с использованием потенциал-зависимых красителей (ПЗК), единственный из малого числа доступных сегодня методов, сочетающий высокое пространственное разрешение (до 1 мкм) с возможностью регистрации сверхбыстрых сигналов (<0.1 мсек) в реальном времени, и обеспечивающим высокое соотношение сигнал/шум. В последнее десятилетие произошел значительный прогресс в применении ПЗК, в особенности при анализе возникновения и кодирования электрических сигналов аксоном и дендритами, связанный с качественным

совершенствованием метода при использовании наилучших красителей в комбинации с последовательным улучшением технических средств и оптического оборудования. Это позволило методу доказать свою полезность и эффективность и из чисто технической плоскости перейти в арсенал основных орудий ведущих лабораторий мира, проводящих исследования на переднем рубеже клеточной биологии и нейрофизиологии.

Оптическая регистрация с использованием ПЗК успешно используется с конца 80-х годов некоторыми лабораториями для отслеживания активности нейронов в реальном времени. Часто оптические методы применялись для получения данных, которые затруднительно или невозможно получить другим способом. Диапазон применения ПЗК варьирует от регистрации суммарных потенциалов для, например, картирования колонок дирекционной избирательности *in vivo* и до одновременной регистрации спайковой активности сетей многих отдельных нейронов, для регистрации потенциала в компартментах аксона и дендритных шипиках. Несмотря на десятилетия успешного применения (Cohen & Salzberg, 1978), метод все еще остается методически и технически сложным и предъявляет высокие требования к подбору оборудования, четкой организации эксперимента и другим необходимым условиям для получения конечного результата. Кроме того, для проведения успешных исследований необходимо постоянное введение усовершенствований в методику как для адаптации ее под конкретную задачу или объект, так и привнося частные технические усовершенствования и улучшения, часто позволяющие добиться качественно новых результатов и увидеть более тонкие детали физиологических процессов, ранее остававшиеся неизвестными из-за недостаточной чувствительности метода. В этих условиях представляется особенно важным постоянно отслеживать технический прогресс в применении ПЗК, освещаемый в растущем числе публикаций ведущих мировых научных коллективов. В разделе рассматриваются новые современные аспекты применения метода оптической регистрации с ПЗК в приложении к наиболее актуальным объектам и задачам современной нейрофизиологии.

3.3.1. Выбор оптимального дизайна установки объектива для оптической регистрации.

Ключевым моментом в процессе определения конкретной задачи эксперимента с применением ПЗК является выбор необходимого дизайна установки для решения фундаментальной проблемы исследования. В современной экспериментальной практике чаще всего используются две основные схемы установки оптической регистрации, имеющие очерченные неперекрывающиеся спектры применения и совершенствования со своими ограничениями, с трудом преодолимыми после того, как выбор сделан. Первой была схема, построенная на использовании матрицы фотодиодов с параллельным усилением сигнала, поступающего от каждого элемента в отдельности. Практически установка на основе фотодиодной матрицы представляет собой набор независимых фотодиодов, собранных в матрицу и передающих сигнал от каждого диода своему усилителю, которые соединены с общим многоканальным аналого-цифровым преобразователем (АЦП). Такая схема имеет высокое разрешение по времени (до 0.2 мкс), меньшее пространственное разрешение (124 или 464 фоточувствительных элемента), среднюю чувствительность при высоком фотодинамическом диапазоне (Рис. 3.3.1А). Разрешение по времени ограничивается как свойствами красителя, так и допустимыми скоростями опроса фотодиодов для получения удовлетворительного отношения сигнал/шум (Cohen 1988). Сигнал усиливается от каждого фотодиода параллельно, поэтому, например, установка с 124 диодами имеет 124 двухкаскадных усилителя, что добавляет сложности в конструкции и обслуживании. Из-за высокой чувствительности к вибрационным шумам (до 20 Гц) и механическим смещениям, модулирующим интенсивность проходящего света, микроскоп установки должен жестко крепиться к антивибрационному основанию комплекса микроманипуляторов или пневматическому антивибрационному столу.

Сигнал, получаемый при регистрации электрической активности нейронных структур с применением абсорбционных красителей в проходящем свете, представляет собой суммацию мембранных потенциалов нейронов, проецируемых на фоточувствительные элементы матрицы (Cohen 1988, Wu et al., 1998). Подаваемый на препарат свет проходит сначала через

тепловой фильтр, и далее через многослойный узкополосный фильтр с полосой пропускания $\sim 720 \pm 20$ нм для получения максимального ответа. При этом увеличение количества проходящего света соответствует деполяризации нейронов, а уменьшение – гиперполяризации. От системы регистрации в проходящем свете не требуется большой чувствительности, так как проходящий свет обладает высокой интенсивностью, но критичны такие параметры, как широкий линейный диапазон и низкие собственные шумы диодной матрицы, усилителей и источника света.

Вторая схема построена на использовании CCD-камеры (Coupled Charged Device, Рис. 3.3.1Б) с последовательным опросом фотоэлементов. Такая схема имеет высокое пространственное разрешение (256000

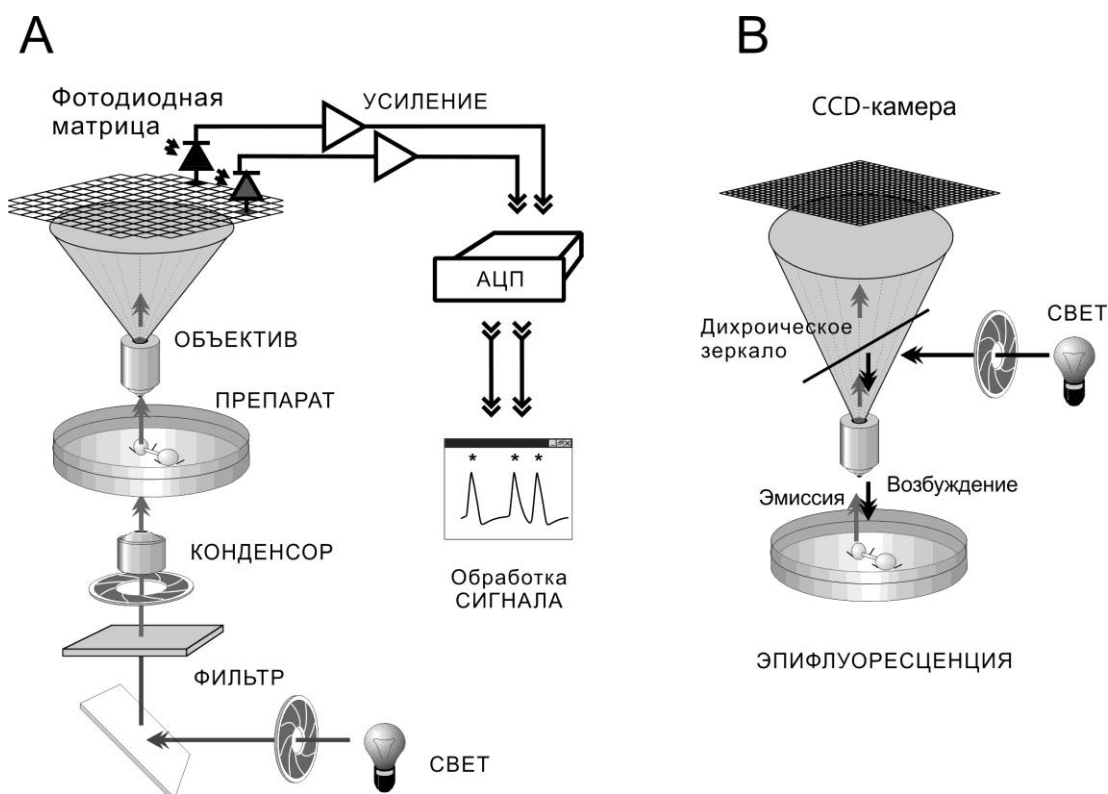


Рис. 3.3.1. Схема установки для оптической регистрации изменения прохождения света через объект ($\Delta T/T$, relative change in transmission) с помощью фотодиодной матрицы (А) при использовании эпифлуоресценции ($\Delta F/F$, relative change in fluorescence) и CCD-камеры в качестве детектора (Б). Сигнал от CCD-камеры также усиливается и оцифровывается (не показано на рисунке). Подписи соответствуют частям оптического пути микроскопа с подключенным к нему устройством детекции.

элементов или более), высокое разрешение по времени (~ 1 мс, Canepari et al., 2008; ~ 0.1 мс, Palmer & Stuart, 2006) и высокую чувствительность к слабым флуоресцентным сигналам. При применении флуоресцентных красителей для регистрации CCD-камерой полезный сигнал отражает относительное изменение флуоресценции ($\Delta F/F$). Наибольшим разрешением по времени при максимально достижимом отношении сигнал/шум на сегодняшний день обладает интегрированная система RedShirtImaging Neuro CCD SMQ 80x80 пикселей (США, с возможностью регистрации 10000 кадров в сек в режиме обрезки кадра до 12x80), которая фактически является наиболее распространенным стандартным оборудованием во многих лабораториях благодаря также удобной программной оболочке (Neuroplex, OptImaging LLC, США) и интегрированным аппаратным и программным решениям для одновременного управления и синхронной регистрации оптофизиологических и электрических сигналов и стимулов. В комплект входит камера, оптический адаптер для установки на микроскоп (зависит от его модели) и обрабатывающий компьютер с АЦП, программным обеспечением и внешним боксом управления и синхронизации.

Кроме CCD-камеры, для регистрации флуоресценции также возможно использование конфокального микроскопа. Однако классические конфокальные микроскопы мало подходят для регистрации сигналов ПЗК, поскольку не могут регистрировать достаточно сильный сигнал с большой скоростью из-за потери интенсивности при пропускании возбуждающего и отраженного света через сканирующее отверстие диафрагмы. Кроме того, при конфокальном сканировании происходит потеря временного разрешения сигнала, поскольку оно происходит поточечно (или построчно) с физическим перемещением точки (или линии, если детектор линейный) зеркалом сканера при том, что никакой сигнал из других точек изображения в это время не регистрируется. В сравнении с ним в CCD-камере огромный выигрыш в скорости визуализации изображения получается от того, что каждый пиксель непрерывно получает проецируемый свет от изображения, перемещается лишь точка считывания заряда, образованного фототоком одной ячейки, в то время как в остальных пикселях заряд продолжает накапливаться до следующего цикла считывания. Некоторые исследователи комбинируют приставку конфокального сканирования,

совмещая, ее с быстрой CCD-камерой меньшего разрешения с помощью дополнительного дихроического делителя (beam splitter) в одной установке. Это позволяет сопоставлять картинку высокого разрешения, полученную посредством конфокальной приставки с быстрой регистрацией CCD-камеры меньшего разрешения (Foust et al, 2010; Foust et al., 2011). При этом соотнесение картинок остается приблизительным, особенно по оси Z, из-за ограниченного разрешения CCD-камеры (~4-5 мкм). Дополнительная конфокальная насадка также позволяет использовать генетически модифицированных крыс/мышей с нейронами, флуоресцентно меченными GFP (green fluorescent protein), что позволяет проводить отбор нейронов нужного типа и морфологии для последующей окраски ПЗК и проведения эксперимента (Foust et al., 2011; Popovic et al., 2011).

Эквивалентный или лучший результат при использовании конфокального микроскопа можно получить только в непрерывном режиме сканирования без перемещения сканируемой точки. Недавно появившийся новый тип линейно сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 Live (Цейсс, Германия) значительно лучше подходит по своим характеристикам для оптической регистрации с применением ПЗК в режиме высокоскоростного линейного сканирования, поскольку его сенсор фактически представляет собой линейный CCD-детектор высокого разрешения, состоящий из 512 элементов (Engelmann 2006). При ограниченных возможностях линейного сканирования по сравнению с полнокадровой CCD-камерой возможно разрешать пространственно гораздо более тонкие структуры (разрешение 0.5 мкм), такие как центральные синапсы млекопитающих, а также проводить трехмерную реконструкцию изображения с высокой точностью, поскольку и для регистрации, и для трехмерного сканирования используются один и тот же детектор и оптический путь, и специального совмещения, как при отдельных камере и конфокальной приставке (Foust et al., 2010; Popovic et al., 2011), не требуется.

Недавно была обнаружена способность демонстрировать потенциал-зависимый сигнал у известного липофильного маркера FM4-64, часто используемого для визуализации пресинаптического выброса медиатора (Branco et al., 2008), при использовании второй гармоники возбуждения.

Сигнал регистрируют в проходящем свете с лазерным инфракрасным просвечиванием с использованием удвоенной длины пика спектра абсорбции и фотоумножителя в качестве детектора (Dombeck et al., 2005). Несмотря на то, что оптическая регистрация потенциала с использованием второй гармоники имеет важное преимущество, заключающееся в подавлении помех от интернализации красителя внутрь клетки (поскольку сигнал производится только упорядоченно ориентированными молекулами красителя в мембране, но не в цитоплазме), низкое соотношение сигнал/шум пока не позволяет использовать этот метод для решения сколько-нибудь значимых задач.

Выбор объектива определяется размером необходимого масштабирования площади чипа камеры/сенсора для лучшего проецирования и разрешения тонких деталей биологических структур оптическими методами. Дополнительные требования также накладывает тип применяемого красителя, требующий определенных условий получения удовлетворительного сигнала. Для регистрации с флуоресцентными или абсорбционными ПЗК множественной клеточной активности используются контактные (ЛК x25 0.4 NA, W.D. <0.025, ЛОМО; Барский и др. 1976), а также водно-иммерсионные объективы (Olympus UPlanFl 20x, 0.5 NA, W.D. 3.3 или аналоги 10- 20x), которые можно сочетать с внутриклеточным отведением и стимуляцией при достаточном рабочем расстоянии. Для регистрации бесконтактным объективом препарат после окрашивания иногда заливают в 1-1.5% -ную агарозу, приготовленную на нормальном физиологическом растворе. Воздушные объективы практически непригодны для регистрации с абсорбционными красителями из-за колеблющейся водной поверхности, изменяющей интенсивность проходящего света гораздо сильнее, чем полезный сигнал.

При использовании флуоресцентных ПЗК для регистрации отдельных нейронов обычно используют электрически изолированные водноиммерсионные объективы высокой числовой апертуры (N.A. 0.4-1.0), от которой прямо зависит яркость флуоресцентной картинки и чувствительность метода (Davidson 2010). При этом для регистрации одиночных нейронов беспозвоночных применяют объективы ~10x - 20x (N.A. 0.4-0.5) (Antic et al., 2000; Antic & Zecevic 1995), а для регистрации

отдельных нейронов, аксонов и дендритов млекопитающих используют объективы 60-х63 (N.A. 0.9-1.0; W.D. 2-2.2, производство Olympus, Zeiss, Nikon; Borst et al., 1997; Djurisić et al., 2004; Foust et al., 2010; Kampa&Stuart 2006; Popovic et al., 2011) и реже 40х (N.A. ~0.8) для дендритов (Antic et al., 1999; Djurisić et al., 2004). При комбинации CCD-камеры с объективом 60х поле регистрации составляет около 200 мкм, что достаточно для регистрации начального сегмента аксона и первых двух перехватов Ранвье на крупных нейронах млекопитающих, таких как клетки Пуркинье и пирамиды 5-го слоя соматосенсорной коры, у которых первый перехват Ранвье расположен на расстоянии 80-130 мкм от сомы нейрона (Foust et al., 2010). Кроме того, для наиболее часто используемых современных красителей (производных ANEP) требуется, чтобы объектив обладал хорошей пропускающей способностью (85-90%) в ближнем инфракрасном диапазоне 700-800 нм, перекрывающемся с пиком эмиссии красителя (Bullen&Sagau 1999). Поскольку регистрация обычно проходит при одновременном использовании стеклянных электродов, служащих для доставки красителя, оптические характеристики объектива являются компромиссом с необходимостью значительного рабочего расстояния (>2 мм) для того чтобы под объективом можно было поместить электрод. Недавно фирма «Zeiss» представила новый объектив W Plan-Apochromat 40х/1.0 DIC, который по своим заявленным характеристикам превосходит ранее использовавшиеся объективы и мог бы еще улучшить полезных оптический сигнал, однако сообщений о том, насколько хорошо он себя ведет в реальных экспериментах, пока еще не публиковалось.

Кроме вышеперечисленных иногда используют воздушные объективы низкого увеличения для регистрации крупных нейронов беспозвоночных или локальных популяционных сигналов (Delaney et al., 1994), а также для регистрации популяционных сигналов *in vivo*, таких как, например, суммарный ответ нейронов обонятельной луковицы (Lam et al., 2003). Воздушные объективы бинокулярного микроскопа используют когда есть необходимость сочетать оптическую регистрацию с двухэлектродной (и более) регистрацией, так как она обеспечивает большую глубину видимости.

3.3.2. Совершенствование источников освещения и оптимальный тип красителя.

Очень важную и часто определяющую роль играет выбор источника освещения, соответствующего выбранному методу оптической регистрации. Почти во всех случаях при оптической регистрации требуется высокое разрешение регистрации по времени (до 10000 кадров/сек, Palmer&Stuart 2006), что вызывает необходимость практически всегда использовать только стабилизированные источники питания осветителя для минимизации его шума (ripple noise) и особенно для регистрации отдельных потенциалов действия. Исключение составляют только, например, опыты с регистрацией в отростках нейрона при стимуляции длинной деполяризующей ступенькой большой длительности, когда не требуется высокое разрешение по времени.

Для регистрации в проходящем свете обычно используют галогеновую лампу мощностью 100-150 Вт со стабилизированным питанием, мощности которой более чем достаточно, чтобы обеспечить равномерный проходящий пучок света. Для регистрации флуоресцентного сигнала требуются более сильные источники освещения, экипированные стабилизированной электродуговой ртутно-ксеноновой лампой высокого давления (150-250 Вт, например, Opti-Quip, США или Crain Research Optosource, Великобритания (Antic et al., 1999; Djurisc et al., 2004; Palmer&Stuart 2006)). По сравнению с классической ртутной лампой такая лампа практически не проигрывает по величине и яркости светящегося тела, однако обладает плоским спектром без сильных пиков в ультрафиолетовом диапазоне и повышенной стабильностью дуги.

Для наиболее требовательных задач, связанных, например, со сверхбыстрой регистрацией возникновения потенциала действия в начальном сегменте аксона млекопитающих, в качестве источника возбуждающего света недавно стали рутинно использовать полупроводниковые лазеры высокой стабильности мощностью 200-500 мВт 532 нм (Foust et al., 2010; Foust et al., 2011; Popovic et al., 2011; Zhou et al., 2007), излучение которых спроецировано с помощью светового конденсора и световода, или системы независимых зеркал. Использование лазера не требует фильтра возбуждения, и обычно один лазер может возбуждать

только один тип красителя. Несмотря на меньшую гибкость, система, построенная на лазерах позволяет, например, одновременно регистрировать сигнал от потенциал-зависимого красителя JPW-1114 или JPW-3028, возбуждая его лазером 532 нм, и одновременно в том же нейроне проводить регистрацию внутриклеточного кальция с использованием зонда Oregon Green ВАРТА 1(гидразидная форма), возбуждаемого лазером 488 нм, сопряженным с первым лазером с помощью полупроницаемого дихроического зеркала. Также предлагалось использовать двухфотонное возбуждение в инфракрасном спектре 1100-1300 нм (Yan et al., 2012), что, однако, в реальных задачах пока не применяется.

Для регистрации по абсорбционной методике применяют витальные пиразо-оксоноловые потенциал-зависимые красители RH-155 (NK-3041, Nikon), JPW-1131 и JPW-1150 (Wuskell and Loew, University of Connecticut). Для улучшения растворения красителей иногда применяют неионогенный детергент Pluronic F-127 (20%-ный раствор в диметилсульфоксиде, Molecular Probes) в соотношении 1/1-2 к сухой массе красителя. Эти красители относятся к ряду пиразо-оксонолов, молекулы которых связываются на клеточной мембране (Cinnelli&Kauer, 1992). Все три красителя являются изомерами, различающимися числом атомов углерода в алкильном заместителе. В зависимости от этого числа атомов углерода в ряду пиразо-оксонолов гидрофобность возрастает от наименее гидрофобного RH155 (заместитель – метил) по направлению к наиболее гидрофобному JPW-1150 (заместитель – n-пропил). Это свойство определяет легкость растворения в воде и скорость вымывания красителя из клеточных мембран после окрашивания. При абсорбционной методике краситель обычно доставляют к нейронам путем его аппликации в омывающий физиологический раствор. При изменении потенциала на мембране молекулы пиразо-оксонола меняют спектр поглощения, что и служит источником оптического сигнала. Кроме того, одним из наиболее важных свойств этих и других ПЗК является линейность сигнала, т.е. оптический сигнал пропорционален потенциалу и полностью повторяет его форму (Рис. 3.3.2). Наибольшее изменение поглощения происходит вблизи 720 нм (London et al., 1987). Оптический сигнал отражает изменение абсорбции света красителем по отношению к ее средней величине ($\Delta T/T$).

Кроме абсорбционных наибольшее применение в современной практике получили флуоресцентные потенциал-зависимые красители, используемые как для регистрации суммарного потенциала, так и для

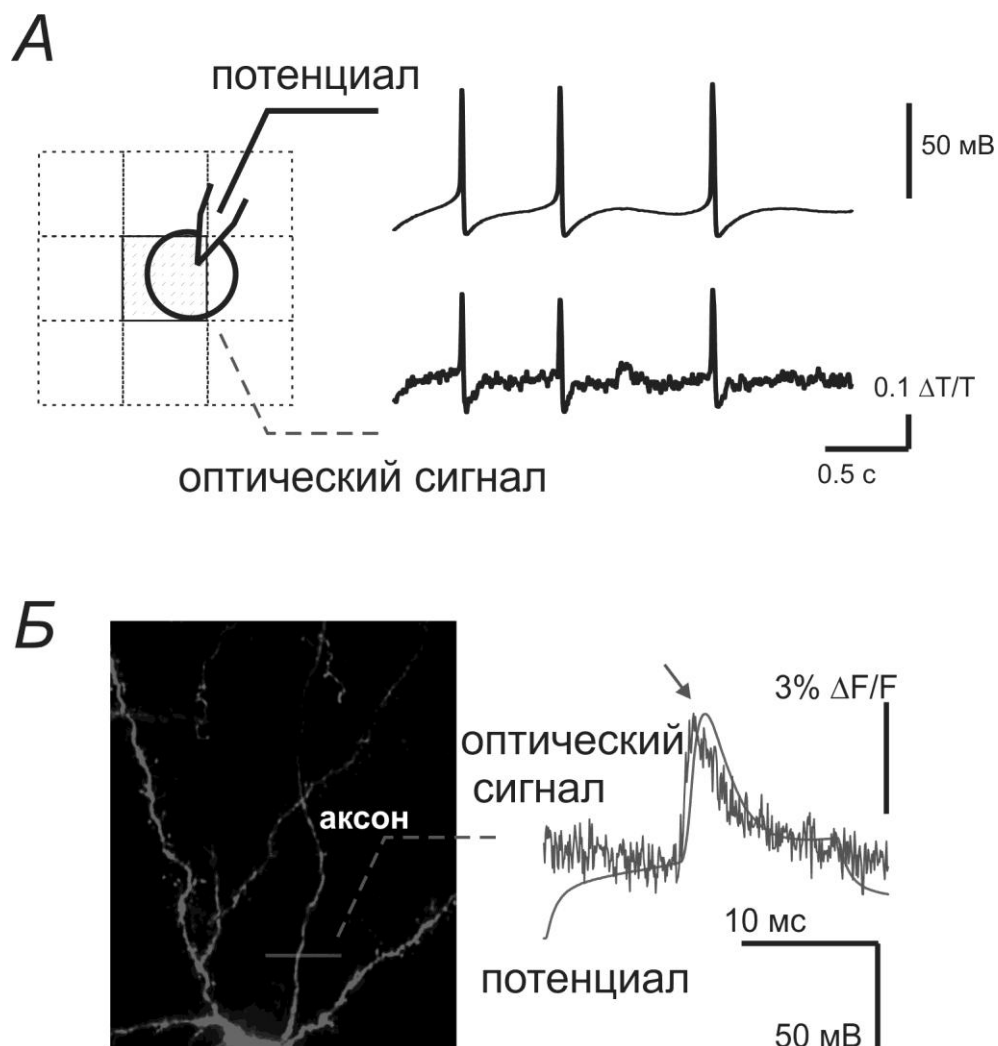


Рис. 3.3.2. Сравнение электрофизиологического отведения потенциала с оптически зарегистрированной осциллограммой. *А* - одновременная регистрация потенциала гигантского нейрона моллюска острым электродом (верхняя регистрация) вместе с оптической регистрацией этого же нейрона, покрашенного абсорбционным потенциал-зависимым красителем JPW-1131 с использованием фотодиодной матрицы. *Б* - одновременная регистрация потенциала пирамидного нейрона неокортекса крысы пэтч-электродом (снизу), наложенная на оптическую регистрацию аксона этого же нейрона на расстоянии 40 мкм, покрашенного флуоресцентным потенциал-зависимым красителем JPW-1114 с использованием непрерывного линейного сканирования со скоростью 20 тыс. линий в сек (усреднено 17 повторных сканирований).

выявления электрической активности отдельных клеток и их компарментов на субклеточном уровне. Для суммарного отведения от коры и интактных структур ЦНС млекопитающих *in vivo* наиболее часто используют красители RH414 (Grinvald et al., 1987; Lam et al., 2003), DI-4-ANEPPS и гораздо реже RH795, который также иногда используется просто как морфологический краситель клеточных мембран или JPW-1114 (Prechtel et al., 1997), который чаще используют для регистрации отдельных нейронов.

Наиболее важное по вкладу в современную науку направление оптической регистрации включает в себя применение ПЗК для оптической регистрации активности отдельных компарментов нейронов млекопитающих и беспозвоночных с использованием внутриклеточно апплицируемых ПЗК производных ANEP (aminonaphthylethylenylpyridinium), включая JPW-1131(di-2-ANEPEQ) (Antic et al., 2000; Kampa et al., 2006), и его близкие аналоги JPW-3028 (di-1-ANEPEQ) (Delaney et al., 1994; Lim et al., 2012; Milojkovic et al., 2005) и JPW-3027 (di-1-ANEPPQ) (Leão et al., 2012). В нейроны моллюсков эти ПЗК доставляют инъекцией давлением растворенного в воде насыщенного красителя (растворимость до 5мг/л при комнатной температуре) через острый стеклянный микроэлектрод, протыкающий клеточную мембрану сомы нейрона (Antic & Zecevic, 1995). Аппликацию этих же красителей внутрь нейронов млекопитающих производят, растворяя их во внутриклеточном растворе для пэтч-клампа в конфигурации whole cell и давая красителю пассивно проникнуть в нейрон в течение около часа при комнатной температуре (Foust et al., 2010). После аппликации микроэлектрод отводят, и перед регистрацией требуется инкубация окрашенных нейронов при комнатной температуре на 1:30-2:30 (млекопитающие; Foust et al., 2010; Foust et al., 2011).

Особенно стоит отметить бурно развивающееся направление, связанное с разработкой нового типа потенциал-зависимых красителей, кодируемых генами флуоресцентных белков, чувствительных к потенциалу, которые экспрессируются в мозге трансгенных животных. Наилучшие результаты, достигнутые на сегодняшний день, продемонстрированы в работе L. Jin et al. (Jin et al., 2012). И хотя соотношение сигнал/шум генетически-кодируемых красителей ниже, чем у мономолекулярных

органических, а так же, как существенный относительный недостаток, существует задержка в реакции красителя на потенциал, искажающая форму, динамику и латентность при регистрации отдельных потенциалов действия. Несмотря на избыточное финансирование по всему миру групп, занимающихся разработкой генетически-кодируемых потенциал-зависимых зондов, по соотношению сигнал/шум и точности отражения потенциалов действия они до сих пор значительно уступают низкомолекулярным красителям-производным ANEP.

3.3.3. Важнейшие современные экспериментальные достижения, полученные с использованием ПЗК.

Оптические методы регистрации потенциала успешно применялись для картирования колонок дирекционной избирательности *in vivo*, мониторинга эпилептиформной активности нейронных ансамблей в коре млекопитающих (Leão et al., 2012; Lieke et al., 1989), одновременной регистрации спайковой активности многих нейронов в ганглии беспозвоночных (Cohen 1989; London et al., 1987), регистрации суммарного потенциала действия в нервах и комиссурах беспозвоночных (Cohen 1988; Gelperin & Tank, 1990), активности в обонятельном пути позвоночных (Canepari et al., 1992), моллюсков (Delaney et al., 1994; Kimura et al., 1998).

Одним из наиболее ранних способов применения ПЗК стала множественная регистрация отдельных нейронов с использованием абсорбционной методики с последующей дискриминацией отдельных потенциалов действия, соответствующих положению, размерам и форме нейронов в регистрируемой области. На морских моллюсках *Aplysia* с использованием оптической регистрации потенциалов показано, что простейший рефлекс втягивания жабры в ответ на раздражение сифона задействует не менее половины нейронов абдоминального ганглия моллюска, а для воссоздания динамической кривой втягивания необходимо сложить активность не менее 40 нейронов, активных в разные фазы сокращения (Zochowski et al., 2000).

Абсорбционные ПЗК также применялись для регистрации компактной группы серотонинергических нейронов (до 56 одновременно) в ганглии моллюска *Helix* для определения параметров потенциалов действия, положения и морфологии нейронов, проливающих свет на структурно-функциональную организацию группы.

Для определения фазового сдвига распространяющейся волны спонтанных осцилляций в обонятельном мозге наземных моллюсков используется анализ временных рядов данных, полученных с помощью оптической регистрации с ПЗК. Для выявления сдвига отстающей волны рассчитывают латентность полупика или используют кросскорреляционный анализ предсказания сдвига, рассчитанного для волны, регистрируемой смежными детекторами (Steinmetz et al., 2000). Рассчитанная средняя скорость движения волны осцилляции в обонятельном мозге моллюска составляет около 3 мм/сек, хотя у улиток и слизней присутствует различие по соотношению амплитуд восходящей (деполяризационной) и нисходящей (гиперполяризационной) фаз волн осцилляций (Delaney et al., 1994). Запах вызывает изменение в частоте и амплитуде осцилляций, имеющее достаточно сложный пространственно-временной рисунок. Кроме спонтанных осцилляций была зарегистрирована волна деполяризации в нейропиле (волоконном слое) обонятельного мозга, вызванная предъявлением запаха. Вызванный потенциал не регистрировался в зоне, где наблюдалась наибольшая амплитуда волн спонтанных осцилляций, и он появлялся со стороны обонятельного нерва и распространялся по нейропиллю в направлении слоя клеточных тел. Области распространения спонтанных обонятельных осцилляций и вызванного потенциала, картированные оптически, только частично перекрываются.

Изучение генерации и проведения нервных импульсов в аксоне и сомато-дендритных компартментах нейрона невозможно без привлечения оптических методов регистрации мембранного потенциала и функциональной активности, позволяющих наблюдать за активностью любой части отдельного нейрона в реальном времени. Одним из важнейших направлений современных исследований с использованием внутриклеточно апплицируемых ПЗК JPW-1114 и JPW-3028 стало изучение возникновения и движения потенциалов на уровне отдельного нейрона и его компартментов у

основных центральных нейронов головного мозга млекопитающих, таких как пирамидные нейроны 5-го слоя коры или клетки Пуркинье мозжечка. С помощью ПЗК было детально изучено обратное распространение потенциала действия (backpropagation) в базальные и апикальный дендриты и их тонкие ветви (Antic et al., 1997; Antic et al., 1999; Antic & Zecevic, 1999; Jin et al., 2012). Также впервые было напрямую оценено сопротивление шейки шипика дендрита коркового пирамидного нейрона (Palmer & Stuart 2006). Краситель JPW-3028 также успешно применялся для одновременной оптической регистрации потенциала и изменения уровня внутреннего кальция в дендритах, в комбинации с зондом Fura-2, введенным одновременно и имеющим отстоящие спектры поглощения и эмиссии (Canepari et al., 2008).

Наиболее важным достижением в последние годы стало применение ПЗК для прямой сверхбыстрой регистрации инициации потенциала действия в начальном сегменте аксона центральных нейронов млекопитающих. Ранее ошибочно предполагалось, что потенциал действия генерируется в аксонном холмике, где происходит преобразование градуальных постсинаптических потенциалов нейрона в пороговые нервные импульсы. Оптическая регистрация потенциала со скоростью 10 тыс. кадров/сек выявила, что потенциал действия генерируется в самом аксоне, а именно в начальном сегменте на расстоянии 30-50 мкм от тела нейрона (Foust et al., 2010; Palmer et al., 2010; Palmer & Stuart, 2006; Popovic et al., 2011). Эти данные представляют полную картину распространения потенциала действия и хорошо соответствуют визуализации внутриклеточного натрия в аксоне (Fleiderovich et al., 2010; Kole et al., 2008), молекулярно-биологическим данным по распределению натриевых каналов и анкиринов в дистальном аксоне (Hu et al., 2009) и электрофизиологической регистрации активности аксона методом пэтч-кламп (Kimura et al., 1998).

В недавнем времени получили широкое распространение оптогенетические методы, позволяющие активировать с помощью тонко сфокусированного света генетически экспрессированные фоточувствительные каналы, оказывающие на мембрану нейрона деполяризующее или гиперполяризующее действие в зависимости от типа конструктора. Комбинация двух фотоактивируемых каналов NpHR и ChR2,

экспрессируемых в нейронах, активируемых двумя разными длинами волн света и пропускающих ионы хлора и неспецифические катионы соответственно, позволяет получить практически полный контроль над нейронными сетями, активируя и выключая отдельные нейроны и навязывая им искусственные паттерны активности (Zhang et al., 2007). Для того, чтобы одновременно с этим регистрировать активность этой нейронной сети, довольно часто используют ПЗК, например RH1692 (Lim et al., 2012). Возможно также сочетание с генетически кодируемыми потенциал-зависимыми зондами, экспрессируемыми одновременно в тех же нейронах (Akemann et al., 2010).

Несмотря на то, что регистрация потенциала нейронов с применением ПЗК требовательна к оборудованию и есть необходимость точно следовать сложным протоколам, этот метод предоставляет важнейшие физиологические данные, которые сложно или невозможно получить другим путем. В сравнении с традиционными методами электрофизиологической регистрации оптические методы на современном этапе постоянно подвергаются критическим усовершенствованиям и улучшениям, позволяющим каждый открывать новые горизонты важнейшей информации о работе и взаимодействии нейронных популяций и отдельных нейронов. По временному разрешению оптическая регистрация приблизилась к электрофизиологической, а по пространственному разрешению, линейности, и однозначности трактовки эксперимента в привязке к морфологическим изображениям намного превосходит ее. Последние улучшения технологии оптической регистрации позволили заполнить многие пробелы в наших знаниях о работе нейрона и скорректировать наши представления о нем. На сегодняшний день оптическая регистрация с применением ПЗК остается одним из самых перспективных направлений методологического развития науки о мозге, особенно если увенчаются успехом поиски быстрых генетически кодируемых потенциал-зависимых сенсоров.

4. МЕТОДЫ.

4.1. Животные и экспериментальные препараты.

Для работы использовались взрослые виноградные улитки *Helix lucorum* L. крымской популяции, пресноводные улитки *Lymnaea stagnalis* лабораторной популяции, и морские ангелы *Clione limacina* беломорской популяции. Для предотвращения операционного шока животное анестезировали изотоническим раствором $MgCl_2$. Из животного извлекали ЦНС (изолированный препарат), или ЦНС с интактными обонятельными нервами и несущими обонятельный эпителий задними щупальцами (периферические обонятельные структуры), вместе с губами, ретракторами щупальца или частью кожи (полуинтактный препарат). Препарат помещали в ванночку с физиологическим раствором. Состав физиологического раствора был следующим (концентрации в ммоль): 100 Na^+ , 4.2 K^+ , 7.0 Ca^{2+} , 4.6 Mg^{2+} , 124.7 Cl^- , 0.2 $H_2PO_4^-$, 2.5 HCO_3^- , 5.0 глюкоза, 10 N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES, Sigma), pH 7.6 (Rhines et al, 1993; с изменениями). Для обеспечения подачи запаха на обонятельный эпителий, кожу щупальца (которое во время извлечения из тела животного выворачивалось наизнанку) почти полностью удаляли. Щупальце прикалывали за мышцу ретрактора к специальной подложке, находившейся над уровнем физиологического раствора (Рис. 4.1; Egan and Gelperin, 1981).

Оболочки с процеребрума удаляли полностью или частично. Очистку наружных грубых оболочек с процеребрума производили особенно полно и аккуратно со всех сторон для уменьшения рассеивания проходящего света оптическими неоднородностями среды. После удаления наружных оболочек, препарат для оптической регистрации обрабатывали 10 мин. протеазой (тип IV, Sigma) в концентрации 2.5 мг/мл или 2.5 мин. протеазой (тип IX, Sigma) в концентрации 1 мг/мл с последующей инкубацией и отмыванием в течение 20-30 мин (время обработки, время инкубации и концентрации ферментов подобраны эмпирически). Во время обработки ферментами обонятельный эпителий находился выше уровня физиологического раствора и не подвергался протеолитическому действию.

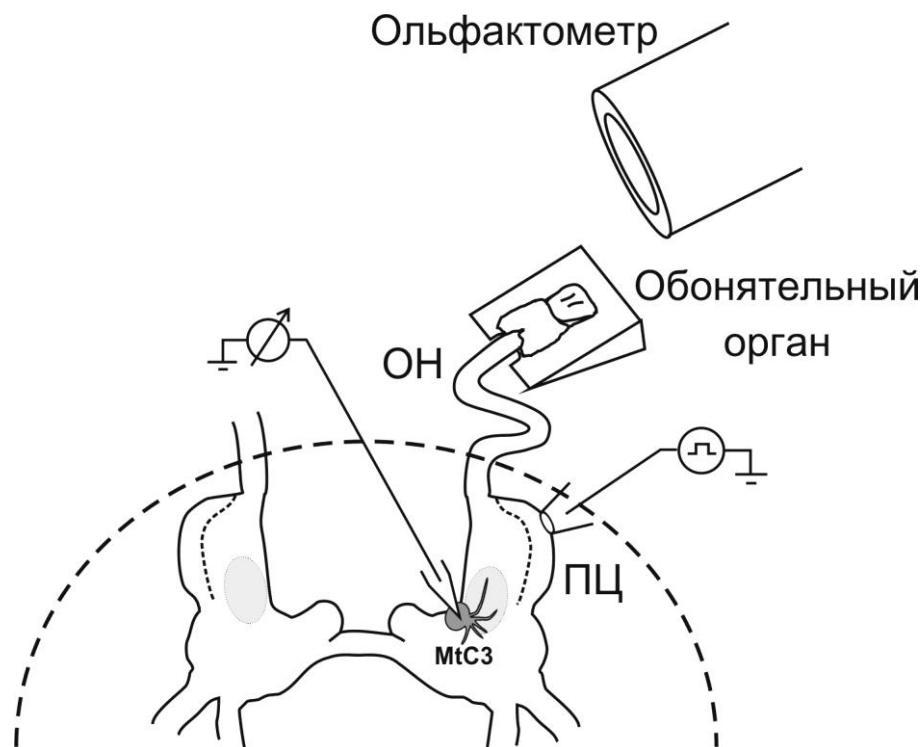


Рис. 4.1. Схема полуинтактного препарата ЦНС с интактными обонятельным нервом (ОН), и обонятельным органом, закрепленным на небольшой платформе. На рисунке показаны церебральный ганглий, процеребрум (ПЦ), мотонейрон МтЦ3 (MtC3), регистрирующий внутриклеточный электрод, и стимулирующий экстраклеточный электрод. Прерывистая линия обозначает стенки камеры с ЦНС. В основании процеребрума серым цветом выделена область внутреннего нейрона.

Для регистрации активности процеребрума без стимуляции запахом также готовили полуинтактный препарат, но щупальца и обонятельный эпителий помещали во время регистрации в ванночку в физиологический раствор вместе с ЦНС. В случае полуинтактного препарата кожа-ЦНС, кожа ноги находилась в отделенной перегородкой от общего объема ванночки камере, и действию протеазы не подвергалась. После удаления соединительной ткани и обработки протеазой тонкие оболочки ганглия оставляли нетронутыми.

Для идентификации серотонинергических нейронов и последующей прицельной регистрации в полость тела животных за 4 недели до эксперимента вводился нейротоксин 5,7-диокситриптамин (5,7-ДОТ, Sigma, США) растворенный в физиологическом растворе с 0.1% аскорбиновой кислотой в качестве антиоксиданта в дозе 20 мг/кг массы тела животного. При введении 5,7-ДОТ в полость тела происходит его избирательный захват

серотонин-продуцирующими клетками, и последующее появление бледно-коричневой пигментации, позволяющей визуально выделить серотониновые нейроны на фоне остальных клеток ЦНС (Балабан и др. 1985). При этом уровень серотонина в ЦНС снижается на 2-3 недели, а затем полностью восстанавливается (Vehovsky et al., 1988). Пигментация серотонинергических нейронов сохраняется до двух месяцев. Эксперименты проводили на 4-5 неделю после инъекции нейротоксина. Для приготовления препарата сначала очищали с ростральной части педального ганглия грубую соединительную ткань. Затем тонкие оболочки ганглия обрабатывали 5 мин протеазой (тип XI, Sigma, США) в концентрации 1 мг/мл в течение 5 мин для улучшения равномерности окрашивания препарата и облегчения проникновения стимулирующего внутриклеточного электрода. В случае полуинтактного препарата кожа ноги находилась в отделенной перегородкой от общего объема ванночки камере, и действию протеазы не подвергалась. После удаления соединительной ткани и обработки протеазой тонкие оболочки ганглия оставляли нетронутыми.

В поведенческих экспериментах использовали взрослых улиток. Во время обучения животных содержали без пищи при комнатной температуре в стеклянном аквариуме. Внутри аквариума находилась фарфоровая чашка с водой, которую меняли каждые два дня. Контрольных и обучающихся животных держали вместе, а животных для тестирования в открытом поле - отдельно в другом аквариуме. Перед тестированием в открытом поле улиток также не кормили 10-12 дней. Всех животных поддерживали в бодрствующем состоянии, помещая их каждый день на 30 минут в среду с высокой влажностью.

Для приготовления переживающих срезов мозга использовали крыс Wistar в возрасте P15-P21. Животных анестезировали диэтиловым эфиром, и декапитировали. Вынутый мозг быстро помещали в холодный раствор ACSF (искусственная цереброспинальная жидкость). Из хирургически изолированной зрительной коры мозга приготавливали срезы толщиной 300 мкм на вибраторе Leica VT1200S (Германия). Композиция ACSF была следующей: 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 27.5 145 glucose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂ and 1.5 MgCl₂ (все Sigma), pH 7.4 аэрировано 95% O₂, 5% CO₂.

Срезы инкубировались при комнатной температуре не менее 1 ч 30 мин до проведения эксперимента.

Основным методом регистрации, использовавшимся в работе, являлась оптическая регистрация с использованием низкомолекулярных органических потенциал-зависимых красителей и кальций-чувствительных зондов в комбинации с электрофизиологическим отведением суммарных потенциалов и внутриклеточным отведением мембранного потенциала нейрона.

4.2. Электрофизиологическая регистрация.

4.2.1. Отведение суммарных потенциалов.

Для электрофизиологического отведения активности в процеребруме использовали заполненный физиологическим раствором тонкий (внутренний диаметр 0,3 - 0,5 мм) стеклянный присасывающий электрод. Электрод сначала обламывали до нужного диаметра, затем кончик электрода затачивали на тонкой алмазной шкурке для выравнивания краёв. После этого кончик электрода оплавливали над спиртовой горелкой для придания краям отверстия гладкости. Помещённая внутрь электрода хлорированная серебряная проволока осуществляла электрический контакт со средой внутри электрода. Индифферентным электродом служила другая хлорированная серебряная проволока, обмотанная по спирали вокруг регистрирующего электрода и оканчивающаяся на уровне его кончика. Сигнал усиливался в 10000 раз на усилителе для регистрации экстраклеточной активности с предварительно установленной полосой пропускания 0.1-50 Гц. Для отведения спайковой клеточной активности *en passant* от нервов использовали также пластиковый присасывающий электрод. Подобным же образом проводили стимуляцию нервов и процеребрума, с той лишь разницей, что два полюса присасывающего электрода были соединены со стимулирующей головкой генератора импульсов, а не с регистрирующим усилителем.

4.2.2. Внутриклеточное отведение.

Внутриклеточное отведение проводили стеклянным микроэлектродом, заполненным раствором, содержащим 1.5М KCl и 1М KCH₃CO₂. Кроме одноэлектродного отведения использовали также двуэлектродные конфигурации фиксации тока и фиксации потенциала. Сопротивление кончика регистрирующего электрода составляло 10-14 МОм, стимулирующего – 2-6 МОм. Для облегчения наведения электрода под микроскопом кончик микроэлектрода окрашивали снаружи черной краской. Для регистрации методом пэч-кламп использовали стандартные внутриклеточный раствор и искусственную цереброспинальную жидкость (детали в Aseyev et al., 2013). Сигнал усиливали с помощью стандартного внутриклеточного усилителя (Warner instruments) или Axoclamp 2B. Сигнал отфильтровывали аппаратно с полосой пропускания 0-500 Гц. В качестве индифферентного электрода использовали хлор-серебряный прессованный электрод (WPI). Усиленный аналоговый сигнал переводили в цифровую форму на специально выделенном канале АЦП оптической установки. Аппликацию фармакологических веществ на ЦНС проводили пипеткой-микродозатором в ванночку до финальной концентрации 10^{-5} – 10^{-6} мМоль/л.

4.3. Оптическая регистрация.

Оптическая регистрация как метод отслеживания активности мозга в реальном времени успешно используется многими лабораториями, начиная с конца 80-х годов. Оптические методы применялись для картирования колонок дирекционной избирательности *in vivo* в коре млекопитающих, мониторинга эпилептиформной активности нейронных ансамблей в коре млекопитающих (Lieke et al, 1989), одновременной регистрации спайковой активности многих нейронов в ганглии беспозвоночных, регистрации суммарного потенциала действия в нервах и комиссурах беспозвоночных (Cohen, 1989). Также оптическими методами регистрируется вызванная активность в обонятельном пути позвоночных (Cinelli and Kauer, 1992), моллюсков (Kleinfeld et al, 1994; Gelperin, 1998).

В современной экспериментальной практике используются две основных схемы установки оптической регистрации. Первая схема, построенная на использовании матрицы фотодиодов с параллельным усилением, имеет высокое разрешение по времени (~ 0.2 мкс), и низкое пространственное разрешение (124 или 464 фоточувствительных элемента). Разрешение по времени ограничивается как свойствами красителя, так и допустимыми скоростями опроса фотодиодов для получения удовлетворительного отношения сигнал/шум (Cohen, 1988). Вторая схема построена на использовании CCD-камеры (Coupled Charged Device) с последовательным опросом фотоэлементов. Такая схема имеет высокое пространственное разрешение (256000 элементов или более), и низкое разрешение по времени (> 1 мс; Cinelli and Kauer, 1992).

Сигнал, получаемый при регистрации электрической активности нейронных структур оптическими методами, представляет собой сумму мембранных потенциалов нейронов, проецируемых на фоточувствительные элементы матрицы (Cohen, 1988). При этом увеличение количества проходящего света соответствует деполяризации нейронов, а уменьшение – гиперполяризации (Рис. 4.2).

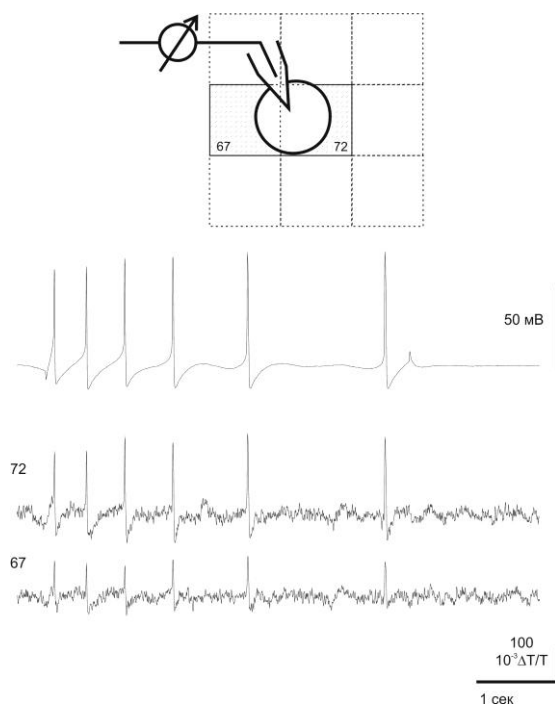


Рис. 4.2. Одновременная внутриклеточная электрофизиологическая (верхняя запись) и оптическая (две нижние записи) регистрации спайковой активности нейрона улитки *Helix*. Сверху изображено положение проекции нейрона на фотодиоды матрицы. Нейрон занимает два канала, отмеченные номерами 72 и 67.

На обоих каналах оптический сигнал имеют форму, идентичную сигналу, записанную внутриклеточным электродом, но на оптической записи отсутствуют артефакты стимуляции. Окрашено пиразо-оксоновым красителем RH -155.

Данная работа выполнена на установке, реализующей схему с параллельным усилением на базе матрицы с 124 чувствительными элементами (Рис. 4.3; Физико-технический институт, С.-Петербург, максимально допустимая частота опроса 5 КГц по каждому каналу). Для устранения вибрационных шумов (до 20 Гц) микроскоп установки жестко

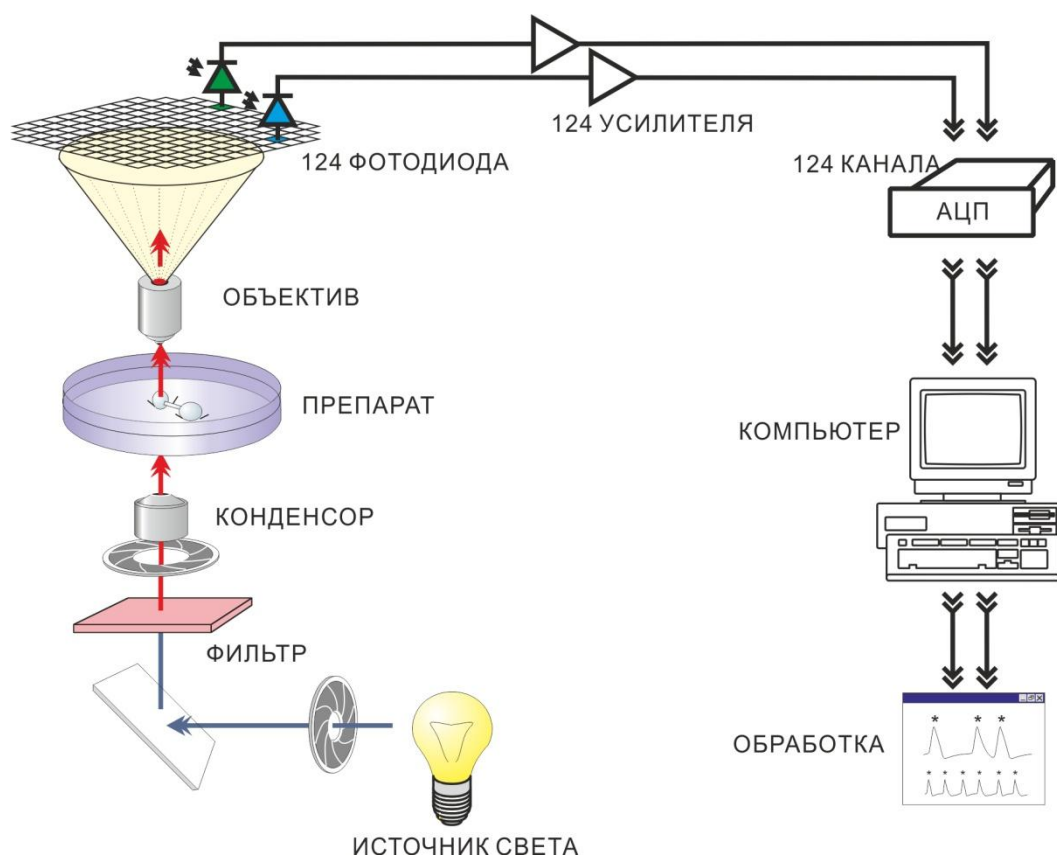


Рис. 4.3. Схема оптической регистрации в проходящем свете с использованием абсорбционных потенциал-зависимых красителей. См. подробное описание в разделе “Методы”, подразделе “Оптическая регистрация”.

крепился к антивибрационному основанию комплекса микроманипуляторов КМ (СКБ НТО АН СССР, Черноголовка). На микроскопе использовали

контактный объектив ЛК x25 (0.4 NA, ЛОМО) и бесконтактный водноимерсионный объектив Plan x20 (0.50 NA, Olympus). Для регистрации бесконтактным объективом препарат после окрашивания заливали в 1,2% агарозу (Lachema/Chemapol), приготовленную на нормальном физиологическом растворе. Регистрацию осуществляли в проходящем свете. Подаваемый на препарат свет проходил сначала через тепловой фильтр и далее через многослойный узкополосный фильтр с полосой пропускания 720 ± 20 нм для получения максимального сигнала. Сигнал усиливали с помощью 124 двухкаскадных усилителей. Усиленный сигнал оцифровывали на стандартном 12-битном АЦП (DAPL 3000A, Microstar laboratories; скорость преобразования по одному каналу 417 тыс. значений/сек). Полученные данные хранились и обрабатывались на компьютере Вгю (Hewlett Packard). Программное обеспечение для приема и обработки данных любезно предоставлено доктором Л. Б. Коэн (Neuroplex, OptImaging LLC). Разрешение оптической записи по времени 4.8 мсек задавалось программно. Пространственное разрешение составляло 0.05 мм на элемент матрицы при регистрации объективом ЛОМО ЛК x25, и 0.06 мм на элемент матрицы при регистрации объективом x20 (Olympus 0.5 N.A WD).

Регистрацию проводили с использованием витальных потенциал-зависимых красителей RH-155 (NK-3041, Nikon), JPW-1131 и JPW1150 (предоставлены Др. Wuskell and Loef, University of Connecticut). Для улучшения растворения красителей применяли неионогенный детергент Pluronic F-127 (20% раствор в диметилсульфоксиде, Molecular Probes) в соотношении 1/1-2 к сухой массе красителя. Применявшиеся красители относятся к ряду пиразо-оксонолов, молекулы которых связываются на клеточной мембране (Cinelli and Kauer, 1992). Все три красителя являются изомерами, различающимися числом атомов углерода в алкильном заместителе. В зависимости от этого числа атомов углерода в ряду пиразо-оксонолов гидрофобность возрастает от наименее гидрофобного RH155 (заместитель – метил) по направлению к наиболее гидрофобному JPW1150 (заместитель – н-пропил). Это свойство определяет легкость растворения в воде и скорость вымывания красителя из клеточных мембран после окрашивания. При изменении потенциала на мембране молекулы пиразо-оксонола меняют спектр поглощения, что и служит источником оптического

сигнала. Наибольшее изменение поглощения происходит вблизи 720 нм (London et al, 1987). Измерявшийся оптический сигнал отражает изменение абсорбции света красителем по отношению к ее средней величине ($\Delta T/T$).

Для доставки потенциал-зависимых красителей также использовали биолистическую установку, построенную по принципиальной схеме, разработанной в лаборатории Гройсмана (Rinberg et al., 2005, Shefi et al., 2006) с необходимыми модификациями для работы на срезах мозга. Использовались золотые микропрожектили BioRad диаметром 1.6 мкм. Был исследован ряд различающихся по липофильности аминопиридиновых потенциал-зависимых красителей (в порядке увеличения липофильности): di-2-ANEPHQ (RH237), di-4-ANEPHS, (RH421), di-8-ANEPHS и di-12-ANEPHQ. ПЗК равномерно наносились на микропрожектили в растворе дихлорметана; после высыхания растворителя окрашенные микропрожектили подвергались ультразвуковому разбиванию конгломератов (Bandelin Sonoplus HD-2070, 80% цикл, 5 минут). В качестве тестовых мишеней использовался 3% агарозный гель, имитирующий плотность нервной ткани. Для визуализации результатов окрашивания нейронов применялся лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (Zeiss LSM5 Live) и гистологический люминесцентный микроскоп (Zeiss Axioskop2) с соответствующими красителю наборами лазеров и фильтров.

Отдельным направлением оптической регистрации является визуализация паттернов концентрации свободного внутриклеточного кальция в объеме цитоплазмы нервной клетки во время генерации ВПСП и потенциала действия (Ross, 1989). Эта задача успешно решается с помощью комбинирования оптической регистрации и конфокальной микроскопии. Недавно появились работы, в которых анализируется динамика распределения внутриклеточного кальция в дендритах, дендритных шипиках и соме нейронов неокортекса (Koester and Sakmann, 1998) и нейронах Пуркинье мозжечка (Konnerth, 1996). Для выявления свободного кальция используют внутриклеточно инъецируемые или свободно проникающие кальций-хелатирующие зонды, такие как Fura-2, Oregon Green 488, Calcium Green.

Кроме потенциал-зависимых красителей в работе использовали оптическую регистрацию свободного кальция в нейронах, избирательно

заполненных кальций-чувствительным красителем Oregon Green 488 Bapta 1, осуществляющуюся в отраженном свете с возбуждающим фильтром 450-480 нм, и отрезающим фильтром 510-530 нм. Для регистрации кальция использовали микроскоп с возможностью работы с флуоресценцией и систему регистрации NeuroCCD (OptImaging LLC) построенную на основе CCD-камеры (80x80 элементов). Регистрацию проводили через люминесцентный водноимерсионный объектив x30 (Ломо, N.A. =0.9) со скоростью оцифровки 500 значений в секунду.

Также в работе использовали методы конфокальной микроскопии с использованием лазерного сканирующего микроскопа LSM 5 live (Zeiss, Германия), с возбуждающими линиями лазеров 405, 488 и 532 нм и полосой пропускания 500-540 нм, 550LP или 650LP. При морфологическом послойном сканировании данные затем подвергали 3D реконструкции с использованием программного обеспечения Zeiss AIM 4.2. Для конфокальной микроскопии использовали объективы x40 W.I. NA 0.8 и x63 W.I. NA 1.0 IR DIC (Zeiss).

В работе также использовали флуоресцентный маркер эндоцитоза и ресайклинга синаптических везикул FM4-64 (Инвитроген) для детекции сайтов активного синаптического релиза медиатора. Краситель хранили в замороженных аликвотах для финального разведения в 100 раз до концентрации 10 мкМ. После 5 мин аппликации краситель отмывали в течении как минимум 20 мин раствором хелатирующего агента ADVASEP 7 (Инвитроген), свежее приготовленного на основе безнатриевого физраствора (натрий замещен на NMDG, Sigma) в концентрации 1 мкМ.

4.4. Предъявление запаха.

Предъявление запаха осуществляли с помощью ольфактометра (Рис. 4.4; Kauer and Moulton, 1974). Ольфактометр позволяет дозировать разведение запаха в пределах 5-100% от насыщенной концентрации, изменяя соотношение холостого потока очищенного воздуха и потока через камеру с запахом. Потоки измеряли двумя флауметрами (GF-1100, Gilmont

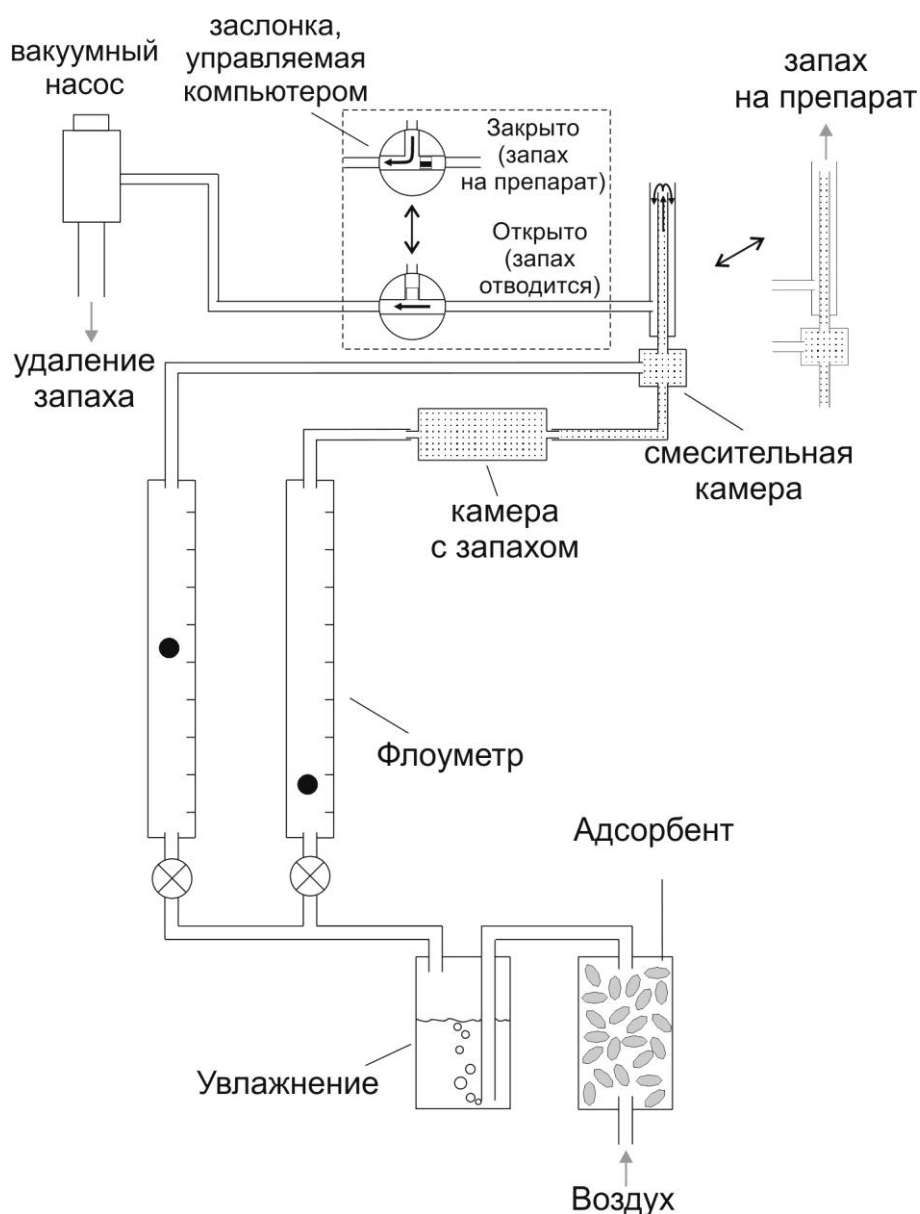


Рис. 4.4. Схема ольфактометра - прибора, использованного для подачи запаха. Электрическая заслонка, управляемая компьютером, прекращает активное откачивание запаха вакуумным насосом, и запускает подачу запаха на препарат.

Instruments). Перед подачей на препарат эти потоки смешивали. Суммарный поток, выходящий из подающего отверстия составлял 100-110 мл/мин. Запах предъявляли на расстоянии 1.5 см от рецепторной поверхности путем прекращения активного отсоса запаха от кончика подающей пипетки. Прекращение осуществляли электрическим соленоидным краном (Parker instruments), управляемым с компьютера. Время поворота заслонки крана

составляет менее 10 мсек. Описанная выше схема подачи запахов позволяет надежно воспроизводить концентрацию запаха и длительность воздействия от опыта к опыту. Кроме того, такая схема подачи запаха не даёт артефактов механического происхождения на оптической записи. Устройство ольфактометра позволяло во время опыта менять камеры, содержащие запахи. Для соединения камеры смесителя и камеры с запахом использовалась тефлоновая трубка для предотвращения адсорбции и накопления остаточных запахов после смены камер. Смеситель также был выполнен из тефлона. Для каждого запаха использовали отдельную сменную стеклянную подающую пипетку. Повторное предъявление запаха обычно проводили не раньше, чем через 6 мин для предотвращения привыкания к предъявляемому запаху кроме опытов, в которых исследовали адаптацию. В работе использовали запахи цинеола, изоамилацетата и бензальдегида (все Sigma). Эти вещества являются жидкостями, которые возможно длительно хранить (в отличие от большинства естественных запахов, которые быстро разлагаются) и легко использовать для предъявления животному или препарату. Предварительно было выявлено, что улитка реагирует на присутствие этих веществ в воздухе, что позволило их использовать в качестве химического стимула для исследования обонятельной системы улитки. Вещества наносили на фильтровальную бумагу до полного увлажнения. Затем фильтровальную бумагу помещали в камеру. Кроме мономолекулярных запахов, в работе использовали естественные пищевые запахи моркови и огурца. Для получения этих запахов перед опытом плоды измельчали до получения сока, который также наносили на помещаемую в камеру фильтровальную бумагу. Концентрацию запаха в камере считали насыщенной ввиду большой поверхности испарения и наличия жидкой фазы.

Чтобы удостовериться в отсутствии утечки запаха, ольфактометр заполняли окрашенным газом, получавшимся путем смешением паров аммиака и соляной кислоты (Chase, 1981). Латентность диффузии запахов калибровали, измеряя промежуток времени, прошедшего с момента открытия заслонки до момента детекции окрашенного газа фотодатчиком, помещенном на расстоянии 1.5 см от подающего отверстия ольфактометра. Датчик окрашенного газа реагировал на затенение и состоял из фотодиода и

источника сфокусированного светового луча, непрерывно подаваемого на этот фотодиод. Измеренная латентность увеличения концентрации до половины конечной величины составляла 134 ± 26 мсек. Исходя из этого, полное время движения запаха от подающего отверстия до препарата в расчетах латентности ответа на запах принимали равным 134 мсек.

4.5. Тактильная стимуляция.

На нейроны роstralной группы педального ганглия воздействовали стимуляцией электрическим током кожного нерва *nervus cutaneus II*, тактильным раздражением кожи ноги улитки и внутриклеточной стимуляцией идентифицируемых нейронов педального ганглия. Для регистрации реакции препарата на стимуляцию нерва и тактильную стимуляцию использовали контактный объектив ЛК x25, а для регистрации реакции на внутриклеточную стимуляцию - объектив x20. Стимуляцию нерва проводили через пластиковый присасывающийся электрод (интенсивность подбиралась в каждом опыте). Тактильную стимуляцию проводили с помощью устройства-касалки, состоящего из пластикового волоска, прикрепленного к подвижной части катушки реле. Волосок приводили в движение, подавая электрический ток на реле. Устройство крепилось к основанию установки независимо от микроскопа для предотвращения появления механических артефактов на записи в момент стимуляции. Длительность тактильного стимула составляла 50 мс, нагрузка 1 грамм, диаметр волоска 0.1 мм. В нескольких опытах проводили повторную стимуляцию одной точки ноги с интервалом в 3-4 мин или же стимуляцию последовательно трех точек на коже, лежащих на одной линии и отстоящих друг от друга на ~5 мм с тем же интервалом. Внутриклеточную стимуляцию нейронов проводили через регистрирующий электрод с сопротивлением 15-20 мОм током силой 5-8 нА, с длительностью стимуляции 50 мс. Аппликацию серотонина проводили пипеткой-микродозатором в ванночку до финальной концентрации $10^{-5} - 10^{-6}$ мМоль/л.

4.6. Иммуноцитохимия.

Поскольку предполагалось, что обучение может приводить к увеличенной экспрессии генов потенциал-зависимых каналов, отвечающих за NaV1.9 подобный постоянный медленно инактивированный ток в нейронах *Lutpaea*, мы использовали иммуногистохимическое окрашивание на NaV1.9. Для этого препараты от контрольных и обученных животных через 24 ч после обучения прикалывали микроиглками на дно препаровальной чашки, покрытой полимером Sylgard, и фиксировали холодным раствором 4% параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (pH = 7.4) в течение одного часа при комнатной температуре. Далее препараты инкубировали при 4°C в течении ночи в PBS, содержащем 30 сахарозы, и после этого делали на срезы 18 мкм с использованием криостата, и помещали их на предварительно подготовленные стекла. Каждый слайд содержал 3 ряда срезов, по одному от каждой группы из этого эксперимента (обученные, несочетанные и наивные).

Срезы потом отмывались в PBS в течении 3x5 мин, потом в PBS, содержащем 0.25% TritonX-100 (PBS-TX, Sigma) в течении 2x10 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание блокировалось специальным буфером (4% нормальной козлиной сыворотки в PBS-TX), затем срезы инкубировали в сыворотке кролик анти-NaV1.9 (1:100, Alomone Labs) при 4°C в течении 16 часов. Затем срезы отмывали в PBS 3x10 мин, потом срезы инкубировали с алкалин фосфатазой (1:200 Sigma) конъюгированной с козлиным IgG анти-кролик при комнатной температуре. Все антисыворотки разводились блокирующим буфером. Срезы промывали в PBS 3x10 мин, потом окраску интенсифицировали алкалиновым фосфатным буфером, 6.6 мкл Nitroblue Tetrazolium (Roche), 4 мкл 3% TritonX-100 при комнатной температуре, после чего реакцию останавливали промыванием срезов в PBS. После окончания процедур препараты заливали в канадский бальзам.

4.7. Поведенческие эксперименты.

4.7.1. Экспериментальное обучение.

Для изучения биологического значения запаха использовали протокол выработки условного рефлекса в специальной экспериментальной установке (Balaban et al, 1987). Улитку прикрепляли за раковину к концу пластинки, жестко прикрепленную другим концом к вертикально установленному стержню. Такой способ крепления оставлял улитке

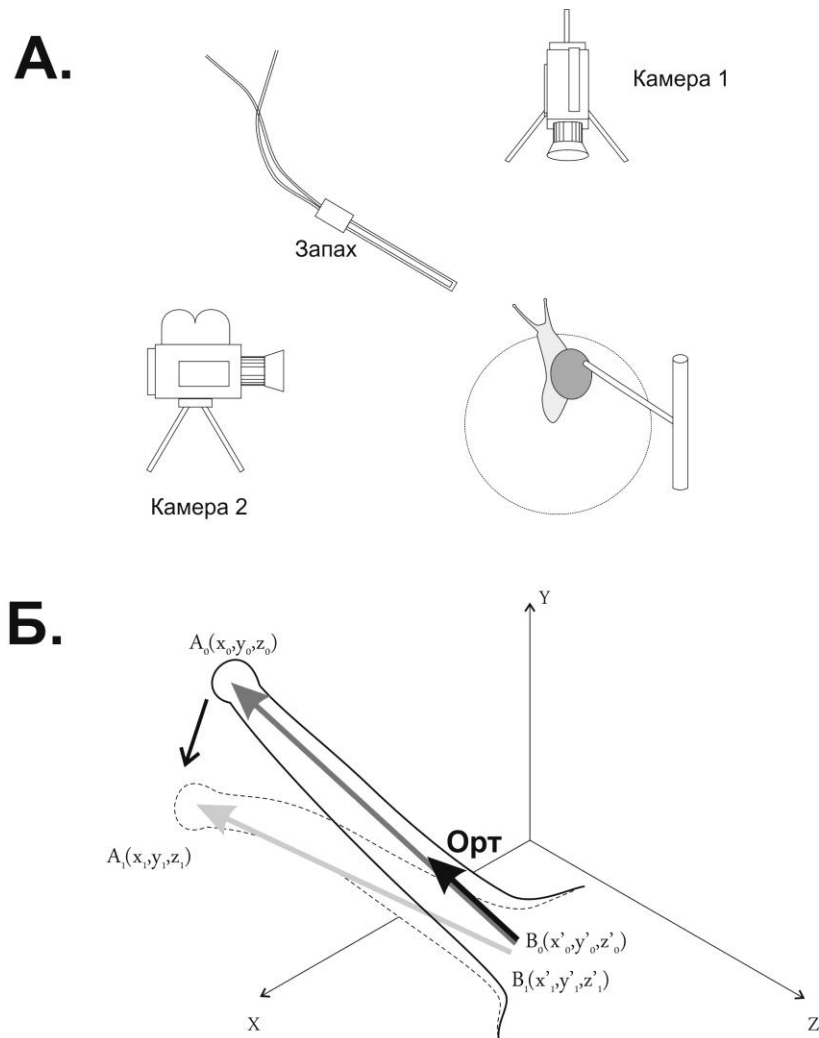


Рис. 4.5. Схема проведения поведенческих экспериментов. (А), открытое поле. Крестиками обозначены положения капсулы с запахом (одно из двух). Улитка находится на отметке старта. (Б), установка для обучения улиток запахам (Запах - выходная трубка ольфактометра с запахом).

некоторую свободу действий и позволял «ползти» по шару, плавающему в 0,01% растворе NaCl (Рис. 4.5). Удары током (~110 мА, 0.5 сек, 10 Гц) наносили металлическим электродом, который вручную подносили к дорзальному участку кожи ноги. Сеть замыкалась через угольный электрод, погруженный в раствор. Шар, по которому ползла улитка, был также покрыт электропроводным материалом. Сила тока была достаточной, чтобы заставить улитку полностью втянуть в раковину ногу и голову. После многократных предъявлений в ходе обучения электрического тока заметного некроза кожи на месте его приложения не наблюдали. Для предъявления запаха открывали герметичную капсулу, содержащую смоченную запахом фильтровальную бумагу с расстояния 4-6 см от головы животного. Концентрацию запаха приблизительно оценивали как 0,1-1% исходя из того, что в капсуле концентрация насыщенная, и она убывает пропорционально квадрату расстояния от источника запаха. При выработке реакции втягивания щупалец в ответ на запах удар током наносили через 10-15 с после начала подачи запаха, и в группе контрольных животных через 30-60 мин. Каждая группа состояла из 12 животных. Обучение проводили в продолжение 16-20 дней, осуществляя по одному сочетанию в день (т. е. за весь период обучения животное получало 16-20 сочетаний). Тестирование выработанного условного рефлекса проводили в смешанной группе обученных и контрольных животных с использованием слепого контроля. В ходе тестирования фиксировали максимальную степень втягивания животным передних щупалец в течение 30 секунд после начала предъявления запаха. Обучение и тестирование проводили в постоянно вентилируемом помещении. Далее на полуинтактном препарате «обонятельный орган – ЦНС» у обученных и контрольных животных регистрировали методом оптической регистрации осцилляторную активность процеребрума в ответ на 5% запах, наносимый с расстояния 1.5 см.

Для окраски препаратов обученных и необученных животных использовали JPW-1131 (RH479). Анализировали вызванные запахом изменения в частоте, суммарной амплитуде, проксимально-дистальном отношении (отношение амплитуды волны осцилляций в проксимальной

части к амплитуде в дистальной части процеребрума) и фазовом сдвиге спонтанных ритмических осцилляций в процеребруме для каждого пика осцилляций. Полученные значения параметров нормировали, за 100% принимали среднее значение в интервале 15 сек. до предъявления запаха. Это позволяло получить относительное значение параметра (напр. относительную частоту). После, относительные значения параметров усредняли по интервалам в 5 сек. и строили гистограммы. Усреднение проводили также для того, чтобы уравнивать количество значений параметров осцилляций (частота, амплитуда и т. п.), полученных из разных опытов и обеспечить одинаковый вклад различных экспериментов в общую статистику, т.к. частота осцилляций в разных опытах варьировала в пределах 0.5-1.2 Гц, и количество осцилляций, приходившихся на интервал 5 сек. различалось. Амплитуду рассчитывали как разность между экстремумами восходящей и нисходящей фаз волны осцилляций на каждом детекторе.

Водных улиток *Lymnaea* обучали классическому пищевому рефлексу с одного предъявления, сочетая водорастворимые химические стимулы: условный стимул амил-ацетата (финальная концентрация 0.004%) и безусловный стимул сахарозы (0.67%) с межстимульным интервалом 15 с. Контрольной группе предъявляли явно несочетанные предъявления стимулов, разделенных по времени на 1 час. Сочетания балансировались совместным предъявлением воды вместо сочетанного компонента. Животных тестировали с использованием двойного слепого контроля. Критерием служило число жеваний (открываний и закрываний рта), посчитанное за определенный период (обычно 2 мин), или же ответ в виде «фиктивных жеваний», регистрировавшихся как спайковый разряд в моторных нервах на полуинтактном препарате губ и ЦНС. Из полученных значений вычитали среднее число жеваний в фоне на аппликацию воды вместо раствора условного стимула.

4.7.2. Видеорегистрация движений щупальца.

Для регистрации сокращения щупальца в ответ на запах использовали такую же экспериментальную установку, как при обучении

(см. выше). Видеосъемку улитки проводили с двух сторон двумя кинокамерами, расположенными примерно под прямым углом. Видеоданные оцифровывали и обрабатывали на компьютере с помощью программы PhysVis 1.4 (Kenyon College, США). Движение щупальца описывали с помощью вектора, соединяющего основание и кончик щупальца (Рис. 4.5Б). По координатам вектора в каждый момент времени вычисляли длину, координаты единичного направляющего вектора (орт, абсолютная длина этого вектора по определению равна 1, а координаты характеризуют только направление в пространстве), и модуля вектора смещения кончика щупальца за единицу времени (0,12 сек), соответствующий частоте видеосъемки 8,3 кадров/сек. Также проводили видеорегистрацию изолированного от ЦНС переживающего щупальца. Для этого использовали препаравальный микроскоп, состыкованный с видеокамерой через адаптер, закрепленный на месте одного из окуляров. Щупальце закрепляли за основание по возможности горизонтально, и наполняли физиологическим раствором под давлением 220-250 мм водного столба для создания поддерживающего давления.

5. НЕСИНАПТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ КАК ОСНОВА АССОЦИАТИВНОЙ ПАМЯТИ И УВЕЛИЧЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ.

Наиболее интригующим свойством нервной системы является способность накапливать и дополнять информацию о произошедших событиях, что позволяет животным менять манеру поведения и более точно и быстро реагировать на изменяющиеся условия окружающей среды. Данное свойство – «пластичность» совпадает во времени, и является основой процессов обучения и запоминания. Важным методом прямого изучения пластичности является применение функциональной прижизненной оптической визуализации для изучения клеточных и субклеточных механизмов хранения и воспроизведения долговременной памяти отдельными нейронами беспозвоночных и млекопитающих. Оптические методы позволяют зарегистрировать, как пластически изменяется возбудимость отдельных компартментов нейрона – аксона и дендритов, и как это влияет на генерацию, проведение по ним и затухание потенциала действия, необходимого для электрической сигнализации.

На модели идентифицированного нейрона моллюска было показано, что появляющаяся после обучения постоянная деполяризация ключевого модуляторного нейрона пищевого поведения CGC, приводит к изменению динамики амплитуды потенциала действия в аксоне, что в итоге вызывает запуск программы пищевого поведения животного. Наши исследования выявили, что деполяризация нейрона, возникающая после обучения и достаточная, чтобы вызывать пищевую реакцию, распространяется на боковую ветвь аксона, и подавляет аттенюацию кальциевого сигнала и амплитуды потенциала действия при его распространении по этой ветви. Использование маркера пресинаптического эндоцитоза показало, что на конце этой боковой ветви находятся скопления пресинаптических везикул, что подтверждает значение этой ветви в выбросе медиатора, необходимой для запуска нейронных сетей уровня генерации пищевого ритма и пищевого поведения. Наши исследования показали, что изменение мембранного потенциала, приобретаемое компетентным нейроном после обучения, способно управлять выходными сигналами этого нейрона путем

регулировки прохождения электрического сигнала по специфическим аксонным компартментам. Исследования локализации пластичности на уровне частей одного нейрона формируют принципиально новые дополнения в концепцию клеточных механизмов памяти, и объясняют ранее не рассматривавшиеся механизмы ее хранения, связанные с фундаментальными морфологическими особенностями строения нейронов.

5.1 Постоянный неинактивируемый натриевый ток как мишень для вызванной цАМФ нейрональной пластичности.

Низкопороговый постоянный входящий натриевый ток, устойчивый к тетродотоксину, был идентифицирован в гигантском церебральном нейроне *Lymnaea* (cerebral giant cell, CGC), являющимся важным модуляторным типом интернейрона пищевой сети моллюска. Этот ток демонстрирует медленную кинетику потенциал-зависимой активации и деактивации, а также ультра-медленную кинетику инактивации и относительно быструю кинетику деинактивации. Он активируется при потенциалах около -90 мВ, достигает максимума приблизительно около -30 мВ и инвертируется при значениях около +35 мВ, не демонстрируя полной инактивации даже при позитивных значениях ступеней тестирующего мембранного потенциала. Эксперименты с замещением натрия показали, что постоянный натриевый ток вносит значительный вклад в поддержание значения мембранного потенциала CGC. Внутриклеточная инъекция циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в тело CGC вызывает значительное увеличение постоянного натриевого тока в последующие несколько часов. Инъекция цАМФ также приводит к появлению пачечных пайковых разрядов и достоверному снижению входного сопротивления и деполяризации мембраны клеточного тела CGC, что указывает на наличие долговременной цАМФ-зависимой пластичности у CGC. Результаты наших экспериментов являются первым связующим звеном между цАМФ-индуцированной модуляцией ТТХ-устойчивого постоянного натриевого тока с одной стороны, и долговременной нейрональной пластичностью идентифицированного модуляторного нейрона, играющего важную роль в определении текущего типа поведения.

Нейрофизиологический анализ модельных систем моллюсков внес значительный вклад в наше понимание клеточных механизмов неассоциативных изменений состояния системы, определяющих поведение, эквивалентное ориентировочной реакции (arousal) у позвоночных (Brezina et al., 2003; Kupfermann 1974; Kupfermann and Weiss 1982; Marinesco et al., 2004; Teuche et al., 1990). К важному типу идентифицируемых модуляторных нейронов, обладающих функцией «установливания» поведенческого состояния в сети пищевого поведения, относятся гигантские клетки церебральных ганглиев CGC улиток *Lymnaea* (Yeoman et al., 1994a, b) и их гомологи у других гастропод (Gillette and Davis 1977; Kupfermann and Weiss 1982; Weiss et al., 1981). Недавно полученные данные предполагают наличие связи механизмов ассоциативной долговременной памяти с функционированием нейронов CGC (Kemenes et al., 2001; Kojima et al., 1997). Кроме того, эти нейроны могут быть важны как для ассоциативной, так и для неассоциативной пластичности пищевого поведения.

Несмотря на большое количество информации о функциях CGC и их гомологов в других системах, удивительно мало до сих пор известно о клеточных механизмах, лежащих в основе участия CGC в пластичности поведенческих реакций. Одной из тестируемых гипотез послужило предположение об участии вторичных посредников в долговременных изменениях в специфических ионных токах CGC, которое приводит к долговременным изменениям электрических свойств мембраны. Эти изменения, в свою очередь, могут затрагивать входное сопротивление, мембранный потенциал и спонтанную активность, являющиеся ключевыми характеристиками, определяющими его функцию как модуляторного нейрона.

Чтобы точнее оценить вклад отдельных токов в электрическую активность CGC, мы сконцентрировали наши усилия на постоянном натриевом токе, который имеет самый низкий порог активации (Staras et al., 2002). Похожие типы постоянных неинактивируемых натриевых токов были найдены у млекопитающих, где они играют роль в регуляции мембранного потенциала и разряда нейрона (Dibb-Hajj et al., 2002). Постоянный натриевый ток CGC активируется при низких значениях мембранного потенциала (приблизительно при -90 мВ), когда ни один другой из

известных токов еще неактивен (Staras et al., 2002). Таким образом, этот ток может играть роль в определении мембранного потенциала и подпороговой возбудимости у CGC и потенциально служить важной мишенью для пластических изменений, лежащих в основе ориентировочного поведения и ассоциативного обучения. В этом разделе мы концентрируем внимание на эффектах цАМФ на постоянный натриевый ток в CGC потому, что известны многие примеры участия цАМФ-зависимых каскадов вторичных посредников в реализации долговременной пластичности (Bailey et al. 1996; Dudai, 1987; Hu et al. 2001; Nguyen and Woo 2003; Nirenberg et al. 1983). Нами было продемонстрировано, что цАМФ изменяет электрические свойства мембраны CGC на длительное время, модулируя постоянный натриевый ток в клеточной мембране сомы этого нейрона. Очень вероятно, что электрические изменения в CGC связаны вызванным цАМФ увеличением постоянного натриевого тока и продолжительной деполяризацией клеточной мембраны, что может иметь огромное функциональное значение как для функции CGC в установлении состояния пищевых сетей, так и для его предположительной роли в ассоциативном обучении.

5.1.1. Активация, деактивация и инактивация $I_{Na(P)}$.

Чтобы охарактеризовать общие свойства постоянного натриевого тока в CGC на полной шкале значений его мембранного потенциала (от -90 мВ до +30 мВ) мы использовали номинально бескальциевый раствор, содержащий блокаторы кальциевых и калиевых токов. На мембрану CGC подавались ступеньки потенциала или протокол с медленным нарастанием потенциала в режиме фиксации потенциала, начиная с уровня удерживаемого потенциала -110 мВ. Примеры экспериментальной регистрации токов со ступенчатой активацией представлены на Рис. 5.1.1А. Ступенька потенциала до -60 мВ активировала только постоянный входящий ток (Рис. 5.1.1А, сверху), в то время как ступенька до значения -30 мВ активировала также и входящий быстрый инактивируемый ток вместе с постоянным входящим током (Рис. 5.1.1А, снизу). Оба этих тока были ранее идентифицированы как натриевые ($I_{Na(T)}$, transient – быстрый натриевый ток;

$I_{Na(P)}$, persistent – постоянный натриевый ток; Staras et al., 2002). Мы измеряли значение оценки времени полуактивации (время до полуамплитуды) в ряду потенциалов от -70 до +30 мВ и выделили две различных одноэкспоненциальных функции, хорошо описывающие зависимость времени полуактивации от потенциала (Рис. 5.1.1В). Первая функция описывает медленную активацию тока для ряда данных в диапазоне от -70 до -30 мВ и она, по-видимому, характеризует активацию $I_{Na(P)}$. Вторая функция описывает быструю компоненту в диапазоне от -30 мВ до +30 мВ соответственно и, по-видимому, характеризует активацию $I_{Na(T)}$.

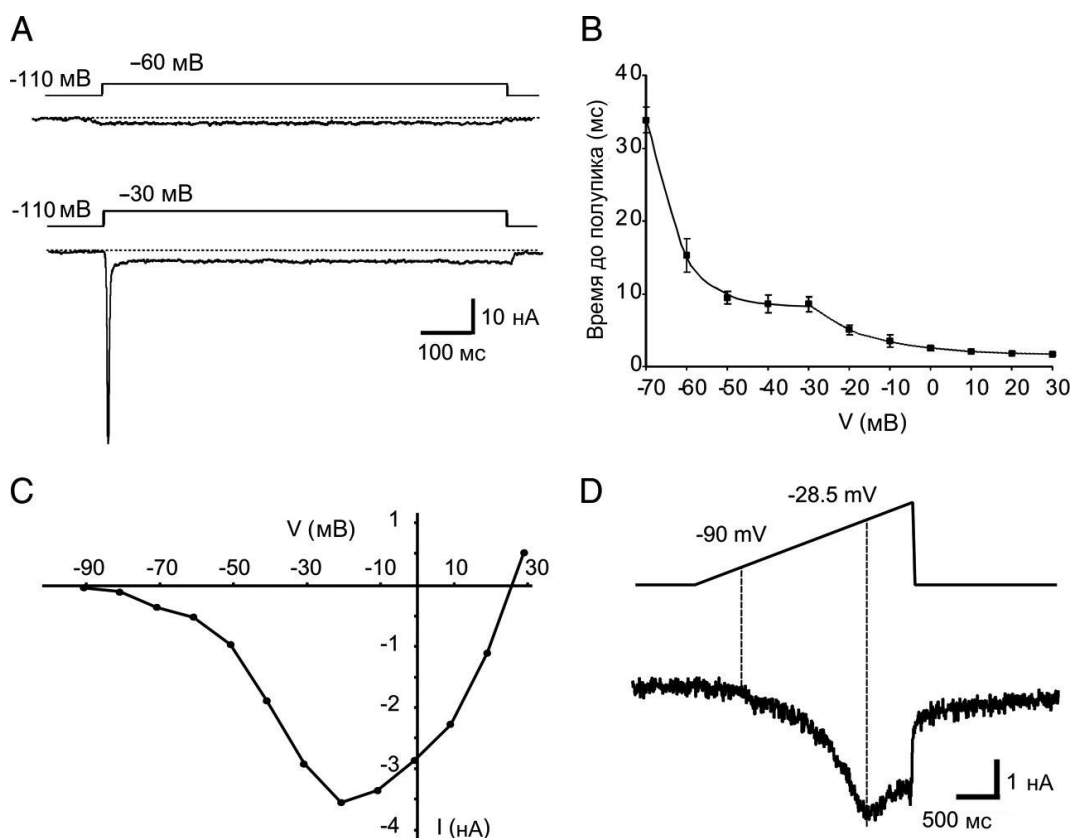


Рис. 5.1.1. Скорость и зависимость активации $I_{Na(P)}$ от потенциала CGC. (A) показаны примеры двух типичных регистраций токов, вызванных ступенями потенциала вверх от удерживаемого значения -110 мВ. Сверху: запись, полученная в ответ на ступень до -60 мВ выявляет только постоянный ток $I_{Na(P)}$, тогда как запись, полученная при смещении потенциала к значению -30 мВ выявляет как постоянный $I_{Na(P)}$, так и быстрый $I_{Na(T)}$ натриевые токи. (B) График зависимости времени полуактивации, отложенного относительно значений ступеней потенциала активации, с подобранными двумя различными моноэкспоненциальными функциями. Первая функция отражает медленную потенциал-зависимую активацию, вторая – быструю

потенциал-зависимую активацию. (С) Вольтамперная характеристика для эксперимента, показанного на «А» для диапазона ступеней от -90 мВ до +30 мВ. Значения тока измеряли в конце каждой ступени. Таким образом, вольтамперная характеристика отражает постоянный входящий ток. (D) $I_{Na(P)}$, вызванный протоколом нарастания потенциала (ramp) от -120 до 0 мВ.

Кривая вольт-амперной характеристики (I-V), базировавшаяся на стационарных значениях (измеряемых в конце 800 мсек ступенек потенциала) представлена на Рис. 5.1.1В. $I_{Na(P)}$, который был исходно описан как натриевый ток, активируемый при низких значениях потенциала ($I_{Na(L)}$; Staras et al., 2002), демонстрировал максимальное пиковое значение -26.4 ± 2.4 мВ ($n = 7$) и инвертировался при потенциале $+30.0 \pm 7.1$ мВ. В подобных же экспериментах мы зарегистрировали пик быстрого натриевого тока ($I_{Na(T)}$) в значениях -27.9 ± 2.2 мВ ($n = 7$), что соответствует предыдущим наблюдениям Staras et al. (2002). Амплитуда $I_{Na(P)}$, измеренная в точке максимума вольтамперной характеристики, была -4.1 ± 0.3 нА, что составляло ~8% пика амплитуды $I_{Na(T)}$ (-51.8 ± 4.1 нА, $n = 7$). Протокол медленного нарастания потенциала со скоростью нарастания 40 мВ/сек (Рис. 5.1.1D) выявил активацию $I_{Na(P)}$ примерно при -90 мВ и пик -28.5 ± 2.1 мВ ($n = 6$) тогда как $I_{Na(T)}$ в этих экспериментах был полностью инактивирован. Вольтамперная характеристика $I_{Na(P)}$, полученная в экспериментах с медленным нарастанием потенциала, была сходна с вольтамперной характеристикой, реконструированной из ступенчатого протокола, а их амплитуды сопоставимы.

Амплитуда $I_{Na(P)}$ оставалась практически постоянной на протяжении всего регистрируемого периода ступени потенциала (800 мсек, Рис. 5.1.1А), демонстрируя уменьшение не более 5% при всех значениях потенциала. Это указывает на ультра-медленную инактивацию этого тока. Однако, ток CGC $I_{Na(P)}$, подобно похожим токам в других системах (Dib-Hajj et al., 2002), мог частично инактивироваться на протяжении ступени потенциала в потенциал-зависимой манере. Если это так, то часть тока $I_{Na(P)}$ может быть инактивированной во время ступени потенциала, но потом со временем восстановиться после реполяризации. Чтобы построить кривую инактивации для $I_{Na(P)}$ мы использовали командный протокол со ступенями от

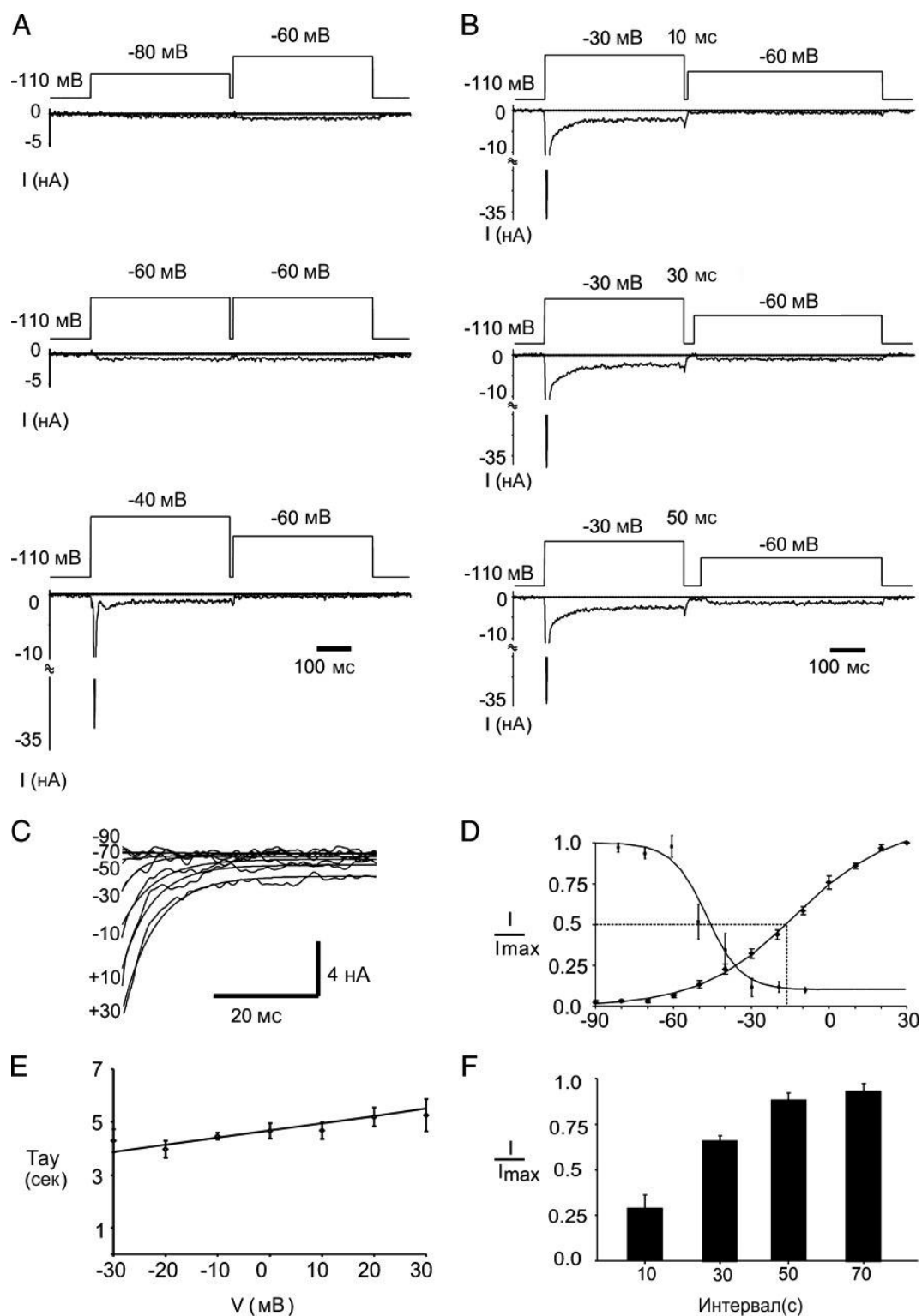


Рис. 5.1.2. Активация, инактивация, деинактивация и восстановление после инактивации у тока $I_{Na(P)}$. (A) Протокол с двумя ступенями для измерения инактивации. (B) Протокол с двумя ступенями для измерения восстановления после инактивации. (C) Семейство хвостовых токов $I_{Na(P)}$, каждый из которых описывается подобранной моноэкспоненциальной кривой для измерения значений активации и деинактивации. (D) Кривые активации и деинактивации, построенные по результатам тестов,

показанных на «А» и «В», и описанных подобранными кривыми Больцмана. (Е) Параметр τ из подобранных функций, показанных на «В» для интервала -30 до +30 мВ. (F) Нормализованные амплитуды $I_{Na(P)}$ измеренные в стационарном состоянии как функция временного интервала между ступенями в эксперименте, показанном на «В».

удерживаемого потенциала -110 мВ до ступеней потенциала от -80 до -10 мВ (с шагом +10 мВ) с последующей короткой реполяризацией (10 мсек) обратно к уровню -110 мВ, затем к значению ступени потенциала -60 мВ ($n = 5$, Рис. 5.1.2А). Чтобы исследовать зависимость восстановления после инактивации в конце каждой ступени потенциала мы использовали протокол с фиксированными кондиционирующими и тестирующими импульсами, -30 и -60 мВ соответственно, и варьировали межимпульсный интервал от 10 до 70 мсек (Рис. 5.1.2В). Чтобы построить кривую активации для $I_{Na(P)}$ мы подбирали одноэкспоненциальные функции для хвостовых токов, вызываемых сдвигом потенциала назад к -110 мВ после кондиционирующего преимпульса от +30 до -90 мВ (Рис. 5.1.2С, $n = 7$).

Кривая активации $I_{Na(P)}$ (Рис. 5.1.2D) построенная по результатам эксперимента, показанного на Рис. 5.1.2В, приближенно описывалась кривой уравнения Больцмана: $I/I_{max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$, где V_h (потенциал полуактивации) = 18 мВ, k (коэффициент наклона) = 76.95. Параметр τ экспоненциальных функций, подобранных для описания хвостовых токов, характеризовал де-инактивацию $I_{Na(P)}$, которая демонстрировала малую зависимость от потенциала (Рис. 5.1.2D). Кривая инактивации $I_{Na(P)}$ (Рис. 5.1.2D), базировавшаяся на типе эксперимента, показанного на Рис. 5.1.2А, наиболее точно описывалась уравнением Больцмана: $I/I_{max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_h)/k]\} + C$, где V_h (потенциал полуактивации) = -46 мВ, k (коэффициент наклона) = 7.43, C (константа, отражающая долю тока, проходящего через неактивированные каналы) = 0.11. Тот факт, что величина C больше «0» указывает на то, что некоторая доля каналов, проводящих $I_{Na(P)}$, не инактивируется даже при командных потенциалах > -30 мВ.

Относительные значения токов (среднее $I/I_{max} \pm$ стандартная ошибка), вызванные второй ступенькой потенциала до значения -60 мВ в типе эксперимента, проиллюстрированного на Рис. 5.1.2В, показаны на Рис.

5.1.2Е. Значение тока, полученное после 10-ти миллисекундного интервала составляло $\sim 26\%$ от I_{\max} , тогда как ток после 70-ти миллисекундного преимпульса составлял $\sim 95\%$ от стационарного значения тока, зарегистрированного без преимпульса, что подразумевает быстрое восстановление после потенциал-зависимой инактивации.

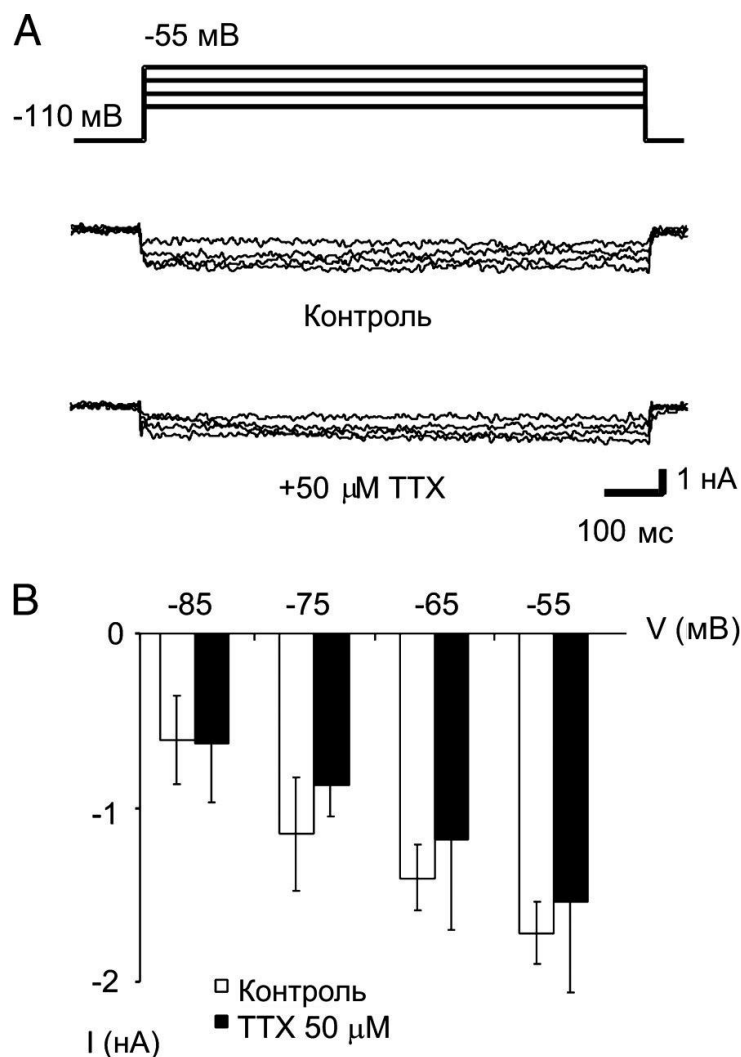


Рис. 5.1.3. Ток $I_{Na(P)}$ нейрона CGC у *Lymnaea* является тетродотоксин-устойчивым. (А) Семейства токов $I_{Na(P)}$ в отсутствие (контроль) и в присутствии 50 мкМ тетродотоксина. (В) Стационарные амплитуды $I_{Na(P)}$ в контрольных и обработанных тетродотоксином препаратах. Значительных отличий между контролем и аппликацией тетродотоксина не наблюдали ни при каких значениях ступеней потенциала.

Также мы тестировали нейроны CGC в режиме фиксации потенциала на предмет присутствия так называемого возрождающегося (resurgent) тока, используя принятые для этого протоколы (Kiss, 2003; Raman and Bean, 1997), но никаких свидетельств его присутствия получено не было (данные опущены).

5.1.2. $I_{Na(P)}$ является тетродотоксин-устойчивым.

Ток $I_{Na(P)}$ активируется при более низких значениях потенциала, чем какой-либо другой ток нейрона CGC (Staras et al., 2002), и это предоставляет уникальную возможность для исследования фармакологических свойств этого тока в диапазоне потенциалов, свободном от интерференции с другими токами. Соответственно с этим, мы тестировали устойчивость $I_{Na(P)}$ к тетродотоксину в нормальном физиологическом растворе, измеряя стационарные токи, вызванные ступенями потенциала от удерживаемого значения -110 мВ до потенциалов ступеней от -85 до -55 мВ. Пример тока, вызванного в CGC на фоне 50 мкМ тетродотоксина, приведен на Рис. 5.1.3А, а усредненные данные для потенциалов от -55 мВ и ниже показаны на Рис. 5.1.3В. Постоянный натриевый ток демонстрировал высокую степень устойчивости к тетродотоксину в концентрации 50 мкМ (данные не показаны), подтверждая предыдущие наблюдения (Staras et al., 2002). Известные блокаторы постоянного натриевого тока нейронов млекопитающих, райлузол и фенитоин (напр. корковые нейроны мозга крысы, Chao and Alzheimer, 1995; Urbani and Belluzzi, 2000) не произвели эффекта на $I_{Na(P)}$ у CGC ($n = 9$ и 4 экспериментов соответственно, данные не показаны).

5.1.3. $I_{Na(P)}$ вносит значительный вклад в мембранный потенциал нейрона CGC.

Чтобы ответить на вопрос о влиянии постоянной натриевой проводимости (тока $I_{Na(P)}$) на величину значения мембранного потенциала CGC, проводились эксперименты, в которых Na^+ во внешнем физиологическом растворе заменяли на ионы Li^+ . Известно, что Li^+

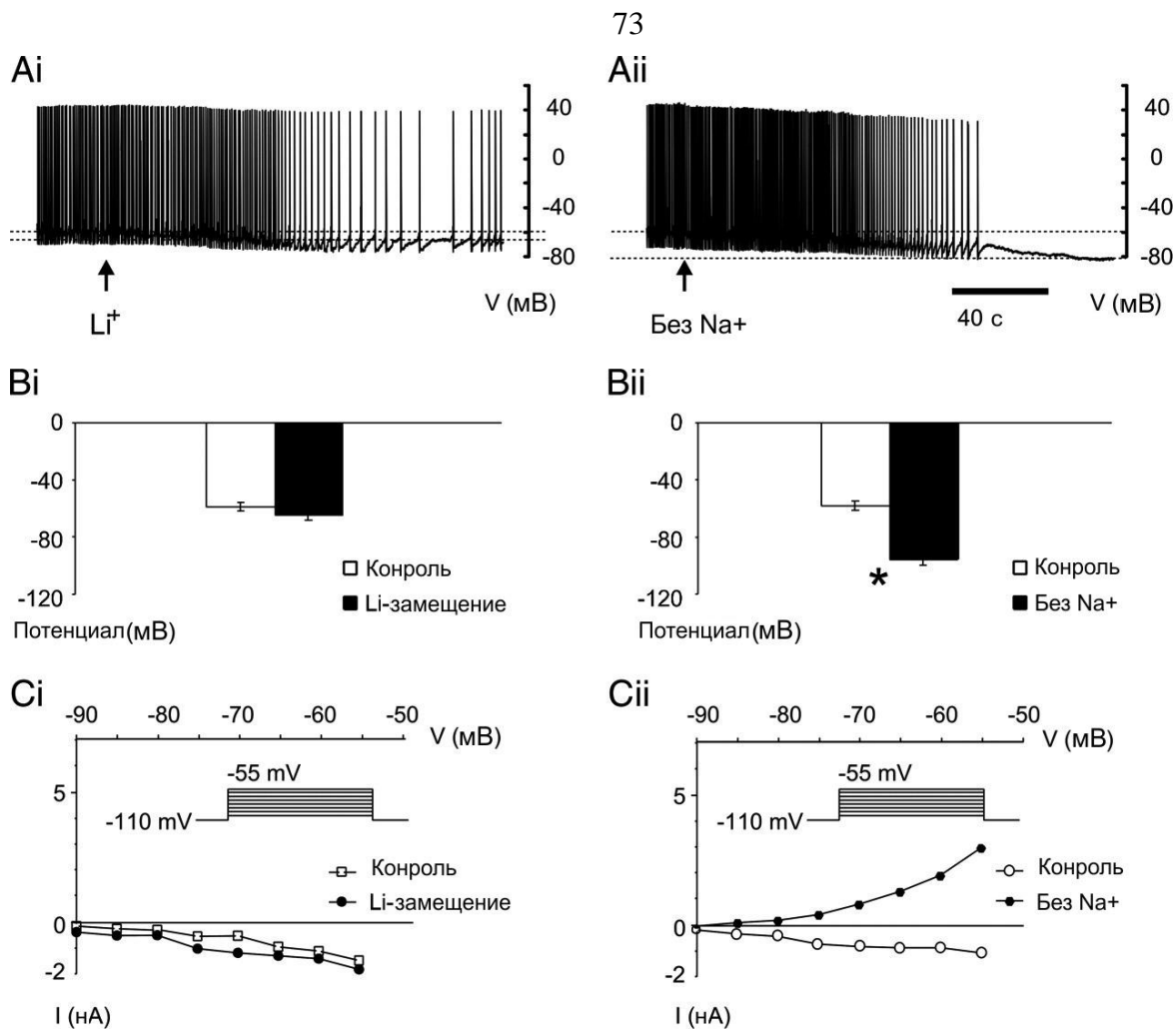


Рис. 5.1.4. Эффект замещения иона натрия на литий *versus* удаление натрия из физраствора на спайковую активность мембранный потенциал покоя гигантской церебральной клетки (CGC). (A) Когда в растворе Na^+ заменили на Li^+ , мембранный потенциал CGC стал немного гиперполяризован (Ai) с уменьшением частоты спонтанного разряда. (B) В безнатриевом растворе мембранный потенциал CGC был сильно гиперполяризован (Bii) с полным прекращением спонтанной активности (см. также Staras et al., 2002). Мембранный потенциал был значительно (*, $p < 0.05$) более гиперполяризован в безнатриевом растворе, чем в растворе с замещением на литий. (Ci) Вольтамперная характеристика $\text{I}_{\text{Na(P)}}$, построенная по токам, измеренным в стационарном состоянии, и вызванным ступенями потенциала от удерживаемого значения -110 мВ до значений от -90 до -55 мВ до (контроль) и после замещения натрия литием. (Cii) Вольтамперная характеристика $\text{I}_{\text{Na(P)}}$, построенная по токам, измеренным в стационарном состоянии, и вызванным ступенями потенциала от удерживаемого значения -110 мВ до значений от -90 до -55 мВ до (контроль) и после замещения натрия на N-метил-D-глутамин.

блокирует Na-Ca обменник (Iwamoto et al., 1999; Sheu et al., 1986), но может замещать натрий в токе через потенциал-зависимые Na^+ каналы (Sakmann et al., 2000; Smith et al., 1975). Эта особенность позволила провести оценку соотношения вкладов Na-Ca обменника и потенциал-зависимой натриевой проводимости в значение мембранного потенциала. Замена ионов Na^+ на Li^+

вызвала небольшую гиперполяризацию (~6 мВ) мембраны (мембранный потенциал до замены, -58.6 ± 2.9 мВ; после замены, -64.3 ± 3.5 мВ, парный t-критерий, $p < 0.05$, $n = 5$, Рис. 5.1.4Ai и 5.1.4Bi). Также, спайки CGC становились значительно (парный t-критерий, $p < 0.05$, $n = 5$) уже в растворе с замещением на Li^+ (данные опущены), что, очевидно, указывало на эффект аппликации лития на Na-Ca обменники, по аналогии с другими системами, такими, как млекопитающие (Janvier et al., 1997). Удаление Na^+ (без замены на Li^+) вызывало гораздо более значительную гиперполяризацию (сдвиг потенциала до 30 мВ) мембраны (мембранный потенциал до замены, -57.8 ± 3.0 ; мембранный потенциал после замены, -85.8 ± 3.9 , парный t-критерий, $p < 0.01$, $n = 5$, Рис. 5.1.4Aii и 5.1.4Bii). Тогда как постоянный ток оставался активным и после замещения на Li^+ (Рис. 5.1.4Ci), он отсутствовал в отсутствие внешнего Na^+ в растворе (Рис. 5.1.4Bii). Эти эксперименты позволили нам установить, что хотя Na-Ca обменник предположительно вносит вклад (до 5 мВ) в значение мембранного потенциала, наиболее значителен вклад (около 25 мВ), по всей очевидности, принадлежит постоянной Na^+ проводимости. Эта проводимость, по-видимому, и является постоянным неинактивируемым натриевым током $I_{\text{Na(P)}}$ что подтверждается нашими расчетами соотношения между единичным (1 нА) входящим током, протекающим через мембрану CGC и результирующим изменением значения мембранного потенциала. Среднее входное сопротивление CGC составляло 27 ± 3.2 МОм ($n = 7$), и поэтому деполяризующее смещение потенциала в ответ на 1-наномперный входящий ток составит ~30 мВ. $I_{\text{Na(P)}}$ увеличивается примерно на ~1 нА на протяжении диапазона потенциалов от -60 до -90 мВ (см. Рис. 5.1.1C), когда другие постоянные токи отсутствуют, что также подтверждает, что $I_{\text{Na(P)}}$ может вносить вклад порядка 30 мВ в значение мембранного потенциала.

5.1.4. цАМФ увеличивает $I_{\text{Na(P)}}$.

Предыдущие работы показали, что постоянные натриевые токи являются важными мишенями для внутриклеточных сигнальных каскадов, включая путь протеинкиназы C и A (PKC и PKA; Astman et al., 1998; Carr et al., 2002; England et al., 1996; Franceschetti et al., 2000; Gold et al., 1996; Saab

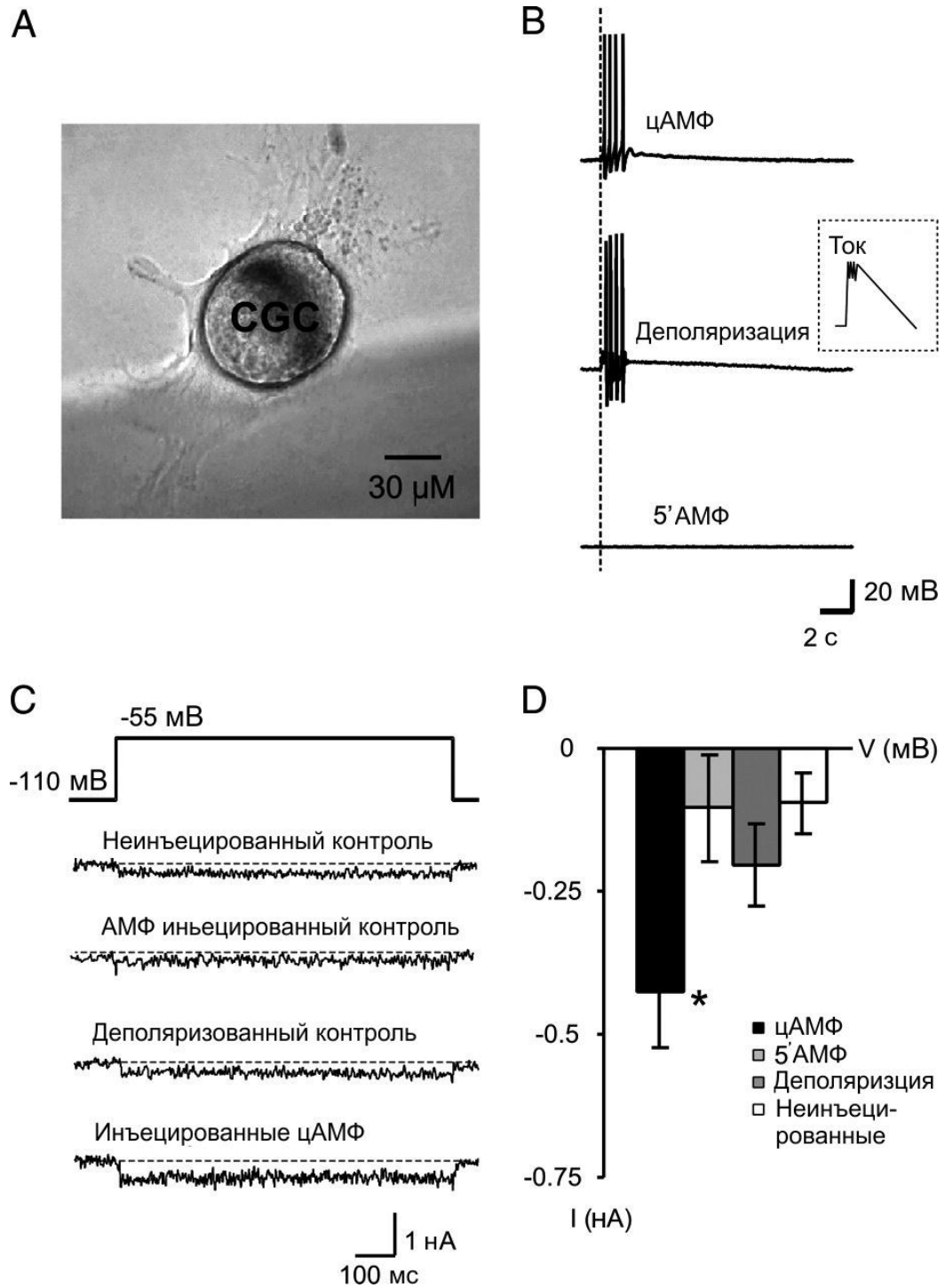


Рис. 5.1.5. Эффект цАМФ на ток $I_{Na(P)}$ у нейрона CGC. (A) Изолированная сома нейрона CGC в первичной клеточной культуре. (B) Сверху: прямой эффект внутриклеточного введения цАМФ на нейрон CGC. Посередине: эффект протокола инъекции тока специальной формы, воспроизводящего прямые электрические эффекты (деполяризацию и спайковый разряд) инъекции цАМФ в тот же CGC, показанный на регистрации сверху. Снизу: отсутствие эффекта при инъекции 5'АМФ в тот же самый нейрон CGC. (C) Типичные записи тока, вызванного ступенью потенциала от удерживаемого значения -110 мВ до -55 мВ в инъецированных цАМФ и контрольных CGC. (D) Средняя (\pm стандартная ошибка среднего) стационарная амплитуда у $I_{Na(P)}$ вызванного ступенькой от -110 мВ до -55 мВ у изолированных нейронов CGC возрастом 1 день через 1.5 часа после

инъекции цАМФ, 5'АМФ и контрольных инъецированных током, воспроизводящим прямой электрический эффект цАМФ (деполяризацию), и неинъецированные.

et al., 2003). Исследования эффекта повышения концентрации внутриклеточного цАМФ на постоянный Na^+ ток в CGC в отсутствие внешнего синаптического притока и модуляции являются очень важными, поскольку из литературы известно, что тетродотоксин-устойчивый натриевый ток нейронов DRG спинальных ганглиев (который в значительной степени подобен $I_{\text{Na(P)}}$ у CGC) проявляет зависимость от лигандов наравне с чувствительностью к значению потенциала (Blum et al., 2002). До настоящего времени $I_{\text{Na(P)}}$ был исследован у CGC только на интактных церебральных ганглиях и ЦНС, и поэтому перед основными экспериментами с цАМФ было необходимо выяснить, может ли этот ток выявляться на полностью изолированной соме. Чтобы измерить $I_{\text{Na(P)}}$ на изолированных CGC (Рис. 5.1.5А), мы использовали протокол активации ступенями потенциала, начинавшимися с удерживаемого потенциала -110 мВ до уровней от -90 до -25 мВ с шагом 5 мВ, и измеряли пиковое значение тока в CGC в разные моменты времени от 5 часов до 1, 2 и 3-х дней после изоляции ($n = 7, 9, 8, 7$ клеток соответственно). Мы показали, что, хотя в среднем пиковое значение амплитуды постоянного натриевого тока в изолированных CGC было $<10\%$ от ее значения в целом мозге, постоянный натриевый ток может надежно регистрироваться на протяжении всего 3-х дневного периода наблюдения без тенденций к изменению или снижению по ходу четырех исследованных отметок времени его измерения (данные не показаны, ANOVA, $p < 0.05$).

Чтобы исследовать эффект цАМФ на внутренний ток $I_{\text{Na(P)}}$ у CGC, мы инъецировали в культивированные CGC возраста 1 день 10 импульсов цАМФ (Рис. 5.1.5В, концентрация в пипетке 0.1 мМ). Как контроль использовали инъекцию 5'АМФ (неактивную производную цАМФ) или деполяризующую волну тока, воспроизводящего прямой деполяризующий эффект цАМФ (Рис. 5.1.5В). Мы измеряли постоянный ток изолированных CGC с использованием ступеней потенциала от удерживаемого значения -110 мВ до потенциалов от -85 и до -55 мВ через 10 мин после инъекции, и далее через 1, 1.5, 2.5 и 24 часов после инъекции цАМФ или контрольного

стимула. Мы обнаружили цАМФ-зависимое увеличение амплитуды $I_{Na(P)}$, которое проявлялось в интервал между 10 мин и 1 часом после инъекции и длилось более 24 часов. На Рис. 5.1.5C приведены типичные токовые ответы на ступеньку от -110 мВ до -55 мВ у неинъецированных, инъецированных 5'АМФ, деполяризованных и инъецированных цАМФ нейронов CGC. Через 1.5 часа после инъекции амплитуда постоянного натриевого тока в инъецированных цАМФ клетках была значительно выше, чем у контрольных CGC, инъецированных 5'АМФ, у деполяризационного контроля (Рис. 5D, $n = 5$ в каждой группе, ANOVA, $p < 0.05$, критерий Тьюки, $p < 0.05$) или у неинъецированных CGC (Рис. 5D, $n = 7$, критерий Тьюки, $p < 0.05$). Практически, подобный же результат был ранее получен для 1 часа после инъекции (данные не показаны, ANOVA, $p < 0.05$, критерий Тьюки, $p < 0.05$). На 10-ую минуту после инъекции цАМФ амплитуда постоянного натриевого тока (-0.15 ± 0.02 нА, $n = 5$) достоверно не отличалась от базовой амплитуды, измеренной у неинъецированных контрольных CGC (-0.2 ± 0.05 нА, $n = 7$), от инъецированных 5'АМФ или деполяризационного контроля ($n = 6$ и 7 соответственно, данные не показаны, ANOVA, $P = 0.35$). На изолированных CGC возраста один день после изоляции нам удалось повторно запустить ступенчатый протокол через 2.5 часа после инъекции и через 24 часа после инъекции цАМФ. В каждом из этих случаев амплитуда постоянного натриевого тока была повышена (-0.5 , -0.3 и -0.5 нА соответственно) по сравнению со средней базовой линией амплитуды, измеренной у неинъецированных CGC (-0.2 нА).

Эксперименты с инъекцией цАМФ на клеточной культуре изолированных нейронов продемонстрировали, что внутренне присущий CGC постоянный натриевый ток может быть значительно усилен циклическим АМФ при значениях мембранного потенциала в диапазоне, близком к значениям потенциала CGC в интактном мозге (-60 мВ; Staras et al., 2002). Это также было подтверждено в экспериментах с инъекцией цАМФ в CGC в интактном церебральном ганглии ($n = 3$), где было также показано длительное увеличение амплитуды $I_{Na(P)}$ (данные не показаны). Чтобы выявить потенциальные эффекты увеличения $I_{Na(P)}$ на электрические свойства CGC в его нормальном нейрохимическом окружении, мы инъецировали цАМФ или 5'АМФ в CGC на препаратах интактной

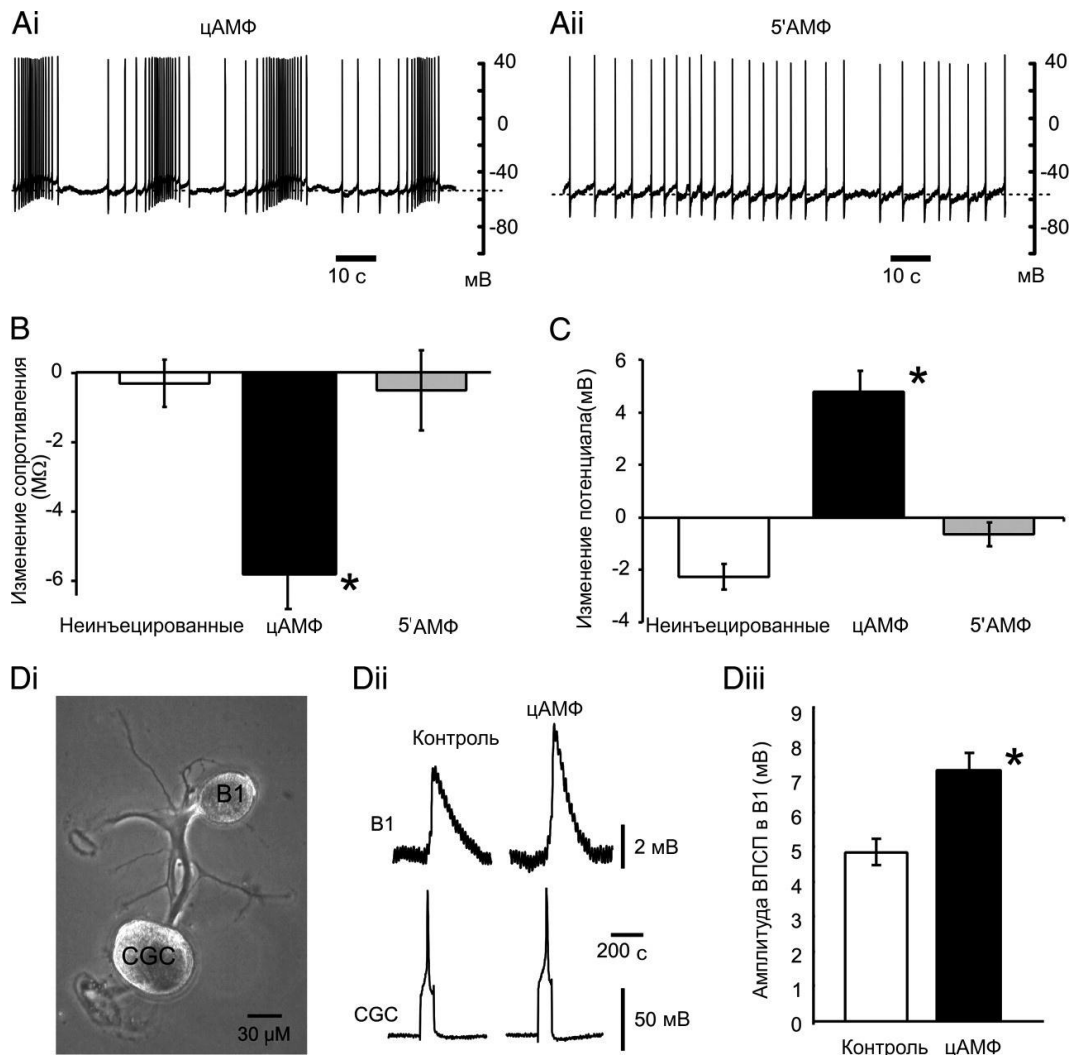


Рис. 5.1.6. Эффект цАМФ на электрические свойства и синаптическую эффективность CGC. (Ai) Пример регистрации CGC с выраженной пачечной активностью через 1 час после инъекции цАМФ. (Aii) Пример регистрации CGC через час после инъекции 5'АМФ с нормальной тонической активностью. (B) Изменения сопротивления между 10 мин и одним часом после инъекции (цАМФ, $n = 8$; 5'АМФ, $n = 8$) и неинъецированными контролями, зарегистрированными в тех же временных точках ($n = 6$). Уменьшение сопротивления в клетках, инъецированных цАМФ, было достоверно выше, чем у инъецированных 5'АМФ или неинъецированных контролей (ANOVA, $p < 0.05$; критерий Тьюки, $p < 0.05$). (C) Изменение мембранного потенциала между 10 мин и одним часом после инъекции (цАМФ, $n = 8$; 5'АМФ, $n = 8$) и неинъецированными контролями, зарегистрированными в тех же временных точках ($n = 6$). Деполаризация у клеток, инъецированных цАМФ, была значительно более выражена, чем у инъецированных 5'АМФ или неинъецированных контролей (ANOVA, $p <$

0.05; критерий Тьюки, $p < 0.05$). (Di) Совместно культивируемые нейроны CGC и V1. (Dii) Пример эксперимента с вызванными путем инициации спайка в CGC возбуждающими постсинаптическими потенциалами (ВПСП) у V1 до и после инъекции цАМФ в CGC (*, парный t-критерий, $p < 0.05$).

изолированной ЦНС, и через 1 час сравнивали паттерн разрядов, входное сопротивление и значения мембранного потенциала с неинъецированным контролем. Эти эксперименты продемонстрировали переключение от тонической спонтанной активности к спонтанным пачечным разрядам (Рис. 5.1.6А), снижение входного сопротивления (Рис. 5.1.6В) и деполяризацию мембраны (Рис. 5.1.6С) как следствие инъекции цАМФ в CGC.

Хотя все CGC, зарегистрированные в этом эксперименте ($n = 22$) изначально демонстрировали тонический тип спонтанной активности на препаратах интактной изолированной ЦНС (Staras et al., 2002) через 1 час после инъекции большинство CGC в группе инъецированной цАМФ (6 из 8) проявили характерную пачечную активность (пример на Рис. 5.1.6Аi). Ни один из контрольных CGC, инъецированных 5'АМФ ($n = 8$, пример на Рис. 5.1.6Аii) или неинъецированных CGC ($n = 6$, пример опущен) не переключился с тонической активности на пачечные разряды (тест χ^2 , $p < 0.05$).

Входное сопротивление в продолжение одночасового периода после инъекции достоверно увеличилось у CGC, инъецированных цАМФ ($n = 8$), по сравнению с неинъецированными ($n = 6$, ANOVA, $p < 0.05$; критерий Тьюки, $p < 0.05$, Рис. 5.1.6В). 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, $p < 0.05$, Рис. 5.1.6С). Подобно амплитуде $I_{Na(P)}$, измеренной в наших экспериментах с фиксацией потенциала, ни входное сопротивление, ни значение мембранного потенциала не различались среди трех групп, при измерениях через 10 мин после инъекции (ANOVA, $P > 0.05$). Это указывает на тот факт, что вызванные цАМФ изменения в $I_{Na(P)}$ и электрических свойствах мембраны CGC развиваются параллельно.

В отдельном эксперименте мы проверили, может ли инъекция цАМФ также привести к увеличению синаптической эффективности CGC в том же временном окне, в котором происходило увеличение $I_{Na(P)}$ параллельно с описанными изменениями электрических свойств этой клетки. Нейрон CGC совместно культивировали ($n = 5$) с его идентифицированной постсинаптической мишенью, мотонейроном B1 (Рис. 5.1.6Di). Далее, сравнивая амплитуды возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) вызванных до инъекции цАМФ и 1 час после инъекции в клеточную сому CGC (Рис. 5.1.6Dii), мы обнаружили значительное увеличение в амплитуде ВПСП, вызываемых CGC в B1 (парный t- критерий, $p < 0.05$, Рис. 5.1.6Diii) после инъекции цАМФ.

5.2. Роль отставленной несинаптической пластичности в долговременной ассоциативной памяти.

На сегодняшний день достоверно установлено, что постоянная несинаптическая нейрональная пластичность возникает после обучения, и, как и синаптическая пластичность, может служить субстратом для долговременной памяти. Пока остается неизвестным, какой именно вклад вносит несинаптическая пластичность в измененное состояние нейронных сетей, напрямую определяющее внешнее проявление памяти в поведении. 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.

Используя парадигму классического условного обучения с одного предъявления вместе с электрофизиологическим анализом, и оптическую регистрацию кальция и потенциала, проводили исследования клеточных механизмов, 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. Мы продемонстрировали, что после условного обучения с одного предъявления у улиток *Lymnaea stagnalis* идентифицированные модуляторные нейроны, являющиеся внешними по

отношению к нейронной сети генератора пищевого ритма, демонстрируют постоянную деполяризацию мембраны, которая возникает между 16-ю и 24-мя часами после обучения. Этот эффект отставлен относительно раннего формирования памяти, но соответствует по времени становлению и продолжительности следа долговременной памяти. Постоянные несинаптические изменения поддерживаются независимо и являются внешними по отношению к синаптическим явлениям, происходящим внутри нейронной сети во время генерации ответа нейронной сетью, ответственной за пищевое поведение и генерацию пищевого жевательного ритма.

Результаты искусственных манипуляций с мембранным потенциалом и эксперименты с кальциевым имаджингом предполагают наличие нового механизма, при котором соматическая деполяризация внешнего модуляторного нейрона запускает внутрисетевые интернейроны командного типа, включающие видоизмененное поведение, выработанное обучением. Мы продемонстрировали, что несинаптическая пластичность во внешнем модуляторном нейроне отражает след обучения, который позволяет экспрессироваться долговременной ассоциативной памяти.

Сейчас уже достаточно широко признано, что несинаптическая пластичность, наряду с синаптической, является субстратом для долговременной памяти (Giese et al., 2001; Debanne et al., 2003; Zhang and Linden, 2003; Magee and Johnston, 2005). Хотя есть довольно много доступной информации о проявлении несинаптической пластичности как результата нейрональных процессов при обучении, гораздо меньше известно о том, как с ее помощью появляется постоянное измененное поведение после обучения. В контексте несинаптической пластичности есть важные вопросы, касающиеся положения во времени и постоянства несинаптических пластических процессов и отношений несинаптической пластичности к изменению синаптического выхода, на которые пока не найдено ответа. Мы рассматриваем эти важные проблемы, исследуя пример вызванной несинаптической пластичности (деполяризации сомы нейрона), вызванной изменениями при обучении, время ее возникновения и длительность сохранения, а также эффект несинаптической пластичности на синаптически активируемые эфферентные нейронные сети на модельной системе моллюска с хорошо отслеживаемыми свойствами. В отличие от

предыдущих исследований несинаптической пластичности (Zhang and Linden, 2003), для выработки долговременной памяти мы используем парадигму обучения условному пищевому рефлексу с одного предъявления. Это позволяет провести точный временной анализ электрических изменений на разных временных отрезках после обучения и делает возможным соотнесение этих изменений с разнообразными этапами формирования памяти на поведенческом и нейрональном уровнях. Такой анализ был практически невозможен в предыдущих работах по пищевому обучению на системах моллюсков с использованием парадигм многократного предъявления (Brembs et al., 2002; Jones et al., 2003; Lorenzetti et al., 2006). Более того, мы выделили вызванные обучением изменения в нейроне, являющимся внешним по отношению к синаптической сети, напрямую обеспечивающей генерацию условного и безусловного поведения. Это позволило нам исследовать вклад несинаптической пластичности в условный ответ независимо от каких-либо синаптических изменений, которые могли бы появиться в сети, генерирующей поведение. В других примерах было продемонстрировано, что несинаптическая пластичность появляется в нейронах, напрямую участвующих в генерации как условного так и безусловного поведения, затрудняя разделение независимых вкладов несинаптической и синаптической пластичности в измененный выход нейронных сетей (Jones et al., 2003; Lorenzetti et al., 2006; Evans and Cropper, 1998; McCrohan and Benjamin, 1980; Kemenes et al., 2001; Plummer and Krik, 1990).

В этом разделе наше исследование направлено на идентифицированные внешние модуляторные нейроны, известные у *Lymnaea* как гигантские церебральные клетки (CGC, cerebral giant cell, Рис. 5.2.1A). Эти парные серотонинергические клетки и их гомологи у других моллюсков (т.е. *Aplysia*, Kupfermann and Weiss, 1982) играют “разрешающую” роль в пищевом поведении (Yeoman et al., 1994a; Yeoman et al., 1994b; Рис. 5.2.1B) но не участвуют напрямую в генерации пищевого моторного паттерна жевания (Yeoman et al., 1994a; Yeoman et al., 1994b; McCrohan and Benjamin, 1980; Straub and Benjamin, 2001). Производя электрофизиологический анализ на полуинтактных препаратах (Рис. 5.2.1C), 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 синаптической функции с помощью

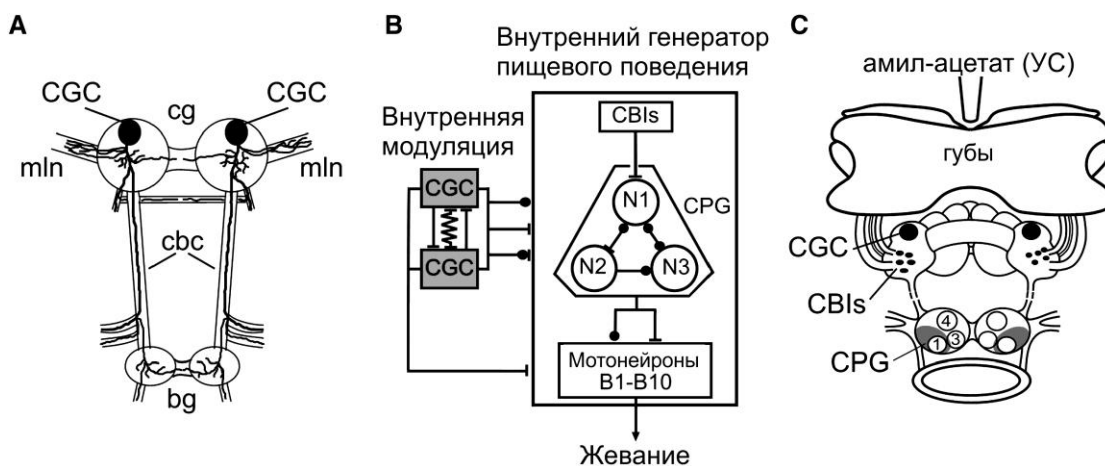


Рис. 5.2.1. Расположение и паттерн аксонального ветвления внешних модуляторных клеток CGC и схема их синаптических контактов с внутренней нейронной сетью, генерирующей пищевое моторное поведение у *Drosophila*.

(А) Парные (левый и правый) CGC посылают свои основные аксональные ветви в буккальный ганглий (bg) через церебро-буккальные коннективы (cbc), давая начало также боковым ветвям внутри церебральных ганглиев. Основные сенсорные входы от губ проходят через медиальный губной нерв (mln). Реконструкция паттерна аксонального ветвления, показанная на рисунке, базируется на препаратах (более 10), в которых оба CGC были внутриклеточно окрашены красителем Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, США).

(В) Связанные электрически и химически, CGC обеспечивают многочисленные моносинаптические входы на нейроны буккального центрального генератора пищевого паттерна и на мотонейроны. Физические модуляторные церебро-буккальные интернейроны (CBI), интернейроны центрального генератора паттерна (типа N1, N2 и N3), и мотонейроны (типы B1-B10, некоторые тоже обладают свойствами центрального генератора паттерна (Staras et al., 1998)), внутренние по отношению к сети пищевого поведения, являются непосредственно ответственными первичными нейронами, генерирующими ритмическое пищевое

поведение. CGC производят внешнее разрешающее действие на пищевое поведение (Yeoman, 1994a; 1994b).

(С) Схема полуинтактного препарата, на котором возможно стимулировать хемосенсорные рецепторы губ одновременно с внутриклеточной регистрацией CGC и внутренних нейронов пищевой сети генератора (см. ниже), и экстраклеточной регистрацией активности СВИ от ЦБК. Нейроны центрального генератора пищевого ритма расположены в серых зонах буккальных ганглиев. Интернейроны (CGC, СВИ) и мотонейроны (В1, В3, В4), регистрировавшиеся в этой работе, обозначены только на левой стороне диаграммы. $\sim\sim\sim$ -, электрический синапс, $\text{I}-$, возбуждающее соединение, $\bullet-$ тормозное соединение, $\text{I}\bullet-$ бифазное возбуждающе-тормозное соединение.

деполяризации (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. Эти эксперименты открывают новый механизм, который объединяет несинаптическую пластичность, возникающую за пределами нейронной сети, обеспечивающей поведение, и возникновение модифицированного моторного выхода, происходящего из активности самой этой сети.

5.2.1. Однократное пищевое обуславливание вырабатывает долговременную память и вызывает постоянную деполяризацию во внесетевом внешнем модуляторном нейроне.

В первых сериях экспериментов мы исследовали, какие физиологические изменения в нейроне CGC происходят одновременно с наблюдающимся обучением моллюска пищевому условному рефлексу с одного предъявления для выявления их связи с хранением следов долговременной (>24 ч) памяти (Fulton et al., 2005). Мы выбрали нейроны CGC как основной объект для этих экспериментов, потому что они обеспечивают внутреннюю модуляцию пищевой системы (Рис. 5.2.1). 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, участвующих напрямую в генерации приобретенного в ходе обучения поведения.

А Условный ответ



В Мембранный потенциал и электрические параметры CGC

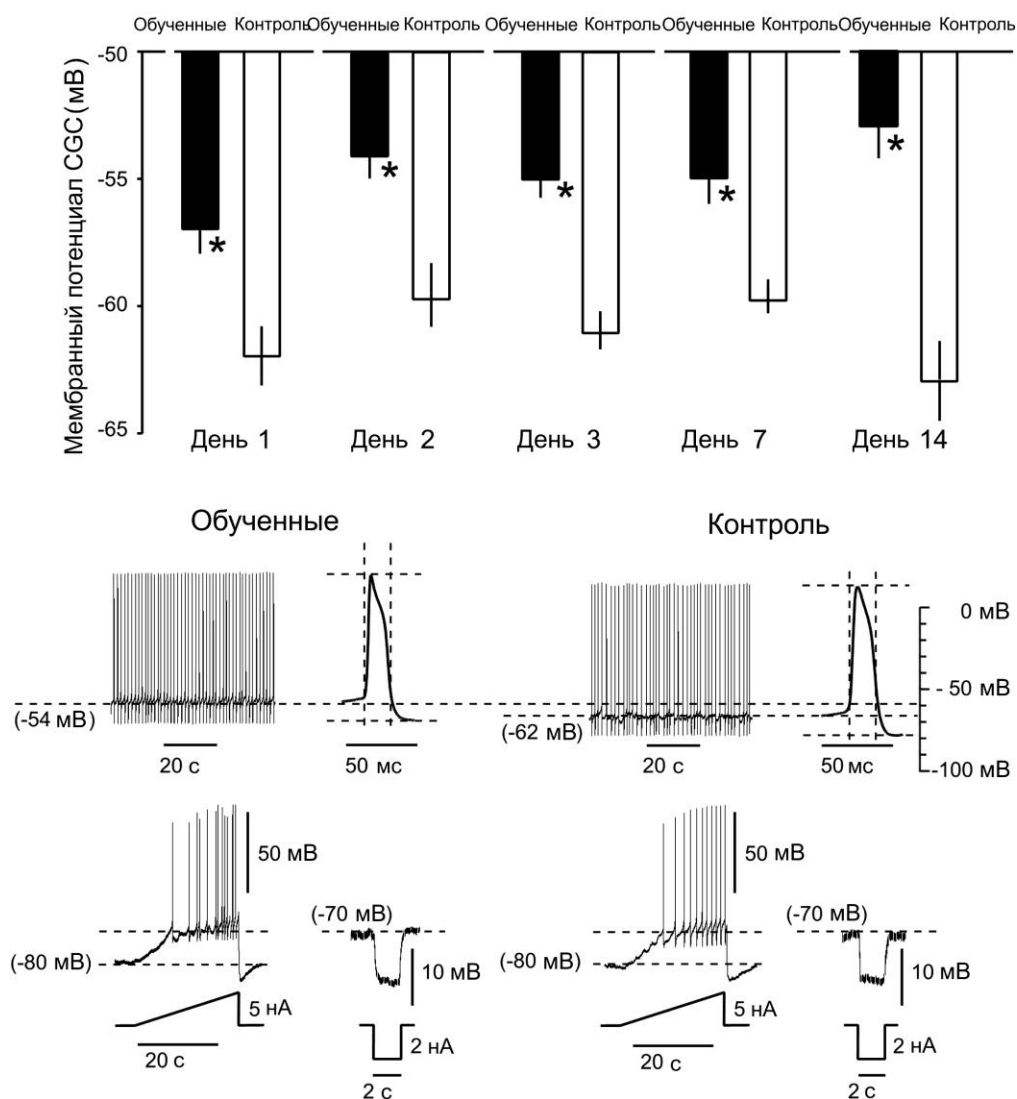


Рис. 5.2.2. Развитие во времени поведенческих изменений и мембранной деполяризации CGC в период от одного до 14 дней после обучения классическому условному пищевому рефлексу с одного предъявления.

(А) Заметный условный ответ наблюдался в продолжение всего 14-дневного периода тестирования. В каждый момент времени проводилось попарное статистическое сравнение (независимый t-тест) ответов, вызванных условным

стимулом, между обученной (средняя количественная разница в жеваниях 10.4-14.1, $n = 14-20$ на группу) и контрольной (средняя количественная разница в жеваниях между 2.3-7.3, $n = 13-20$ на группу) группами. Сравнений между разными временными отрезками не проводилось, поэтому тесты ANOVA и критерии множественного сравнения не использовались. Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего SEM. Рассчитанные статистические значения для независимого t-теста составили: день 1, $df = 28$, $t = 3.9$, $p < 0.001$; день 2, $df = 25$, $t = 2.2$, $p < 0.04$; день 3, $df = 28$, $t = 3.2$, $p < 0.03$; день 7, $df = 36$, $t = 2.5$, $p < 0.02$; день 14, $df = 38$, $t = 5.1$, $p < 0.01$.

(B) Нейроны CGC были достоверно более деполяризованы у препаратов обученных животных (среднее значение мембранного потенциала находится между -53 мВ и -57 мВ, $n = 14-24$ на группу) по сравнению с препаратами контрольных животных (средние значения мембранного потенциала между -59 и -63 мВ, $n = 15-26$ на группу) на протяжении временного периода тестирования. Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего. Рассчитанные статистические значения для независимого t-теста составили: день 1, $df = 46$, $t = 3.0$, $p < 0.004$; День 2, $df = 31$, $t = 2.5$, $p < 0.02$; день 3, $df = 49$, $t = 3.7$, $p < 0.0005$; день 7, $df = 27$, $t = 3.2$, $p < 0.003$; день 14, $df = 38$, $t = 5.1$, $p < 0.01$. Пример регистрации от CGC на 14-ый день после обучения на препарате обученного животного (зарегистрированный мембранный потенциал -54 мВ) и контрольного животного (зарегистрированный мембранный потенциал -62 мВ). Несмотря на разницу в значениях мембранного потенциала, различий в форме спайка CGC не наблюдалось (усредненные на 100 сек отрезках записей CGC при зарегистрированном уровне мембранного потенциала), и также не наблюдалось различий в пороге генерации спайка (протокол медленно возрастающей деполяризации, начиная с значения -80 мВ), и входном сопротивлении (клетки удерживали на уровне потенциала -70 мВ, показаны средние ответы на пять ступенчатых гиперполяризующих импульсов тока 2 нА) при сравнении препаратов, приготовленных из обученных и контрольных животных.

Около 400 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 (Рис. 5.2.2). В каждый из исследованных моментов времени обученные животные демонстрировали значительно более выраженный ответ на условный стимул (Рис. 5.2.2А, $p < 0.05$) по сравнению с контрольными животными, что говорило о том, что мы выработали у животных условное ассоциативное обучение.

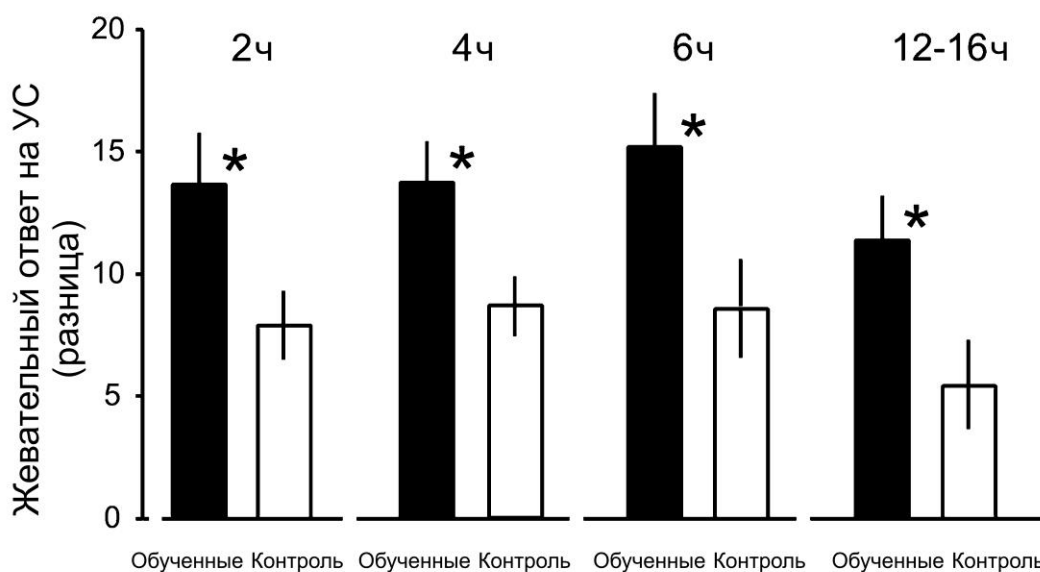
Кроме того, мы регистрировали мембранный потенциал CGC в каждый из указанных выше моментов времени на полуинтактных препаратах (губы- ЦНС, Рис. 5.2.1D), приготовленных из случайно выбранных животных. Мембранный потенциал CGC достоверно отличался у группы обученных животных по сравнению с группой контрольных животных (Рис. 5.2.2B, $p < 0.05$) каждый день в протяжении всего эксперимента (Рис. 5.2.2B).

Также, количественно измеряли входное сопротивление CGC, частоту спонтанной спайковой активности, порог генерации спайка, его амплитуду, длительность, и следовую постспайковую гиперполяризацию – параметры, которые потенциально могли измениться в результате условного обучения. Статистически достоверных различий по этим параметрам между контрольной и обученной группами обнаружено не было ни в один из моментов времени (данные не показаны, пример регистрации и экспериментальных измерений, проведенных на 14-ый день, показан на Рис. 5.2.2B).

Далее, мы фокусировали наше внимание на отрезке первых 24 часов, прошедших после обучения. Поведенческое тестирование интактных животных в моменты времени, соответствующие 2, 4, 6, и 12-16 часам после обучения ($n = 17-23$ улиток в каждой группе) выявило достоверный условный ответ (минимально $p < 0.05$, Рис. 5.2.3A) но достоверных различий между препаратами контрольных и обученных животных обнаружено не было (Рис. 5.2.3B). 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 обучения и формирования следа обучения.

В этих же экспериментах мы измеряли входное сопротивление CGC, частоту спонтанной спайковой активности, порог генерации спайка, его амплитуду, длительность, и следовую послеспайковую гиперполяризацию в каждый исследованный момент времени в течение первых 24-х часов после

А Условный ответ



В Мембранный потенциал CGC

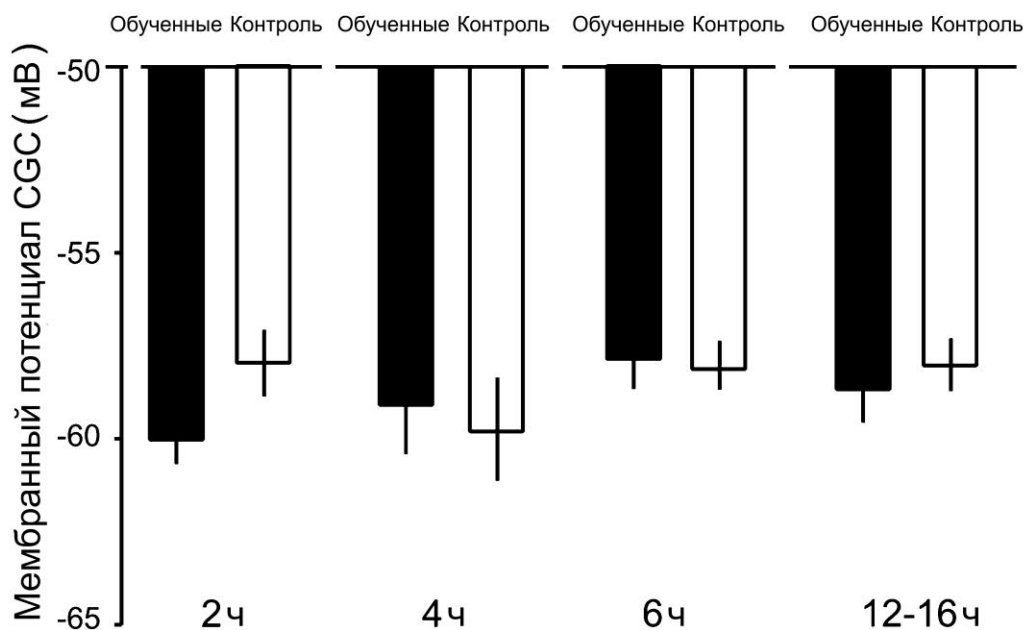


Рис. 5.2.3. Память, регистрируемая поведенчески при отсутствии электрофизиологических коррелят в интервале времени 2-16 ч после обучения классическому условному рефлексу с одного предъявления.

(А) Условный ответ наблюдали на протяжении 16-ти часового периода тестирования. Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего. Рассчитанные статистические значения для независимого t-теста в каждой точке: 2 часа, $df = 33$, $t = 2.2$, $p < 0.003$; 4 часа, $df = 38$, $t = 2.4$, $p < 0.002$; 6 часов, $df = 37$, $t = 2.3$, $p < 0.03$; 12-16 часов, $df = 40$, $t = 2.2$, $p < 0.05$.

(В) За тот же период тестирования не обнаружили разницы между контрольной и обученной группами в значении мембранного потенциала CGC (2 часа, $df = 14$, $t = 1.1$, $p = 0.3$; 4 часа, $df = 14$, $t = 0.5$, $p = 0.65$; 6 часов, $df = 13$, $t = 0.7$, $p = 0.5$; 12-16

часов, $df = 13$, $t = 0.24$, $p = 0.8$). Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего.

обучения. Ни один из этих параметров не продемонстрировал изменений, которые можно бы было соотнести с обучением в этих или предыдущих экспериментах.

5.2.2. Постоянная деполяризация в CGC совпадает по времени с проявлением выявляющихся электрофизиологически следов долговременной памяти.

После того, как было показано, что следы долговременной памяти проявляются как электрофизиологически, так и на поведении *Lyttaea* (пищевое поведение, вызываемое УС), и продемонстрировано наличие деполяризации CGC, начиная с двадцатичетырехчасового срока после обучения, было решено в следующих сериях экспериментов протестировать, насколько деполяризация CGC совпадает по времени с фиктивным пищевым ответом, вызванным условным стимулом, и электрофизиологическими проявлениями следа памяти. Фиктивное пищевое поведение определяли как ритмическую активность мотонейронов генератора пищевого ритма, по параметрам соответствующую той активности, которая в норме приводит к пищевому поведению, которое, в свою очередь, запускается нейроном CGC (а также N1, N2, N3-типами церебральных нейронов; Рис. 5.2.1B).

В поведенческих экспериментах с обучением мы показали, что пищевой ответ группы обученных животных ($n = 37$; количественная разница в жеваниях) через 14 дней после обучения был на 11 ± 1.5 достоверно выше ($p < 0.001$), чем ответ в группе контрольных животных (2.3 ± 0.6 , $n = 34$). Подобным же образом, при сравнении фиктивного жевания в ответ на условный стимул у препаратов, приготовленных из обученных животных и получавших сочетанные предъявления (средняя количественная разница в жеваниях, 3.2 ± 0.8 , $n = 10$) по сравнению с несочетанным контролем (0.5 ± 0.6 , $n = 10$) было выявлено, что их число значительно ($p < 0.01$) выше (Рис. 5.2.4A). На примере, приведённом на Рис. 5.2.4B,

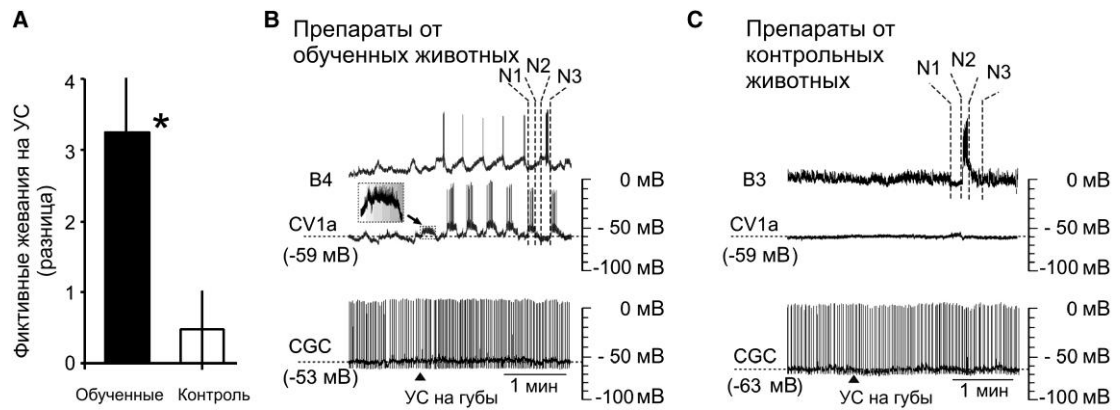


Рис. 5.2.4. Классический условный рефлекс вызывает постоянную деполяризацию CGC и повышает фиктивный пищевой жевательный ответ на полуинтактном препарате.

(А) Величины количественной разницы фиктивного жевания между препаратами обученных и необученных животных. Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего. Рассчитанные статистические значения для независимого t-теста количественной пищевой разницы составили: $df = 18$, $t = 2.72$, $p < 0.01$. Фоновая пищевая активность (фиктивное жевание) до предъявления условного стимула ($df = 18$, $p = 0.66$) у обученной (1.2 ± 0.6 циклов/2 мин) и контрольной (1.6 ± 0.7 циклов/2 мин) групп достоверно не различалась. У тех же самых препаратов мы не обнаружили достоверной разницы в базовых значениях спонтанной активности CGC у обученной по сравнению с контрольной группой (0.83 ± 0.02 и 0.70 ± 0.07 Гц соответственно), а также не наблюдали достоверных различий в частоте спонтанной активности между препаратами обученных (0.84 ± 0.05 Гц) и несочетанным контролем (0.74 ± 0.07 Гц).

(В и С) Примеры регистраций от препаратов обученных и контрольных животных. В3, В4 - пищевые мотонейроны; CV1a - физически активный внутренний модуляторный нейрон; CGC - тонически активный внешний модуляторный нейрон. (В) На обученном препарате условный стимул вызывал серию коротколатентных ритмических циклов жевания (в составе фаз N1, N2 и N3), сопровождаемых в соответствующих фазах спайковой активностью в соме нейронов В4 (N3) и CV1a (N1). Кроме того, CV1a демонстрировал коротколатентные разряды транкированных аксональных спайков или быстрых подпороговых ВПСП до общей активации фиктивного жевания. Детали показаны в квадрате, сопровождаемом черной стрелкой, указывающей на секцию записи от CV1a, которую увеличили, с увеличенными в три раза шкалами времени и потенциала. (С) У контрольных препаратов, условный стимул вызывал только единичные длиннолатентные циклы фиктивного жевания со спайковой активностью в мотонейроне В3 и подпороговыми ответами в CV1a. На рисунке видно, что CGC заметно более деполяризован на обученных препаратах по сравнению с препаратами контрольных животных (см. статистику в тексте), однако у CV1a, в отличие от CGC, не отмечено повышение мембранного потенциала после обучения (среднее значение мембранного потенциала у контрольной группы, -56.6 ± 2.8 мВ, $n = 9$; в контрольной группе, -57.5 ± 3.2 мВ, $n = 8$, независимый t-тест, $df = 15$, $p = 0.6$).

условный стимул вызывал серию разрядов фиктивного жевания как в регистрируемом мотонейроне В4, так и в внутрисетевом командном интернейроне пищевого поведения CV1a, что служило надежным критерием наличия пищевого жевательного ответа. В отличие от обученной группы, на контрольных препаратах фиксировали только один длиннотентный разряд в мотонейроне В3 и подпороговые входы в интернейроне CV1a (Рис. 5.2.4С). В полном соответствии с предыдущим экспериментом (Рис. 5.2.2В), среднее значение мембранного потенциала CGC у обученных препаратов (т.е. Рис. 5.2.4В) было сдвинуто в сторону деполяризации (-53 ± 1.3 мВ) по сравнению с контрольными препаратами (-63 ± 1.6 мВ, независимый t-критерий, $df = 18$, $t = 4.96$, $p < 0.001$, т.е. Рис. 5.2.4С). На тех же самых препаратах мы не обнаружили различий в частоте спонтанного разряда CGC у обученных животных по сравнению с необученными (0.83 ± 0.02 и 0.70 ± 0.07 Гц соответственно), а также не было обнаружено достоверных различий в частоте вызванных условным стимулом спайковых разрядов в двух группах препаратов (обученные, 0.84 ± 0.02 Гц; несочетанный контроль, 0.74 ± 0.07 Гц).

5.2.3. Деполяризация в CGC достаточна для усиления фиктивного пищевого ответа в ответ на условный пищевой стимул.

Чтобы установить, достаточно ли изменений в мембранном потенциале CGC для того, чтобы обеспечить фиктивный жевательный ответ на условный стимул, мы искусственно деполяризовали мембрану нейрона CGC у наивных животных. Мембранный потенциал CGC на полуинтактном препарате, приготовленном из наивных животных искусственно устанавливался на средний уровень деполяризации, который ранее регистрировали у обученных животных по прошествии 14-ти дней после процедуры обучения (-53 мВ), и затем сравнивали ответы при искусственно поднятом уровне деполяризации с ответами тех же препаратов, но при естественном уровне деполяризации CGC (-63 мВ).

Деполяризация мембраны CGC до уровня -53 мВ, поддерживавшегося постоянной инъекцией тока, увеличивала частоту фонового спайкования CGC. Однако наши эксперименты ранее показали отсутствие увеличения частоты спайкового разряда у препаратов обученных животных по сравнению с несочетанным контролем. По этой причине частоту спайкового разряда у контрольных (-63 мВ) и деполяризованных (-53 мВ) препаратов поддерживали на постоянном уровне в 1 Гц путем

пропускания коротких надпороговых импульсов тока через второй микроэлектрод. Таким образом, в эксперименте тестировали потенциальную способность деполяризованного мембранного потенциала влиять на интенсивность фиктивного пищевого ответа на условный стимул.

Когда нейроны CGC были деполяризованы до уровня -53 мВ, препараты наивных животных ($n = 12$) демонстрировали увеличенный ответ на амил-ацетат (Рис. 5.2.5). Фиктивный пищевой ответ был достоверно ($p < 0.01$) более сильным (по разнице в числе жеваний, -0.25 ± 0.3 ; примеры

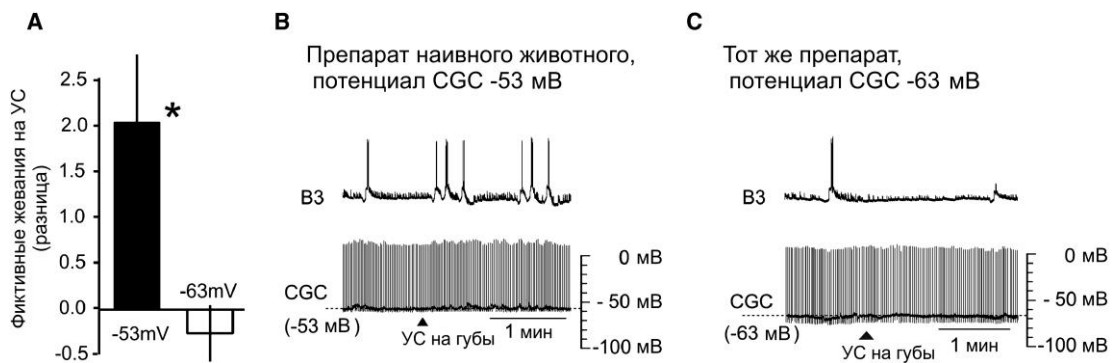


Рис. 5.2.5. Деполяризации CGC у наивных животных достаточно, чтобы увеличить количество циклов фиктивных жеваний в ответ на условный раздражитель.

(А) Значения ответа в виде количества фиктивных пищевых жеваний у препаратов наивных животных, в которых мембранный потенциал (МП) у CGC был установлен на -53 мВ или на -63 мВ при поддержании постоянной частоты разряда CGC на уровне около 1 Гц (до навязывания частоты 1 Гц нейроны CGC демонстрировали значения спонтанной активности в пределах 0.7-1.0 Гц, что также соответствовало значениями частот в обученной группе, см. подпись к рисунку 5.2.4). Планки погрешностей фиктивных пищевых жеваний показывают стандартную ошибку среднего. Рассчитанные значения для статистики (парный t-тест) составили: $df = 11$, $t = 2.89$, $p < 0.01$.

(В и С) Примеры электрофизиологической регистрации от препарата наивного животного, у которого мембранный потенциал CGC был установлен на значения -53 мВ (В) или -63 мВ (С). Частота спайкового разряда сходна в обоих CGC (правом и левом), поэтому приведена только одна из регистраций CGC на (В) и (С). При обоих значениях мембранного потенциала, этот препарат наивного животного демонстрировал спонтанное фиктивное жевание. Однако, когда мембранный потенциал CGC был установлен на -53 мВ (В), условный стимул вызывал гораздо более сильный ответ по сравнению с контролем, когда потенциал того же самого CGC удерживали на -63 мВ (В), и условный стимул вызывал только отставленное появление одного цикла подпороговых синаптических входов.

приведены на Рис. 5.2.5B и 5.2.5C). Эти результаты свидетельствуют о том, что одной лишь деполяризации CGC достаточно для того, чтобы вызвать значительное увеличение пищевой реакции в ответ на условный стимул. Таким образом, продемонстрированное в предыдущей серии экспериментов повышение уровня деполяризации мембраны после обучения, очевидно, способно внести значительный вклад в долговременную память, обеспечивая проявление условной реакции в ответ на условный стимул. Этот вывод поддерживается статистическим анализом, демонстрирующим отсутствие значительных различий в числе жеваний между обученными животными (3.2 ± 0.8 , Рис. 5.2.4A) по сравнению с контрольными наивными животными с искусственно деполяризованными CGC (2.0 ± 0.7 , см. ниже).

Если деполяризация CGC была бы необходимой и достаточной для обеспечения фиктивного пищевого ответа, тогда было бы возможно обратить эффект, вызванный обучением, путем обращения деполяризации в гиперполяризацию. Однако, когда этот эксперимент проделали, то обнаружили, что гиперполяризация сомы нейрона CGC не может эффективно передаваться по аксональным отросткам в места, где, как полагали, были расположены синаптические контакты CGC с постсинаптическими нейронами (Styles, 2002), поэтому таким способом было невозможно обратить эффект деполяризации CGC на нейронную сеть (Рис 5.2.6). Это наблюдение указывает на то, что деполяризация аксональных компартментов CGC, близких к нейронам-мишеням в церебральном ганглии, играет главную и непосредственную роль в увеличении ответов на условный раздражитель. Таким образом, далее мы концентрировали внимание на изменениях, вызванных соматической деполяризацией в этих субклеточных компартментах.

5.2.4. Деполяризация мембраны CGG приводит к увеличенным постсинаптическим ответам и повышению уровня пресинаптического кальция.

Используя методы клеточного культивирования нейронов в комбинации с электрофизиологией, проводили исследование того, может ли

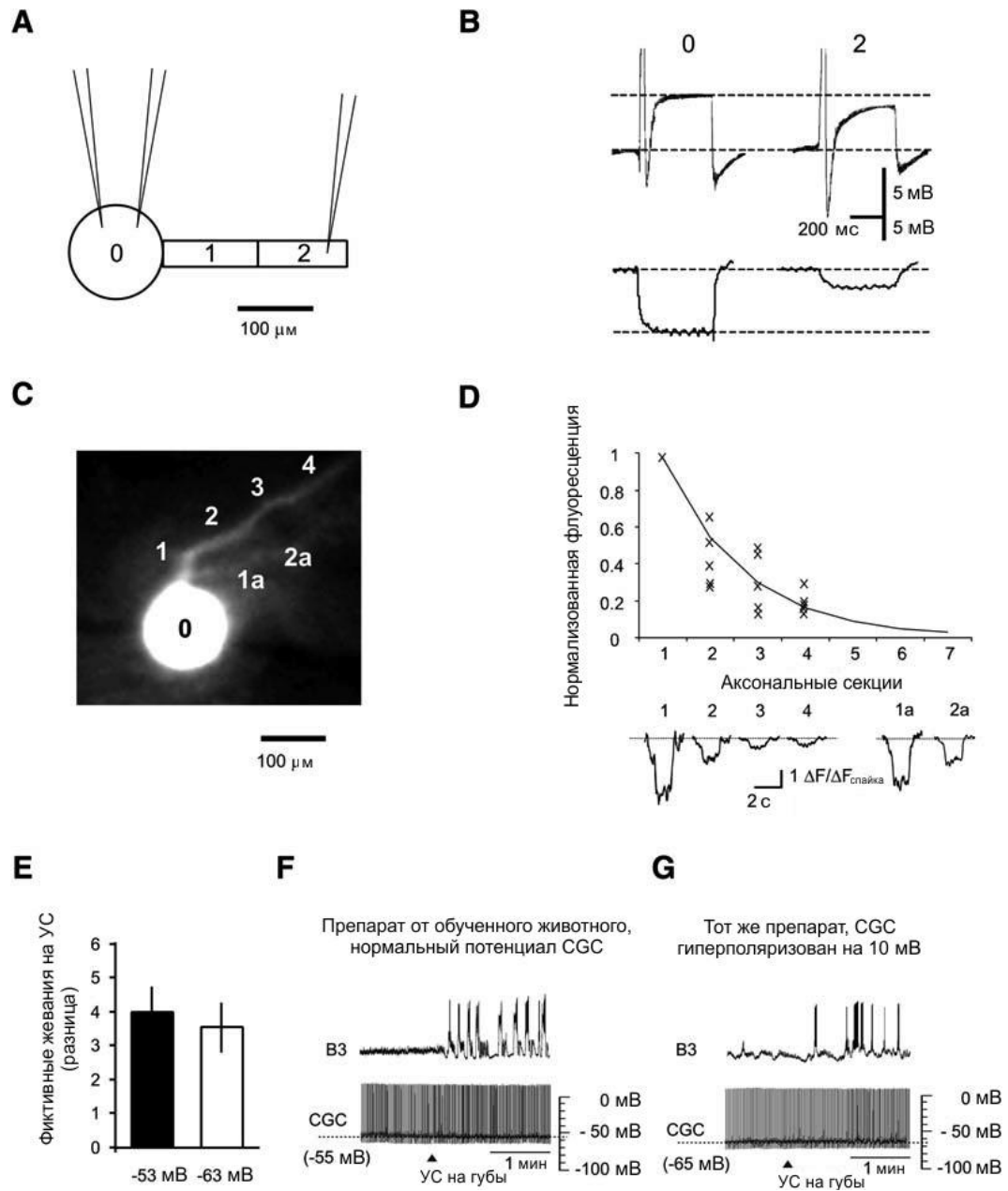


Рис. 5.2.6. Распространение гиперполяризации и деполяризации по аксональным компартментам CGC. (A) Схематическая диаграмма сомы и аксона нейрона CGC, показывающая расположение электродов во время стимуляции (соча) и регистрации (соча и аксон). (B) Вызванный гиперполяризационный сдвиг демонстрирует большее затухание вдоль аксона CGC по сравнению с деполяризационным сдвигом. На примере видно, что даже небольшой деполяризационный сдвиг в соме (на ~ 5 мВ), затухает гораздо медленнее, чем значительно большая соматическая гиперполяризация (на ~ 15 мВ). Изображение спайка обрезано по амплитуде, которая не демонстрировала затухания вдоль отрезка сома-сегмент. Амплитуда измеренного во втором сегменте (аксональном) спайка CGC составляла $97.3\% \pm 0.8\%$ относительно его амплитуды в соме нейрона ($n = 8$ спайков). (C) Соча и аксон нейрона CGC, окрашенного потенциал-зависимым красителем. (D) Измерение распространения соматической деполяризации в сегментах основного аксона 1-4 и в секциях 1a и 2a боковой ветви

(коллатерали). Длина каждого участка примерно соответствует диаметру сомы CGC (около 120 мкм). Сигнал регистрировали с помощью потенциал-зависимого красителя JPW-1114, инъецированного в клеточное тело. Вызванные сдвигом потенциала изменения флуоресценции (ΔF) были нормализованы по отношению к изменению флуоресценции, вызванному одиночным спайком ($\Delta F_{\text{спайка}}$), который распространялся по направлению из сомы нейрона в незатухающей манере (см. [A] и [B]). Уже на расстоянии в два диаметра сомы CGC (сегменты 2 и 2a) гиперполяризация затухает более чем на 50% по отношению к значению, измеренному вблизи сомы (сегменты 1 и 1a). Эти эксперименты продемонстрировали, что относительно небольшое затухание деполяризации сигнала присутствует в зависимости от сдвига потенциала в отростках CGC на расстояниях до порядка 200 мкм от тела клетки, свидетельствуя о том, что деполяризационный сдвиг эффективно передается на проксимальные аксональные ветви. Напротив, гиперполяризационные сдвиги потенциала быстро затухают и уменьшаются до <50% от значения амплитуды в теле клетки уже на протяжении первых 100 мкм основного аксона и его боковых ветвей. Значение средней постоянной длины при распространении гиперполяризационного сдвига имеет небольшое значение ($\lambda = 230$ мкм). Результат этого эксперимента предсказывает, что гиперполяризация сомы CGC будет неэффективна для подавления ответа препарата на условный стимул в виде фиктивного жевания у обученных животных, что было подтверждено в последующих экспериментах, описанных в (D)-(F). (F) Соматическая гиперполяризация не обращала эффект обучения при регистрации CGC у обученных животных ($n = 19$) при уровне «зарегистрированного» мембранного потенциала (-53 ± 3 мВ в этих экспериментах) когда мембранный потенциал сомы CGC искусственно снижали на 10 мВ на тех же препаратах. Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего. (E и G) Примеры записей от препарата одного и того же животного с нейронами CGC при зарегистрированном уровне мембранного потенциала (-55 мВ у CGC на этом препарате) и при гиперполяризации сомы того же CGC на 10 мВ соответственно. В обоих случаях наблюдали значительный фиктивный жевательный пищевой ответ на условный стимул.

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 совместно с мотонейроном B1 (Рис. 5.2.7A). Известно, что CGC моносинаптически связан с мотонейроном B1 в интактной ЦНС (McCrohan and Benjamin, 1980). Таким образом, изменение амплитуды ВПСП в B1 является подходящим критерием для выявления увеличенного синаптического выхода CGC. Обе эти клетки были помещены в культуральную чашку на расстоянии около 400 мкм друг от друга. Это позволило нейронам CGC и B1 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 церебральном ганглии (Styles, 2004). Далее в ветвях также проводили измерение уровня свободного кальция (см. ниже). Уровень мембранного потенциала у CGC в культуре устанавливали с помощью одного электрода и вызывали спайки в соме нейрона с помощью второго независимого электрода. Мы показали, что, хотя форма спайков CGC и не изменилась как функция деполяризации (пример на Рис. 5.2.7С), возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) на совместно культивированном мотонейроне В1 значительно увеличились в размере, демонстрируя повышенные значения постсинаптической деполяризации (Рис. 5.2.7В и 5.2.7С). Похожие результаты были получены на нервно-мышечном соединении и гигантском аксоне кальмара (Charlton and Atwood, 1977; Wojtowich and Atwood, 1984).

В другом эксперименте мы проверяли, может ли деполяризация клеточного тела CGC влиять на препаратах интактной ЦНС на синаптическую передачу CGC на В1 (дистанция между клеточным телом CGC и его аксональными терминалями, пресинаптическими по отношению к В1, составляет около 2 мм). Хотя и не предполагалось, что моносинаптическая передача от CGC на В1 участвует в реализации обучения, мы провели эксперимент, подобный совместному культивированию CGC и В1 где мы исследовали с использованием соответствующих методов (Рис. 5.2.7), можем ли мы детектировать усиление синаптического выхода при деполяризации CGC. Регистрировали CGC и В1 одновременно на 11 препаратах интактной ЦНС (расстояние между клеточным телом CGC и аксональными пресинаптическими терминалями по отношению к В1 порядка ~2 мм). В отличие от эксперимента на культуре (расстояние между клеточным телом CGC и аксональными пресинаптическими терминалями по отношению к В1 порядка ~400 мкм), где деполяризации на 5 мВ было достаточно для усиления ВПСП в В1, клеточное тело CGC на интактной ЦНС было необходимо деполяризовать на 20 мВ для того, чтобы увидеть значительное

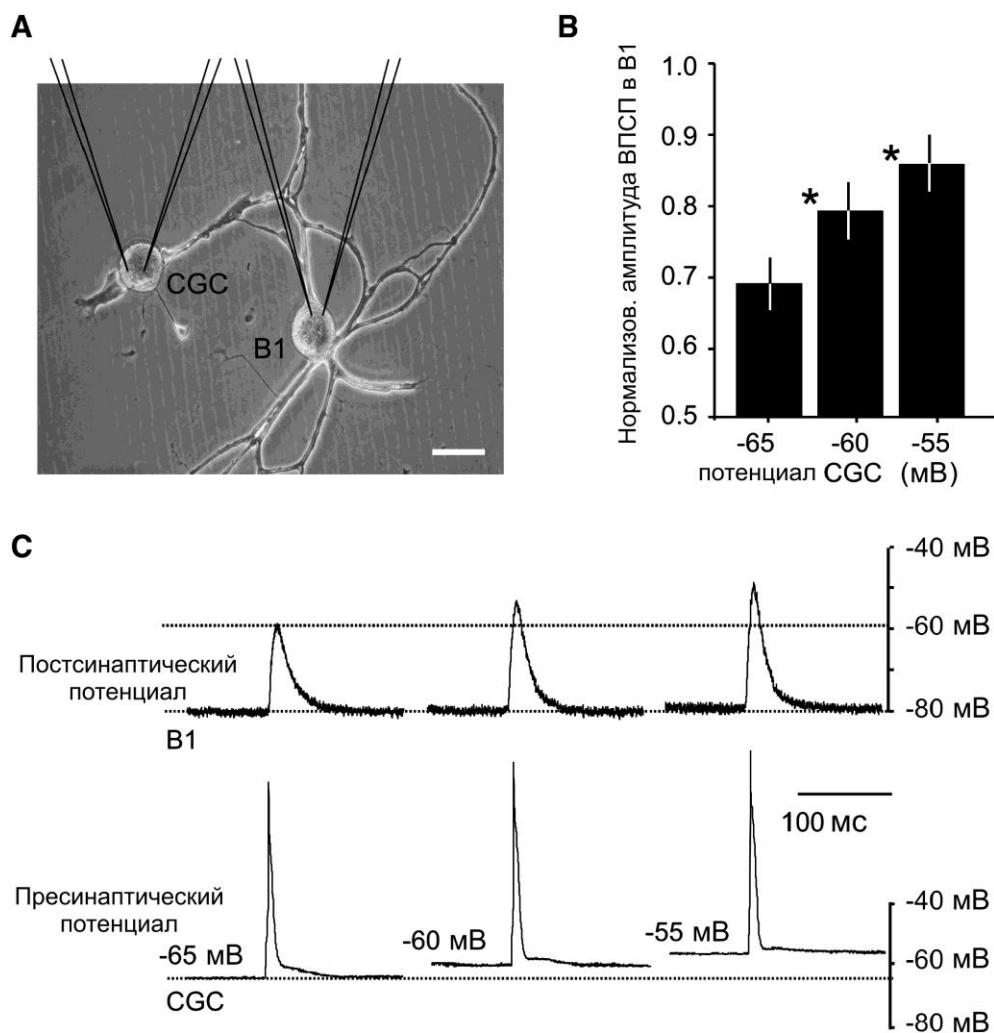


Рис. 5.2.7. Деполяризация сомы CGC приводит к усиленному постсинаптическому ответу. (А) Совместно культивированные нейроны CGC и B1 в возрасте 3-х дней после посадки. Наложенный рисунок электродов показывает, как эти нейроны прокалывали двумя электродами каждый для контроля над мембранным потенциалом с одновременной возможностью регистрации и вызывания одиночных спайков в CGC. Линейка масштаба соответствует 100 мкм. (В) С повышением уровня деполяризации сомы одиночные спайки, инициированные в теле CGC, вызвали возрастающие по амплитуде ВПСП в постсинаптическом нейроне B1. Мембранный потенциал CGC увеличивали ступенями в 5 мВ, начиная с базового значения -65 мВ и до -45 мВ, измеряя в нейроне B1 амплитуду ВПСП, вызванного индуцированными одиночными спайками в CGC. Протокол повторяли 3 раза, и каждый раз измеренные амплитуды нормализовали по максимальному значению (в каждом случае оно составляло ~45 мВ). График показывает средние нормализованные ВПСП в B1 (\pm стандартная ошибка среднего) при значениях мембранного потенциала CGC -65, -60, и -55 мВ. Величины, измеренные при -60 и -55 мВ достоверно больше значений при 65 мВ (парный t-критерий, $df = 2$, $t = 12.0$ и 9.8 , $p < 0.003$ и 0.01). (С) Пример электрофизиологического теста, демонстрирующего повышающиеся постсинаптические ответы в нейроне B1 в ответ на отдельные спайки, вызываемые в теле нейрона CGC, деполяризованного ступенями в 5 мВ начиная с значения -65 мВ и до -45 мВ. Показаны регистрации

ответов при значениях от -65 до -55 мВ. Очевидно, форма спайка не меняется при повышенных уровнях деполяризации. Присутствуют отличия в фазе послегиперполяризации между культуральными и нейронами, зарегистрированными в ганглии (сравн. с Рис. 5.2.2), что, однако, не влияет на интерпретацию данных.

увеличение ВПСП в В1 (от значения 3.8 ± 1.1 мВ при мембранном потенциале CGC около -65 мВ, до 6.4 ± 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 бóльшие расстояния в интактной ЦНС по сравнению с моделью моносинаптической связи на клеточной культуре.

Недавние работы на синапсах млекопитающих показали, что повышение пресинаптического потенциала покоя увеличивает синаптический выход через повышение уровня фонового кальция (Awatramani et al., 2005). Чтобы выяснить, присутствует ли в случае связей CGC похожий механизм опосредованной деполяризацией синаптической фасилитации, мы провели эксперименты с визуализацией уровня свободного кальция нескольких областях аксона CGC на препарате интактной ЦНС с одновременной деполяризацией мембраны CGC и фиксацией потенциала сомы CGC по методу двухэлектродной фиксации потенциала (Рис. 5.2.8А). Мы нашли, что деполяризации сомы на 5 мВ уже достаточно, чтобы вызвать небольшое детектируемое повышение уровня кальция (≥ 40 нМ) в исследованных участках аксона CGC (Рис. 5.2.8В). Ступенька деполяризации в 10 мВ вызвала значительно более высокий кальциевый ответ ($p < 0.006$) в тех же частях аксона (Рис. 5.2.8В). Кроме того, кальциевые ответы как на ступеньку деполяризации сомы в 5 мВ, так и в 10 мВ продолжались все время, пока длилась деполяризация, что показано на примерах на Рис. 5.2.8А и Рис. 5.2.8С.

Взятые вместе, приведенные результаты подтверждают идею о том, что изменение мембранного потенциала CGC может модулировать синаптический выход этого нейрона подобно тому, как это происходит у млекопитающих (Awatramani et al., 2005), и эта модуляция может быть связана с увеличением пресинаптического уровня свободного кальция.

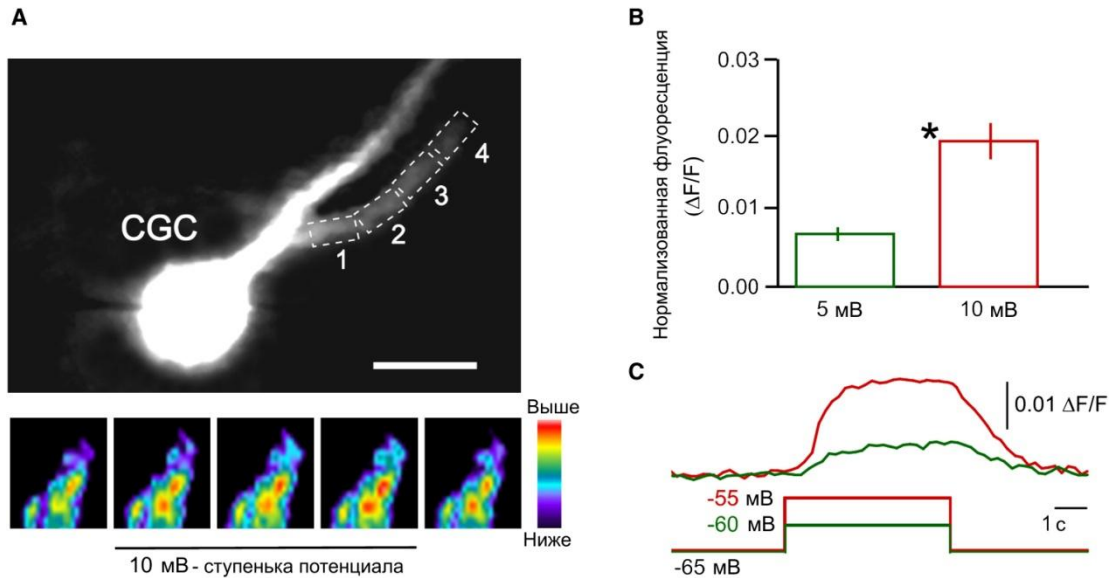


Рис. 5.2.8. Деполяризация мембраны CGC приводит к повышению уровня свободного кальция в проксимальных аксональных отростках. (А) Нейрон CGC, заполненный внутриклеточно кальций-чувствительным красителем Oregon Green 488 BAPTA-1 с введенными в него двумя электродами для экспериментов с фиксацией потенциала. Порог чувствительности красителя к кальциевому сигналу составляет 40 нМ (см. детали на Invitrogen.com). Линейка масштаба соответствует 100 мкм. Кальциевый сигнал регистрировали и оцифровывали от четырех аксональных участков, показанных на рисунке, непосредственно до и после ступеньки, а также во время предъявления ступенек потенциала, начинавшихся с базового значения -65 мВ, и поднимающихся до -60 мВ и -55 мВ соответственно. На примере изображен кальциевый сигнал, с интенсивностью, закодированный псевдоцветом (от низкой к высокой), регистрировавшийся от участка 4. Масштаб картинок в последовательности увеличен в 4 раза по сравнению с картинкой наверху. (В) Увеличение силы кальциевого сигнала, зарегистрированное от четырех разных аксональных районов CGC с фиксированным мембранным потенциалом, показанных на (А), в ответ на ступеньки потенциала, стартующие с -65 мВ, и возрастающие до -60 мВ и -55 мВ соответственно (показаны на рисунке снизу). Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего. Нормализованный флуоресцентный сигнал ($\Delta F/F$) достоверно (парный t-тест, $df = 3$, $t = 7.12$, $p < 0.006$) выше при ступеньке в 10 мВ по сравнению с 5 мВ, что свидетельствует о том, что сигнал зависит от уровня деполяризации. (С) Обе ступеньки потенциала: 5 мВ (зеленая) и 10 мВ (красная), подававшиеся на нейрон CGC с фиксированным потенциалом, вызывали постоянно поддерживавшийся ступенчатый кальциевый сигнал в аксональном участке 4.

5.2.5. Деполяризация мембраны CGG увеличивает ответы на условный стимул командных пищевых нейронах.

Далее, мы разрабатывали способ проверки гипотезы о том, существует ли связь между соматической деполяризацией CGC и

изменениями на уровне нейронных сетей. Для этого мы проводили эксперименты на полуинтактных препаратах наивных животных (Рис. 5.2.1С) с одновременной внутриклеточной регистрацией активного фиктивного жевания в мотонейронах, варьируя при этом уровень мембранного потенциала CGC и сопровождая это экстраклеточной регистрацией спайковой активности в церебро-буккальных коннективах (СВІ). Ранее было продемонстрировано, что химическое (ольфакторное) обуславливание увеличивает ответ на УС в нейронах СВІ (Straub et al., 2004), и командно-подобных церебро-буккальных интернейронах пищевого поведения, напрямую задействованных в активации пищевого поведения через возбуждающие синаптические связи в сети центрального генератора паттерна (Рис. 5.2.1В). Мы предполагаем, что коротколатентное увеличение ответа на УС в нейронах СВІ после обучения было вызвано фасилитацией условного раздражения на пути к нейронам СВІ, деполяризованным CGC (Рис. 5.2.9А). Это могло также объяснить случаи, отмеченные на препаратах, когда CV1a, один из нейронов СВІ, после предъявления условного стимула часто демонстрировал коротколатентную спайковую реакцию (см. пример на Рис. 5.2.4В).

Мы исследовали эффект искусственной деполяризации мембранного потенциала CGC на ответы интернейронов СВІ на условный раздражитель, регистрируя их аксональные спайки в церебро-буккальной коннективе, используя присасываемые электроды по методу «en passant». Это позволяло нам регистрировать суммарные популяционные спайки в церебро-буккальной коннективе в ответ на условный стимул (Straub et al., 2004). В наивных препаратах CGC ($n = 5$) был деполяризован на 10 мВ относительно «зарегистрированного» до этого (не затронутого вмешательством) потенциала (среднее составило 61.2 ± 4.7 мВ). Одновременно с поддержанием в CGC спайкового разряда на постоянной величине, СВІ была сходна при обоих уровнях мембранного потенциала в CGC. Однако, когда CGC был деполяризован, появлялось заметное быстрое

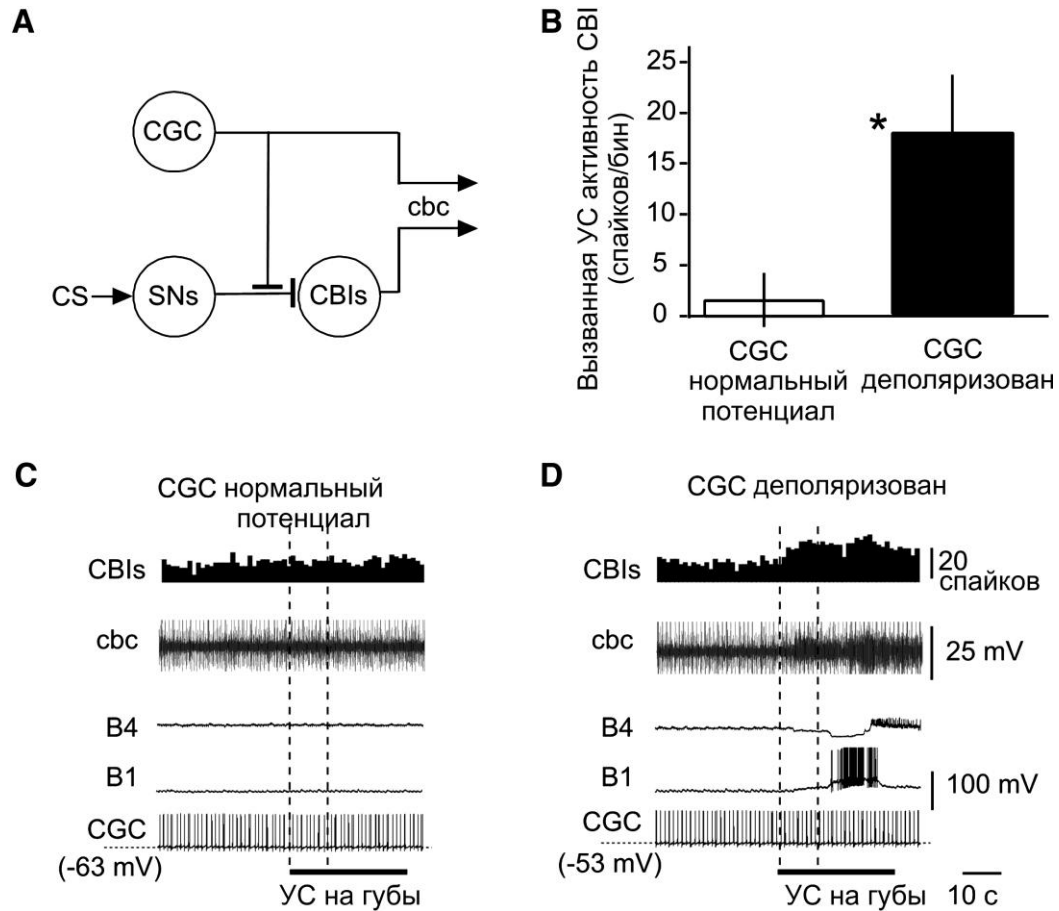


Рис. 5.2.9. Деполяризация соматической мембраны CGC увеличивает вызванную условным стимулом спайковую активность церебро-буккальных интернейронов. (А) Диаграмма постулируемых возбуждающих связей между нейроном CGC и сенсорными нейронами (SNs) в пути условного рефлекса. Путь условного рефлекса включает в себя возбуждающие синаптические входы на церебро-буккальные интернейроны (CBI). CBI являются единственными интернейронами, которые проецируются из церебрального ганглия в буккальный ганглий и были идентифицированы по соответствующей спайковой активности при экстраклеточной регистрации церебро-буккальных коннектив (cbc) и внутриклеточной регистрации индивидуальных спайков в нейронах CBI (Staras et al., 2002). Предшествующая работа (Straub et al., 2004) продемонстрировала, что частота экстраклеточно регистрируемых событий (позднее идентифицированных как спайки нейронов CBI; Staras et al., 2002), повышается после пищевого условного обучения с одного предъявления. Градуальные изменения в соматическом потенциале должны проникнуть в аксоны CGC достаточно далеко, чтобы повлиять на активность SNs в сенсорном пути, возбуждающем CBI. (В) Вызванное условным стимулом увеличение числа спайков в течение первых 10 сек после аппликации достоверно больше, когда CGC деполяризован по сравнению с тем, когда мембранный потенциал находился на зарегистрированном значении. Показаны средние величины (\pm стандартная ошибка среднего) рассчитанные на каждом 1-сек отрезке. Рассчитанные статистические величины (парный t-тест) составляют: $df = 4$, $t = 2.95$, $p < 0.04$. (С) Отсутствие эффектов предъявления условного стимула на

активность СВІ и пищевого генератора ритма у препаратов наивных животных при зарегистрированном значении мембранного потенциала CGC. (D) Вызванная условным стимулом активность в СВІ (обработанная спайковая диаграмма и запись от cbc), наблюдалась одновременно с фиктивным жеванием (записи от мотонейронов В1 и В2) в том же препарате, что и на (D), только нейрон CGC деполяризован на 10 мВ. Спайки самого CGC в показанной регистрации от cbc обрезаны по амплитуде. Мотонейрон В1 начинает разряжаться спайками полной амплитуды в фазе фиктивного жевания N1 через ~15 сек после предъявления условного стимула. Мотонейрон В4 во время фаз N1 и N2 выторможен, и демонстрирует аксональные спайки только в фазе N3. Прерывистые линии отмечают 10-ти секундный интервал после аппликации условного стимула, во время которого проводили сравнение активности СВІ (см. [B]).

проводили сравнение популяционного ответа нейронов СВІ и сравнивали его с ответами, наблюдаемыми при «зарегистрированном» мембранном потенциале.

Когда нейрон CGC был деполяризован, среднее увеличение спайковой активности нейронов СВІ во время первых 10 секунд после аппликации УС и до проявления фиктивного жевания было достоверно ($p < 0.04$) выше (18 ± 5 спайков/интервал) по сравнению с экспериментами, когда CGC записывали при «зарегистрированном» мембранном потенциале (2 ± 3 спайка/интервал, Рис. 5.2.9В). То же самое было справедливо для вызванной условным стимулом активности СВІ, которую регистрировали в течение всего времени аппликации условного стимула (30 сек; $df = 4$, $t = 3.2$, $p < 0.03$, данные не показаны). Фоновая активность интернейронов СВІ достоверно не отличалась при двух экспериментальных значениях мембранного потенциала CGC (32 ± 3 спайков/интервал при «зарегистрированном» мембранном потенциале), в сравнении с деполяризованным мембранным потенциалом, 26 ± 5 спайков/интервал (парный t-критерий, $df = 4$, $t = 1.68$, $p = 0.17$). На рисунках 5.2.9С и 5.2.9D представлены примеры одновременной регистрации церебробуккальной коннективы, CGC, мотонейронов В4 и В1 на одном препарате, когда у CGC был «зарегистрированный» мембранный потенциал (Рис. 5.2.9С) и деполяризованный относительно «зарегистрированного» (Рис. 5.2.9D). Верхние гистограммы на Рис. 5.2.9С и 5.2.9D отражают число спайков CGC на односекундных интервалах, регистрируемых в течение 30-секундного периода до и после предъявления условного стимула на губы препарата. Фоновая активность интернейронов

увеличение числа спайков в интернейронах СВИ, регистрируемых экстраклеточно в церебро-буккальной коннективе, чего не наблюдалось, когда мембранный потенциал находился на «зарегистрированном» уровне. Когда мембрана CGC была деполяризована, начальное увеличение активности интернейронов СВИ сопровождалось циклами фиктивного жевания, вызываемым нейронами центрального генератора паттерна (наблюдавшимися как активность регистрируемых одновременно с этим мотонейронов В4 и В1; Рис. 5.2.9D). Напротив, когда CGC не был деполяризован и его потенциал находился на уровне «зарегистрированного», циклов фиктивного жевания условным стимулом не вызывалось (Рис. 5.2.9C).

Все вместе, приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что деполяризация CGC увеличивает ответы нейронов СВИ на условный стимул, обеспечивая действенный на уровне нейронных сетей механизм для запуска пищевого поведения условным стимулом после пищевого подкрепления.

5.3. Постоянный натриевый ток является несинаптическим субстратом долговременной ассоциативной памяти.

Хотя синаптические механизмы часто представляют как первичный механизм, формирующий память (Kandel, 2001), формы несинаптической пластичности, такие, как повышенная соматическая и дендритная возбудимость или изменение мембранного потенциала, также были показаны как на беспозвоночных, так и на позвоночных животных (Debanne et al., 2003; Frost, 2006; Giese et al., 2001; Magee and Johnston, 2005; Marder et al., 1996; Zhang and Linden, 2003) Однако, по сравнению с синаптической пластичностью, имеется гораздо меньше информации о механизмах отдельных типов несинаптической пластичности, задействованных в хранении памяти, идентифицируемой поведенческими методами. Выше, мы показали, что вызванная обучением соматическая деполяризация идентифицируемого модуляторного нейрона CGC пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* хранит информацию, которая необходима для извлечения

и проявления в поведении следа долговременной ассоциативной памяти. Таким образом, CGC - нейроны *Lymnaea* - представляют собой подходящую экспериментальную систему для исследования ионных механизмов несинаптической пластичности, связанной с поведенчески детектируемым обучением. Базируясь на комбинированном подходе, включающем поведенческие методы, электрофизиологию, иммуногистохимию и компьютерную симуляцию, мы продемонстрировали, что увеличение постоянного натриевого тока в CGC стоит за отставленной постоянной деполяризацией, появляющейся в этом нейроне после обучения животного классическому условному рефлексу с одного подкрепления. Наши экспериментальные данные открывают новые перспективы исследований того, как вызванные обучением изменения на уровне мембранного потенциала обеспечивают форму долговременной нейрональной пластичности, ранее отмеченную за ее вклад в адаптивные изменения на нейросетевом и поведенческом уровнях.

5.3.1. Вызванная обучением долговременная деполяризация совпадает по времени с увеличением значения постоянного неинактивируемого натриевого тока в нейронах CGC.

В предыдущих частях главы было продемонстрировано, 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 (технические детали см. в методах). 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 фундаментальной 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.

Тестирование поведенческих проявлений памяти подтвердило, что однократное пищевое обучение с одного подкрепления действительно приводило к долговременной памяти и образовывало ассоциации между условным и безусловным стимулами. Электрофизиологические эксперименты, проведенные на препаратах изолированной ЦНС, также подтвердили ранее описанные наблюдения того, что через 24 часа после обучения (но не ранее 12 часов после обучения) мембранный потенциал CGC в группе сочетанных предъявлений УС/БС был достоверно деполяризован по сравнению с контрольной группой.

Вызванное условным стимулом количество жеваний в группе животных, получавших сочетанное предъявление УС/БС ($n = 30$ животных), составило 10.8 ± 1.6 жеваний/2 мин, что достоверно выше, чем количество жеваний в группе несочетанных предъявлений УС/БС (1.8 ± 0.9 жеваний/2 мин, $n = 30$ животных) или в группе наивных необученных животных (2.9 ± 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 сочетанное предъявление УС/БС (-55.8 ± 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 ± 1.1 мВ и -58.3 ± 1.1 мВ соответственно, $n = 10$ препаратов в каждой группе, ANOVA, $F[2, 29] = 11.0$; $p < 0.0003$; критерий Тьюки, $p < 0.05$).

После регистрации мембранного потенциала, на каждом нейроне CGC использовали два разных протокола стимуляции в режиме фиксации потенциала. Первый протокол фокусировался на регистрации $I_{Na(P)}$, а второй протокол в большей степени концентрировался на регистрации отставленного выпрямляющего калиевого тока, порог активации которого не имеет такого же сильного негативного сдвига по сравнению с порогом активации $I_{Na(P)}$ (Staras et al., 2002). Хорошо охарактеризованный ранее 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 (~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. На первой стадии нашего исследования мы, используя эту особенность, сравнивали $I_{Na(P)}$ в группах УС/БС сочетанных предъявлений, с контрольной с несочетанным предъявлениями, и группой наивных необученных животных, измеряя ответ при достижении стационарного (равновесного) тока, вызываемого деполяризующей ступенькой от -110 мВ до -55 мВ. В каждом электрофизиологическом эксперименте мы регистрировали как правый, так и левый CGC, и далее в анализе для статистических сравнений использовали усредненные данные по обоим контралатеральным нейронам.

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 (Рис. 5.3.1А; ANOVA, $F[2,19] = 7.7$; $p < 0.002$; критерий Тьюки, $p < 0.001$; примеры регистрации $I_{Na(P)}$ от каждой группы

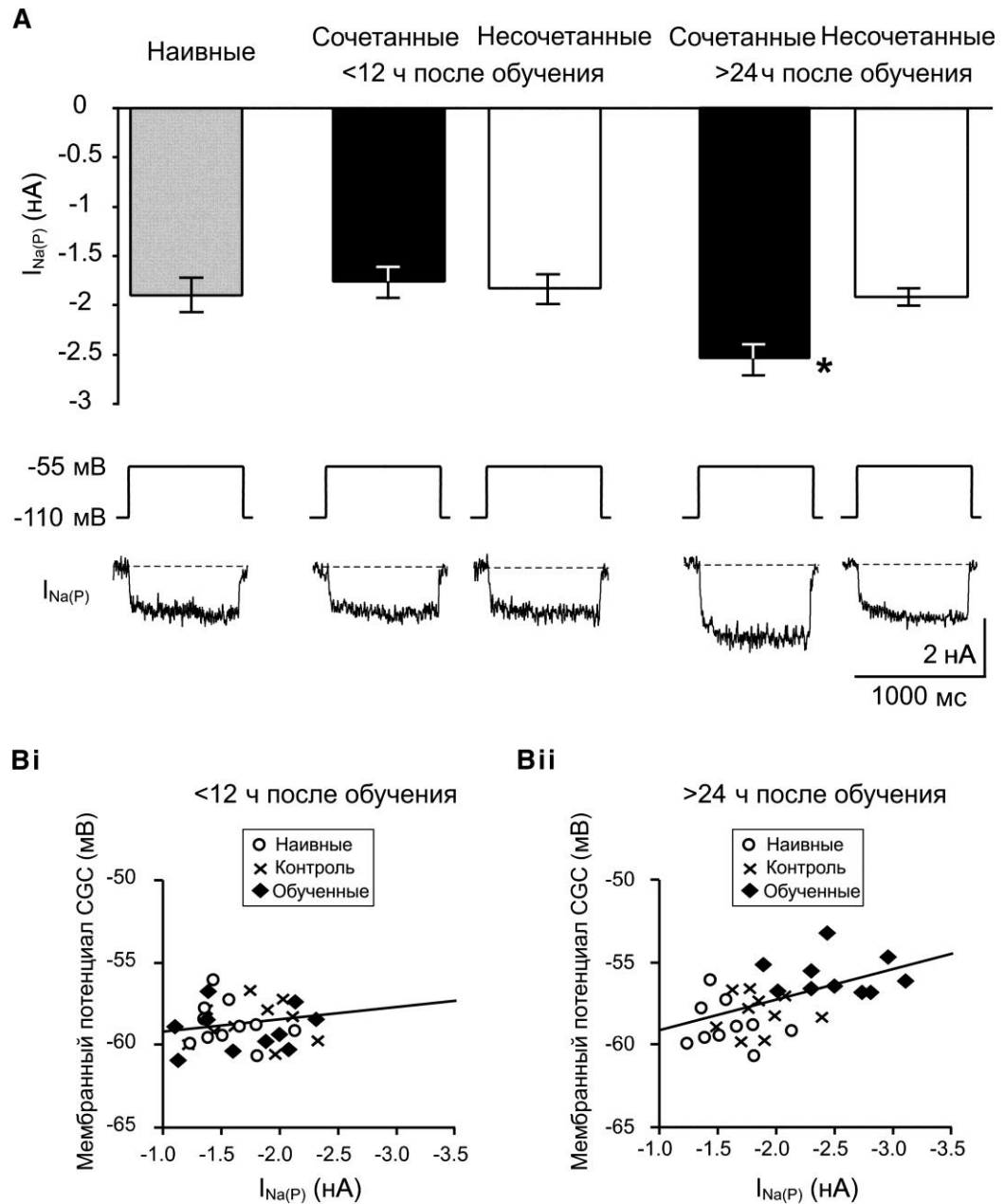


Рис. 5.3.1. Увеличение $I_{Na(P)}$ после обучения классическому условному рефлексу совпадает по времени и коррелирует с деполяризацией мембраны CGC.

(А) Средние равновесные значения амплитуды $I_{Na(P)}$ (\pm стандартная ошибка) у CGC на препаратах, приготовленных из наивных и обученных животных <12 часов и >24 часов после обучения ($n = 10$ препаратов в каждой группе). Сравнимые ответы тока были вызваны ступенькой потенциала от -110 мВ до -55 мВ, из описанного ранее многоступенчатого протокола, применявшегося к каждой клетке (см. эту главу выше по тексту). Примеры регистрации тока в нейронах CGC в разных группах показаны под соответствующими гистограммами.

(В) Точечные гистограммы с линейными регрессиями измеренного мембранного потенциала, построенного относительно $I_{Na(P)}$ (вызванного ступенькой потенциала от -110 мВ до -55 мВ) для тех же экспериментов, данные по которым приведены на (А).

приведены под графиками). 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 измерениям $I_{Na(P)}$ 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 (Рис 5.3.1Vi) в группах, зарегистрированных после 24 часов, между этими двумя переменными была обнаружена значительная корреляция (Рис. 5.3.1Vii; 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 (Рис. 5.3.1Vii, ромбики) были кластеризованы в более деполяризованном диапазоне значений мембранного потенциала, а большинство данных от наивных препаратов и несочетанной группы предъявлений УС/БС (Рис. 5.3.1Vii, кружки и крестики соответственно) были кластеризованы в меньшем $I_{Na(P)}$ /менее деполяризованном (Рис. 5.3.1Vi). 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 вольтамперной 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 (Рис. 5.3.2Ai и

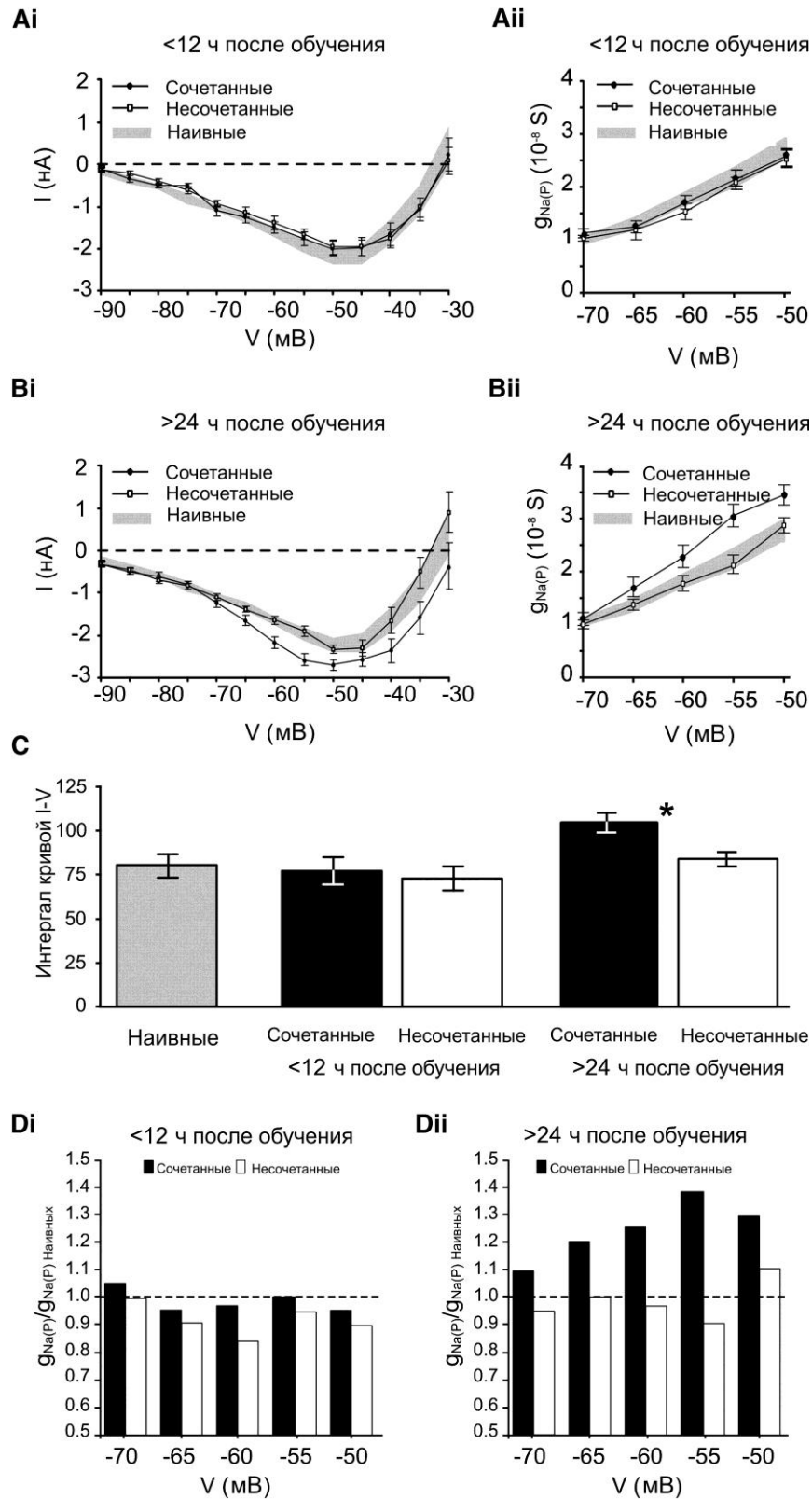


Рис. 5.3.2. Отставленные изменения $I_{Na(P)}$ и $g_{Na(P)}$ вызванные обучением в нейронах CGC в широком диапазоне значений потенциала активации.

(А и В) (панели i) Вольт-амперная характеристика (I-V) в равновесном состоянии постоянного натриевого тока, зарегистрированного у CGC в группе, получавшей сочетанные предъявления УС/БС, в группе несочетанного контроля, зарегистрированных <12 часов и >24 часов после обучения и в группе наивных

животных (серая полоса обозначает среднее \pm стандартная ошибка для этой группы). (панели ii) Рассчитанные значения постоянной натриевой проводимости $g_{Na(P)}$ в CGC у группы, получавшей сочетанные предъявления УС/БС, животных группы несочетанного контроля, зарегистрированных <12 часов и >24 часов после обучения и группы наивных животных.

(C) Средние значения площади между кривой I-V и нулевой осью (\pm ошибка среднего), рассчитанные для CGC группы, получавшей сочетанные предъявления УС/БС, группы несочетанного контроля, зарегистрированных <12 часов и >24 часов после обучения и группы наивных животных.

(D) Отношения проводимостей $g_{Na(P)}$ у групп сочетанных и несочетанных предъявлений УС/БС, протестированных <12 часов и >24 часов после обучения и группы наивных животных.

5.3.2C). 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 (Рис. 5.3.2Вi и 2C).

Второй тип анализа проводили путем расчета значений проводимости постоянного неинактивируемого натриевого тока ($g_{Na(P)}$) для интервала активации от -70 мВ до -50 мВ для наивной группы, контрольной с несочетанными предъявлениями и экспериментальной с сочетанными предъявлениями УС/БС для данных <12 часов и >24 часов после обучения (Рис. 5.3.2Aii и 5.3.2Bii). Одновыборочный t-критерий отношений среднего проводимости у сочетанной к наивной, и несочетанной к наивной группе выявил, что отношения были достоверно выше в обученной сочетанной группе, исследованной через 24 часов после обучения ($t = 4.0$, $df = 4$, $p < 0.016$, Рис. 5.3.2Dii).

Активация отставленного выпрямляющего калиевого тока I_K нейрона CGC происходит около значения -50 мВ (Staras et al., 2002). Поскольку наши эксперименты проводились в нормальном физиологическом растворе, теоретически возможна вероятность того, при значениях потенциала, более позитивных чем -50 мВ, в вызванное обучением уменьшение I_K вносит вклад в общее суммарное уменьшение постоянного входящего тока. Однако

наши эксперименты с использованием второго типа протокола в режиме фиксации потенциала (удерживаемый базальный потенциал -60 мВ; шаг до уровней от -50 мВ до +30 мВ с шагом 10 мВ) не выявили достоверной разницы в I_K между контрольной и обученной группами по всему диапазону значений потенциала (Рис. 5.3.3). Это подтвердило, что вызванное обучением увеличение общего входящего тока вызвано именно увеличением постоянного входящего натриевого тока, а не снижением калиевого тока.

Также, мы провели дополнительные эксперименты для того, чтобы исключить возможность, что вызванная обучением деполяризация мембранного потенциала была в действительности вызвана возникновением еще одного постоянного тока, отличного от $I_{Na(P)}$, и переносимого не ионами натрия, а каким-нибудь другим типом ионов. Если бы это было так, тогда было бы возможным увидеть разницу между контрольными и обученными препаратами постоянном входящем токе в CGC даже в отсутствие натрия во внеклеточной среде. В среде с нормальным натрием нейроны CGC были достоверно более деполяризованы у препаратов животных, получавших сочетанные предьявления ($n = 14$) по сравнению с препаратами контрольных животных (наивные, $n = 9$; несочетанные, $n = 11$; Рис. 5.3.4А и 5.3.4Вi). Однако, когда нормальный раствор заменили на безнатриевый (Рис. 5.3.3А), потенциал нейронов CGC стабилизировался на одинаковом уровне -80 мВ во всех трех группах (Рис. 5.3.4Вii). Тесты в режиме фиксации потенциала с длинными 800 мсек ступеньками от -110 мВ до -55 мВ не выявили постоянного входящего тока у CGC ни в обученной сочетанной, ни в контрольной группе (Рис. 5.3.4В), подтвердив, что увеличение величины постоянного входящего тока в CGC у группы сочетанных предьявлений действительно вызвано увеличением постоянной натриевой проводимости.

Дополнительный анализ на основе метода пэтч-клэмп мог бы потребоваться для определения источника повышения $I_{Na(P)}$ (то есть повышения проводимости отдельных каналов или/и повышения их числа), однако его применение на интактных ЦНС наивных и обученных животных нашей работе не рассматривалось. Однако, мы произвели иммуногистохимические исследования с использованием антител к натриевому каналу $Na_v1.9$ для того, чтобы установить, присутствует ли какой-нибудь признак повышения плотности натриевых каналов в результате обучения

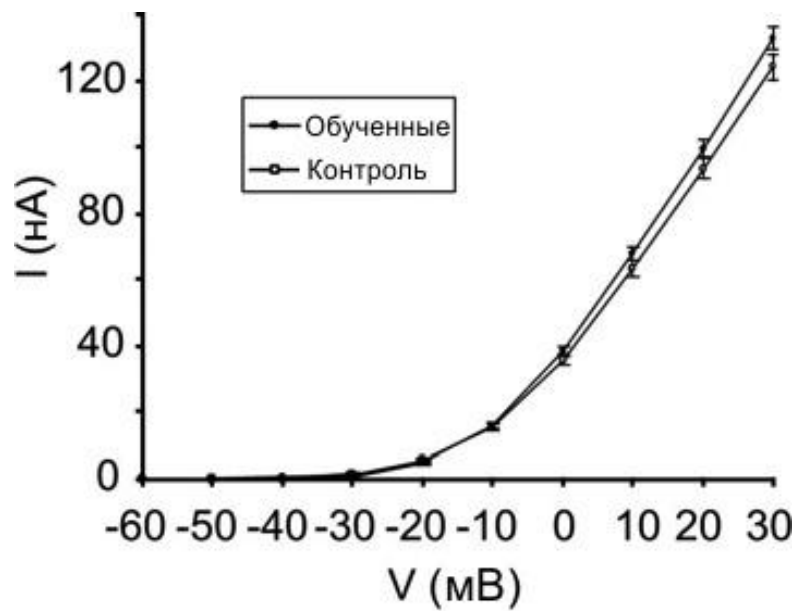


Рис. 5.3.3. Отставленный выпрямляющий калиевый ток I_K у CGC заметно не изменяется после обучения классическому условному рефлексу с одного подкрепления. Показаны вольтамперные характеристики I_K , измеренные у CGC в группах сочетанных предъявлений УС/БС ($n = 10$) и несочетанных предъявлений ($n = 10$). Вольтамперные характеристики I_K у CGC наивных животных также очень похожи на этот график (данные не показаны).

через 24 часа после обучения. Постоянный натриевый ток, переносимый каналами этого типа, очень близок по параметрам к постоянному натриевому току, зарегистрированному в наших экспериментах (см. выше). Это сходство говорит о возможной структурной консервативности этого канала, что подтверждается стандартными методами контроля и тестами специфичности на вестерн-блотах с гомогенатами как ЦНС крысы, так и *Lutinaea* (Рис. 5.3.5). Используя иммуоцитохимию, мы нашли достоверное отличие в специфичном окрашивании ЦНС у CGC в группе, получавшей сочетанные предъявления УС/БС по сравнению с группой несочетанных предъявлений УС/БС и наивной контрольной группой (Рис. 5.3.4D). Это указывает на то, что увеличение числа $Na_v1.9$ -подобных каналов является важным фактором, вносящим вклад в увеличение постоянной натриевой проводимости и натриевого тока после обучения.

5.3.2. Вызванное обучением увеличение $I_{Na(P)}$ полностью соответствует увеличенной деполяризации мембранного потенциала CGC у обученных животных.

Наши текущие эксперименты продемонстрировали, что вызванное обучением увеличение $I_{Na(P)}$ соответствует по времени и коррелирует с деполяризацией мембраны CGC. Также ранее мы упоминали, что инъекция cAMP в сому увеличивает как $I_{Na(P)}$, так и деполяризует мембрану CGC, тогда как удаление натрия из экстраклеточного раствора приводит к значительной гиперполяризации (Staras et al., 2002). Все вместе, эти наблюдения указывают на возможную связь между вызванным обучением увеличением $I_{Na(P)}$ и деполяризацией мембранного потенциала. Чтобы протестировать возможность этой причинной связи, мы использовали преимущества предсказаний недавно созданной модели электрических свойств мембраны сомы CGC (тип модели Ходжкина-Хаксли; Vavoulis et al., 2007). Реалистичные математические модели отдельных нейронов играют значительную роль в оценке вкладов отдельных специфических ионных токов в нейрональную возбудимость.

Наша математическая модель базируется на данных по фиксации потенциала CGC, полученных на наивных животных в предыдущих сериях экспериментов (Staras et al., 2002). Для создания детальной модели CGC осуществляли подгонку однокомпарментного математического описания Ходжкина-Хаксли к данным, полученным методом двуэлектродной фиксации тока и фиксации потенциала с использованием комбинации линейных и нелинейных методов суммы наименьших квадратов.

Далее, проводились опыты с селективной блокадой отдельных проводимостей, чтобы уточнить их роль в модели и математически воспроизвести фармакологические эксперименты на модели. Модель аккуратно воспроизводила форму потенциала действия биологического нейрона при тоническом разряде (Рис. 5.3.6), и обеспечивала аккуратное описание эффектов выключения известных ионных проводимостей, включая $g_{Na(P)}$ (Рис. 5.3.6Vi), а также кальциевые токов HVA и LVA-типов, быстрого калиевого тока А-типа, быстрых натриевого и отставленного выпрямляющего калиевого токов на значения мембранного потенциала

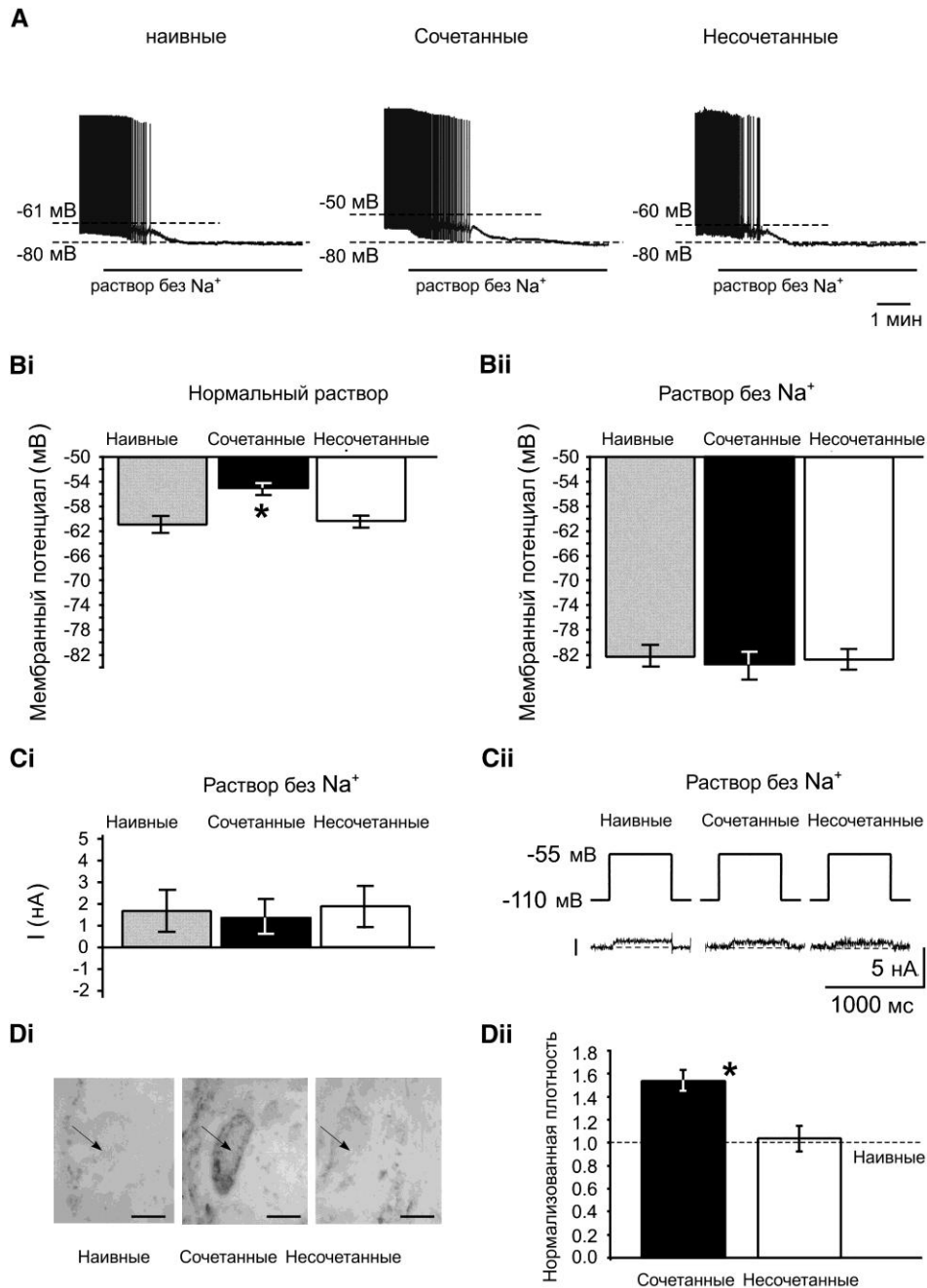


Рис. 5.3.4. Каналы $I_{Na(P)}$ являются субстратом для долговременной памяти, появляющейся по прошествии >24 часов после процедуры обучения с однократного предъявления.

(А-В) В безнатриевом растворе различий между группами сочетанных и несочетанных предъявлений УС/БС замечено не было.

(А) Примеры регистраций потенциала CGC у препаратов животных из групп сочетанных и несочетанных предъявлений УС/БС, вmyаемых в безнатриевый раствор. Мембранный потенциал CGC трех различных препаратов понизился до значений порядка -80 мВ несмотря на то, что в нормальном растворе в группе сочетанных предъявлений потенциал CGC был более деполяризованным на ~10 мВ по сравнению с двумя остальными препаратами.

(С) Статистическое сравнение значений мембранного потенциала CGC (среднее \pm стандартная ошибка) между тремя группами в нормальном и безнатриевом

растворах соответственно. ANOVA: (Di) $F[2, 32] = 6.9, p < 0.04$; тест независимых испытаний, $p < 0.05$ (сочетанные по сравнению с несочетанными и наивными).

(Dii) $F[2, 29] = 0.9, p = 0.4$ (не достоверно).

(Ci) Статистическое сравнение значений равновесных токов в безнатриевом растворе (среднее \pm стандартная ошибка), вызванных ступенькой потенциала длительностью 800 мсек от -110 мВ до -55 мВ между тремя группами. ANOVA: $F[2, 22] = 0.9, p = 0.4$ (не достоверно).

(Cii) Примеры записей уменьшенного постоянного выходящего (по-видимому калиевого) тока, зарегистрированного у CGC на препаратах у всех трех групп.

(D) Плотность белка $\text{Na}_v1.9$ -подобных каналов увеличивается у CGC >24 часов после обучения классическому пищевому рефлексу с одного подкрепления.

(Di) Пример увеличения включения иммуноцитохимической метки в тела клеток CGC (указаны стрелочками) в группе сочетанных предъявлений УС/БС по сравнению с группами несочетанных предъявлений и контрольной. Линейка масштаба - 50 мкм.

(Dii) Статистическое сравнение плотности включений иммуноцитохимической метки в тела клеток CGC (среднее \pm стандартная ошибка) у группы сочетанных предъявлений УС/БС по сравнению с группой несочетанных предъявлений (* $p < 0.006$, независимый t-тест, $df = 10, t = 3.50$). Суммарные значения плотности были получены от двух экспериментальных групп и затем нормализованы к значениям, измеренных в CGC на срезах от наивной группы, которые держали на том же слайде. Эти результаты хорошо соответствуют данным и их обобщениям, полученным в результате экспериментов по измерению тока.

форму спайка и частоту разряда (Vavoulis et al., 2007). Таким образом, мы предполагали, что эта модель может помочь извлечь важную количественную информацию по вызванному обучением эффекту увеличения $g_{\text{Na(P)}}$ на значение мембранного потенциала независимо от прямых измерений, полученных в наших опытах с использованием метода фиксации потенциала на обученных и контрольных животных.

Разница в значениях $I_{\text{Na(P)}}$, взятых у обученных с сочетанными предъявлениями и контрольных наивных животных, была введена в исходные данные модели при том, что моделист не знал о происхождении этих данных и не знал о разнице в измеренном мембранном потенциале CGC у этих животных. Предсказания делались по изменению измеренного максимального значения постоянной натриевой проводимости $g(\text{max})_{\text{Na(P)}}$ (см. методы). Модель продемонстрировала, что $g(\text{max})_{\text{Na(P)}}$ (и таким образом $I_{\text{Na(P)}}$) увеличивается на 38.9% (наблюдаемая средняя разница в процентах $I_{\text{Na(P)}}$ между группами сочетанных предъявлений УС/БС и наивной контрольной группой, Рис. 5.3.1), и это должно деполяризовать сому

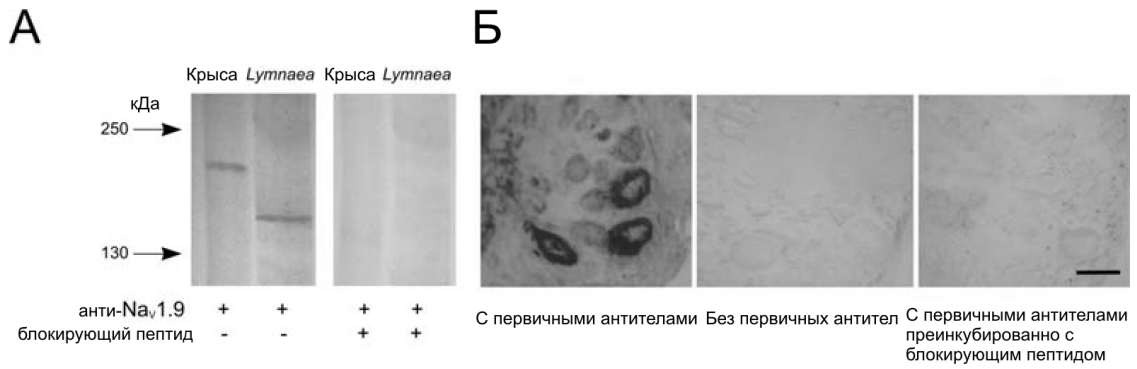


Рис. 5.3.5. Антитела млекопитающих к каналу $NaV1.9$ детектируют специфический сигнал в гомогенате ЦНС *Lyttaea* и на иммуногистохимических срезах. (А) Преинкубация с первичными антителами с блокирующим их пептидом подавила сигнал вестерн-блота в гомогенизированных пробах, взятых как из мозга крысы, так и из ЦНС *Lyttaea*. (В) Сигнал отсутствовал в иммуногистохимических срезах, обработанных только вторичными антителами (без первичных антител) или с первичными антителами, преинкубированными со специфическим блокирующим пептидом (с последующей инкубацией со вторичными антителами). Эти срезы были подвергнуты общей реакции проявления цвета, которая привела к выявлению сильного сигнала в срезах, обработанных первичными антителами (с последующей инкубацией со вторичными антителами). Линейка масштаба - 50 мкм.

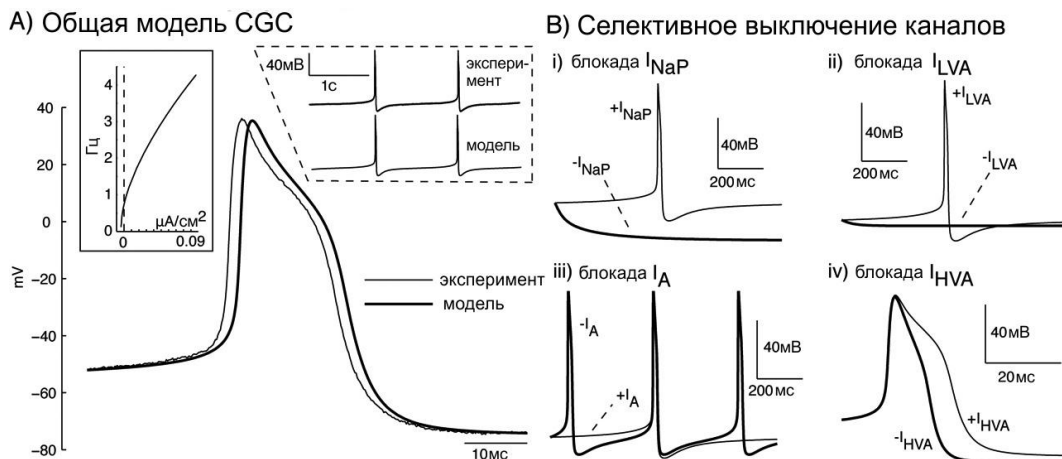


Рис. 5.3.6. Математическая модель нейрона CGC *Lyttaea* представляет собой мощное средство для изучения характеристик нейрона и факторов, приводящих к изменениям в его электрических свойствах при обучении. (А) Тонический режим спонтанной активности модели CGC соответствует паттерну, зарегистрированному на реальном биологическом нейроне CGC, а форма спайка модельного CGC повторяет форму спайка биологического CGC. (Вi) Блокада тока $I_{Na(P)}$ у модельного нейрона CGC вызывает гиперполяризацию мембранного потенциала. Этот симулированный эффект очень похож на наблюдавшийся на биологическом CGC

эффект удаления натрия из омывающего физиологического раствора (Staras et al., 2002). (Bii-Biv) Блокада основных токов и их влияние на активность и форму потенциала действия CGC. Получено в соавторстве с Д. Вавулисом.

нейрона CGC от значения -58.3 мВ (среднее значение мембранного потенциала CGC в наивной группе) до значения -55.6 мВ (Рис. 5.3.7). Среднее значение мембранного потенциала в группе сочетанных предъявлений УС/БС было -55.8 мВ, что позволяет заключить о значительной близости рассчитанного значения к экспериментально измеренному значению сдвига мембранного потенциала (Рис 5.3.7), подтверждая, что вызванное обучением увеличение $I_{Na(P)}$ не только совпадает по времени и коррелирует, но и является причиной вызванных обучением изменений мембранного потенциала.

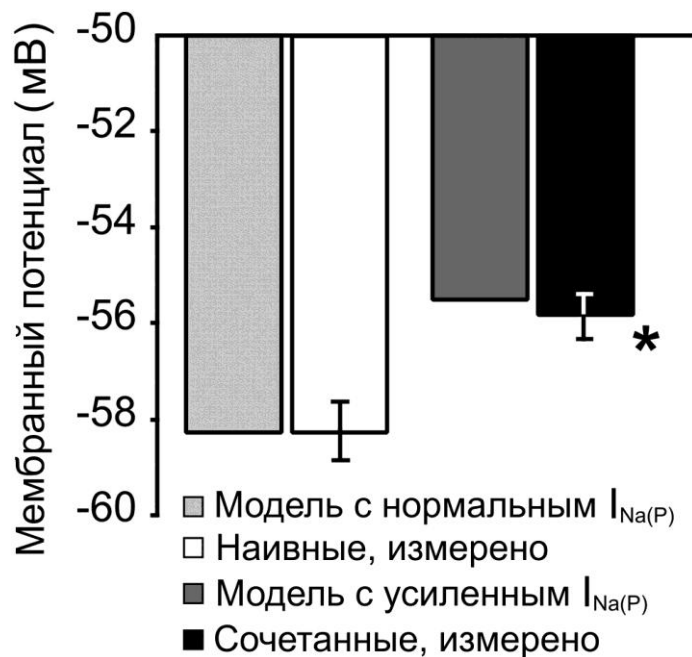


Рис. 5.3.7. Компьютерное моделирование изменений, вызванных обучением в CGC. Увеличение максимальной натриевой проводимости $g(\max)_{Na(P)}$ (и соответственно $I_{Na(P)}$) воспроизводит деполяризационный эффект классического условного обучения, оказываемый на мембранный потенциал. Средние значения (\pm стандартная ошибка) измеренного мембранного потенциала реальных нейронов CGC у наивных и обученных на сочетанные предъявления УС/БС ($n = 10$ препаратов каждая группа) приведены на рисунке вместе с рассчитанными значениями мембранного потенциала, соответствующего 38.9%-ому увеличению $g(\max)_{Na(P)}$ на компьютерной модели CGC наивных животных.

5.4. Несинаптическая пластичность в основе компарментализованного увеличения синаптической эффективности.

Существует достаточное число примеров того, что несинаптическая пластичность, наравне с синаптической, является субстратом долговременной памяти как на системах позвоночных, так и беспозвоночных животных (Debanne et al. 2003; Magee & Johnson 2005; Benjamin et al. 2008; Mozzachiodi & Byrne 2010). Однако, пока мало известно о том, как вызванная обучением несинаптическая пластичность может приводить к компарментализованным пресинаптическим изменениям, лежащим в основе специфических следов памяти, оставляя остальные сетевые функции нейрона незатронутыми. В этом исследовании, применяя поведенческие, электрофизиологические и оптические методы регистрации мы продемонстрировали, что ранее описанная вызванная обучением долговременная деполяризация модуляторного нейрона пищевой системы улитки *Lymnaea* влияет на аксонные терминалы этого нейрона в пространственно-специфичной манере. В боковой ветви аксона гигантского церебрального нейрона (CGC) классический условный рефлекс на целом животном уменьшает аттенюацию проксимально-дистального отношения вызванного спайком кальциевого сигнала, обеспечивая высокоэффективный механизм компарментализованного повышения синаптической пластичности. Соматическая деполяризация путем инъекции тока, который распространяется в боковую аксональную ветвь CGC и блокирование быстрого калиевого тока А-типа с помощью 4-аминопиридина производило на кальциевые сигналы эффект, близкий к таковому вызванному обучением. Оба этих экспериментальных манипулирования вызывали ослабление аттенюации аксонального спайка. Эти наблюдения подтверждают, что потенциал-зависимая инактивация калиевого тока А-типа служит ключом, соединяющим общие несинаптические изменения в нейроне с компарментализованными пластическими изменениями.

Мы предположили, что вызванные обучением несинаптические изменения в гигантских церебральных клетках (CGC) ассоциированы с механизмом, который усиливает синаптическую эффективность в церебральной аксональной ветви. Она играет «позволяющую» роль в

классическом условном рефлексе (Рис. 5.4.1 и 5.4.2), 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.

В предыдущей главе мы предоставили электрофизиологические доказательства *in vitro* пресинаптической функции аксонных терминалей CGC, которая, как считалось, участвует в формировании долговременной памяти. В этой работе мы использовали оптические методы чтобы выяснить, являются ли эти терминали с потенциальными сайтами пресинаптической пластичности мишенями вызванных обучением изменений у наивных животных. 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 включения в виде красных флуоресцентных пятнышек размером 1-4 мкм, колокализированных с зеленым сигналом Alexa Fluor 488, присутствующем в дистальных ветвлениях церебральной ветви CGC (Рис. 5.4.1С). Это исследование предоставило экспериментальную поддержку нашего понимания того, что компартменты церебральной ветви CGC несут аксональную функцию у наивных препаратов, и обосновало их изучение в наших дальнейших экспериментах в качестве потенциальных локусов пластичности и мест хранения долговременной памяти.

5.4.1 Обучение уменьшает аттенюацию вызванного спайком аксонального кальциевого сигнала.

Далее 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 амил-ацетат в качестве условного стимула и сахарозу в качестве безусловного

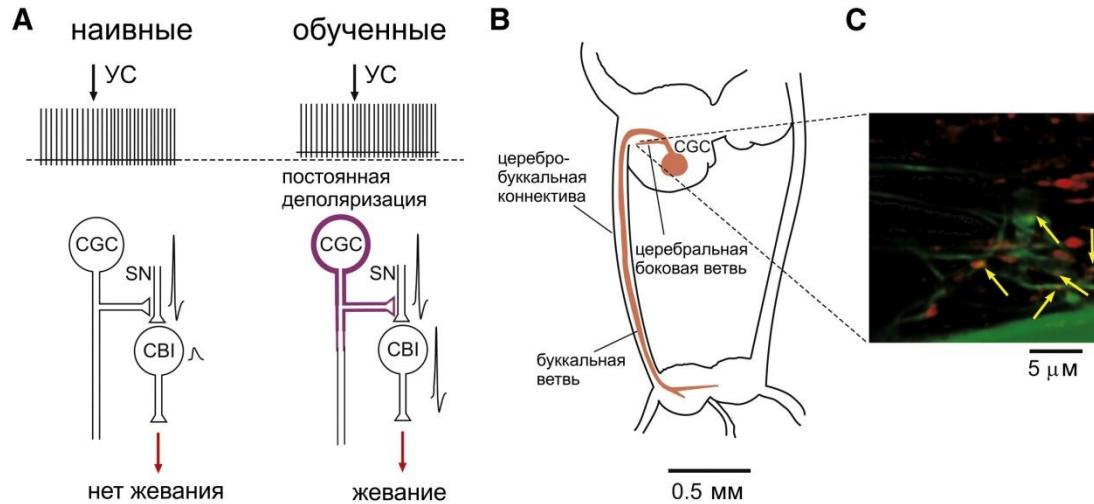


Рис. 5.4.1. Терминали боковой церебральной ветви аксона CGC являются пресинаптической зоной, на которую предположительно оказывает воздействие вызванная обучением несинаптическая пластичность.

(А) Предполагаемый механизм «дистанционного управления», увеличивающий синаптическую эффективность после обучения классическому пищевому условному рефлексу у *Lyttaea*. У наивных необученных животных аппликация амил-ацетата (использованного как условный стимул (УС) во время обучения приводит к небольшому увеличению в тоническом медленном разряде в гигантских церебральных нейронах CGC (верхняя схематическая осциллограмма). Спайки, вызванные УС в сенсорных нейронах (SN) губ вызывают только слабый ответ в запускающих командно-подобных церебро-буккальных интернейронах (СВІ) пищевого поведения. У обученных животных, сома CGC и сегменты проксимального аксона находятся под воздействием долговременной деполяризации (схематически показано сдвинутой верхней осциллограммой, и толстой фиолетовой линией, обводящей контур CGC справа), и УС вызывает такое же слабое усиление медленного разряда у обученных животных как у необученных. Однако, из-за увеличенного фонового уровня внутриклеточного кальция в боковой ветви CGC, у обученных животных активность CGC обеспечивает пресинаптическую фасилитацию выходных сигналов сенсорных нейронов SN, что в результате приводит к генерации потенциалов действия в интернейронах СВІ. Интернейроны СВІ, в свою очередь, активируют нейроны сети центрального генератора пищевого ритма (CPG), обеспечивая условный пищевой ответ на УС.

(В) Анатомические особенности аксонального ветвления CGC. Основная проекция аксона следует в буккальный ганглий (буккальная ветвь). Боковая церебральная ветвь начинается от основного аксона на расстоянии ~50 мкм от тела клетки.

(С) Пример взаимоотношений между сигналом синаптического маркера FM4-64 (красной флуоресценции) и дистального конца церебральной боковой ветви CGC, который был внутриклеточно покрашен зеленым флуоресцирующим красителем Alexa Fluor 488. Стрелки указывают на включения FM4-64, локализованные совместно со структурами, покрашенными Alexa Fluor 488 и, таким образом, предположительно являющиеся активными синапсами аксональных терминалей CGC. Красные включения за пределами аксональных структур CGC указывают на

присутствие синапсов других нейронов, которые были спонтанно активны во время инкубации с красителем FM4-64.

стимула. Эксперименты с одновременными оптофизиологической и электрофизиологической регистрациями производили через 24 часа после обучения (обученная группа, $n = 10$ препаратов; контрольная группа, $n = 8$ препаратов). Кроме этого, в независимых контрольной и обученной группах животных подвергали поведенческим тестам через 24 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 ± 0.5 против -2.7 ± 1.2 жеваний/мин; независимый t-критерий Стьюдента: $df = 13$, $t = 4.3$, $p < 0.0008$).

На препаратах изолированной центральной нервной системы (ЦНС) зарегистрированные кальциевые сигналы в основном аксоне (обозначенном прерывистым прямоугольником на Рис. 5.4.2А) не были изменены после обучения классическому условному рефлексу (см. таблицу 5.4.1), 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 $\sim 36\%$ (Рис. 5.4.2А и 5.4.2В). В противоположность этому, аттенюация в обученной группе составляла только $\sim 17\%$ и не достигала уровня достоверности (Рис. 5.4.2А и 5.4.2В). В наиболее удаленной области боковой ветви кальциевый сигнал был значительно больше в препаратах обученных животных по сравнению с контрольными, демонстрируя снижение аттенюации, вызванное обучением (Рис. 5.4.2В). Дистально-проксимальное отношение амплитуд кальциевых сигналов также было достоверно выше в обученной группе животных (0.58 ± 0.03 , независимый t-критерий Стьюдента: $df = 16$; $t = 2.66$, $p < 0.02$), таким образом, демонстрируя значительное снижение после обучения.

Подтверждая предыдущие наши наблюдения, изложенные выше, мембранный потенциал CGC был значительно более деполяризован в

Контрольная группа		Обученная группа	
Независимые препараты	$\Delta F/F$ в основном аксоне	Независимые препараты	$\Delta F/F$ в основном аксоне
1	0.044	1	0.050
2	0.019	2	0.043
3	0.037	3	0.025
4	0.029	4	0.056
5	0.033	5	0.035
6	0.018	6	0.024
7	0.026	7	0.032
8	0.047	8	0.024
		9	0.065
		10	0.044
среднее 0.032		среднее 0.039	
SEM 0.004		SEM 0.005	

Таблица 5.4.1. Классический условный рефлекс не оказывает значительного влияния на кальциевые сигналы, зарегистрированные от проксимального участка основной ветви аксона CGC (показано на Рис. 5.4.2А).

обученной группе по сравнению с контрольной группой (Рис. 5.4.3). Мембранный потенциал CGC демонстрировал достоверную позитивную корреляцию со снижением аттенюации кальциевых сигналов (Рис. 5.4.2С; критерий корреляции Пирсона, $R^2 = 0.56$, $p < 0.05$).

5.4.2. Деполаризация CGC и 4-аминопиридин снижают аттенюацию кальциевых сигналов и потенциалов действия.

Чтобы напрямую проверить, может ли деполаризация 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 деполаризации соматической мембраны на 5 мВ. Известно, что такая деполаризация также распространяется в церебральные боковые ветви (см. предыдущую часть).

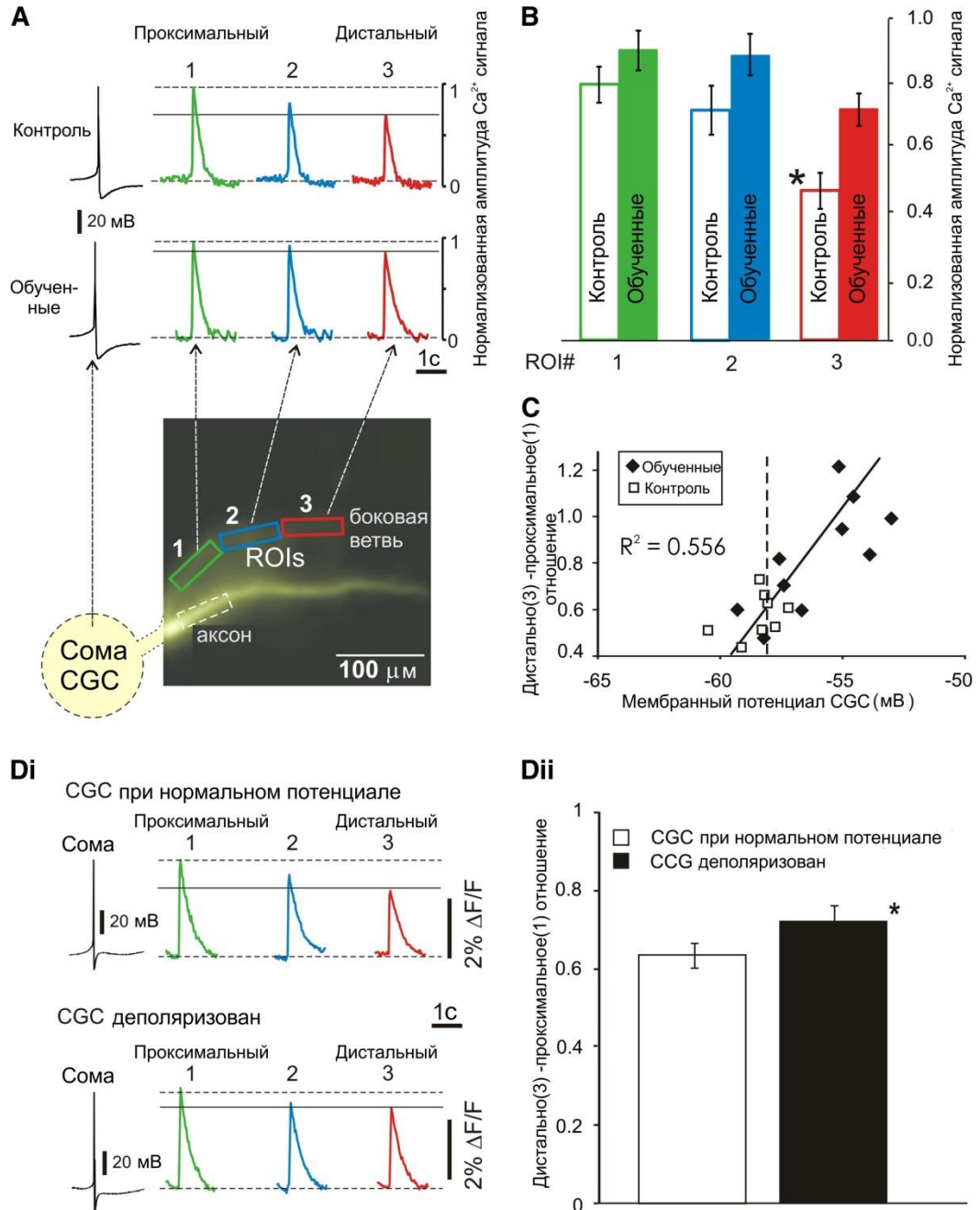


Рис. 5.4.2. Классический пищевой условный рефлекс и деполяризация и эффекты, производимые ими на кальциевые сигналы в аксональной боковой ветви CGC.

(А) Примеры усредненных (по спайку) кальциевых сигналов, зарегистрированных оптически с использованием кальций-чувствительного красителя Oregon Green BAPTA 1 от сегментов боковой церебральной ветви аксона CGC по направлению от проксимально к дистальному (см. нижний рисунок) и нормализованные к сигналу из области сегмента основного аксона CGC. Атенюация сигнала между областями интереса (ROIs) 1 и 3 меньше на препарате обученного животного, чем контрольного. Прерывистые линии указывают на отсутствие сигнала выше базового уровня в ROI 1. Жирная линия соответствует пику сигнала в ROI 3. Спайки, зарегистрированные электрофизиологически и вызывающие кальциевые сигналы, показаны слева.

(В) Сравнение аттенюации кальциевых сигналов в боковой аксональной ветви на препаратах контрольной группы ($n = 8$) и обученной группы ($n = 10$) животных. Средние значения (\pm SEM) нормализованных кальциевых сигналов показаны для

разных районов ROIs аксональной боковой ветви CGC. Двусторонний тест ANOVA выявил значительный эффект для обученной группы ($F[1,48] = 12.9$, $p < 0.0008$) и положения ROI ($F[2,48] = 10.4$, $p < 0.0002$). Посттест Бонферони выявил, что кальциевый сигнал в ROI 3 от препаратов контрольных животных был достоверно аттенюирован по сравнению со всеми остальными сигналами ($*p < 0.05$).

(C) Дистально-проксимальное отношение нормализованной амплитуды кальциевых сигналов в боковой ветви CGC как функция мембранного потенциала по всем экспериментам. Большинство значений от обученной группы кластеризованы в менее негативном районе, чем средний уровень мембранного потенциала контрольной группы (-58.4 мВ, прерывистая линия), что указывает на вызванные обучением параллельные изменения как в мембранном потенциале, так и в проксимально-дистальном отношении, вносящие вклад в общую корреляцию.

(Di и Dii) Деполяризация соматической мембраны CGC инъекцией тока значительно снижает аттенюацию кальциевого сигнала в боковой ветви. На (Dii) показаны данные (\pm SEM), полученные на восьми препаратах. Парный t-критерий Стьюдента, $t = 3.7$, $p < 0.007$. Присутствует сходство с эффектом обучения у интактных животных.

Эти эксперименты (Рис. 5.4.2D) практически воспроизвели результаты с обучением.

Представлялось слишком затруднительным использовать потенциал-зависимый краситель, как, например, JPW1131, чтобы напрямую исследовать изменения аксональных спайков, вызванные обучением в церебральной боковой ветви, потому что необходимая для регистрации и окрашивания длительная инкубация препарата при низких температурах обращала пластичность и нивелировала эффект обучения. Однако, наша гипотеза состояла в том, что специфичность в деполяризации CGC после обучения уменьшает аттенюацию вдоль аксона как потенциала действия, так и кальциевого сигнала. Поскольку протокол окраски с JPW1131 не влияет на базовые электрофизиологические параметры CGC, мы реализовали возможность использования этого потенциал-зависимого красителя для сравнения аксональных спайков (вызванных спонтанными соматическими спайками, Рис. 5.4.4). Поскольку деполяризация CGC инъекцией соматического тока воспроизводит эффект классического условного рефлекса, было бы возможно предполагать, что вызванная обучением долговременная деполяризация производит на аксональный спайк такой же эффект, как и деполяризация, искусственно вызванная путем инъекции тока.

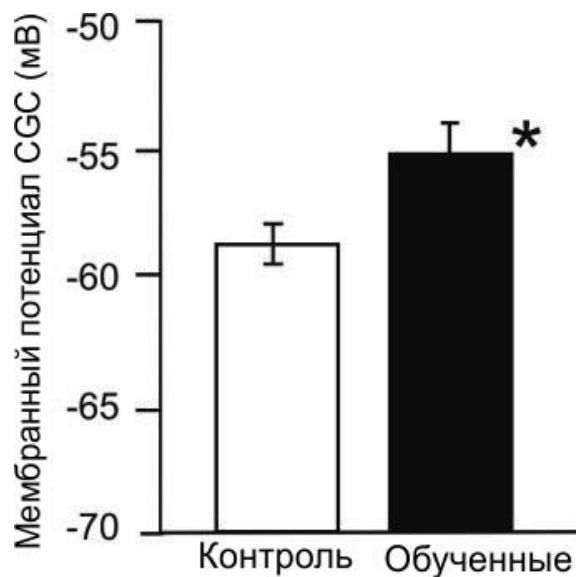


Рис. 5.4.3. Обучение классическому условному рефлексу вызывает деполяризацию CGC.

Показаны средние значения мембранного потенциала \pm SEM, зарегистрированные электрофизиологически в соме нейрона CGC. Независимый t-критерий, $df = 16$, $t = 3.4$, $p < 0.004$. Мембранный потенциал CGC демонстрировал значительную корреляцию с дистально-проксимальным отношением амплитуд кальциевых сигналов (см. выше).

Подобно кальциевым сигналам, зарегистрированные оптически, когда CGC были деполяризованы, спайки (Рис 5.4.4А и 5.4.4В) демонстрировали достоверно меньшую аттенюацию по сравнению с тем, когда кальциевые сигналы регистрировали при нормальном мембранном потенциале ($n = 5$; Рис 5.4.4С). Очень важное значение имеет то, что метод с применением потенциал-зависимых красителей выявил, что деполяризация не приводит к расширению аксонального спайка (Рис 5.4.4С). Таким образом, наши данные не подтверждает участие механизма расширения спайка в увеличении кальциевого сигнала в пресинапсе.

Предыдущие работы с применением протоколов долговременной потенциации (LTP) на переживающих срезах гиппокампа продемонстрировали важную роль деполяризации в инактивации калиевого тока А-типа (I_A) в фасилитации обратного распространения потенциалов действия в дендриты пирамидных нейронов, в результате чего увеличивался вход кальция в эти дендриты (Frick et al. 2004). В соответствии с этим мы предположили, что вызванное обучением снижение аттенюации кальциевых

сигналов в аксональных ветвях CGC подобным же образом может быть опосредовано инактивацией калиевого тока I_A . 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 (Рис 5.4.5А, вставка на графике).

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-аминопиридином (Рис. 5.4.5), демонстрируя эффект, очень похожий как на обучение, так и на эффект деполяризации сомы CGC (сравнить Рис 5.4.5Вi с Рис 5.4.2А и 5.4.2D).

Мы использовали потенциал-зависимый краситель JPW1114 для того, чтобы проверить, что 4-аминопиридин влияет на аттенюацию амплитуды аксонального спайка независимо от его влияния на увеличение уровня внутриклеточного кальция (4-аминопиридин может непосредственно стимулировать кальциевые каналы; Wu et al. 2009). Эффекты 4-аминопиридина на аксональные спайки и кальциевый сигнал были схожи (сравн. Рис. 5.4.5С и 5.4.5Вi). Использование JPW1114 также позволило нам установить, что, подобно деполяризации, 4-аминопиридин значительно снижает аттенюацию амплитуды аксональных спайков, но не вызывает заметного расширения спайка (Рис 5.4.4D).

Рассматриваемые 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,

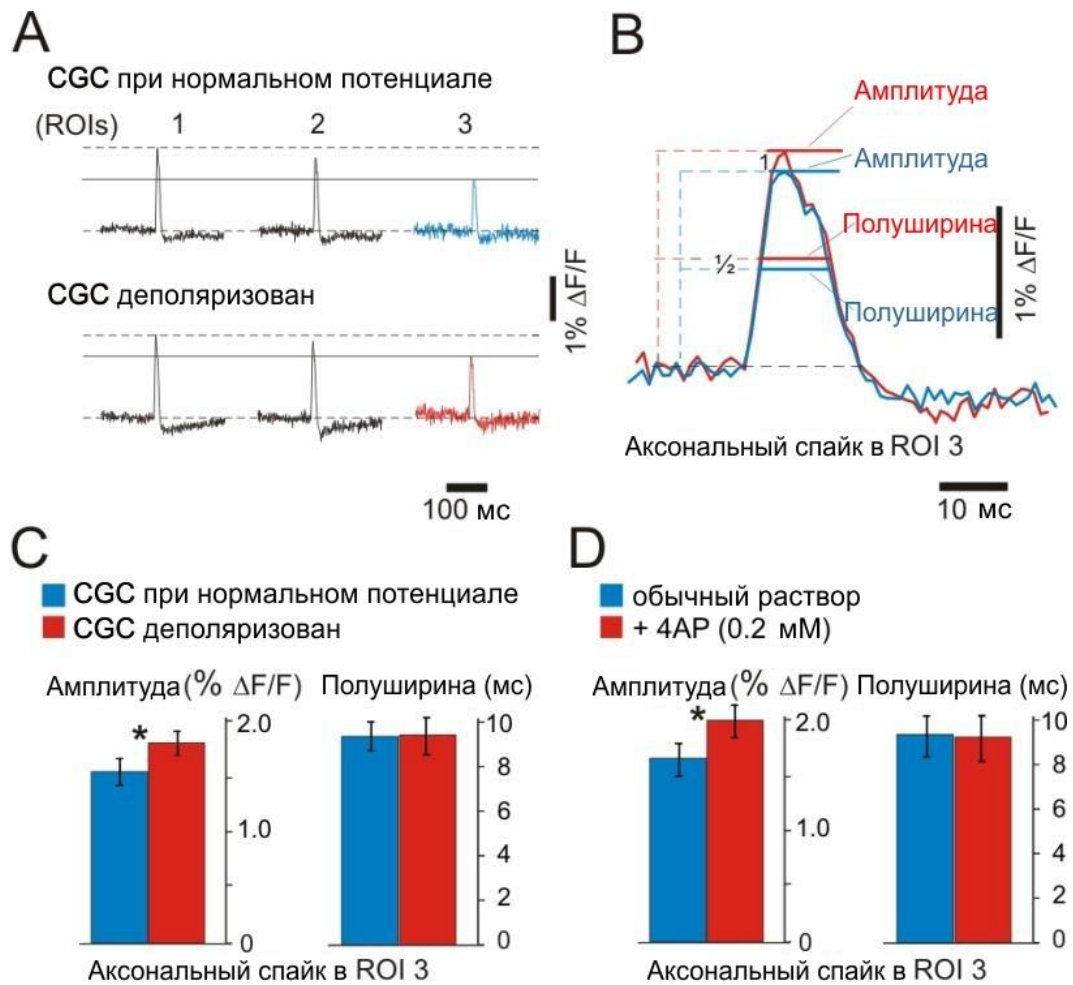


Рис. 5.4.4. Деполяризация CGC или аппликация 4-аминопиридина вызывают снижение аттенуации кальциевых сигналов, не оказывая влияние на длительность аксональных спайков.

(А) Аксональные спайки, зарегистрированные оптически с использованием красителя JPW1114 при нормальном значении мембранного потенциала и во время того, как это же нейрон CGC был деполяризован. Прерывистые линии указывают на базальный уровень и пик потенциала действия в наиболее проксимальном участке боковой аксональной ветви CGC (ROI 1). Толстые линии отмечают пик потенциала действия в наиболее дистальном сегменте аксональной ветви (ROI 3).

(В) Спайки, зарегистрированные в ROI 3 в растянутой шкале времени. Синий – потенциал действия, начавшийся при нормальном мембранном потенциале. Красный – при деполяризованном мембранном потенциале.

(С) Слева – аксональные спайки достоверно менее аттенуированы в ROI 3 когда CGC был деполяризован. Парный t-критерий, $n = 5$, $df = 4$, $t = 4.35$, $p < 0.01$. Справа – ширина потенциала действия на высоте половинной амплитуды (полуширина) достоверно не отличается при деполяризации CGC по сравнению с нормальным значением потенциала. Парный t-критерий, $n = 5$, $df = 4$, $t = 1.5$, $p = 0.21$.

(D) Слева – аксональные спайки, зарегистрированные оптически с помощью красителя JPW1114 значительно больше в ROI 3 в присутствии 4-аминопиридина. Парный t-критерий, $n = 6$, $df = 5$, $t = 2.99$, $p < 0.03$. Справа – полуширина аксональных спайков не изменяется после аппликации 4-аминопиридина. Парный t-критерий, $n = 6$, $df = 5$, $t = 0.005$, $p = 0.99$.

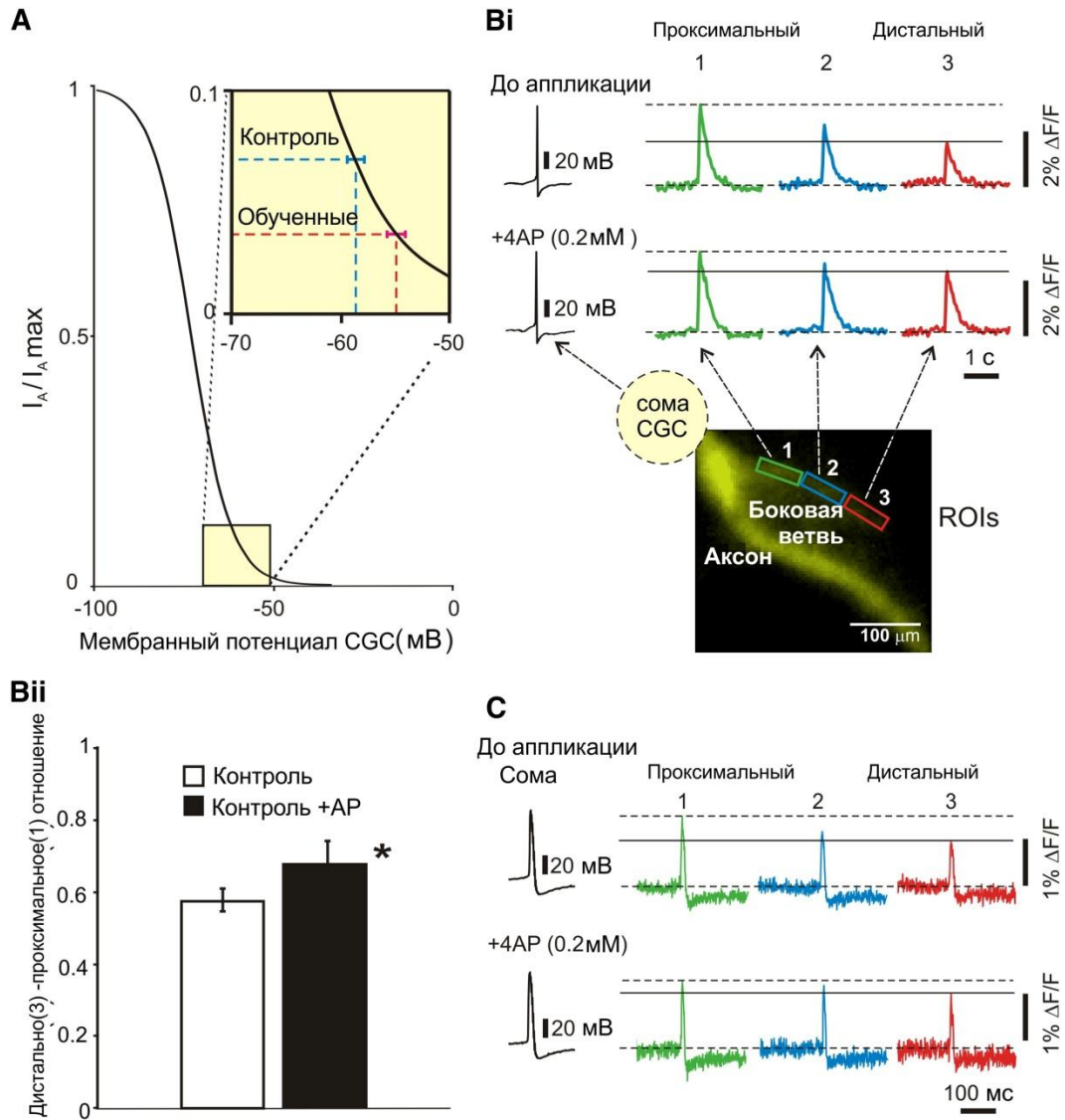


Рис. 5.4.5. Подавление калиевого А-тока снижает аттенюацию кальциевого сигнала и спайка в церебральной аксональной ветви CGC.

(A) Кривая инактивации калиевого тока (I_A) нейрона CGC (построена по данным из экспериментов с фиксацией потенциала по Staras et al. 2002). Вставка: значения мембранного потенциала CGC (среднее \pm SEM; отложены на соответствующем отрезке кривой инактивации), от препаратов контрольной (показано синим) и обученной (показано красным) групп.

(Bi) Сравнение отношений амплитуд кальциевых сигналов, измеренных в наиболее проксимальном (1) дистальном (3) и участках ROI 1 и ROI 3 соответственно (см. нижний рисунок), полученных из регистрации препаратов наивных контрольных животных до и после аппликации 4-аминопиридина. Прерывистые линии обозначают базальный и пиковый уровни в ROI 1 соответственно. Толстая линия обозначает пик кальциевого сигнала в ROI 3. Также показаны электрофизиологически зарегистрированные соматические спайки, вызывавшие аксональные кальциевые сигналы (зарегистрировано с помощью Oregon Green 488 BAPTA 1).

(Bii) Отношение (среднее \pm SEM от восьми препаратов) значительно выше после аппликации 4-аминопиридина (парный t-критерий, $df = 7$, $t = 2.36$, $p < 0.05$).

(С) Аттенюация спайков в боковой церебральной ветви CGC и ее снижение после аппликации 4-аминопиридина, зарегистрированное с помощью потенциал-зависимого красителя JPW1114. Прерывистые линии обозначают базальный уровень и пик аксонального спайка в ROI 1 соответственно. Толстая линия обозначает пик аксонального спайка в ROI 3.

лежащим в основе обучения и обеспечивающимся долговременной деполяризацией CGC, вызванной процессами классического обуславливания.

5.4.3. Компармент-специфическое снижение аттенюации кальциевых сигналов деполяризацией сомы нейрона.

Чтобы напрямую проверить гипотезу о том, что на разные компарменты CGC (Рис 5.4.6А) оказывается разное влияние от 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 ~ 10 мВ. Тогда амплитуда кальциевых сигналов в боковой церебральной ветви становилась достоверно больше в деполяризованных нейронах CGC по сравнению с нейронами CGC, записанными при нормальном значении потенциала (Рис. 5.4.2D). Однако, мы не обнаружили никаких достоверных различий в кальциевых сигналах, вызванных отдельными потенциалами действия при нормальном по сравнению с деполяризованным значением мембранного потенциала в основной аксональной ветви CGC в месте при входе ее в буккальные ганглии (Рис 5.4.6С). Эти данные напрямую свидетельствуют о том, деполяризация уменьшает аттенюацию вызванных спайками кальциевых сигналов в церебральной боковой ветви, но не в основном аксоне CGC, который проецируется в буккальные ганглии. Также, аксональные кальциевые сигналы блокировали CdCl_2 (Рис 5.4.7), что позволило идентифицировать потенциал-зависимый механизм с участием кальциевого тока с высокопороговой активацией HVA типа (Staras et al. 2002) как источник вызванного спайком входа свободного кальция в аксон.

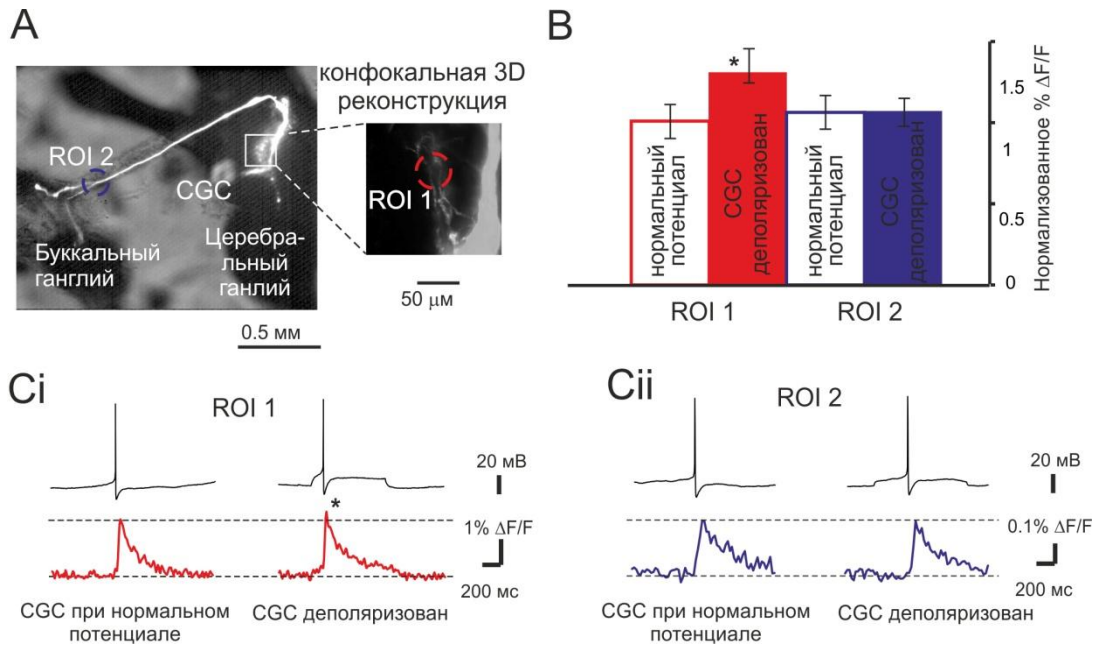


Рис. 5.4.6. Сравнение вызванных спайком кальциевых сигналов в церебральной боковой ветви и основном аксоне CGC при нормальном и искусственно повышенном мембранном потенциале.

(A) Микрофотография тела нейрона CGC и его аксональных ответвлений, от нативного препарата, сделанная с использованием инъекции смеси красителей Alexa Fluor 594 и Oregon Green. Отмечены участки оптической регистрации. Область ROI 1 (на вставке) определяет место, от которого проводили регистрацию боковой церебральной ветви (церебральная проекция), а область ROI 2 указывает место оптической регистрации в основном аксоне (буккальная проекция). Справа показана детальная 3D-реконструкция боковой ветви по конфокальным снимкам в проекции на плоскость.

(B) Нормализованные амплитуды (среднее \pm SEM) кальциевых сигналов, зарегистрированных в областях ROI 1 и ROI 2 при нормальном потенциале и когда мембранный потенциал был деполяризован на 10 мВ. В каждом ROI отдельные значения $\Delta F/F$ нормализованы по среднему значению, полученному от этих же ROI при нормальном мембранном потенциале CGC. Звездочка указывает на достоверное различие между нормализованным сигналом в ROI 1 когда CGC были деполяризованы по сравнению с нормальными значениями мембранного потенциала (ANOVA: $F[3,23] = 3.8$, $p < 0.03$; тест независимых испытаний: $p < 0.05$ для каждого попарного сравнения).

(Ci) Пример эксперимента с кальциевыми сигналами, полученными от ROI 1. Верхние электрофизиологические записи: потенциалы действия в соме CGC при нормальном потенциале (слева) и при деполяризации сомы на 10 мВ (справа). Нижние оптические записи: кальциевые сигналы, зарегистрированные с помощью Oregon Green 488 BAPTA 1 в ROI 1, соответствующие спайкам на верхних регистрациях. Прерывистые линии отмечают базальную линию и пик кальциевого сигнала при регистрируемом потенциале соответственно.

(Cii) Пример эксперимента с кальциевыми сигналами, зарегистрированными от ROI 2. Отмечается значительно меньшая амплитуда кальциевого сигнала,

зарегистрированного в ROI 2 по сравнению с ROI 1, что обусловлено концентрацией соматически инъецированного Oregon Green, которая ниже в удаленных буккальных компартментах аксона CGC по сравнению с более проксимальными.

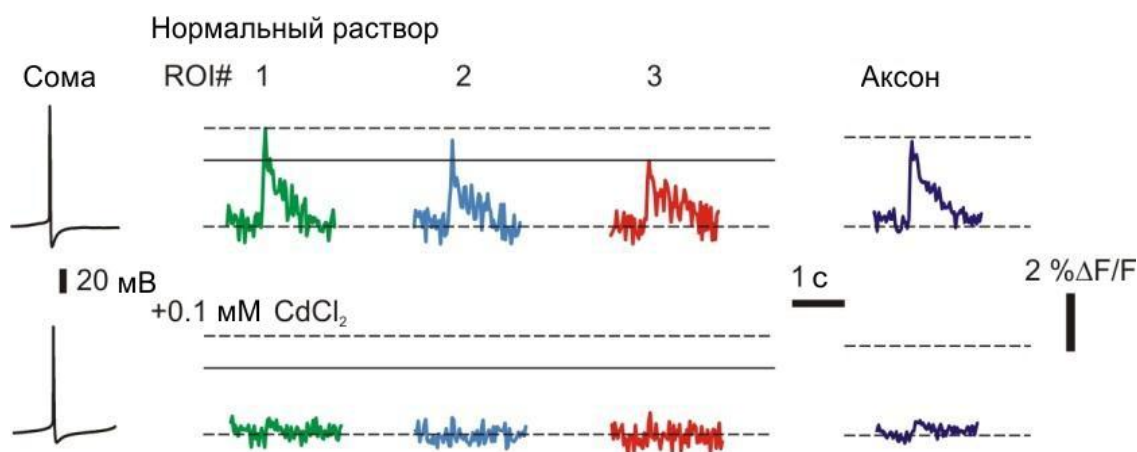


Рис. 5.4.7. Вызванные аксональным спайком кальциевые сигналы в CGC блокируются аппликацией кадмия (блокатора кальциевых каналов NVA типа). Показаны соматические спайки (зарегистрированы электрофизиологически) и аксональные кальциевые сигналы (зарегистрированные оптически с помощью зонда Oregon Green 488 BAPTA 1). Сигналы от трех различных участков боковой ветви показаны вместе с сигналом от проксимального сегмента основного аксона. Кадмий не блокирует соматические спайки, но блокирует кальциевые сигналы во всех показанных участках аксона.

5.5 Обсуждение.

5.5.1. Вызванная нейрональная пластичность в модуляторном интернейроне, определяющем состояние сети.

В этой главе мы описали 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. Параллельно с длительным эффектом, оказываемым на величину $I_{Na(P)}$, цАМФ также вызывает деполяризацию мембранного потенциала CGC, увеличивает входное сопротивление, и переключает его спонтанную активность с тонического режима на режим фазных разрядов, что обычно связывают с проявлением нейрональной пластичности. В предыдущих работах было продемонстрировано, что, подобно другим центральным нейронам систем моллюсков (Aldenhoff et al., 1983; Connor and Hockberger, 1984; Kononenko et al., 1983; Sudlow et al. 1993; Swandulla, 1987) у нейронов CGC у *Lymnaea* инъекция цАМФ в сому напрямую стимулирует натриевый ток ($I_{Na, \text{цАМФ}}$; McCrohan and Gillette, 1988). Ток $I_{Na, \text{цАМФ}}$ у CGC, который зависит от величины потенциала, длится около ~ 5 секунд после инъекции цАМФ (McCrohan and Gillette, 1988), тогда как эффект цАМФ на потенциал-чувствительный $I_{Na(P)}$ длится более ≤ 24 часов, указывая на то, что цАМФ может участвовать как в кратковременной, так и в долговременной пластичности нейрона CGC.

Некоторые свойства цАМФ-чувствительного $I_{Na(P)}$ у CGC похожи на свойства постоянных натриевых токов, описанных ранее на нейронах позвоночных и беспозвоночных (Clay, 2003; Crill, 1996; Kiss, 2003; Smith et al., 1975). При пиковом значении потенциала (в значении $\sim +35$ мВ) $I_{Na(P)}$ составляет только 5-10% от быстрого $I_{Na(T)}$, что находится в одних и тех же пределах с величинами этого тока в других нейронах, хотя его отличительной особенностью является то, что он активируется в диапазоне

мембранных потенциалов, когда другие потенциал-зависимые каналы еще не активированы (Alzheimer et al., 1993; Crill, 1996).

Из всех постоянных токов млекопитающих (см. обзор у Crill 1996), $I_{Na(P)}$ у *Lymnaea* демонстрирует наибольшее сходство с тетродотоксин-устойчивым током позвоночных через канал $Na_v1.9$ в нейронах спинальных ганглиев млекопитающих (Cummins et al., 1999; Dib-Hajj et al., 2002). Постоянные натриевые тетродотоксин-устойчивые токи как у млекопитающих, так и у моллюсков активируются при значении потенциала около -80 мВ с медленной кинетикой потенциал-зависимой активации, и достигают пикового значения при около +30 мВ, демонстрируя значительное перекрытие активации и инактивации в стационарном состоянии, что может служить причиной наличия больших входящих токов, вблизи значения потенциала покоя (между -70 и 40 мВ) у нейронов спинального ганглия и у CGC. Дополнительное сходство придает то, что ни постоянный натриевый ток CGC, ни постоянный натриевый ток, проходящий через каналы $Na_v1.9$ спинальных нейронов не участвуют напрямую в генерации спайка, таким образом, отличаясь от быстрых натриевых токов. Исследования с помощью методов компьютерной симуляции (Herzog et al., 2001) продемонстрировали, что постоянный тетродотоксин-устойчивый ток оказывает значительное влияние на потенциал покоя нейронов спинальных ганглиев, сдвигая его от примерно -70 мВ до величины около -50 мВ. Настоящая работа показала, что удаление тока $I_{Na(P)}$ путем вымывания нейрона в безнатриевый раствор на интактной ЦНС приводит к гиперполяризации сомы CGC примерно на 30 мВ, из которых только ~6 мВ может приходиться на блокаду Ca-Na обменника. Это указывает на то, что, подобно тетродотоксин-зависимому току нейронов спинальных ганглиев млекопитающих, активация $I_{Na(P)}$ может сдвинуть потенциал покоя мембраны CGC на ≥ 20 мВ, что также подтверждено нашими расчетами, базирующимися на известных значениях сопротивления сомы CGC и вольтамперных характеристик $I_{Na(P)}$ в диапазоне от -80 до -30 мВ. Дополнительное подтверждение деполяризующей роли $I_{Na(P)}$ на мембрану CGC получено в наших экспериментах с инъекцией цАМФ, инъекция которого вызывала одновременно и длительное увеличение $I_{Na(P)}$, и постоянную деполяризацию мембраны CGC.

Четко различимый ток $I_{Na(P)}$ может быть зарегистрирован на изолированных нейронах, что указывает на то, что $I_{Na(P)}$ является внутренним собственным свойством мембраны сомы CGC. Однако было найдено, что $I_{Na(P)}$ по амплитуде значительно меньше у изолированных CGC по сравнению с этим же током у CGC в интактной нервной системе. Это отличие по сравнению с интактной нервной системой могло бы быть объяснено уменьшением числа функциональных тетродотоксин-устойчивых каналов $I_{Na(P)}$ из-за перерезки аксона, как было описано на нейронах млекопитающих (Dib-Hajj et al., 1998, 1999), или же, при сохранении числа каналов – уменьшением индивидуальных токов, проходящих через каждый канал в ответ на такую же деполяризующую ступень потенциала. Интересно, что натриевые каналы $I_{Na(P)}$, проводящие постоянный тетродотоксин-устойчивый потенциал-зависимый натриевый ток в нейронах спинальных ганглиев, являются лиганд-активируемыми (Blum et al., 2002). Возможно, что на интактной ЦНС у *Lymnaea* величина потенциал-активируемого тока $I_{Na(P)}$ у CGC модулируется внешним лигандом, таким как нейрогормон или нейротрансмиттер, который, однако, пока остается неидентифицированным.

Детальное исследование того, переносятся ли токи $I_{Na(P)}$ и $I_{Na(T)}$ разными типами натриевых ионных каналов, или же одним и тем же оставалось за пределами проведенного исследования. Однако наша работа продемонстрировала, что даже если одни и те же каналы проводят оба тока, они должны сильно различаться по режимам проведения когда проводится $I_{Na(P)}$ versus $I_{Na(T)}$. Кроме разительно различающейся кинетики инактивации (быстрая и ультрамедленная), эти два тока также обладают сильно различающимися потенциалами активации и кинетикой активации. Подобно многочисленным примерам типов потенциал-активируемых каналов моллюсков и млекопитающих (например, Elliott and Elliott, 1993; Gilly et al., 1997), ток $I_{Na(P)}$ у CGC обладает медленной кинетикой активации. В добавление к этому, наклон кривой активации был значительно менее крутым у $I_{Na(P)}$ по сравнению с наклоном кривой активации быстрого натриевого тока $I_{Na(T)}$ (это соответствует предыдущим наблюдениям Staras et al., 2002), что определяет сдвиг плато активации $I_{Na(P)}$ по направлению к более положительным значениям мембранного потенциала по сравнению с

$I_{Na(T)}$. Моноэкспоненциальная природа хвостовых токов релаксации $I_{Na(P)}$ подтверждает предположение о том, что канал, проводящий ток, не проходит через открытое инактивное состояние (Pusch et al., 2000). Различия во временной экспрессии $I_{Na(P)}$ и $I_{Na(T)}$, у изолированных CGC также поддерживают предположение о том, что два эти тока переносятся разными типами ионных каналов, однако для более точного заключения могли бы потребоваться детальные исследования с использованием метода пэч-кламп (patch clamp). Отсутствие так называемого возрождающегося (resurgent) тока подразумевает, что $I_{Na(P)}$ у CGC *Lytnaea* не может переноситься активируемыми реполяризацией натриевыми каналами, как это предполагают для $I_{Na(P)}$ у нейронов Пуркинье мозжечка (Raman and Bean 2001).

Наиболее важное открытие представленной работы состояло в демонстрации того факта, что короткое повышение уровня внутриклеточного цАМФ приводит к продолжительному повышению $I_{Na(P)}$. Это наблюдение дополнительно подтверждает представления о том, что $I_{Na(P)}$ у CGC *Lytnaea* обладает значительным сходством с тетродоксин-устойчивым натриевым током нейронов спинальных ганглиев. Постоянный натриевый ток мелкоклеточных нейронов спинальных ганглиев увеличивается в ответ на активацию пути цАМФ/протеинкиназы А (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. Также показано, что Протеинкиназа А увеличивает спонтанную активность в нейронах спинальных ганглиев (Hu et al., 2001). Те же авторы предположили, что постоянный тетродоксин-устойчивый натриевый ток может вносить вклад в это увеличение, однако они не проверяли эту гипотезу. В представленной 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 $I_{Na(P)}$ (см. также эксперименты с литием). Инъекция цАМФ вызывала пачечную активность в виде спонтанных фазических разрядов в CGC. Предыдущая работа показала, что цАМФ может вызвать пачечные разряды у молчащих в норме нейронов MGC у

Aplysia (Drake and Treistman, 1981), и те же авторы предположили, что этот эффект может быть вызван увеличением потенциал-чувствительного натриевого тока, что также до сих пор остается неизученным у *Aplysia*. Предполагают, что кроме влияния на мембранный потенциал, тетродотоксин-устойчивый натриевый ток может вносить важный вклад в электрогенные свойства малых нейронов спинальных ганглиев (Cummins et al., 1999; Herzog et al., 2001). Эффект запуска разрядов цАМФ у нейронов CGC у *Lymnaea* может быть вызван через схожее влияние $I_{Na(P)}$ на возбудимость мембраны CGC.

Недавние экспериментов показали, что классическое пищевое обуславливание с одного подкрепления на *Lymnaea* приводит к быстрой активации протеинкиназы А (см. ниже) и фосфорилирование элемента ответа цАМФ (cAMP responsive element binding protein, CREB; Ribeiro et al., 2003) в церебральном ганглии, являющимся ключевым местом нейрональной пластичности, вызванной поведенческим обучением (Straub et al. 2004). Эти наблюдения указывают на то, что в нейронах церебрального ганглия уровень цАМФ может быть повышен в результате классического условного обучения. Возможная связь между цАМФ-зависимым увеличением $I_{Na(P)}$ и долговременной ассоциативной памятью была получена из нашего недавнего наблюдения того, что также, как и при активации протеинкиназы А и CREB, пищевое обучение с одного подкрепления приводит к значительному повышению максимальной амплитуды $I_{Na(P)}$.

Кроме вызванного цАМФ увеличения $I_{Na(P)}$ мы также обнаружили вызванное цАМФ увеличение вызванных постсинаптических потенциалов CGC на В1 в клеточной культуре (Рис. 5.1.6D). Это подтвердило предыдущие наблюдения, сделанные Nakamura et al. (1999), которые базировались на инъекции протеинкиназы А в CGC на интактной ЦНС *Lymnaea* и продемонстрировали сходство с другими модельными системами, где введение цАМФ приводит к синаптической пластичности в CGC. В области исследований обучения и памяти все больше нарастает понимание того, что изменения синаптических контактах и, наравне с ними, изменения во внутренних ионных токах являются необходимыми для проявления нейрональной и поведенческой пластичности (Daoudal and Debanne, 2003; Marder et al., 1996; Zhang and Linden, 2003). Наши эксперименты

предоставили прямые доказательства того, что активация пути протеинкиназы А/цАМФ приводит к параллельным изменениям в электрических свойствах мембраны сомы и эффективности синаптических связей у идентифицированного типа модуляторного нейрона, участвующего как в неассоциативной (пищевое возбуждение), так и ассоциативной (пищевое с подкреплением и аверзивное обучение) поведенческой пластичности.

5.5.2. Роль несинаптической пластичности в ассоциативной памяти.

В этой главе мы показали, что мембрана важного внешнего модуляторного интернейрона пищевой системы моллюска переходит в процессе обучения в постоянное деполяризованное состояние, отставленное во времени. Продолжительная по времени регистрация мембранного потенциала CGC вместе с мониторингом активности других пищевых нейронов (Jones et al., 2003; Yeoman et al., 1994a, 1994b; McCrohan and Benjamin, 1980; Straub and Benjamin, 2001; Styles, 2004) исключила 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 мы 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.

В то время, как долговременная память может поддерживаться деполяризованным состоянием в CGC, ранняя консолидация памяти должны задействовать другие механизмы, то есть синаптическую пластичность самого CGC или синаптическую или несинаптическую пластичность в нейронах, внутренних по отношению к ритмически активной пищевой сети. Предыдущие работы на *Lymnaea* показали пластические изменения в синаптических связях нейронов CGC с интернейронами и мотонейронами центрального генератора пищевого паттерна, появляющиеся в результате аверзивного обучения (Kojima et al., 1997), инъекции цАМФ или протеинкиназы А (Nakamura et al., 1999). Можно предположить, что синаптические изменения в CGC и/или в других нейронах также имеют место после обучения с подкреплением. Если эти синаптические изменения сохраняются одновременно с долговременной памятью, возможная роль вызванной обучением несинаптической пластичности и долговременной деполяризации в CGC может быть в добавлении определенного рода внешней несинаптической пластичности к пищевой нейронной сети для поддержания долговременной памяти. Таким образом, постоянная несинаптическая пластичность может служить своего рода резервным хранилищем по отношению к наблюдающимся эффектам синаптической пластичности, как было предложено Zhang and Linden (2003). Она может также поддерживать консолидированную память сама по себе, как показано нашими опытами с искусственной деполяризацией CGC у наивных животных (Рис. 5.2.5). Эти данные указывают на то, что эффект деполяризации может быть значимым даже в отсутствие синаптической пластичности.

Пока не существует досконального детального описания клеточных и молекулярных механизмов постоянной деполяризации CGC, вызываемой обучением. Тем не менее, недавняя наша работа показала, что цАМФ чувствительный постоянный натриевый ток CGC (описан у Staras et al.,

2002) достоверно увеличивается через 24 часа после обучения классическому условному пищевому рефлексу с одного предъявления (см. следующую главу). Этот тип натриевого тока известен тем, что вносит важнейший вклад в деполяризацию мембранного потенциала и повышение ответа на подпороговые стимулы в других системах (Herzog et al., 2001; Darbon et al., 2004). Похожую роль он играет и у CGC. Другие электрические параметры CGC (входное сопротивление, характеристики спайка, частота разряда) после обучения остаются неизменными. Наличие постоянной деполяризации, не сопровождаемой другими электрическими изменениями, может на первый взгляд показаться необычным, однако в литературе описано несколько важных примеров, когда деполяризация возникает в отсутствие таких изменений или с незначительными изменениями во входном сопротивлении и форме спайка (Jones et al., 2003; Swandulla and Lux, 1984, Kemenes et al., 1992; Him and Dutia, 2001). Также было показано, что вызванная обучением постоянная деполяризация может привести к значительным постсинаптическим и нейросетевым эффектам даже при отсутствии других электрических изменений (Jones et al., 2003; Awatramani et al., 2005; Ross and Soltesz, 2001).

На нейросетевом уровне мы продемонстрировали, что деполяризация CGC позволяет вызвать пищевую реакцию входам, активируемым условным стимулом. Таким образом мы полагаем, что вызванная обучением постоянная деполяризация CGC как результат производит функциональное усиление в пути обработки информации об условном стимуле через усиление модуляции синапсов сенсорных клеток на командных интернейронах (Рис. 5.2.9А).

Клеточные механизмы конвертации деполяризации CGC в модифицированный выход нейронной сети, по-видимому, базируются на эффектах соматической деполяризации CGC, наблюдавшихся на пресинаптических по отношению к аксонам сенсорных нейронов хемосенсорного пути ветвях CGC. Недавние работы показали наличие небольшой соматической деполяризации мембранного потенциала нейронов млекопитающих (на ~ 10 мВ, такое же значение как и изменения, вызываемые в CGC обучением), которая не изменяла размеры и форму спайка и вызывала небольшие кальциевые токи в пресинаптических

терминалях (Awatramani et al., 2005). Эти токи не производят значительных изменений в измеряемых электрических характеристиках пресинаптической мембраны, но увеличивают вероятность выброса медиатора в ответ на спайк почти в два раза, что приводит к значительному усилению постсинаптических ответов. В нашей работе мы показали (Рис. 5.2.8), что соматическая деполяризация на 10 мВ (или даже 5 мВ) может также увеличить вход кальция в аксональные компартменты CGC и, таким же образом, увеличить постсинаптические ответы на спайки в CGC (Рис. 5.2.7). Результаты наших исследований вызванных деполяризацией изменений в уровне кальция и синаптического выхода, тем не менее, только предполагают постоянные клеточные изменения как результат условного обучения. Например, очень важным вопросом является механизм поддержания уровня постоянного кальция в деполяризованном CGC у обученных животных. Неинактивируемые кальциевые каналы были найдены в соме нейронов моллюсков, и они могут служить источником повышения постоянного кальция в клетке, несмотря на известные процессы внутриклеточной буферизации (Kits and Mandsvelder, 1996). Предыдущие исследования методом фиксации потенциала (Staras et al., 2002) не выявили постоянного кальциевого тока в соме CGC, однако поддерживаемый кальциевый сигнал может быть вызван и выбросом кальция из внутриклеточных депо в аксональных компартментах или же селективной экспрессией неинактивируемых кальциевых каналов в аксонах (которые нельзя зарегистрировать фиксацией потенциала в соме).

Эта работа на CGC несколько контрастирует с предыдущими исследованиями с использованием обучения тактильному рефлексу с многократными предъявлениями, когда деполяризация возникала в модуляторном нейроне CV1a, находящемся внутри пищевой сети (Jones et al., 2003), но не в CGC. В противоположность этому, тот же самый модуляторный нейрон CV1a не демонстрировал постоянной деполяризации после обучения хемосенсорному пищевому рефлексу с одного подкрепления (Рис. 5.2.4В), использовавшемуся в нашей работе с CGC. Таким образом вероятно, что один и тот же тип несинаптической пластичности но в нейронах разного типа может служить субстратом для формирования памяти после разных процедур классического условного обучения с

использованием одинакового безусловного стимула (сахарозы), но при его сочетании с двумя разными типами условных стимулов: тактильным и химическим.

Преыдушие работы по исследованию клеточных механизмов классического условного рефлекса, проявляющегося в имплицитной памяти (Milner et al., 2005; Thompson, 2005), идентифицировали вызванные обучением изменения в нейронах, которые являются внутренними по отношению к сети, генерирующей данный тип обуславливаемого поведения (Jones et al, 2003; Darbon et al., 2004; Hawkins et al., 1981; Gainutdinov et al., 1998; Davis et al., 1983; Kovac et al., 1985; Spencer et al., 1999; Jones et al., 2001; Nargeot et al., 1999; Antonov et al., 2003; London et al. and Gilette, 1986), включая один пример участия серотонинергического нейрона *C. elegans* (Zhang et al., 2005). Наша новая работа, однако, представляет первый пример, когда постоянные изменения в электрических свойствах одного нейрона, располагающегося вне сетей и механизмов, генерирующих паттерн пищевого поведения, кодируют информативные изменения, которые могут быть использованы для извлечения следа имплицитной долговременной памяти. Хранение информации о следе памяти вне рабочей сети, которая сильно ритмически активизируется во время пищевого поведения, а также может быть спонтанно-активной (Kemenes et al., 2001; Zhang et al., 2005), по-видимому, обеспечивает механизм, предотвращающий затухание активности модулирующего нейрона из-за моторных паттернов, генерирующихся также и в отсутствие условного стимула. Существование такого независимого механизма хранения может быть особенно важным для поддержания стабильного следа долговременной памяти после пищевого обучения условному рефлексу.

5.5.3. Роль постоянного натриевого тока в несинаптической пластичности.

Главный экспериментальный результат, полученный в этой части - это то, что вызванные изменения в мембранном потенциале модуляторного нейрона моллюска, участвующие в формировании долговременной памяти,

возникают одновременно и коррелируют с увеличением постоянного натриевого тока в этой клетке (Staras et al., 2002) через 24 часа после обучения. Это наблюдение также было поддержано результатами экспериментов с иммуоцитохимией, которые показали наличие селективного увеличения плотности $Na_v1.9$ -подобных белков в соматической мембране нейрона CGC. Правдоподобность причинно-следственной связи между увеличенным током $I_{Na(P)}$ и значением мембранного потенциала также была исследована с помощью математической модели нейрона CGC, разработанной для наивных животных, которая продемонстрировала наличие эффекта деполяризации мембранного потенциала CGC сходного порядка при повышении $I_{Na(P)}$, подобному наблюдавшемуся в реальных нейронах. Таким образом, мы впервые продемонстрировали связь между вызванными обучением изменениями в поведении и постоянном натриевом токе, и представили пример несинаптической пластичности вместе с информацией как по участвующим ионным каналам, так по механизмам на уровне нейронных сетей, вовлеченных в проявления пластичности в поведении.

Предыдущая работа, исследующая ионные механизмы вызванной обучением несинаптической пластичности, продемонстрировала основные типы токов, которые вносят вклад в повышенную возбудимость мембраны, которые переносятся кальциевыми и калиевыми ионами или через активируемые гиперполяризацией катионные каналы (Zhang and Linden, 2003). Мы не нашли вызванного обучением уменьшения отставленного выпрямляющего калиевого тока, которое, в теории, могло бы внести вклад в повышенную деполяризацию мембраны. Идентифицированные ранее в CGC кальциевые токи (Staras et al., 2002) инактивируются слишком быстро, чтобы оказывать длительный эффект на мембранный потенциал. Наш предыдущий анализ не выявил никаких доказательств того, что подобного рода повышение нейрональной возбудимости может быть индикатором изменения калиевого тока А-типа или присутствия тока гиперполяризационно-активируемого типа (Staras et al., 2002). Таким образом, в отличие от других известных на сегодняшний день примеров несинаптической пластичности, вызванная обучением деполяризация

мембранного потенциала CGC является особым случаем и базируется исключительно на постоянном натриевом токе.

Постоянный натриевый ток также присутствует в гиппокампе млекопитающих (French et al., 1990; Vervaeke et al., 2006), однако возможная связь между $I_{Na(P)}$ и известными примерами вызываемой обучением несинаптической пластичности (Debanne et al., 2003; Magee and Johnson, 2005; Zhang and Linden, 2003) в этой ключевой области мозга до сих пор не исследована. В свете представленных данных, изучение того, какой вклад вызванные обучением изменения в $I_{Na(P)}$ могут вносить в уже известные и еще не открытые формы ассоциативной несинаптической пластичности, имеет важное значение и вызывает большой интерес.

На системном уровне, ранее известные формы патологической пластичности, такие, как гипералгезия, нейропатическая боль и эпилепсия, как было показано недавно, имеют связь с повышением $I_{Na(P)}$ (Amaya et al., 2006; Dib-Hajj et al., 1999; Gold et al., 1996; Stafstrom, 2007). Наша работа впервые показала важную роль этого типа тока в непатологических формах пластичности, связанные с долговременной памятью, приобретаемой в ходе ассоциативного обучения.

5.5.4. Взаимосвязь между локальной несинаптической пластичностью и эффективностью локальных синапсов.

В этой главе мы продемонстрировали, что аттенуация 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 у моллюска *Lutnaea* была продемонстрирована выше. Имеет важное значение, что деполяризация CGC путем инъекции тока также снижает аттенуацию кальциевого сигнала (вызванного аксональными спайками) в церебральной ветви аксона. Однако, такой же уровень деполяризации не смог изменить амплитуду вызванного спайком кальциевого сигнала в буккальной ветви аксона. Таким образом, именно церебральная ветвь представляется

обособленным участком, на который воздействует несинаптическая пластичность. Она ветвится в области наибольшего ветвления церебробуккальных интернейронов (McCrohan & Kyriakides 1989) рядом с местом вхождения губных нервов в церебральный ганглий, что обеспечивает анатомический контекст для известной способности CGC облегчать активацию входов с хемосенсорных нейронов на церебробуккальные интернейроны, активирующиеся условным стимулом амил-ацетатом.

В сети пищевого поведения моллюска *Aplysia* передача сигнала между сенсорными и моторными нейронами подвергается аттенюации спайка, которая может быть уменьшена центральной деполяризацией пресинаптического нейрона (Evans et al. 2003). Подобно происходящему с *Lymnaea* CGC, центральная деполяризация нейрона B21 у *Aplysia* вызывает градуальные изменения фонового внутриклеточного кальция в аксонных терминалях (Ludwar et al. 2009). Однако, у *Aplysia* роль фазовой центральной деполяризации была исследована в контексте безусловного пищевого поведения, а на моллюске *Lymnaea* мы продемонстрировали роль постоянной центральной деполяризации в пищевом условном обучении.

Подобно нашим данным о том, что аттенюация аксонального спайка снижается после аппликации 4-аминопиридина (селективного блокатора быстрого калиевого тока у CGC; Staras et al. 2002), прерывание распространения аксонального спайка в гиппокампальных культурах может быть приостановлено аппликацией 4-аминопиридина на пресинаптические нейроны (Debanne et al. 1997).

Хотя механизмы, которые мы описываем, 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 на переживающих срезах мозга *in vitro*, используемых в работах не млекопитающих, в нашей работе впервые для выявления связи центральной долговременной деполяризации с компартиментализованными изменениями в синапсах было применено поведенческое обучение с последующей оптической регистрацией функциональных сигналов и электрофизиологическими экспериментами на препаратах целого мозга.

Также, тип экспериментов с индукцией LTP, используемый в работе Frick et al. (2004) и других (Kampa et al. 2006; Losonczy et al. 2008) обычно не позволяет проводить эксперименты дольше чем ~ 1 час и, значит, он соотносится только с кратковременной или промежуточной пластичностью. В наших экспериментах сравнения были проведены через 24 часа после процедуры обучения, что позволило нам изучить механизмы, лежащие в основе долговременной памяти. Еще одно важное отличие состоит в том, что вызванная LTP модификация тока I_A в дендритах нейронов млекопитающих, по-видимому, 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 ее, по-видимому, достаточно чтобы инактивировать ток I_A у этого нейрона моллюска. Однако не стоит исключать вариант, что обучение также влияет на аксональные каналы, которые могут также вносить вклад в аксональную деполяризацию. Дальнейшие развернутые исследования могут быть очень важны для дополнения модели CGC и внесения в нее более тонких деталей относительно ионно-канальных механизмов аксонных компартментов в дополнение к соматической пластичности.

Однако, наиболее фундаментальным отличием между предыдущими исследованиями несинаптической пластичности в дендритах и нашими исследованиями является то, что наше исследование выявило детали связи между соматической пластичностью и усилением синаптического аксонального выхода, что лежит в другой плоскости относительно нейронов, выбирающих какие из своих входов надо усилить, так как, в противоположность этому, рассматривает усиление выходов нейрона. 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.

Недавние эксперименты с использованием оптической регистрации с потенциал-зависимыми красителями продемонстрировали, что чувствительный к 4-аминопиридину ток, протекающий через калиевые каналы Kv1-типа, лежит в основе изменения формы спайка в ближайших коллатеральных аксона пирамидных нейронов как ответ на деполяризацию в зависимости от расстояния до сомы (Foust et al. 2011). Мы показали, что распространение спайков в аксональных ветвях интернейрона моллюска подвергается аттенюации, которая может быть уменьшена как деполяризацией, так и аппликацией 4-аминопиридина. Исходя из этого, как нейроны млекопитающих, так и моллюсков, по-видимому, обладают сходным механизмом, объединяющим центральную деполяризацию и компартментализованную пресинаптическую активность, и этот механизм может также участвовать в реализации компартментализованной пластичности в дендритах нейронов млекопитающих.

Пресинаптическая деполяризация может потенцировать синаптический выход синапсов, как у беспозвоночных, так и у позвоночных животных через изменение уровня внутриклеточного кальция (Ludwar et al. 2009; Awatramani et al. 2005). Также известны примеры того, как соматическая деполяризация увеличивает вероятность выброса медиатора, увеличивая уровень фонового внутриклеточного кальция и амплитуду вызванного спайком входа кальция в проксимальных пресинаптических терминалях (Christie et al. 2011; Yu et al 2010). Однако, наша работа впервые продемонстрировала работу этого механизма на идентифицированном нейроне при реализации специфического поведенческого обучения.

5.6. Выводы.

1. Внутриклеточная инъекция циклического аденозин-монофосфата в тело ключевого модуляторного нейрона пищевого поведения вызывает долговременное увеличение постоянного натриевого тока.
2. После условного обучения, ключевые модуляторные нейроны, являющиеся внешними по отношению к нейронной сети генератора пищевого ритма, демонстрируют постоянную деполяризацию мембраны возникающую между 16 и 24 часами после обучения, сохраняющуюся вместе с приобретенной реакцией.
3. Искусственная деполяризация ключевого модуляторного нейрона воспроизводит эффект обучения у наивных препаратов и увеличивает уровень кальция в проксимальных аксональных ветвях.
4. Увеличение постоянного натриевого тока в ключевом модуляторном нейроне вызывает отставленную постоянную деполяризацию, появляющуюся в этом нейроне после обучения животного классическому условному рефлексу.
5. Соматическая деполяризация, появляющаяся после обучения, увеличивает вероятность выброса медиатора путем локального увеличения входа пресинаптического внутриклеточного кальция, вызванного потенциалом действия.

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

В предыдущей главе была описана компартментализация несинаптической пластичности на уровне отдельного нейрона и на субклеточном уровне с использованием комбинации физиологических и поведенческих методов, включая критически важные эксперименты по оптической регистрации активности отдельных компартментов нейрона. Это стало возможным во многом потому, что ключевой модуляторный нейрон пищевого поведения CGC модулирует практически всю сеть пищевого поведения, но находится вне ее, и его активность, в отличие от остальных интернейронов и мотонейронов этой нейронной сети, не зависит от фаз генератора пищевого ритма. Ситуация намного усложняется, если какой-нибудь важный для организации поведения нейрон получает не только сенсорно-опосредованные входы, но и находится под контролем внутренних центральных сетей, самостоятельно генерирующих собственные ритмы. Эффективные подходы к проблеме взаимодействия ключевого нейрона с осциллирующей сетью возможно разработать также с привлечением оптической регистрации как отдельного нейрона и его компартментов, так и суммарной нейросетевой активности осциллирующих нейронов и их нейрональных отростков в контексте воздействия биологически значимых сенсорных стимулов. В данной главе будет описано исследование формирования обонятельного поведения в норме и после обучения на примере взаимодействия осциллирующей обонятельной сети интернейронов процеребрума моллюска с мотонейроном МтЦЗ ретрактора щупальца улитки, несущего на кончике обонятельный орган. Также будет выявлена связь между коррелирующими с обучением параметрами осцилляций в обонятельном органе, и динамикой/латентностью ответов на запах этого важнейшего мотонейрона, образующего обонятельное и оборонительное поведение.

6.1. Тонкая настройка обонятельного ориентировочного поведения путем взаимодействия осцилляторной активности с активностью отдельного нейрона.

Мы использовали простую сенсорную и моторную систему для исследований нейрональных механизмов обонятельного ориентировочного поведения и обучения. Основные обонятельные органы наземных моллюсков, экспериментальных животных этой главы, расположены на кончиках их щупалец, которые демонстрируют сложные движения, когда улитка исследует окружающую среду. Реконструируя траекторию движения кончиков щупалец («носов») улитки в трех измерениях в свободном поведении мы продемонстрировали, что вытянутые щупальца совершают постоянные сканирующие движения, как в фоновом режиме, так и в ответ на запаховый раздражитель. Аппликация запаха вызывала быстрое, похожее на избегание сгибание щупальца, не зависевшее от концентрации вместе с одновременным концентрационно-зависимым втягиванием щупальца. Предыдущие работы показали, что активация идентифицированного мотонейрона MtC3 также вызывает втягивание щупальца. Здесь мы продемонстрируем на полуинтактных препаратах, что MtC3 отвечает на запах в манере, зависящей от концентрации, и схожей по динамике с реакцией втягивания щупальца в ответ на предъявление запахов интактным животным. Это наблюдение позволяет полагать, что MtC3 участвует в центральном контроле области сканирования и регулировании длины щупальца. Используя оптическую регистрацию и потенциал-зависимые красители мы показали, что во время гиперполяризационной фазы осцилляций в процеребруме, главном обонятельном центре ЦНС наземного моллюска, частота спайкования MtC3 значительно уменьшалась. Мы также продемонстрировали, что прямая активация процеребрума вызывает фазическое ингибирование активности MtC3. Эти результаты служат примером того, что в обонятельной системе взаимодействие осцилляторной активности и активности отдельного нейрона играет важную роль в тонкой

настройке ориентационного поведения к изменяющимся условиям окружающей среды.

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 отделе ЦНС, где происходит центральная обработка обонятельной информации (Gelperin & Tank, 1990). Интересная возможность того, что широко распространенные обонятельные осцилляции могут являться частью механизма моторного контроля обонятельного поведения, остается пока неизученной.

У наземных улиток обонятельные органы (эпителиальные сенсорные выстилки, «носы») расположены на кончиках щупалец (Chase & Croll, 1981) и напрямую контактируют с воздушными потоками. Когда улитка приближается к источнику запаха, частота медленных поворотов щупальца относительно основания значительно увеличивается (Lemaire & Chase, 1998). 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 собираемся исследовать простую 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. Однако, затруднительно тестировать полное движение щупальца, поскольку полная функция щупальца не может поддерживаться на полуинтактном препарате «мозг-нос», в то время как активность MtC3 затруднительно регистрировать на интактных животных. Исходя из этого мы сделали выбор в пользу экспериментальной стратегии, при которой мы регистрировали нейрональную активность в ответ на мономолекулярные запахи на препаратах мозг-нос и сравнивали ее динамику с движениями щупалец, зарегистрированных в свободном поведении. В данной главе мы впервые представим количественный совместный анализ вызванных запахом активных обонятельных движений периферического обонятельного органа и коррелирующей спайковой

активности в отдельном идентифицированном центральном нейроне, а также продемонстрируем, что активность этого нейрона коррелирует с осцилляторной активностью в ЦНС.

6.1.1. Вызванные запахом движения щупалец у интактной улитки.

Как в отсутствии запаха, так и в ответ на его предъявление мы наблюдали медленные сканирующие движения вытянутых щупалец улитки (Рис 6.1.1А). Сканирующие движения представляли собой медленные изменения ориентации щупалец, которые могли быть описаны как синусоидальные изменения координат единичного направляющего вектора (Рис 6.1.1А нижний график). Построение траектории движения щупальца выявило практически непрерывные движения щупалец из стороны в сторону (Рис 6.1.1Вi). Угол сканирования составлял порядка 60 градусов. Разнообразные короткие смещения, такие, как кивок и замедление, также влияли на траекторию щупальца. 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. Кивки и вытягивания не наблюдали в контрольных экспериментах с подачей чистого воздуха вместо запаха (6 животных). Мы отделяли кивок от сокращения по скачку координат направляющего вектора, показывающего быстрый сдвиг кончика щупальца (Рис. 6.1.1А снизу). Кивок временно прерывал сканирование, тогда как сокращение или вытягивание этого не делали (Рис. 6.1.1А и Вi). Кивок происходил во всех возможных направлениях (Рис. 6.1.1Вii). Мономолекулярные запахи высокой концентрации (10 и 30%) прекращали сканирование, поскольку происходило полное вытягивание щупальца. После вытягивания, щупальце обычно возвращалось к своей нормальной длине через 20-40 с после аппликации запаха.

Сравнение значения длины щупальца (модуль вектора, Рис. 6.1.1А верхняя диаграмма) и данных о координатах направляющего вектора (Рис. 6.1.1А нижняя диаграмма) выявило, что пика одной из координат

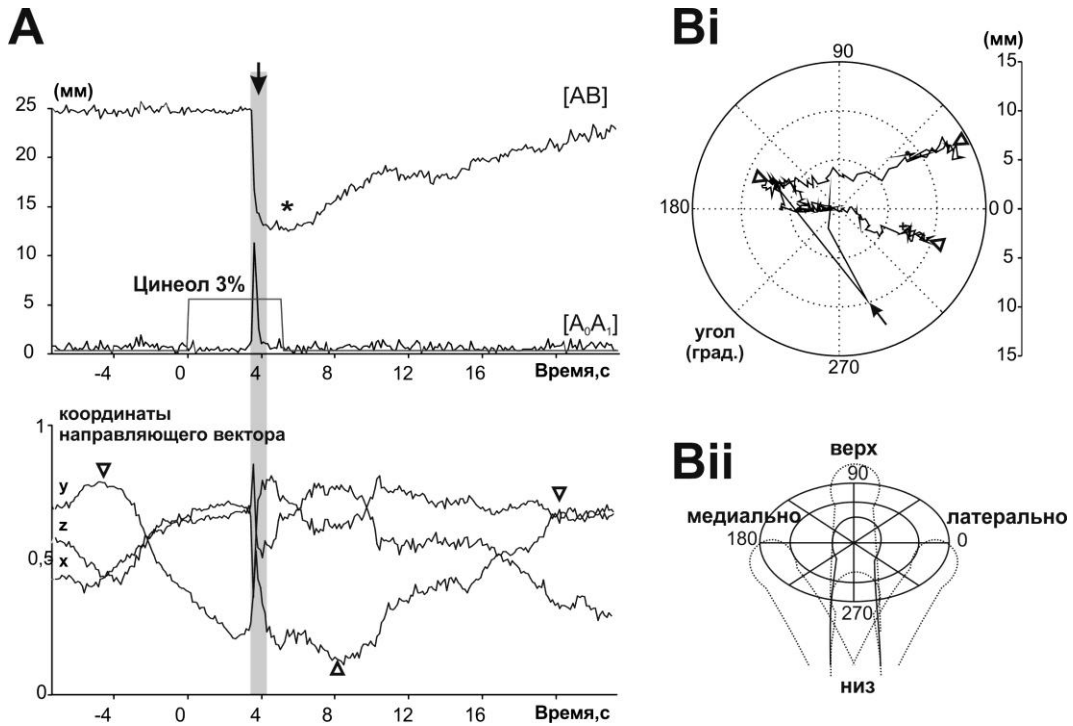


Рис. 6.1.1. Пример анализа тентакулярных движений, вызванных 3% запахом цинеола. (А) Сверху графика расстояние кончик-основание [AB] и сдвиг кончика за единицу времени [A₀A₁] отложены как функция времени. На нижнем графике изображена временная функция координат единичного направляющего вектора. Белые треугольники отмечают крайние точки сканирующих движений. Аппликация запаха вызвала быстрый кивок – похожее на избегание сгибание щупальца, накладывавшееся на относительно долгое уменьшение длины щупальца. Стрелка и вертикальная серая полоса обозначают вызванный запахом кивок – похожее на избегание сгибание (длительность ~0.5 с). Звездочкой отмечен пик длительного сокращения щупальца. Отметим, что сгибание щупальца также как и сокращение щупальца влияли на падение значения [A₀A₁], но когда кивок уже закончился, щупальце все еще продолжало втягиваться. (Bi) Соответствующая траектория проекции кончика щупальца на плоскость, ортогональную средней ориентации щупальца (отложенная в полярной системе координат). Каждая прямая линия траектории представляет собой смещение кончика за бин 0.12 с. Чем длиннее прямой отрезок, тем больше сдвинулся кончик. (.), Начало регистрации траектории движения кончика; (+), конец зарегистрированной траектории кончика щупальца. Стрелка указывает на фазу кивка у тентакулярного движения (см. стрелку и серую полосу на А). (Bii) Схема щупальца с наложенной полярной системой координат. Направления латеральное, вверх, медиальное, вниз отмечены '0', '90', '180' и '270' соответственно.

направляющего вектора достаточно для определения кивка, поэтому далее будет представлена только одна координата направляющего вектора.

6.1.2. Рекции щупальца и MtC3 на мономолекулярные запахи.

Предыдущая работа показала, что электрическая стимуляция вызывает сокращение мышцы тентакулярного ретрактора (Prescott et al., 1997). MtC3 также активируется запахами (Chase & Hall, 1996), и одной из гипотез, которую мы здесь тестируем, было то, что паттерн активации MtC3 коррелирует с втягиванием щупальца в ответ на запахи. Таким образом, в наших экспериментах мы анализировали движения щупальца и спайковую активность MtC3 в присутствии и в отсутствии запахов. Чтобы проанализировать сгибания и втягивания щупалец на полной шкале амплитуд и сравнить их с вызванными запахом ответами в MtC3, мы регистрировали поведенческие ответы на мономолекулярные запахи цинеола и бензальдегида (1%, 3%, 10% и 30%). В отличие от естественных запахов, состоящих из многих летучих компонентов, мономолекулярные запахи однокомпонентны, что обеспечивает высокую контрастность запаха относительно фона. Аппликации цинеола и бензальдегида обычно вызывали кивок и сокращение щупальца, что выражалось в одно- или двухфазном изменении длины щупальца (Рис 6.1.2 слева). 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 (Рис. 6.1.2 слева, 2 нижние регистрации). Три процента цинеола, однако, вызывали только короткое сокращение щупальца, похожее на так называемые «дергания», описанные Lemaire & Chase (1998) в свободном поведении во время активной ориентации животного по запахам. Подобные же данные были получены с использованием бензальдегида (данные не показаны). 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 ($n = 20$). Кросскорреляционный коэффициент между значениями сокращения щупальца и длиной щупальца до предъявления запаха был -0.10 для ответов на цинеол и 0.03 для ответов

на бензальдегид. Таким образом, 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.

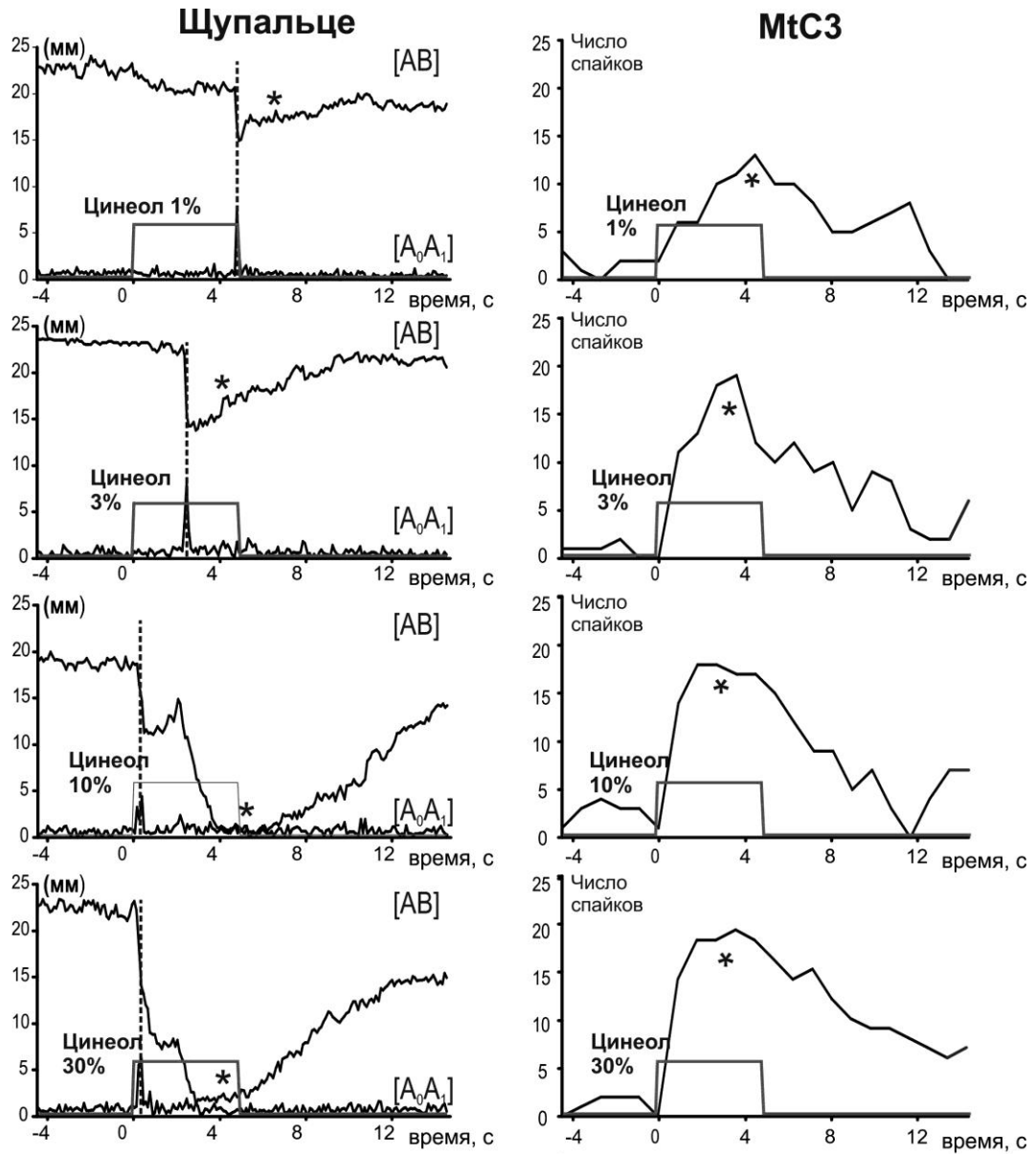


Рис. 6.1.2. Сравнение реакции щупальца на интактной улитке с ответами MtC3 на препарате нос-мозг на мономолекулярный запах цинеола, подававшийся в возрастающих концентрациях. (Слева), график расстояния кончик-основание [AB] и сдвига кончика [A0A1] от времени. Стрелка и вертикальная серая линия отмечают вызванный запахом кивок щупальца. (Справа), графики спайковой активности нейрона MtC3 (каждая точка представляет число спайков за интервал 1 с). Звездочки отмечают пик долговременного сокращения щупальца и спайковый разряд мотонейрона MtC3 соответственно. Как для движения щупальца, так и регистрации активности MtC3 начало и длительность запахового стимула отмечены ступенькой внизу каждой диаграммы.

Lemaire & Chase (1998) продемонстрировали, что кивок занимает фиксированное время порядка 0.5 с. Чтобы сравнить ответы на разные концентрации запаха, мы рассчитывали амплитуды кивка как суммарный сдвиг кончика щупальца внутри интервала до того момента, когда кивок достигает пикового значения. Амплитуда кивка, нормализованная по длине щупальца (относительная амплитуда кивка, %) до аппликации запаха, была практически константна для предъявлений различной концентрации (Рис. 6.1.3Ai, $n = 6$, парный t -критерий). Кросскорреляционный коэффициент между амплитудой кивка и концентрацией запаха составил 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. Таким образом, амплитуда кивка зависела только от длины щупальца до аппликации запаха, но не зависела от концентрации запаха.

В следующем эксперименте 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. Как и щупальце (Рис. 6.1.2, справа), мотонейроны MtC3 демонстрировали ответы в концентрационно-зависимой манере (Рис. 6.1.2. и 6.1.3В). Длительный (до 15 сек) разряд MtC3 был однофазным с одним максимумом (Рис. 6.1.2, справа). Латентность ответа MtC3 (за вычетом времени диффузии) на 3%, 10% и 30% цинеола или бензальдегида варьировала в пределах 150-350 мс. Латентность ответа на 1% запах не могла быть достоверно установлена ввиду медленного градуального нарастания спайковой активности в MtC3. Латентность до пика разряда MtC3 уменьшалась с увеличением концентрации (Рис. 6.1.3Aii) 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. Также, по-видимому, для полного сокращения щупальца MtC3 должен разряжаться с короткой латентностью и с частотой, близкой к максимальной в течение некоторого промежутка времени >3 потому, что 3% цинеол обычно вызывает длительно-латентный короткий ответ в MtC3 высокой частоты ~ 2 с (Рис. 6.1.2 справа),

но он не вызывал полного сокращения щупальца у интактных животных (Рис. 6.1.2 слева).

В этой части работы мы также подтвердили предыдущие наблюдения (Zakharov et al., 1982; Prescott et al., 1997), что спайковая активность в MtC3 достаточна для того, чтобы вызвать сокращение мышцы ретрактора щупальца (6 препаратов). На препарате мозг-мышца с мышцей, соединенной с электрическим преобразователем силы мы наблюдали как спонтанные, так и вызванные стимуляцией MtC3 сокращения (Рис. 6.1.3Ci и Cii).

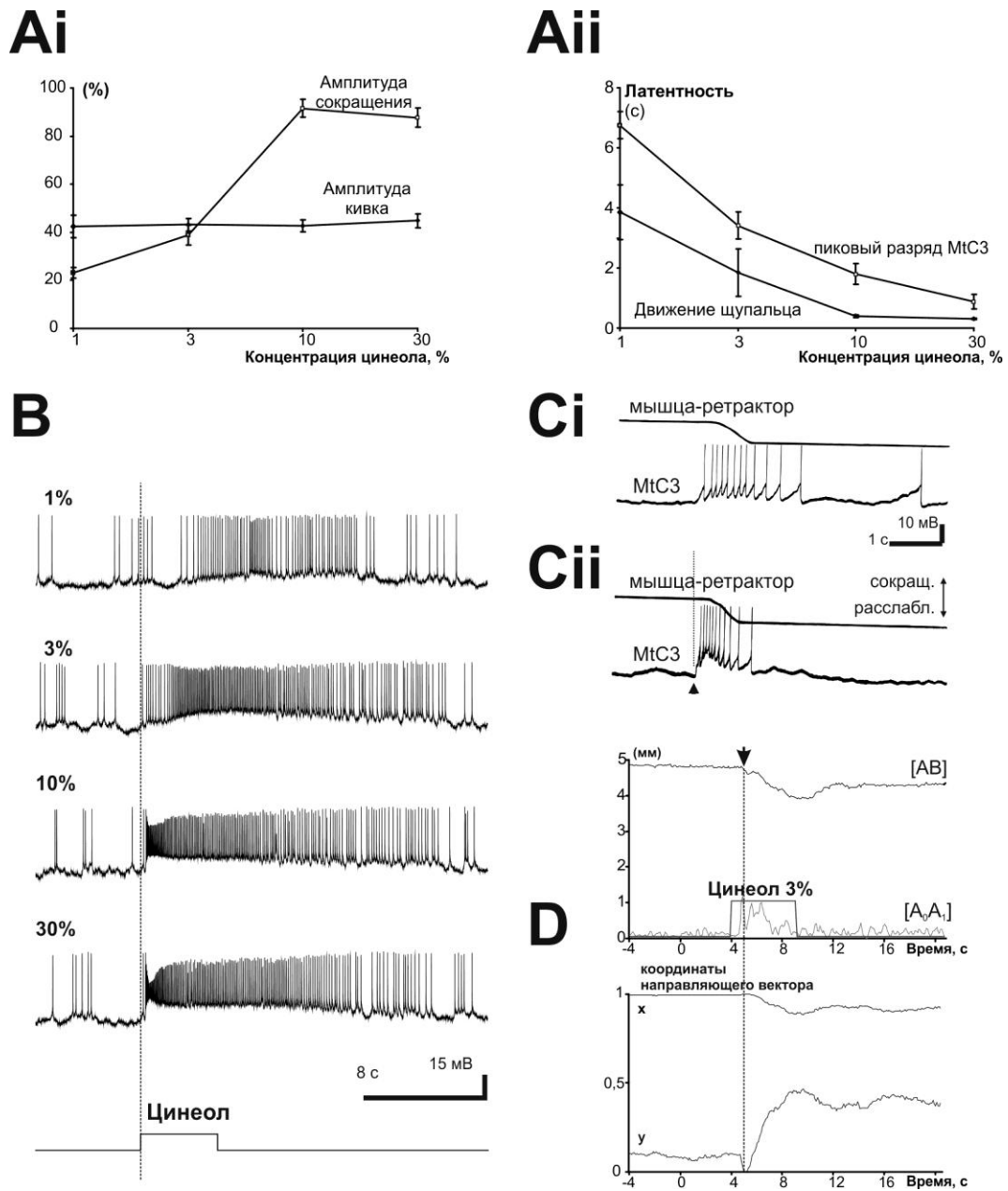
6.1.3. Вызванные запахом движения изолированного щупальца и обонятельной подложки.

Чтобы изучить вызванные запахом латеральные движения щупальца (кивки) при изоляции щупальца от остальной нервной системы мы снимали на видео изолированное щупальце с отрезанной мышцей-ретрактором. Этот тип препарата позволил нам исследовать возможную роль тегументальной (кожной) мышцы в кивке щупальца. В этом препарате только кожная мышца и гидравлическое давление (отрезанный конец щупальца был зажат) поддерживали обонятельный орган, поэтому сгибания могли быть возможны только за счет локального сокращения волокон тегументальной мышцы. Мы регистрировали на изолированном щупальце сходные с кивком движения в ответ на 3% цинеол ($n = 6$, пример на Рис. 6.1.3D) и 3% бензальдегид (данные не показаны). Сгибания щупальца на этом препарате были похожи на кивки щупальца у интактных животных (сравн. с Рис. 6.1.1A). Хотя сокращение щупальца и не было представлено как отдельное движение, каждое сгибание сочеталось с небольшим уменьшением длины щупальца (Рис. 6.1.3D, верхний график [AB]), что также может вносить небольшой вклад в измеряемое сокращение щупальца.

6.1.4. Модуляция спайковой активности MtC3 церебральными осцилляциями.

Внутриклеточная микроинъекция нейробиотина выявила основной отросток MtC3, который образовывал петлю в мезоцеребруме и далее

возвращался назад к коме и делился на три основные ветви, проецирующиеся в мышцы через ольфакторный, внутренний перитентакулярный и внешний перитентакулярный нервы (Рис. 6.1.4Ai). В



добавление к этому, MtC3 посылал большое число тонких отростков (длина

Рис. 6.1.3. Кивки и сокращения у интактного и изолированного щупальца. (Ai) Нормализованные амплитуды кивка и сокращения, отложенные как функция от концентрации запаха (логарифмическая шкала, 6 интактных животных, показаны значения \pm SEM). Расстояние кончик-основание [AB] до аппликации запаха было принято за 100%. (Aii) Графики пиковой частоты спайкового разряда нейрона MtC3, вызванные цинеолом на препаратах нос-мозг и латентность движения щупальца в ответ на аппликацию от концентрации запаха (логарифмическая шкала,

8 интактных животных, показаны значения \pm SEM). (B) Вызванные запахом ответы мотонейрона-ретрактора щупальца MtC3 в ответ на аппликацию цинеола, подаваемого ступенями в увеличивающихся концентрациях от 1% до 30%. Спонтанная (Ci) и вызванная (Cii) активность MtC3 сопровождалась сокращением ипсилатеральной мышцы-ретрактора. Верхние регистрации представляют собой механограмму мышцы-ретрактора щупальца, зарегистрированную с помощью измерителя силы. Стрелка и прерывистая линии отмечают начало деполяризации MtC3. Отклонение механограммы вниз соответствует сокращению щупальца. Нижние регистрации представляют собой внутриклеточные записи активности MtC3 острым электродом. (D) Вызванные запахом ответы на изолированном щупальце. Стрелка и прерывистая линия отмечают вызванное запахом сгибание щупальца подобное кивку.

до 250 мкм, Рис. 6.1.4Aii) в область внутреннего нейропиля процеребрума. Все отростки MtC3 располагались вблизи поверхности ганглия и, таким образом, 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 (1 мг/мл) и регистрировали вход кальция в его отростки одновременно со стандартной внутриклеточной электрофизиологической регистрацией соматического потенциала. В отсутствие какой-либо стимуляции в MtC3 регистрировались спонтанные ВПСП и потенциалы действия (Рис. 6.1.4B, нижние записи). Как и ожидалось, спайки сопровождалась быстрым входом кальция (Рис. 6.1.4B, записи 1-8 справа) во все отростки MtC3 вблизи сомы, включая проксимальную часть петли и моторные ветви (регистрации 5, 6 и 8). С другой стороны, гигантские спонтанные ВПСП сопровождалась локальным входом кальция только в проксимальные тонкие ветви из области внутреннего нейропиля (Рис. 6.1.4B осциллограммы 1-4 слева), но не в другие отростки поблизости (сравн. Рис. 6.1.4B, осциллограммы 5-8 слева). 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 (Рис. 6.1.4B и C). Результаты этих экспериментов с визуализацией кальция подтвердили предположение, что густое ветвление нейритов MtC3 во внутреннем нейропиле процеребрума является важной целью для

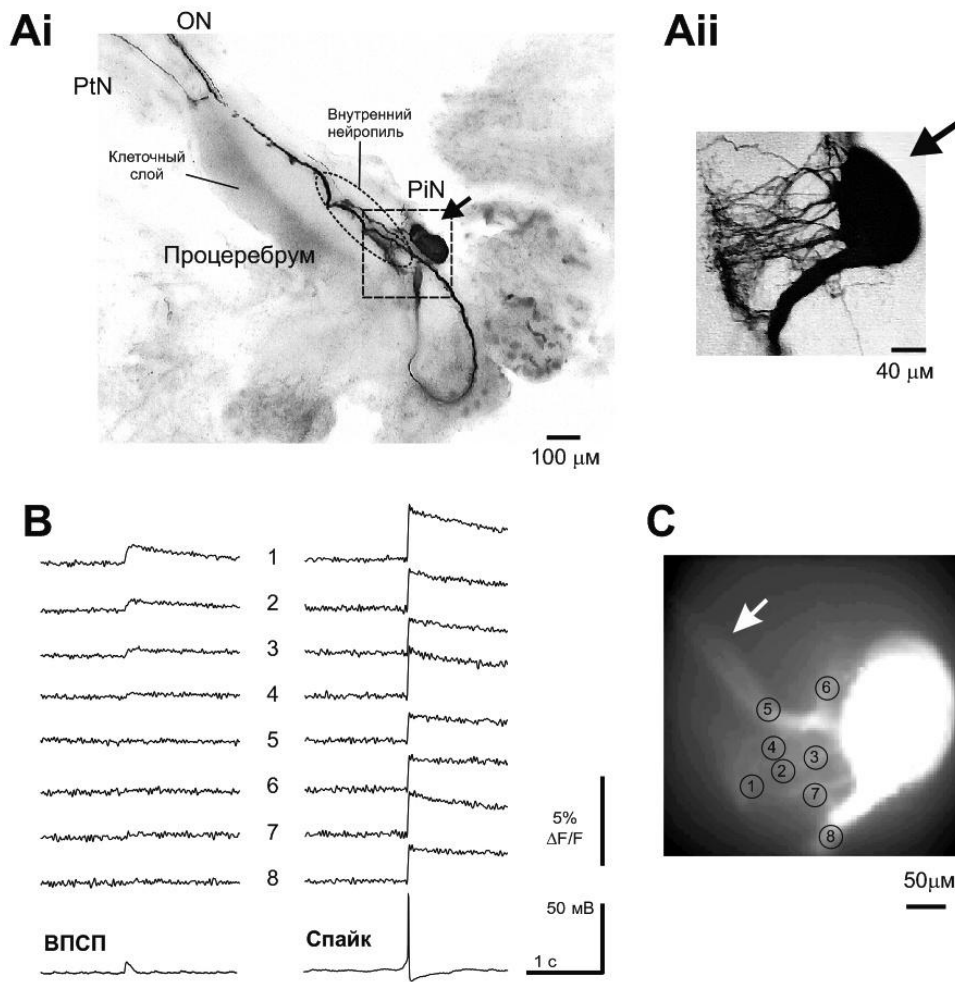


Рис. 6.1.4. Морфология MtC3 и вход кальция в его нейриты, расположенные в процеребральном нейропиле. (Ai) Паттерн ветвления нейритов мотонейрона MtC3 в церебральном ганглии, выявленный внутриклеточной инъекцией нейробиотина. Наиболее сильное ветвление происходит во внутреннем нейропиле (внутри овальной области, ограниченной мелкой прерывистой линией) процеребрума. ON – обонятельный нерв, PiN – внутренний перитентакулярный нерв, PtN – внешний перитентакулярный нерв. (Aii), Увеличенная картинка плотного ветвления отростков MtC3 в проксимальной области. (B), Записи входа кальция в отростки MtC3, полученные с помощью оптической регистрации и высокоскоростной CCD-камеры во время спонтанного спайка и спонтанного ВПСП. Записи, зарегистрированные во время потенциала действия, с помощью скоростной оптической регистрации, демонстрируют, что вход кальция, происходящий после электрической активности в соме, регистрируется на всех участках регистрации. Таким образом, отсутствие кальциевых сигналов на записях 5-8, зарегистрированных во время ВПСП, не свидетельствует о различиях в распределении краски между местами регистрации. В этом примере ВПСП были зарегистрированы до потенциала действия, и значит, фотовыцветание краски тоже не могло внести вклад в отсутствие сигнала в областях 5-8. (C) Пример кадра, регистрируемого с помощью CCD-камеры. Каждая регистрация на (B) соответствует области на (C) с таким же номером. Белая стрелка указывает на моторные ветви, иннервирующие ретрактор и тегументальную мышцы через ON и PtN (сигнал от области 5).

осцилляторного выхода процеребральной нейросети, который 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 (Рис.6.1.5А). Этот метод очень эффективен для выявления синхронных осцилляций групп нейронов обонятельного пути, как позвоночных, так и у моллюсков (Kleinfeld et al., 1994; Lam et al., 2003). Он также подходит для регистрации активности как в сомах нейронов, так и в их отростках и нейропиле. Хорошо известное свойство потенциал-зависимых красителей обеспечивать сигнал, пропорциональный деполяризации клеточной мембраны по всей шкале физиологических значений мембранного потенциала позволяет им детектировать как деполяризацию, так и гиперполяризацию (Cohen, 1989). Используя водноимерсионный объектив (20x, 0.5 NA, WD 3.3 mm), мы регистрировали низкочастотные осцилляции 1-0.2 Гц в процеребральном слое клеточных тел и внутреннем нейропиле процеребрума (Рис. 6.1.5В). Осцилляции возникали в апикальной части клеточного слоя и распространялись во внутренний нейропиле через 42 ± 31 мс ($n = 6$). Амплитуда гиперполяризационной фазы осцилляций составляла $21.5 \pm 2.9\%$ от общей амплитуды в клеточном слое, тогда как амплитуда во внутреннем нейропиле процеребрума составляла $53 \pm 5.7\%$ (Рис. 6.1.5В). 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 деполяризационная, так и гиперполяризационная фазы (Рис. 6.1.5В). Однако, частота осцилляций лучше сохранялась в слабо окрашенных препаратах. Известно, что потенциал-зависимые красители могут гиперполяризовать нейроны, таким образом ослабляя спонтанную активность. В последующих экспериментах мы использовали только слабое

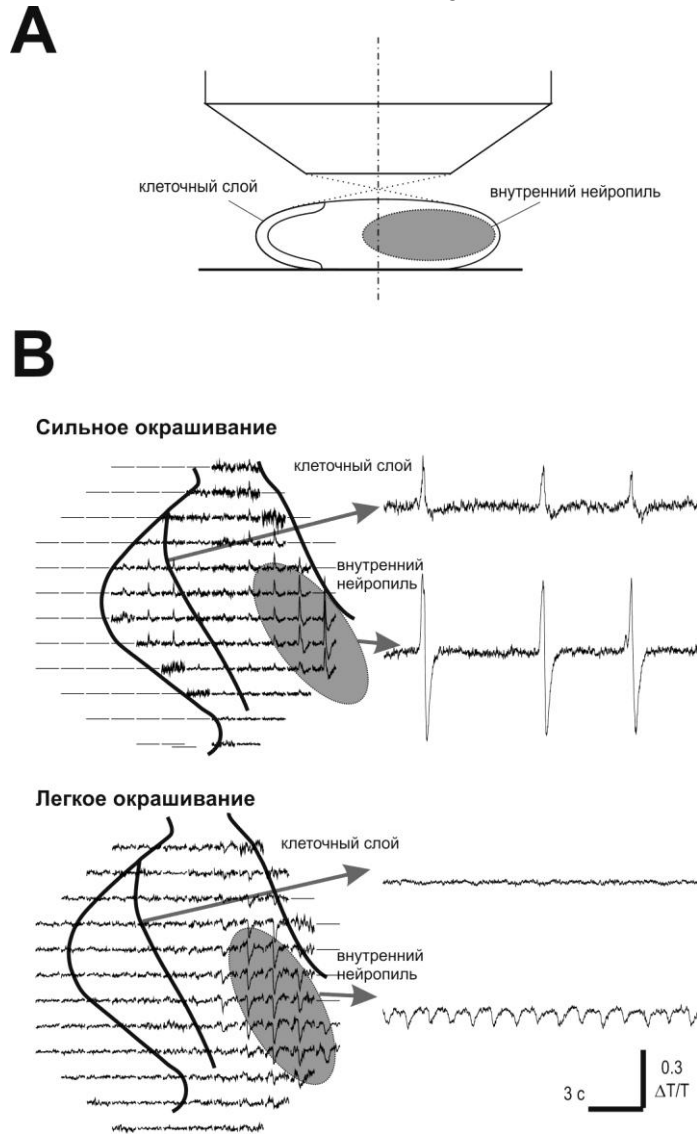


Рис. 6.1.5. Осцилляции в слое клеточных тел процеребрума и внутреннего нейропиля процеребрума (PC). (A) Схема, демонстрирующая взаимное положение объектива и препарата. Показан поперечный срез процеребрума. (B) Слева – контур процеребрума наложен на схему фотодиодной матрицы. Регистрации наложены на местоположения детекторов, которые их записывали. Свет проходил через препарат в направлении от вентральной к дорзальной стороне. Поэтому регистрации от фотодетекторов отражают двумерную фронтальную проекцию электрических событий в процеребруме. Справа показаны записи от слоя клеточных тел (верхняя регистрация) и внутреннего нейропиля (нижняя регистрация), отфильтрованные с помощью программного обеспечения с полосой пропускания 0.1-19 Гц. Наблюдали два различных паттерна в зависимости от длительности окрашивания. Легкое окрашивание позволяло селективно регистрировать от внутреннего нейропиля процеребрума (серый овал на схеме). Толстые линии показывают контур процеребрума и область слоя клеточных тел.

окрашивание, достаточное для выявления осцилляций во внутреннем нейропиле, на которых было сосредоточено дальнейшее исследование.

Чтобы установить более прямую связь между активностью процеребрума 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. Мономолекулярные запахи цинеола и бензальдегида апплицировали 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 (Рис. 6.1.6Ai). Чтобы проанализировать полученные данные, мы использовали усреднение потенциалов действия по интервалам, синхронизированным по максимальному уровню гиперполяризации осцилляций в процеребруме (wave-triggered average). Этот способ усреднения продемонстрировал, что во время каждого цикла осцилляций число спайков в MtC3 достоверно уменьшается как при аппликации цинеола (1.44 ± 0.09 спайков/100 мс до осцилляции, 1.16 ± 0.09 спайков/100 мс во время осцилляции, $n = 7$; парный t-критерий, $p < 0.05$, Рис. 6.1.6Aii), так и бензальдегида (1.47 ± 0.10 спайков/100 мс до осцилляции, 1.19 ± 0.09 спайков/100 мс после осцилляции, $n = 6$; парный t-критерий, $p < 0.05$). Эти наблюдения заставляют полагать, что во время вызванного запахом 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 процеребрум на число спайков в разряде MtC3, подвергнутого небольшой деполяризации. Чтобы провести этот эксперимент, мы использовали стимуляцию трейном (train 50 Гц, пульсы 2 мс) апекса процеребрального клеточного слоя, содержащего спонтанно разряжающиеся нейроны, которые активируют осцилляции (Watanabe et al., 1998). Этот вид стимуляции вызывал значительное падение спайковой активности MtC3 в 1.78 ± 0.35 раза по сравнению со спайковой частотой до стимуляции (парный t-тест, $p < 0.05$, $n = 6$ препаратов, пример показан на Рис. 6.1.6B). В каждом эксперименте, который вошел в статистику для анализа, применялось напряжение стимуляции, более чем в 10 раз меньшее

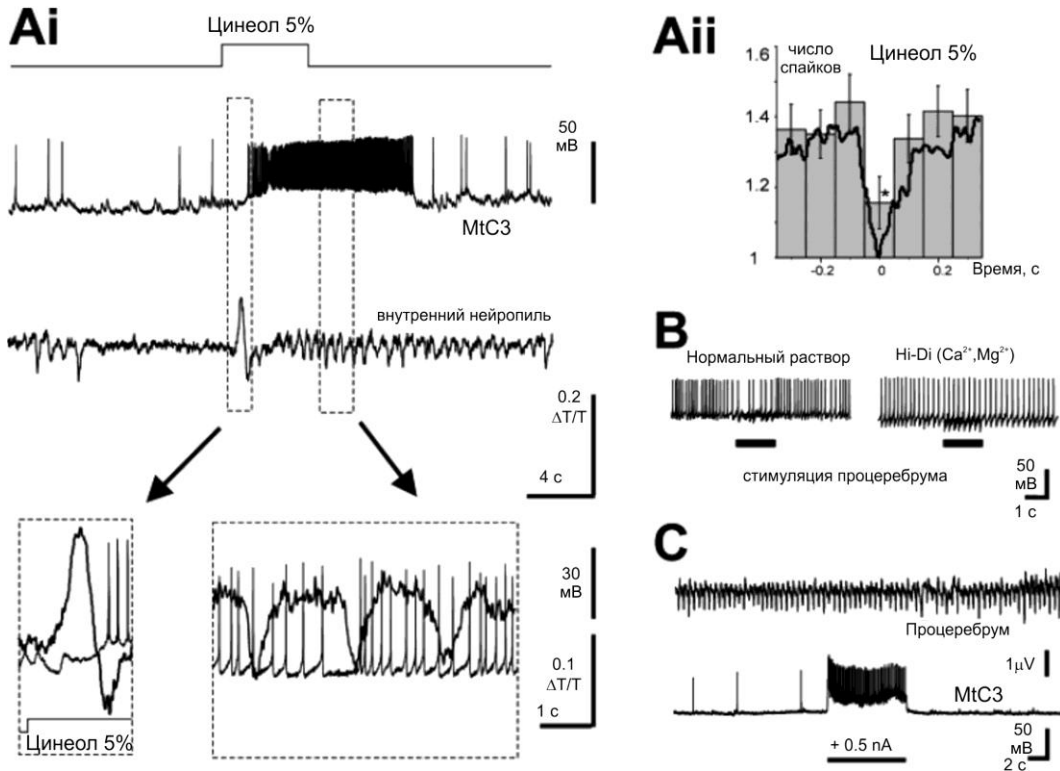


Рис. 6.1.6. Корреляция спайковой активности MtC3 с процеребральными осцилляциями. (Ai) Вызванный запахом разряд MtC3, зарегистрированный одновременно с оптическим сигналом от осцилляций во внутреннем нейропиле процеребрума (легкое окрашивание потенциал-зависимым красителем JPW-1150). Увеличенные фрагменты с наложенными регистрациями также показаны. (Aii) Усреднение частоты спайков MtC3 по положению волны осцилляций процеребрума, рассчитанное для разряда MtC3, вызванного запахом цинеола. Форма волны наложена на спайковую гистограмму. Спайки усреднены на интервалах 0.1-секундных отрезков. '0' на оси X соответствует впадине гиперполяризационной фазы осцилляции. Во время гиперполяризационной фазы спайковая активность в MtC3 значительно падает (парный t-критерий, $p < 0.005$). (B) Реакция фоново деполяризованного MtC3 на экстраклеточную стимуляцию процеребрума в нормальном растворе и после вымывания в модифицированный раствор HiDi с повышенными концентрациями Ca^{2+} (x 3) и Mg^{2+} (x 5). (C) Разряд нейрона MtC3, вызванный инъекцией тока 0.5 нА, зарегистрированный одновременно с процеребральными осцилляциями. Повышенная частота разряда в MtC3 не оказывала влияния на параметры осцилляций.

порога активации антидромного спайка в проксимальных волокнах MtC3 (который измеряли в каждом эксперименте), что показывает незначительное или полное отсутствие влияния стимуляции на ближайшие области терминального нейропиля и входных волокон обонятельного нерва (см. анатомические детали на Рис. 6.1.5). Чтобы выяснить, являются или нет связи MtC3 и процеребрума моносинаптическими, мы сравнивали реакцию

MtC3 на стимуляцию процеребрума в нормальном растворе и модифицированном Hi-Di (высокие кальций и магний), который, как показано ранее, способен отсечь полисинаптические входы на MtC3 (Chase & Hall, 1996). Стимуляция процеребрума в растворе Hi-Di не изменяла частоту спайкования MtC3 (парный t-критерий, $P = 0.89$, $n = 3$, Рис. 6.1.6B), что заставляет полагать, что дисинаптические или полисинаптические связи между процеребрумом и MtC3 обеспечивают основной тормозной ответ, регистрируемый в нормальном растворе (Рис. 6.1.6B).

Далее, мы выясняли, может ли спайковая активность в MtC3 влиять на процеребральную активность, но не обнаружили такого влияния ($n = 5$ препаратов, пример показан на Рис. 6.1.6C).

Взятые вместе, результаты описанных выше экспериментов свидетельствуют о том, что активность процеребрума, как вызванная запахом, так и прямой стимуляцией, оказывает модулирующее тормозное влияние на MtC3, однако обратно активность MtC3 на осцилляторную активность процеребрума не оказывает заметного влияния.

6.2. Обязательный опыт модифицирует эффекты запахов на обязательное пищевое поведение в соответствии с биологической целесообразностью.

Для того чтобы выяснить, реагируют ли улитки на натуральный запах таким же образом, как и на искусственные мономолекулярные – изгибанием и сокращением щупальца, мы предъявляли натуральные запахи моркови и огурца в увеличивающихся концентрациях (2, 10 и 50%) группе улиток (9 животных). Предъявление запаха моркови в концентрации 10% вызывало значительное увеличение длины щупальца в продолжение нескольких 10 сек интервалов по сравнению с длиной щупальца непосредственно перед началом предъявления запаха ($n = 9$, парный t -критерий, $p < 0.05$; выборки соответствуют критериям нормальности распределения и равенства дисперсий; см. Рис. 2Б слева). Реакция щупальца на 2% концентрацию огурца в общих чертах походила на ответ на запах моркови (Рис 6.2.1Б), в то время как 10% и 50% запах огурца вызывал быстрое изгибание щупальца сопровождаемое значительным его сокращением и втягиванием ($n = 9$, парный t -критерий, $p < 0.05$; выборки соответствуют критериям нормальности распределения и равенства дисперсий; см. Рис. 6.2.1Б справа). Амплитуда втягивания была выше для концентрации 50%, а латентность максимального втягивания меньше (Рис. 6.2.1Б справа). Хотя высокие концентрации запаха огурца обычно вызывали изгибание щупальца, в двух случаях (из 18) предъявление 10% и 50% запаха огурца не вызывало изгибания щупальца (Рис. 6.2.2А). В наших экспериментах мы также обнаружили, что голодные улитки почти всегда съедают свежий кусочек моркови (в 7-ми случаях из 8) или огурца (в 4-ёх случаях из 8) помещенный в их аквариум на 3 часа, тогда как огурец иногда оставался нетронутым в продолжении одного дня (2 случая из 8). Это наблюдение свидетельствует в пользу того, что оба растительных продукта распознаются улиткой как пища, но распознавание моркови более надёжно (Рис. 6.2.2Б).

В предыдущей части 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.

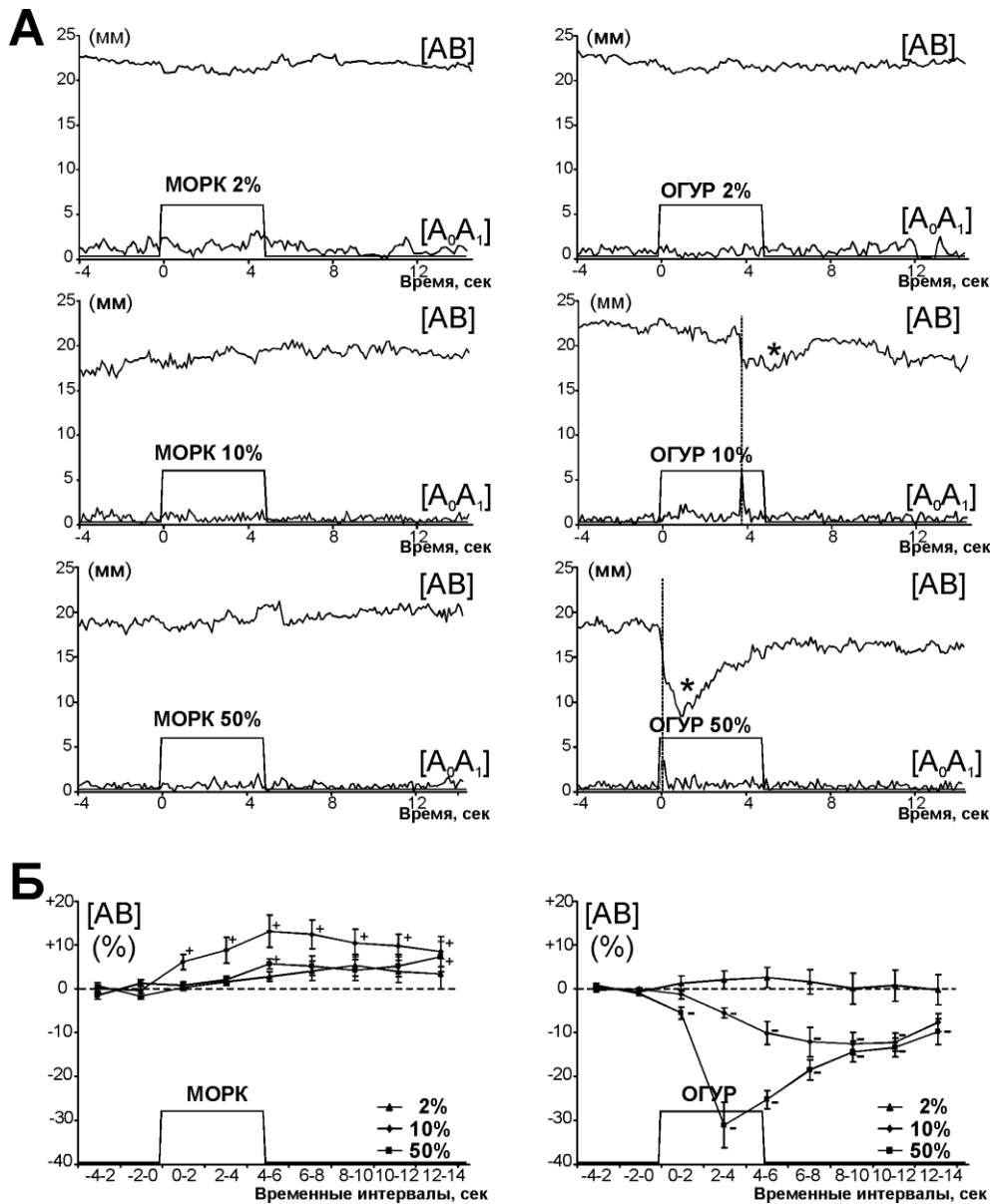


Рис. 6.2.1. Примеры регистрации реакции щупальца улитки *Helix lucorum* в ответ на аппликацию запаха моркови (MORК) и огурца (ОГУР) в ступенчато-возрастающих концентрациях 2%, 10% и 50% от насыщенной (А). Длина щупальца [AB] и смещение кончика щупальца [A₀A₁] изображены как функции времени. Вертикальная прерывистая линия отмечает пиковое значение вызванного запахом смещения кончика щупальца в результате изгиба. Звездочками отмечено относительно длительное сокращение длины щупальца. (Б) Изменения в длине щупальца [AB], измеренной как расстояние от кончика до основания, нормированные по максимальной длине, рассчитанные для каждого из 2 сек интервалов, суммированные на гистограмме для ответов на запахи концентрации 2%, 10% и 50%. (+) Интервалы времени со статистически достоверными увеличением длины щупальца по отношению к длине щупальца до аппликации запаха с достоверностью $p < 0.05$ (парный t-критерий, $n = 9$). (-) Временные интервалы когда происходило уменьшение длины щупальца [AB] по отношению к длине щупальца до аппликации запаха с достоверностью $p < 0.05$ (парный t-критерий, $n = 9$). Длину щупальца [AB] до предъявления запаха принимали за 100%.

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 высоких концентраций 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) *Helix lucorum* с ответами

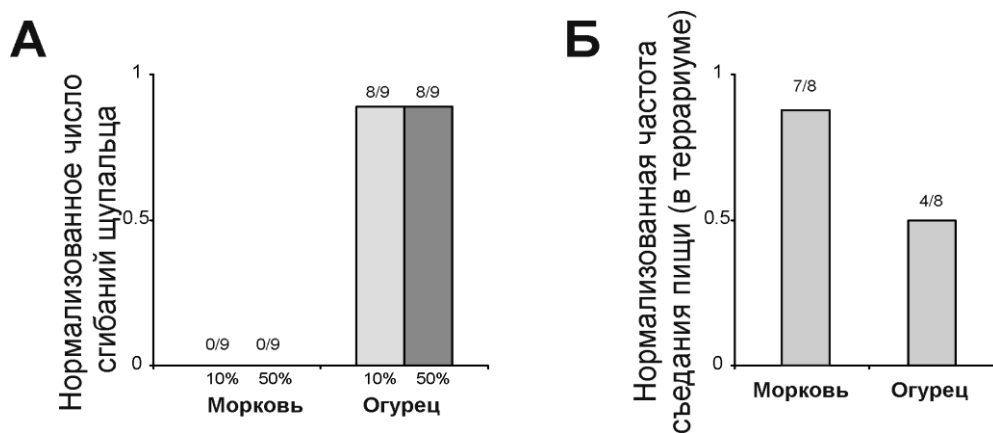


Рис. 6.2.2. Сгибания щупальца и частота поедания пищи. (А) Число сгибаний, вызванных запахами огурца и моркови в концентрациях 10% и 50%, нормализованное по общему числу экспериментов. (Б) Частота случаев полного поедания пищи, помещенной в террариум 6-ти взрослым особям на 24 часа, нормализованное к общему числу предъявлений.

контрольной группы (8 улиток), содержащейся в тех же условиях но питавшейся капустой. Ответы щупалец на запах огурца в концентрации 10, 50 (Рис. 6.2.2А) и 2% (данные не показаны) в группах контрольных и обученных животных достоверно не различались ни на одном из рассматриваемых двухсекундных интервалах ($n = 8$, независимый t -критерий, $P > 0.1$; выборки соответствуют критериям нормальности распределения и равенства дисперсий). Таким образом, втягивание щупальца в ответ на запах огурца представляется безусловным рефлексом, и этот запах можно рассматривать как негативный фактор сенсорного окружения, вызывающий того, что оба растительных продукта распознаются улиткой как пища, но распознавание моркови более надёжно (Рис. 6.2.2Б).

В предыдущей части 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. поедание огурца), животное могло бы обучиться демонстрировать стабильный ответ, зависящий от концентрации этого запаха и независящий от приобретенного опыта. Хотя аппликация запаха с помощью ольфактометра в диапазоне концентраций 2, 10 и 50% не полностью имитирует запах, испускаемый свежим кусочком пищи (моркови или огурца), мы полагаем, что наши опыты охватывали целиком диапазон концентраций, воспринимаемых животным во время приема пищи, от чувства запаха на расстоянии, когда животное приближалось к пище до приближения щупалец к объекту настолько близко, что они иногда почти задевали источник запаха обонятельными органами. Подробнее концентрационная зависимость реакций щупалец описана в предыдущей части главы, посвященной мономолекулярным запахам.

Сходные результаты были получены на другом виде улиток, *Cornu aspersa* с использованием того же протокола обучения. После выдерживания обученной группы на диете из огурца и контрольной группы на диете из капусты в течение 30 дней (в каждой группе по 8 улиток), мы не обнаружили разницы в амплитуде сокращения щупалец между животными обученной и контрольной групп в ответ на предъявление запаха огурца в концентрации 10% (13.1 ± 2.1 и $14.3 \pm 2.6\%$ от исходной длины щупальца соответственно; $t = 0.376$, $P = 0.713$, независимый t-критерий, выборки соответствуют критериям нормальности распределения и равенства дисперсий). В этих сериях экспериментов мы также сравнивали число изгибаний щупалец и латентность изгибания, и также не обнаружили разницы между двумя группами (изгибания были зафиксированы у 7 из 8 и у 8 из 8 животных контрольной и обученной питавшейся огурцом групп соответственно, $P = 0.99$; критерий Хи-квадрат; латентности: 3.4 ± 0.4 сек, 3.0 ± 0.5 сек; $t = -0.447$, $P = 0.66$, независимый t-критерий, обученная и контрольная группы соответственно, выборки соответствуют критериям нормальности распределения и равенства дисперсий).

Наблюдавшаяся разница в реакциях улитки на морковь и огурец позволяет предполагать, что новый тип пищи не всегда притягателен для животного до того, как животное его попробовало и употребило в пищу. Далее, мы предъявляли улиткам кусочек 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 кусать и глотать (т.е. 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 Рис. 6.2.3Б). Такой подход позволил нам исследовать возможность того, что изменение в 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 обстоятельств (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 ($p < 0.05$, Рис. 6.2.3Б), тогда как кондиционированная и наивная группы достоверно одна от другой не отличались.

Далее, мы последовательно предъявляли улиткам 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 через 2 часа морковь. Другие 50% улиток получали сначала морковь, а потом огурец через 2 часа для нивелирования эффекта порядка предъявления на результаты экспериментов. Для реализации пищевого поведения высшему наземному моллюску необходимо

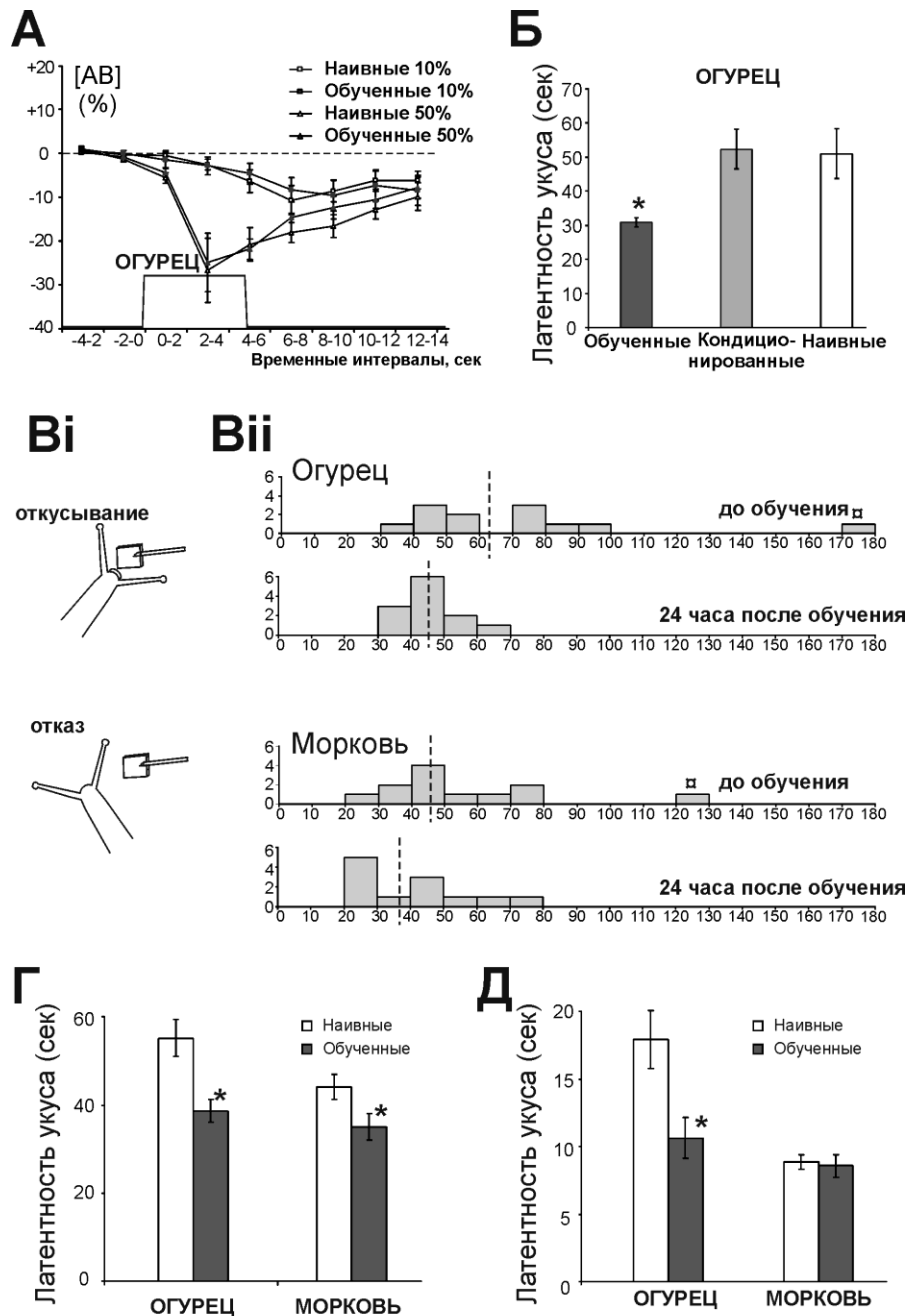


Рис. 6.2.3. Поведенческие ответы на морковь и огурец у наивных и обученных с позитивным подкреплением животных. (А) Втягивание щупальца в контрольной группе (питавшейся капустой) и обученной группе (питавшейся огурцом) на аппликацию запаха огурца. (Б) Средние латентности первого укуса у трех групп взрослых улиток *Helix lucorum*; первую группу обучали по парадигме однократного подкрепления (предъявляли запах огурца и позволяли его есть) и затем сравнивали с кондиционированной группой (предъявляли запах огурца, но не позволяли есть огурец) и наивной группой (незнакомые с запахом огурца и не евшие огурец). (Vi) Схематичное изображение улитки, принимающей и кусающей огурец (сверху) или отказывающейся от него (снизу). (Vii) Характеристические гистограммы частот латентностей первого укуса на 10 сек интервалах, измеренные относительно начала предъявления запаха огурца или моркови у животных до поедания кусочка огурца или моркови и 24 часа после съедания кусочка соответственно. Прерывистые линии

обозначают медиану выборки. Символ (∞) отмечает случаи, когда пища была изначально отвергнута. Отказы засчитывали, когда латентность взятия превышала удвоенное значение медианы, даже если впоследствии улитка брала пищу. (Г) Средние латентности первого укуса пищи у взрослых улиток *Helix lucorum* у обученных животных по сравнению с наивными животными (теми же самыми) до того, как они были обучены по парадигме с одиночным подкреплением, когда им разрешали съесть кусочек моркови или огурца соответственно, которые им до того были незнакомы как пища (11 улиток, среднее \pm значение SEM). (Д) Средняя латентность первого укуса у наивных ювенильных улиток *Cornu aspersa* до и после употребления в пищу маленького кусочка моркови (24 улитки, среднее \pm значение SEM).

прицельное откусывание пищи ртом и губами. В результате этого латентность первого укуса пищи у моллюска складывается из времени, необходимого животному, чтобы детектировать еду, плюс время принятия решения и длительность акта откусывания пищи как такового. Мы полагали время детекции запаха пищи примерно одинаковым для обоих видов пищи, тогда как время принятия решения и длительность акта кусания могли отражать притягательность предъявлявшегося вида пищи. Для использования критерия латентности в парадигме обучения необходимо было отбрасывать из выборки те случаи, когда улитка не брала пищу (пример на Рис. 6.2.3Vi). Даже когда улитки возвращались к пище после исходного отказа повторно, латентность взятия пищи более чем в два раза превышала медиану и такие значения явно выпадали из общей выборки (пример на Рис. 6.2.3Vii). В группе из 23 улиток (одна улитка отказалась от еды, и соответствующие данные были отброшены) латентность укуса огурца значительно уменьшилась после того, как животные употребили в пищу кусочки огурца, т.е. получили единичное подкрепление, когда они были протестированы на следующий день после этого (53.7 ± 4.0 с до обучения, 37.6 ± 2.5 с после обучения, критерий суммы рангов Манна-Уитни, $p < 0.002$, $n = 23$, Рис. 6.2.3Г). Те же улитки продемонстрировали достоверное снижение латентности укуса моркови после того, как получили подкрепление в виде кусочка моркови (42.8 ± 2.8 сек до обучения, 34.0 ± 3.0 с 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 дольше по сравнению с предъявлениями моркови (критерий

суммы рангов Манна-Уитни, $p < 0.03$, $n = 23$, Рис. 6.2.3Г). После обучения достоверных различий между латентностями взятия огурца по сравнению с латентностями взятия моркови не наблюдали (критерий суммы рангов Манна-Уитни, $P = 0.34$, $n = 23$).

Мы также тестировали молодых улиток (7 дн. возраста) *Cornu aspersa* (группа из 24 животных из лабораторной колонии, не встречавших ранее ни моркови, ни огурца) и измеряли латентность первого укуса до употребления улиткой в пищу небольшого кусочка моркови или огурца и после его поедания (Рис. 6.2.3Д). Ранее было показано, что молодые улитки демонстрируют более высокую скорость обучения пищевому предпочтению (Croll and Chase, 1980). Почти все протестированные улитки кусали морковь в первом предъявлении ($n = 23/24$, или 96%, один отказ), в то время как число улиток, откусивших огурец в первом предъявлении, было меньше (17/24, или 71%, семь отказов). Отказы от моркови и огурца представляли собой независимые события согласно критерию Хи-квадрат ($p < 0.01$). До получения пищевого подкрепления 17 улиток, откусивших морковь и огурец в первом предъявлении, демонстрировали более высокую латентность взятия огурца (17.9 ± 2.2 сек) по сравнению с латентностью взятия моркови (8.9 ± 0.6 сек, критерий суммы рангов Манна-Уитни, $p < 0.002$; Рис. 6.2.3Д). Через день после того как улитки попробовали кусочек моркови или огурца, улитки были снова протестированы и обнаружилось, что латентность взятия пищи для огурца достоверно уменьшилась (10.6 ± 1.5 сек) и достоверно отличалась от латентности взятия до первого употребления огурца в пищу (критерий суммы рангов Манна-Уитни, $p < 0.002$). Латентность взятия моркови достоверно не изменилась (8.4 ± 0.5 сек; критерий суммы рангов Манна-Уитни, $P = 0.43$).

6.3. Обсуждение.

6.3.1. Роль взаимодействия осцилляторной активности и активности отдельного нейрона в тонкой настройке ориентационного поведения.

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. Таким образом, активность обонятельных интернейронов не только отражает параметры стимула, как было показано ранее (Kleinfeld et al., 1994), но также играет важную роль в процессах обонятельного восприятия и исследования пространства для ориентации по запахам.

Мы обнаружили, что сканирующие движения щупалец в пространстве происходят как спонтанно, так и после предъявления специфических запахов. Эти активные сканирующие движения, по-видимому, необходимы для получения информации о наличии и расположении в пространстве актуальных источников запаха. Удаление одного из щупалец оказывало незначительный эффект на аккуратность ориентации по запаху в открытом поле, но приводило к круговым перемещениям в статическом поле запаха (Chase & Croll, 1981). Это указывает на то, что сканирующие движения направлены не на уменьшение расстояния от органов обоняния до запахов во время ориентации в потоках запахов. Известно, что запахи распределены в пространстве неравномерно, рассеиваясь и двигаясь вместе с флуктуациями воздуха (Hopfield, 1991). Постоянные сканирующие движения щупалец могут облегчить и сделать более аккуратным ориентацию по направлению движения к привлекательному запаху или в противоположенную сторону от негативного репеллента. Тентакулярные движения представляют интерес как модель

активного восприятия окружающей среды, явление, которое было также исследовано на восприятии с помощью антенны у омара (Atema, 1995; Koehl et al., 2001) и у мотыльков (Vickers, 2000).

Зарегистрированные втягивания щупалец в ответ на запахи могут быть систематизированы в следующем порядке: (1) низко латентные кивки, сопровождаемые начальным сокращением с последующим втягиванием щупальца (цинеол, бензальдегид 10% и 30%); (2) кивки с большой латентностью, сопровождаемые небольшим начальным сокращением и градуальным медленным неполным втягиванием (более слабая концентрация запахов). Потенциально опасные стимулы требуют более быстрой реакции, поэтому ответы с короткой латентностью сопровождаются впоследствии полным втягиванием щупальца, которое является указанием на разновидность оборонительного поведения. В наших экспериментах полное втягивание щупальца было замечено только на мономолекулярные запахи, но никогда не наблюдалось на натуральные пищевые. Однако, реакция сокращения мантии и полное втягивание щупальца в ответ на натуральный репеллент – запах чеснока – было недавно продемонстрировано на слизнях (Inoue et al. 2004). Lemaire & Chase (1998) продемонстрировали полное сокращение щупальца в присутствии линалола, являющегося компонентом естественного пищевого запаха. Присутствие пищевых запахов высокой концентрации, по-видимому, сигнализирует о враждебном окружении и заставляет улиток быстро и полностью втягивать щупальца вне зависимости от качества самого запаха. Долговременное небольшое сокращение щупальца в ответ на низкие концентрации запаха может быть важно для регулировки области сканирования в соответствии с концентрацией запаха, тогда как вызванное нейроном MtC3 втягивание тентакулярного ретрактора может вносить весомый вклад в этот процесс.

Мы продемонстрировали, что кивок сохраняется на изолированном щупальце и обонятельном органе, лишенном мышцы-ретрактора и афферентного контроля со стороны ЦНС. Среди зарегистрированных движений щупальца кивок представляется наиболее автономным, и его амплитуда слабо зависит от концентрации запаха. В противоположность этому, втягивание щупальца и соответствующий ему разряд в MtC3 демонстрирует ясно выраженную зависимость от концентрации.

Волокна обонятельного нерва образуют моносинаптические связи как с MtC3, так и с нейронами процеребрума (Chase & Hall, 1996). У наземных моллюсков присутствуют как минимум два афферентных пути обонятельной информации: первый (включающий процеребрум) для запахов низкой концентрации, имеющих отношение к обучению; и второй (независимый от процеребрума) для запахов высокой концентрации, репеллентов (Рис. 6.3.1). Показано, что процеребрум участвует в дискриминации запахов, но не в идентификации (Teyke & Gelperin, 1999). В его состав входит до 80% всех нейронов ЦНС, и это самая

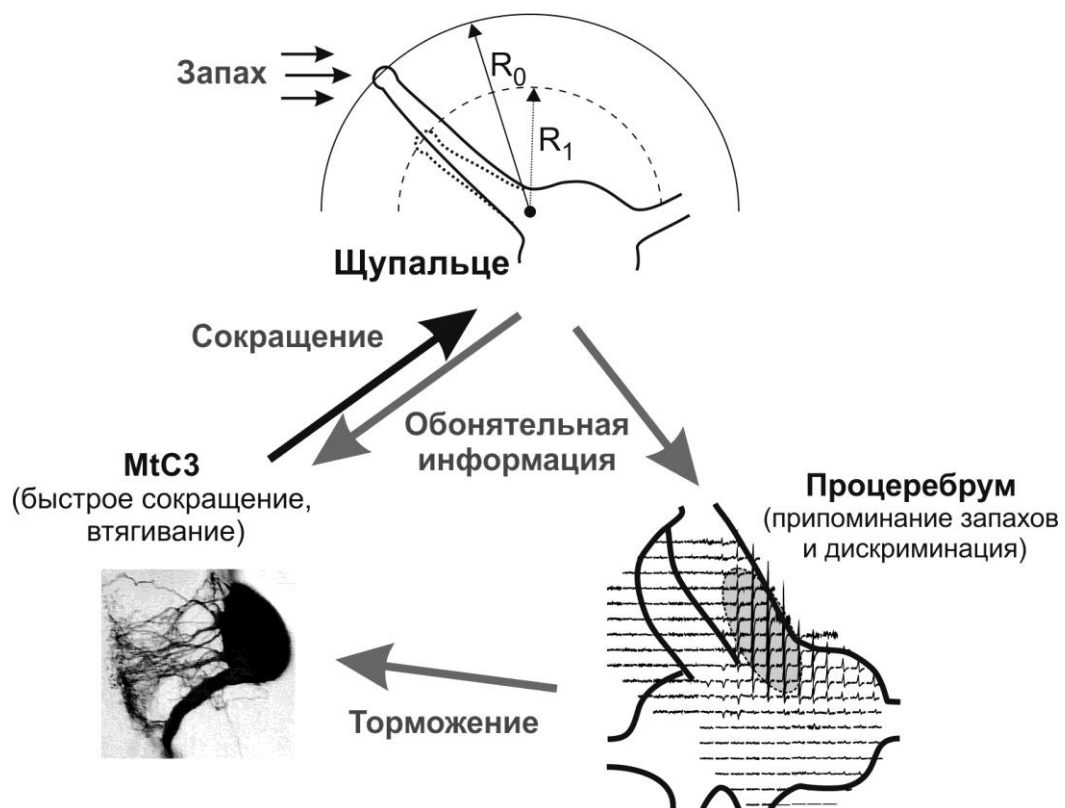


Рис. 6.3.1. Схематическое представление обонятельной ориентации с помощью щупалец у наземных моллюсков. Сокращение щупальца требует взаимодействия двух параллельных афферентных путей проведения обонятельной информации: первый (включающий процеребрум) для запахов низкой концентрации, предположительно ассоциированных с пищевыми стимулами, и второй, (независимый от процеребрума) для запахов высокой концентрации и неприятных репеллентов. Процеребральная активность в свою очередь снижает интенсивность вызванных запахом ответов в MtC3, активность которого может модулироваться осцилляторной активностью процеребрума. R_0 – радиус области сканирования до детекции запаха; R_1 – радиус области сканирования после детекции запаха.

сложноорганизованная часть мозга моллюска. Большинство нейронов процеребрума не посылают отростков за пределы этого отдела (Ratte' & Chase, 1997). Более того, нейриты педальных нейронов (Chase & Tolloczko, 1989), буккальных нейронов (Gelperin, 1998) и гигантского метациеребрального нейрона который получает ритмический вход, синхронизованный с фазами процеребральных осцилляций (Shimozono et al., 2001), были найдены во внутреннем нейропиле процеребрума. Нейроны процеребрума, которые ветвятся во внутреннем нейропиле, имеют большинство входных синапсов вблизи своих клеточных тел (в слое клеточных тел) и выходных синапсов в большинстве в терминальной области отростков (Ratte & Chase, 2000).

Три различных компонента осцилляций (ростральный, медиальный и каудальный) были зарегистрированы, и описана их одновременная модуляция запахами в обонятельной луковице позвоночного не млекопитающего, покрашенной потенциал-зависимым красителем (Lam et al., 2003). Наши эксперименты продемонстрировали фазную связанность осцилляций между клеточным слоем и внутренним нейропилем процеребрума улитки, что свидетельствует в пользу единственного доминирующего осцилляторного компонента. Снижение интенсивность разряда MtC3 во время вызванных запахом процеребральных осцилляций (Рис. 6.1.6А) позволяет полагать, что процеребральные клетки тормозят MtC3, что было также подтверждено экспериментами с прямой стимуляцией процеребрума (Рис. 6.1.6В). Вход кальция в дистальные отростки MtC3 церебрального ганглия в районе внутреннего нейропиля процеребрума, зарегистрированный во время спонтанных ВПСП, продемонстрировал присутствие дендритной функции этих отростков. Harris et al. (2002) продемонстрировали, что перекрестное взаимодействие между величиной относительно медленно нарастающего деполяризирующего входа и ритмическим торможением может служить механизмом смещения фазы генерации спайков при высоких частотах спайкового разряда у пирамидных нейронов гиппокампа. Схожим образом, взаимодействие между процеребральным торможением и моносинаптическим деполяризирующим входом от волокон обонятельного нерва на MtC3 может быть ответственным

за снижение латентности пика спайкового разряда и, как следствие, определять динамические параметры сокращения щупальца.

Активный контроль обонятельного поведения ограничен локомоторными способностями животного. Разнообразные организмы, такие, как лобстеры, крабы и мотыльки, могут использовать схожие поведенческие стратегии, чтобы решать задачи навигации по запахам, опираясь на быстрое перемещение к предполагаемому источнику запаха с быстрыми сменами курса при движении в потоке запаха (Vickers, 2000). Наземные улитки не могут передвигаться быстро, но эволюция наградила их длинными щупальцами, несущими два обонятельных органа на расстоянии до половины длины их тела друг от друга, и совершающими регулярные и относительно быстрые сканирующие движения. Тонкая настройка сканирования, по-видимому, требует участия как минимум трех процессов: локально вызываемого кивка, более длительного сокращения щупалец, центрально управляемых MtC3, и тормозной модуляции последнего осцилляторной активностью в процеребруме (Рис. 6.3.1.). Эти процессы вместе обеспечивают быстрые изменения в конфигурации области сканирования щупальцами в ответ на любые изменения в запаховом окружении.

Недавно мы проводили сравнения ответов щупалец улиток, получавших парные предъявление 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 важно для усиления вызываемой MtC3 реакции втягивания щупальца 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.

6.3.2. Зависимость реакции щупальца от качества запаха и предыдущего обучения.

Ранее мы показали, что улитки постоянно сканируют пространство вытянутыми щупальцами головы в присутствии запахов так же как и без предъявления улиткам следов запаха (Рис. 6.2.4). Также, аппликация мономолекулярного запаха вызывала быстрое, похожее на испуг сгибание щупальца, не зависящее от концентрации с последующим концентрационно-

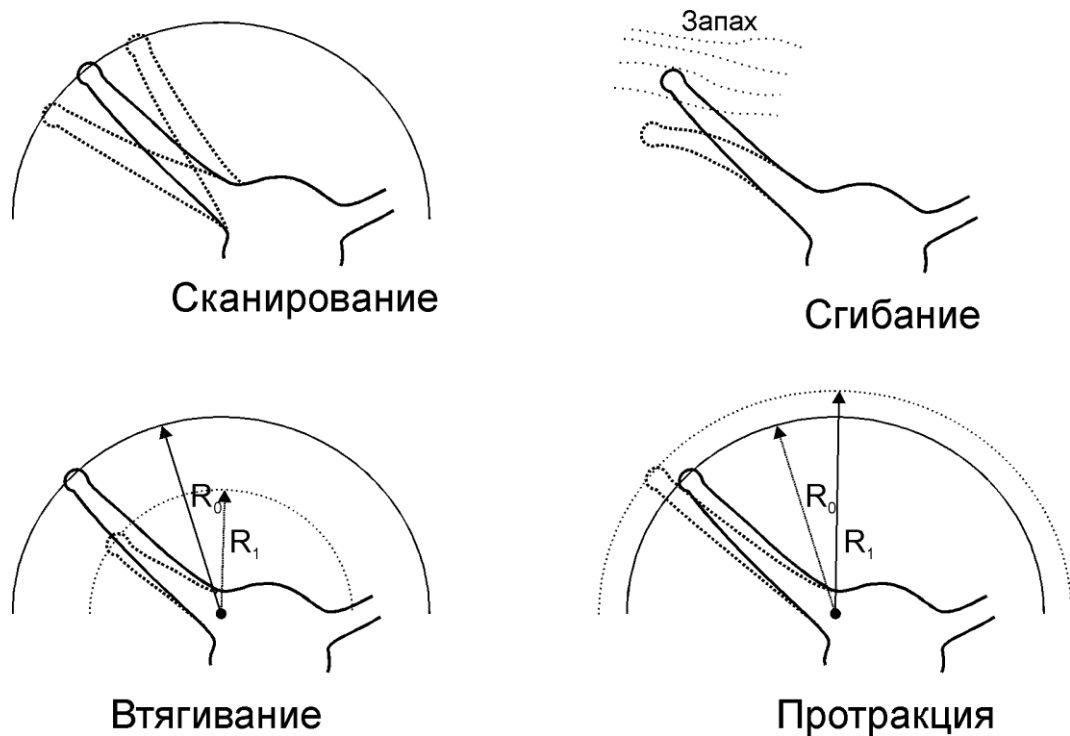


Рис. 6.2.4. Схематическое представление обонятельной ориентации с помощью тентакулярных движений у наземных моллюсков. Сканирование представляет собой медленные повороты вытянутых щупалец из стороны в сторону. Оно частично прерывается реакциями на сильные запахи. Сгибание (quiver) – вызванное запахом быстрое (~ 0.5 с) сгибание фиксированной амплитуды, для избегания и ухода щупальца в сторону. Вероятность возникновения сгибания зависит от концентрации запаха. Втягивание – это долговременное (10 с или дольше) градуальное втягивание щупальца, снижающее размер области сканирования. Протракция увеличивает длину щупальца, что приводит к увеличению области сканирования. R_0 – радиус области сканирования до детекции запаха, R_1 – радиус области сканирования после детекции запаха.

зависимым сокращением щупальца, наложенным на сканирование. Обеспечивая улитке доступ к информации по пространственному распределению запахов, сканирование, по-видимому, необходимо для детекции объектов по их запаховым следам. Аппликация относительно слабого пищевого запаха огурца (2%, 10% и 50% в наших экспериментах) не вызывала полного втягивания щупальца и не прекращала контакт обонятельного органа с воздушной средой, однако вызывала сгибание щупальца и уменьшало длину щупальца и, как результат, охватываемое сканированием пространство также сокращалось (Рис. 6.2.1, 6.2.4). Отличие от этого реакция на запах моркови состояла в вытягивании щупальца, приводившем к увеличению области сканирования (Рис. 6.2.1, 6.2.4).

Потенциально опасные стимулы требуют наиболее быстрой реакции животного на изменения в среде и коротколатентных ответов, характерных для оборонительного поведения. В наших экспериментах мы не наблюдали полного втягивания щупалец в ответ на естественные пищевые запахи. Lemaire и Chase (1998) зарегистрировали полное втягивание щупальца в присутствии чистого химического компонента пищевого запаха линалола (linalool). Сильная концентрация летучего химического компонента может сигнализировать животному об агрессивной внешней среде и заставлять улитку полностью втягивать щупальце независимо от того, входит ли этот компонент в состав пищевого запаха или нет. Недавно Straub с коллегами (2006) продемонстрировали на примере пищевого условного рефлекса с положительным подкреплением, что улитки, обученные, на низкую концентрацию растворенного в воде запаха могут демонстрировать даже подавление пищевого ответа на более высокие концентрации того же запаха по отношению к контрольному предъявлению чистой воды. Таким образом, концентрация запаха, достигающего обонятельного органа, может быть очень важна для реализации адекватного поведения, базирующегося на опыте, полученном в результате пищевого обучения.

Животные, сильно зависящие от обоняния, используют чувствительность к запахам как на расстоянии, так и для ближней ориентации (Hopfield, 1999). Относительно длительное градуальное сокращение щупальца в ответ на высокие концентрации запаха без полного втягивания (такое как наблюдалось в ответ на запах огурца) может быть

направлено на регуляцию величины области сканирования для более осторожного исследования окружающего пространства, оказывая также влияние на разрешающую способность сканирования (Рис. 6.2.4). Таким образом, функция сокращения щупальца зарезервирована не только для ответа на сигналы, несущие потенциальную угрозу, но также позволяет улучшить исследование окружающего пространства, что биологически целесообразно для большего числа возможных ситуаций, в которых оказывается животное.

Известно, что улитки втягивают свои щупальца в ответ на болевые стимулы (Zakharov and Balaban, 1987; Malyshev and Balaban, 2002). Кроме аверзивного ответа, вызванные запахом сокращения и изгибания щупальца могут быть направлены на избегание, и также на обеспечение способа регуляции интенсивности запахового стимула. В ситуации, когда два новых вида пищи предъявлены улитке (огурец и морковь), наивные животные демонстрировали более долгую латентность укуса и большее число отказов в ответ на запах огурца. После того, как животные попробовали огурец, латентность первого 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 (Рис. 6.2.1, 6.2.3А). Мы полагаем, что запах огурца (или его компоненты) был репеллентом и обладал отталкивающими свойствами для улитки, воспринимавшей его как неприятный раздражитель до обучения, и он поменял свое биологическое значение после получения улиткой пищевого подкрепления, то есть запах огурца стал более привлекательным после того как улитка приобрела новую память о пище. С другой стороны, вызываемые запахом огурца быстрые изгибания щупальца, похожие на испуг, по-видимому, не зависят от пищевого обуславливания. Е.Н. Соколов (Sokolov 1963) выдвигал аргументы в пользу того, что поведенческие (моторные) акты, обеспечивающие тонкую настройку анализаторов в соответствии с особенностями сенсорного окружения и оберегающие функцию сенсорного органа, могут быть являться высоко специализированными

оборонительными рефлексами, филогенетически составляющими часть оборонительного поведения.

Классический условный рефлекс на запахи у других моллюсков был ранее описан в литературе: у моллюска *Lymnaea* обучение с единичным пищевым подкреплением на запах, растворенный в воде, (Alexander et al., 1984), пищевое обучение с многократным подкреплением (14 сочетаний) у морского моллюска *Aplysia* (Colwill et al., 1997). Хотя в наших экспериментах улитка *Helix* обучалась определять запах в воздушной среде, а не в воде, *Lymnaea* тоже имеет легкие и принадлежит к тому же подклассу *Pulmonata* (наземные предки этого вида вернулись в водное окружение). Напротив, для *Aplysia* (подкласс *Opisthobranhia*) требуется много повторных сочетаний, чтобы выучить пищевой условный рефлекс, что, возможно, говорит об эволюционной дивергенции этих двух групп моллюсков.

Откусывание или скобление радулой у улиток происходит по принципу «все или ничего» и может быть легко зарегистрировано. В работах на *Lymnaea* и *Aplysia* анализ числа кусаний или поскребываний радулой традиционно используют для демонстрации того, что обучение имело место после сочетанных предъявлений (Benjamin et al., 2000; Brembs et al., 2002). В отличие от водных видов, которые начинают покусывать или скрести радулой, почувствовав ассоциированный с пищей запах, наземная улитка *Helix* обычно нацеливается на пищу губами и ртом и начинает ее откусывать после контакта с кожей, таким образом, демонстрируя целенаправленное поведение. То есть мы полагаем, что латентность первого укуса для *Helix* лучше отражает результат обучения с положительным подкреплением, чем число укусов. Кроме начала консумматорной фазы, могут быть использованы другие индикаторы обучения. У наземных *Pulmonata* обучение с единичным подкреплением было описано у слизней (Sahley et al., 1981), когда обучение выявляли с помощью теста пищевых предпочтений в открытом поле. На другом представителе подкласса *Pulmonata*, улитки *Achatina fulica*, Croll и Chase (1980) использовали ориентацию по движению воздушного потока с запахом пищи, обеспечиваемого постоянно работающим ольфактометром, чтобы исследовать пищевую предпочтительность и обнаружили, что после пребывания в течение 12-ти часов на диете из единственного вида пищи улитки стали охотнее стремиться к условному

запаху. Эксперименты Croll и Chase позволили произвести специфическую оценку зависимости силы обучения от возраста. В наших экспериментах с втягиванием щупальца мы не обнаружили никаких признаков обучения, однако оно было обнаружено с использованием парадигмы измерения латентности при единичном подкреплении. Выбор индикатора обучения может быть очень важен для верной постановки задачи в экспериментах с обучением с целью достижения конкретных целей исследования. В качестве спекуляции мы можем предположить, что некоторые сенсорные ответы, необходимые для выживания (такие как втягивания щупальца в ответ на запах) значительно менее подвержены модификации при пищевом обучении, чем консумматорные фазы поведения.

6.4. Выводы.

Мотонейрон ретрактора отвечает на запах в манере, зависящей от концентрации, и сходной по динамике с фазой втягивания щупальца в ответ на запах у интактных животных.

Осцилляции в обонятельном мозге при предъявлении запахов ритмически тормозят активность мотонейрона ретрактора, осуществляя центральный контроль длины щупальца и области сканирования.

Реакция щупальца на нейтральный и пищевой запах зависит главным образом от концентрации этого запаха и может модифицироваться при пищевом обучении.

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

В предыдущих частях были рассмотрены подходы к изучению клеточных основ обучения и памяти с использованием редукционистского механистического подхода, позволявшего выделить наиболее важные идентифицируемые нейроны, необходимые для реализации поведенческого ответа при обучении. Это позволяло сосредоточиться на локализации пластичности в пределах клеточной формы этих нейронов и на отдельных наиболее важных аспектах взаимодействия нейрона с нейронными сетями, обеспечивающими изучаемый тип поведения в более широком аспекте. При этом, важнейшими характеристиками являлись морфология нейронного дерева и специфические связи нейрона, включая идентификацию входящих и нисходящих проекций, а также их точную пространственную локализацию. На более высоком уровне, нейронные сети, определяющие поведение, состоят из массы индивидуальных нейронов с не менее сложной морфологией и устройством связей. В этой главе с использованием соответствующего метода оптической регистрации будут исследоваться достаточно большие функциональные группы отдельных нейронов, демонстрирующие совместную реакцию на адекватные стимулы и синхронизованные повторяющиеся осцилляции. Исследования проведены на моделях модуляторных сетей оборонительного условного рефлекса *Helix* и сети пищевого ритма *Clione*. Особое внимание будет уделено координации фаз активности и взаимодействию нейронов внутри сети.

7.1. Отдельный серотонинергический нейрон может обеспечить подкрепление в сети избегательного условного рефлекса оборонительного поведения наземного моллюска.

Кластер из около 40 серотонинергических нейронов в ростральной части педального ганглия наземного моллюска *Helix* согласно предыдущим работам принимает участие в модуляции оборонительного поведения, и его наличие необходимо для приобретения аверзивного условного рефлекса

интактными улитками. Локальная экстраклеточная стимуляция серотонинергических нейронов в сочетании с тестовым стимулом вызывала специфичное увеличение (разница между обученными и несочетанным контролем достоверна с уровнем доверия $p < 0.01$) синаптического ответа на тестовые стимулы в премоторных интернейронах оборонительного поведения. Этот результат предполагает участие серотонинергических нейронов в обеспечении подкрепления в сети нейронов оборонительного поведения. Внутриклеточная стимуляция только одного идентифицируемого нейрона Pd4 pedalной группы серотонинергических нейронов, сочетанная с тестовым стимулом, также достоверно увеличивала (разница между обученными и несочетанным контролем достоверна с доверительным уровнем $p < 0.01$) синаптический ответ в тех же премоторных нейронах оборонительного поведения в ответ на парную стимуляцию нервов. Морфологическое исследование кластера pedalных серотонинергических нейронов продемонстрировало, что только нейрон Pd4 посылает свои отростки в нейропиль париетального ганглия, где расположены синапсы между премоторными нейронами оборонительного поведения и пресинаптическими нейронами. Эти данные показывают, что отдельный серотонинергический нейрон может обеспечивать подкрепление в сети оборонительного поведения наземного моллюска. Паттерны активации нейрона Pd4 в ответ на тактильные и химические стимулы также подтверждают это суждение.

В добавление к известным командным нейронам оборонительного поведения, у *Helix* 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 описание модуляторных нейронов. Экстраклеточная стимуляция этих серотонинергических нейронов вызывает кратковременную фасилитацию синаптических ответов и генерирующихся потенциалов действия в запускающих нейронах оборонительного поведения, вызываемых неприятными раздражителями. Индивидуальные серотонинергические клетки отвечают более сильным ответом на ипсилатеральную чем на

контралатеральную стимуляцию и обладают различающимися рецептивными полями (Zakharov et al., 1995). Иммуногистохимические исследования продемонстрировали присутствие серотонинергических терминалей в нейропиле и слое клеточных тел, и облевание ими запускающих командных нейронов в париетальном ганглии, контролирующей оборонительные реакции (Vehovszky et al., 1993), что подразумевает прямое взаимодействие между серотонинергическими и командными нейронами.

Обработка нейротоксином 5,7-дигидрокситриптамин (5,7-DiHT) нейронов улитки *Helix* в высокой концентрации селективно выключает эти серотонинергические нейроны, а также контекстуальные и ассоциативные аверзивные оборонительные рефлексy (Balaban et al., 1987; Zakharov&Balaban, 1991). Предполагается, что серотонинергические модуляторные нейроны могут принимать непосредственное участие в процессе подкрепления, лежащем в основе формирования условного рефлекса.

В данном разделе мы проводим исследование возможного участия целой группы и индивидуальных серотонинергических модуляторных нейронов в обеспечении подкрепления. В модельной ситуации синаптические входы на премоторные нейроны оборонительного поведения сочетались (в контрольных экспериментах явно несочетанные предъявления) с активацией модуляторных клеток. Из экспериментов выяснилось, что экстраклеточная активация группы серотонинергических нейронов может служить подкреплением. Активность одного серотонинергического нейрона может также вызывать подкрепление в сети оборонительного поведения наземной улитки. Паттерны ответов нейрона Pd4 на тактильные и химические стимулы также подтверждают это утверждение.

7.1.1. Условная экстраклеточная активация педальных серотонинергических нейронов может служить подкреплением.

Ранее опубликованные результаты показывают необходимость серотонинергических нейронов для реализации поведенческого привыкания и выработки контекстуального аверзивного условного рефлекса на пищу (Balaban et al., 1987; Zakharov & Balaban, 1991; Balaban & Bravarenko, 1993; Zakharov et al., 1995). 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). В этой работе мы проверяли предположение о том, что серотонинергические нейроны могут обеспечивать подкрепление. Мы проводили эксперименты, в которых ВПСП, вызванные в нейронах оборонительного поведения стимуляцией нервов, сочетались с локальной экстраклеточной стимуляцией серотонинергических нейронов, расположенных в ростральной части ипсилатерального педального ганглия. Следует отметить, что в 12 пилотных экспериментах значительных долговременных или кратковременных эффектов на амплитуду комплексных ВПСП в оборонительных командных нейронах в ответ на экстраклеточную стимуляцию серотонинергических нейронов, располагающихся на краю висцерального и педального ганглиев, не было отмечено.

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. Усредненные данные от 38 экспериментов (Рис. 7.1.1) 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 премоторных командных нейронах между сочетанной и несочетанной группами через 60-100 мин после начала подкрепляющей экстраклеточной стимуляции. Эти результаты подтверждают, что педальные

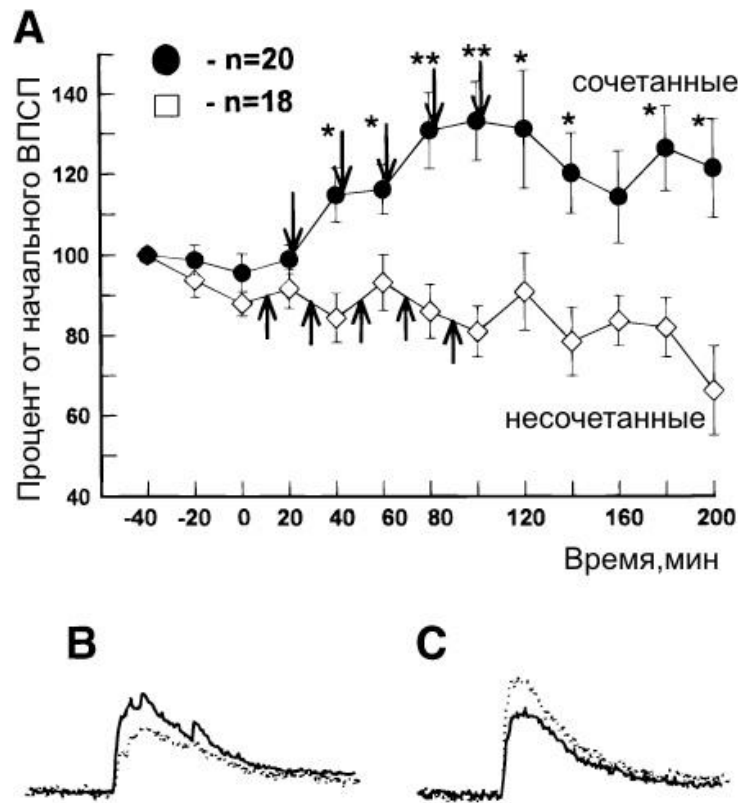


Рис. 7.1.1. (А) Средние изменения (среднее \pm SEM) амплитуды комплексного ВПСП, вызванного в париетальных оборонительных нейронах стимуляцией интестинального нерва в сочетании (темные кружочки) и явно несочетанные (белые кружочки, другие эксперименты) с экстраклеточной активацией (отмечено стрелками) педальных серотонинергических нейронов. Начальный ответ был взят на 100%. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$, критерий суммы рангов Манна-Уитни. (В и С) Примеры ВПСП до (толстая линия) и через 90 мин после начала процедуры обучения (прерывистая линия) показаны для экспериментов с несочетанными предъявлениями (В) и с сочетанными предъявлениями (С). Получено в соавторстве с О.А. Максимовой.

серотонинергические нейроны способны при совпадении стимулов во времени усиливать амплитуду оборонительного условного рефлекса в ответ на стимуляцию нерва. На поведенческом уровне это усиление влечет за собой фасилитацию оборонительной избежательной реакции, наподобие того, что наблюдалось в опубликованных более ранних экспериментах во время контекстуального обуславливания (Balaban & Bravarenko, 1993) и ассоциативного обучения (Balaban et al., 1987).

Эксперименты с использованием экстраклеточной стимуляции, описанные выше, не могут идентифицировать индивидуальные нейроны, вовлеченные в нейромодуляцию или предоставить детальную информацию по клеточным механизмам. Поэтому, мы также использовали внутриклеточную стимуляцию индивидуальных нейронов в ростральной области педального ганглия. Процедура обучения была скорректирована в сторону уменьшения длительности сессии обучения. Тестовые стимулы подавались с 5-ти минутными интервалами до и после сочетания. Увеличение частоты тестового стимула в норме увеличивает уровень привыкания (Balaban & Zakharov, 1992). При частоте 1/5 мин ответ в нейронах париетального ганглия на тестовые стимулы по интестинальному нерву обычно демонстрирует привыкание до 65-70% от первоначального значения (Bravarenko et al., 1995; Malyshev et al., 1997). Сессия сочетанного предъявления состояла из пяти тестовых стимулов с 2-минутными интервалами и пятью «подкрепляющими» внутриклеточными пачками (трейнми) в педальных нейронах (Рис. 7.1.3В), что обеспечило одновременные тестовые стимулы (сочетанная процедура) или стимуляцию в промежутке между стимулами (явно несочетанные предъявления, Рис. 7.1.3А). Амплитуда ВПСП не анализировалась во время сессии обучения (см. интервал на Рис. 7.1.2А и 7.1.3С) потому, что артефакты тетанизации при сочетанном предъявлении маскировали форму ВПСП (Рис. 7.1.2В). «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 сочетанная и одна несочетанная серии.

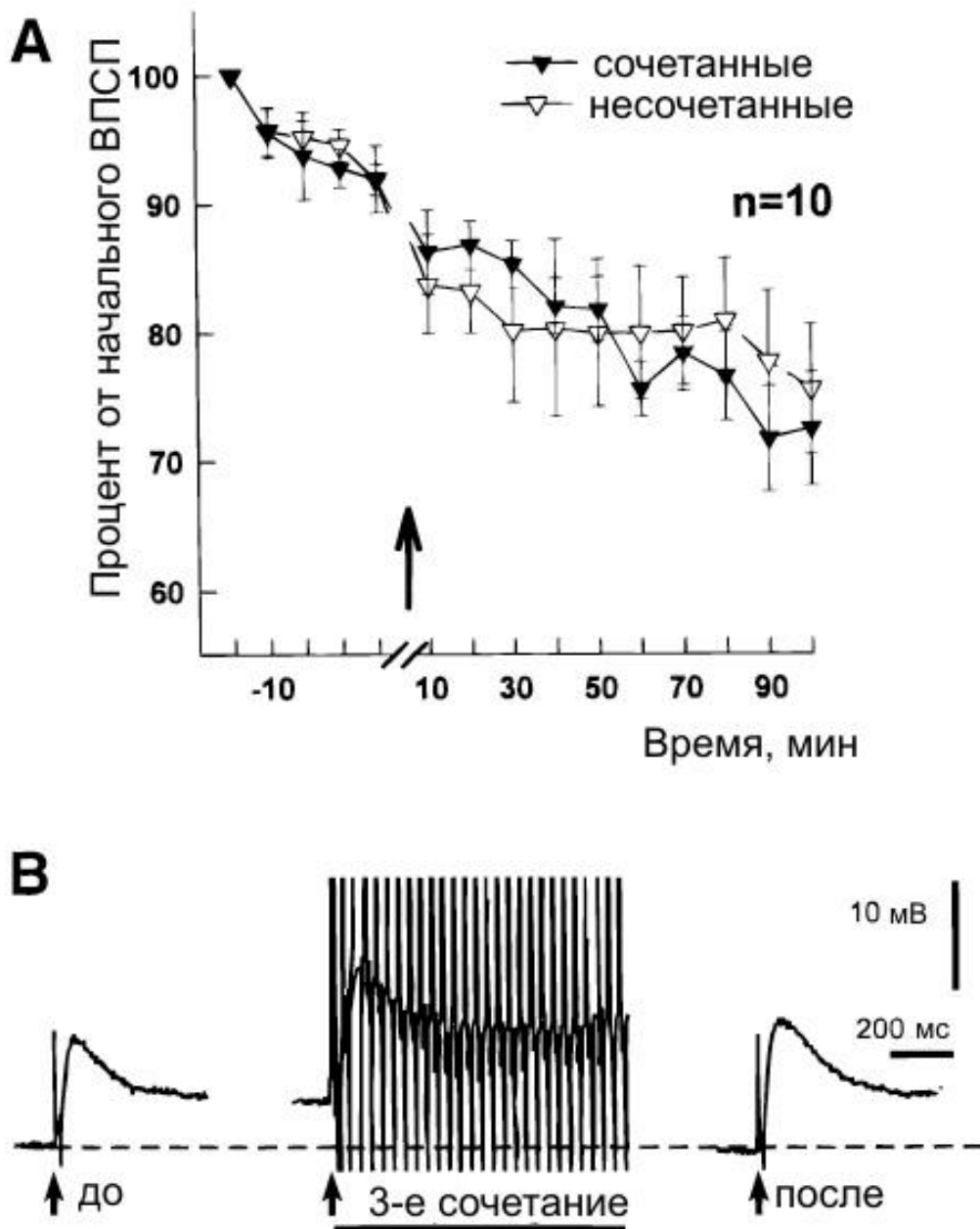


Рис. 7.1.2. (А) Изменения в амплитуде комплексного ВПСП, вызванные в париетальных нейронах оборонительного поведения стимуляцией интестинального нерва в сочетании или явно несочетанные с внутриклеточной активацией педальных серотонинергических нейронов, исключая Pd4 (10 нейронов в 10 разных экспериментах). Начальный ответ во всех экспериментах принят за 100%. Процедура обучения отмечена разрывами на осях и стрелочкой. (В) Пример сочетания тестового стимула, вызывающего ВПСП в париетальных нейронах оборонительного поведения с экстраклеточной тетанизацией. Получено в соавторстве с Н.И. Браваренко.

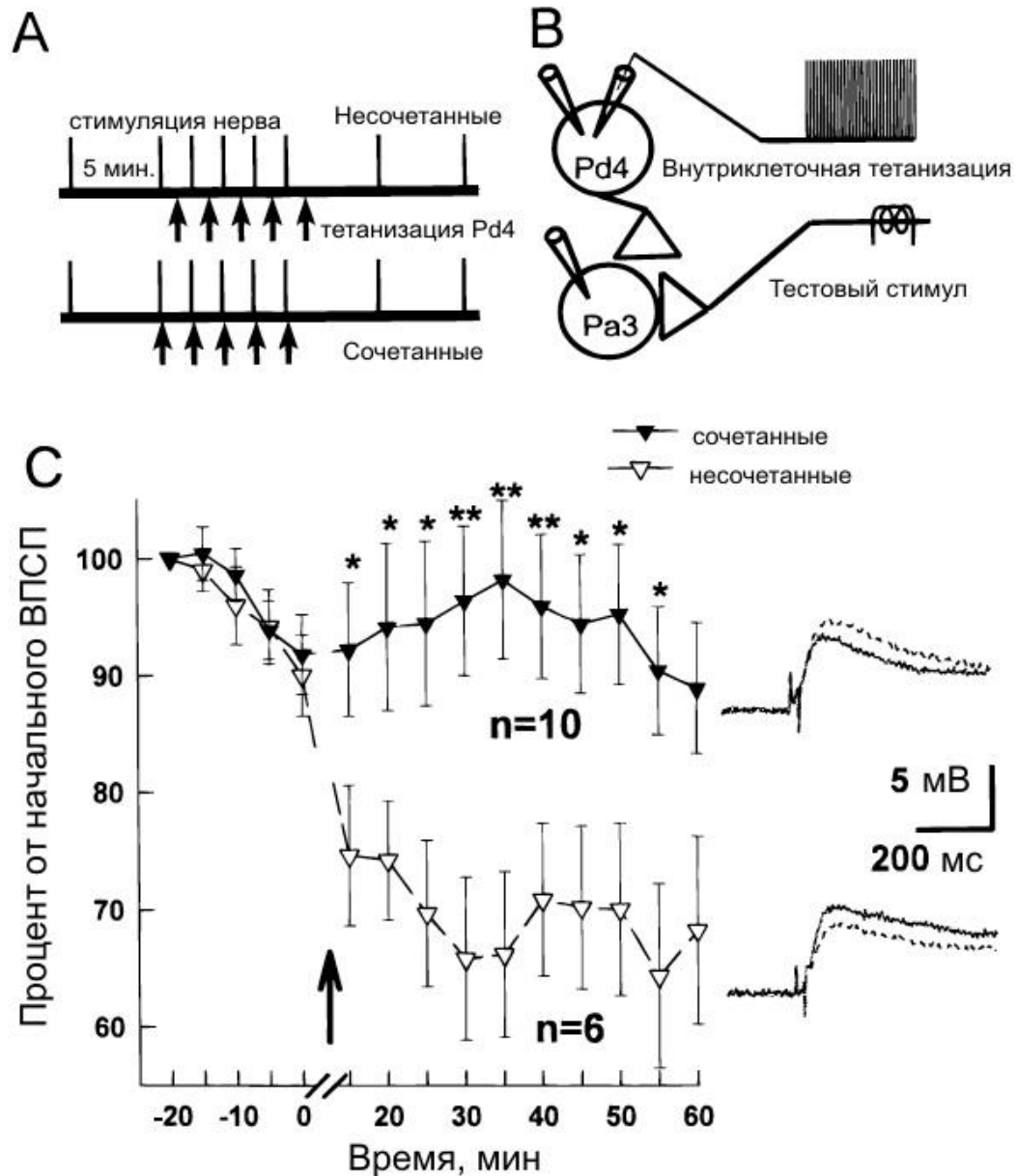


Рис. 7.1.3. Изменения в амплитуде комплексных ВПСР, вызванных в париетальных оборонительных нейронах стимуляцией интестинального нерва в сочетании или явно несочетанные с внутриклеточной активацией нейрона Pd4. (А) Диаграмма эксперимента, (В) схема регистрации и экспериментальной установки, (С) усредненные результаты (среднее \pm SEM), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, критерий суммы рангов Манна-Уитни. Начальный ответ во всех экспериментах принимали за 100%. Процедура обучения отмечена разрывами на осях и стрелочкой. Во вставке показаны примеры ВПСР до (толстая линия) и через 30 мин после (прерывистая линия) процедуры обучения для одного и того же эксперимента. Получено в соавторстве с Н.И. Браваренко.

педальных серотонинергических нейронов регистрировали одним или двумя острыми электродами. Второй электрод в педальном нейроне использовался для внутриклеточной тетанизации или инъекции биоцитина (Рис. 7.1.3В). В большинстве экспериментов процедура обучения повторялась дважды: одна

В сумме, в экспериментах было использовано 27 животных. У 12 экспериментальных животных серотонинергические нейроны были предварительно помечены 5,7-дигидрокситриптамиином (Balaban et al., 1985). Коричневая пигментация, типичная для нейронов, меченых 5,7-дигидрокситриптамиином, позволяла нам быть уверенными, что для экспериментов использовались именно серотонинергические нейроны. Также, в большинстве экспериментов после опыта в нейрон инъецировали биоцитин для последующей реконструкции морфологии зарегистрированной клетки.

Неожиданно, когда подвергали тетанизации малые серотонинергические нейроны или гигантский идентифицируемый серотонинергический нейрон Pd2, не обнаружили значительных модуляторных эффектов (Рис. 7.1.2А). Различия между ответами сочетанной и несочетанной группами было близко к 0 при тестировании 17 улиток и ни разу не превысило стандартную ошибку среднего при усреднении. Только в случае тетанизации нейрона Pd4 в качестве подкрепления мы наблюдали увеличение амплитуды ВПСР во время процедуры сочетания ($n = 10$ животных, Рис. 7.1.3С) по отношению к экспериментам с несочетанной стимуляцией нейронов Pd4 ($n = 6$, те же животные, Рис. 7.1.3С). Значительные различия были отмечены сразу после тетанизации ($p < 0.05$, критерий суммы рангов Манна-Уитни; соответствующие значения сравнивались между группами сочетанных и несочетанных предъявлений). Через тридцать минут после сочетанного предъявления различие было еще более значительным ($p < 0.01$), и до 50-ой минуты различия между сочетанной и явно несочетанной группами оставались достоверными (Рис. 7.1.3.С). В целом, результаты были подобны полученным на экспериментах с экстраклеточной стимуляцией серотонинергических нейронов (Рис. 7.1.1). Таким образом, внутриклеточная стимуляция только нейрона Pd4 может вызвать специфическое (по отношению к сочетанию) увеличение амплитуды

ВПСП в париетальных гигантских нейронах, контролирующим оборонительное поведение.

7.1.2. Морфология серотонинергических нейронов.

Внутриклеточное окрашивание рострального кластера педальных клеток с помощью ионов кобальта (46 нейронов) или биоцитином (32 нейрона) выявило отростки этих клеток, покидающие ганглий через кожные нервы (n. cutaneous). Покрашенные отростки только одного нейрона, Pd4, были замечены в нейропиле париетального ганглия, где также находятся протяженные ветвления премоторных нейронов оборонительного поведения (Рис. 7.1.4С), также как и пресинаптических нейронов, посылающих отростки в интестинальный нерв (Arakelov et al., 1991).

Используя метод окрашивания путем ретроградного транспорта ионов кобальта, мы обнаружили нейроны, посылающие аксоны из педального ганглия в нейропиле париетального ганглия. Окрашивание через париетоплевральную комиссуру позволило надежно выявить педальные серотонинергические нейроны Pd4, а также один или два случайных маленьких нейрона ростральной части педального ганглия, и пару крупных идентифицируемых несеротонинергических нейронов (Рис. 7.1.4А). Принимая во внимание то, что только отростки нейронов Pd4 перекрываются с предполагаемыми местами разветвлений синаптической специализации гигантских (командных) нейронов в нейропиле париетального ганглия (Рис. 7.1.4В и 7.1.4С), будет разумно предположить, что основной вклад в значительные изменения амплитуды синаптических входов на командные нейроны принадлежит нейрону Pd4. Также следует отметить, что нейроны Pd4 могут быть идентифицированы у эмбрионов улиток на финальной стадии развития, когда эмбрионы уже могут демонстрировать ответы на неприятные раздражители.

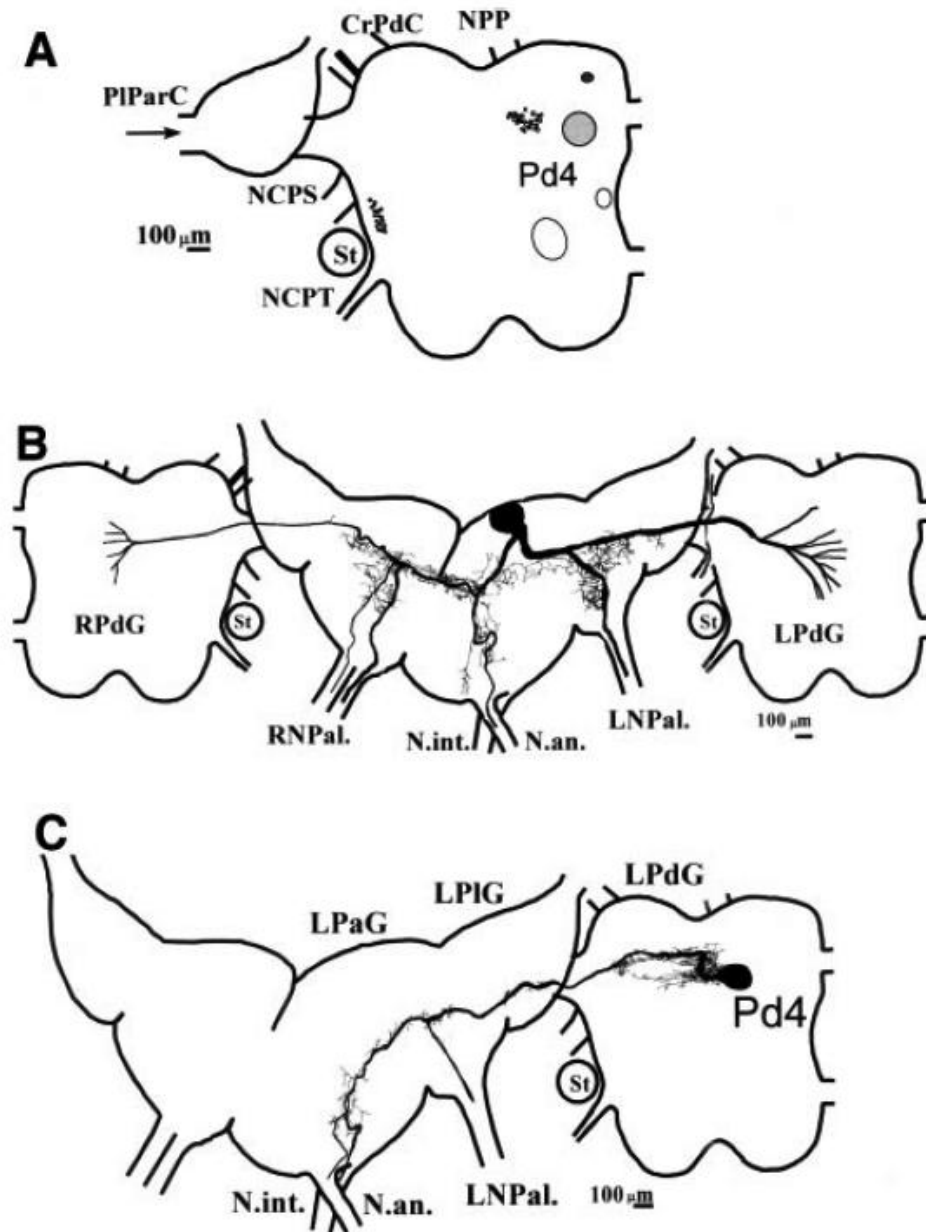


Рис. 7.1.4. Морфология париетальных и педальных нейронов. (А) Расположение клеток, выявленное кобальтовым окрашиванием через плевропариетальную коннективу (PIParC). Черные кружочки - клетки, помеченные пигментным окрашиванием с помощью 5,7-дигидрокситриптамина; белые кружочки - несеротонинергические клетки. (В) Распределение ветвей париетального оборонительного нейрона №3 (его активация вызывает закрытие пневмостома и втягивание тела), выявленное внутриклеточной инъекцией кобальта. (С) Расположение ветвей нейрона Pd4, выявленное внутриклеточной инъекцией кобальта. Следует особо отметить перекрытие отростков гигантского париетального нейрона и Pd4 в области нейропиля париетального ганглия. Получено в соавторстве с В.Н. Иерусалимским.

7.1.3. Участие нейронов Pd4 в контроле оборонительного поведения.

Из предыдущих работ известно, что клетки, расположенные в медиорастральной части педального ганглия, содержат серотонин (Sakharov, 1974; Valaban et al., 1985; Zakharov et al., 1995). Также было показано, что распределение серотонин-содержащих нейронов в центральных ганглиях *Helix*, полученное с помощью прижизненной пигментации нейротоксином 5,7-дигидрокситриптамиином, совпадает с распределением, полученным методом иммунохимического окрашивания. Для данного исследования наиболее важным является тот факт, что пигментно-окрашенные клетки демонстрируют иммунореактивность на серотонин (Hernadi et al., 1989). Схематическое расположение серотонинергических нейронов, полученное этими двумя методами (по нашим и литературным данным) показано на Рис. 7.1.5А. В ростральной части педального ганглия располагаются только серотонинергические нейроны. В каждом педальном ганглии находится примерно 40-50 серотонинергических нейронов в ростральной части и несколько небольших кластеров на вентральной стороне. Эта область была единственной, с которой было возможно эффективно вызывать фасилитацию оборонительного ответа путем экстраклеточной стимуляции (Zakharov et al., 1995). Эти результаты свидетельствуют о том, что специфические сочетанные эффекты экстраклеточной стимуляции педальных клеток на синаптические входы командных нейронов оборонительного поведения имеют под собой в качестве причины воздействие серотонинергических нейронов.

Используя потенциал-зависимые красители и фотодиодную матрицу, мы экспериментально охарактеризовали спонтанную и вызванную активности ростральной серотонинергической группы в педальном ганглии целиком ($n = 12$ экспериментов, более 480 зарегистрированных нейронов). Во всех экспериментах серотонинергические нейроны были помечены пигментно с помощью 5,7-дигидрокситриптамиина, поэтому имелась возможность фокусировать объектив на большинстве этих нейронов и сохранять данные видеорегистрации в видеофайл. Большинство ($76 \pm 5\%$) зарегистрированных пигментно-окрашенных нейронов ростральной части

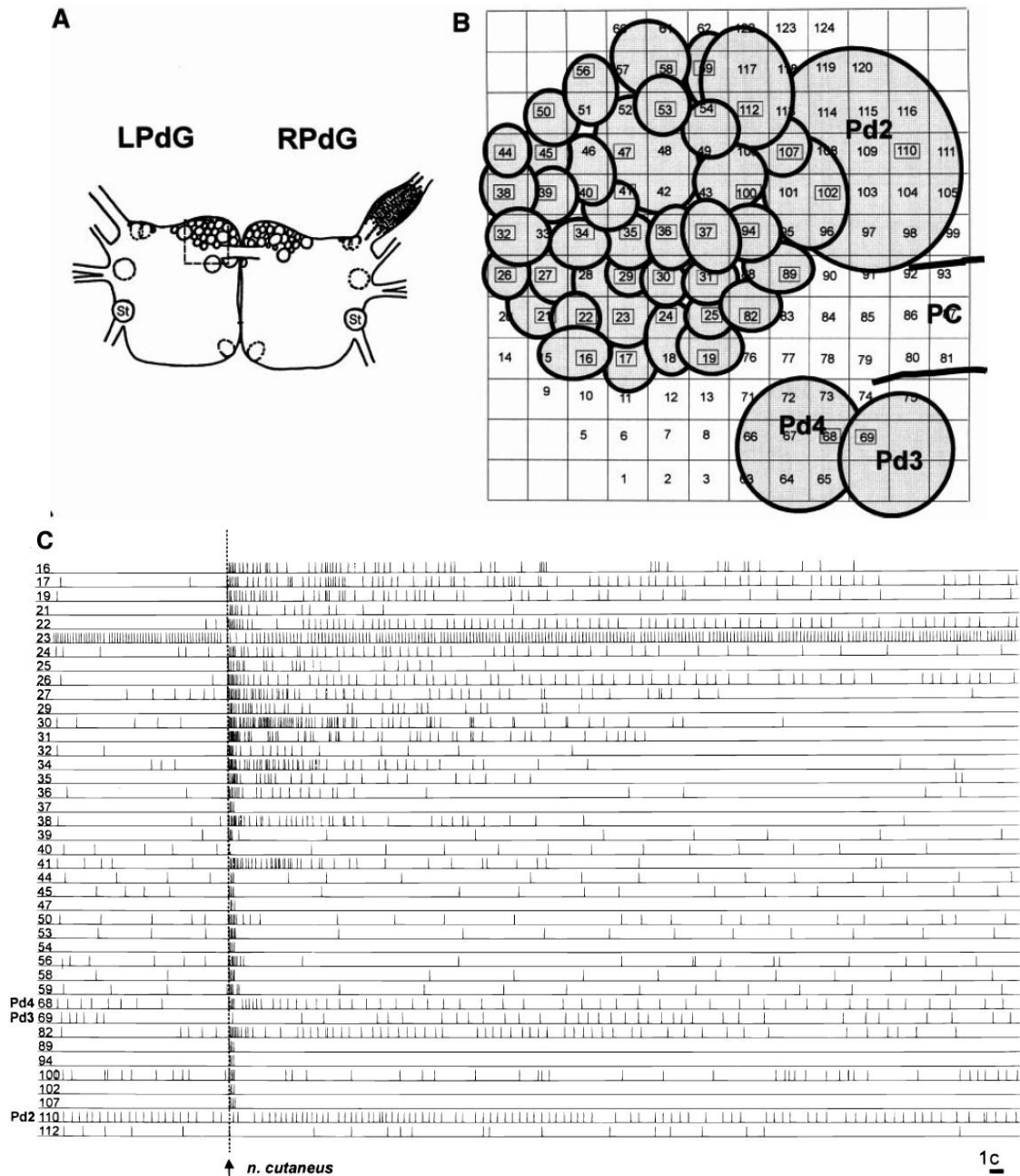


Рис. 7.1.5. Оптическая регистрация pedalных серотонинергических нейронов с использованием потенциал-зависимого красителя RH155. (А) Карта размещения серотонинергических нейронов на дорзальной поверхности pedalного ганглия. Большой квадрат – область оптической регистрации. (В) Реконструкция размеров и расположения клеток, зарегистрированных оптически (активность показана на С) и спроецированных на фотодиодную матрицу. (С) Растерная диаграмма спонтанной спайковой активности в серотонинергических нейронах в ответ на стимуляцию нерва (стрелка). PC – pedalная комиссура; St – статоцист; L – левый; RPdG – правый pedalный ганглий.

педального ганглия были спонтанно активны. В эксперименте, представленном на Рис. 7.1.5B и 7.1.5C, активность 41 серотонинергического нейрона, пигментно-помеченных с помощью 5,7-дигидрокситриптамина, были зарегистрированы от области, содержащей около 60 нейронов, доступных для оптической регистрации. Каждая спайковая осциллограмма на Рис. 7.1.5C представляет собой активность одного индивидуального нейрона. Локализация каждого нейрона была установлена с помощью программы для оптической регистрации, оценивающей размер каждого нейрона, и с помощью видеосъемки. Следует отметить, что использование абсорбционного красителя не позволяло нам различать дорсальную и вентральную локацию более мелких нейронов. Тридцать восемь нейронов, зарегистрированных в этом эксперименте, реагировало на стимуляцию второго кожного нерва, демонстрируя спайковую активность (Рис. 7.1.5C). Клетка № 23 демонстрировала временно вытормаживание спонтанной активности. Клетки № 40 и 112 (номера соответствуют центральному фотодиоду) демонстрировали изменения активности менее чем на 20% от начального значения. Подобные результаты были получены и в других 11 экспериментах. В 4-ех из 12-ти экспериментов спонтанная пачечная активность зарегистрированных серотонинергических нейронов прослеживалась достаточно четко.

Оптическая регистрация активности как минимум 70% клеток кластера ростральных серотонинергических педальных нейронов подтвердила предположение, возникшее из электрофизиологических экспериментов, о том, что эти нейроны отвечают спайковым разрядом на стимуляцию второго кожного нерва, проводящего неприятную, болевую чувствительность от кожи (Balaban & Zakharov, 1992). Ранее было продемонстрировано, что некоторые педальные серотонинергические нейроны на полуинтактном препарате отвечают на короткий (длительность ~0.1 с) тактильный стимул путем повышения спонтанного разряда на период длительностью как минимум 10 секунд (Zakharov et al., 1995). Оптическая регистрация изолированной ЦНС позволила нам провести количественную оценку, показавшую, что $54 \pm 6\%$ (12 экспериментов, 480 нейронов) записанных клеток увеличивали частоту своих спонтанных разрядов в ответ на стимуляцию кожного нерва на протяжении как минимум 10 секунд, что

соответствуя критерию увеличения начальной частоты разряда на 20% (21 из 41 нейронов, Рис. 7.1.5С). Нейрон Pd4 демонстрировал типичное для представителя группы поведение (Рис. 7.1.5С, детектор №68).

В ответ на первую тактильную стимуляцию в серии регулярно подававшихся тактильных стимулов с межстимульным интервалом 20 с, нейрон Pd4 (зарегистрированный внутриклеточно на полуинтактном препарате) демонстрировал значительное увеличение фоновой спайковой активности. Максимальная частота ответа нейрона Pd4 коррелировала с максимальным ответом в командных нейронах оборонительного поведения. Интересно, что уменьшение частоты спайкового разряда Pd4 соответствовало по времени снижению числа спайков в командном нейроне.

Внутриклеточная активация нейрона Pd4 сильным током на изолированной ЦНС (результаты от семи препаратов) вызывала продолжительную деполяризацию и появление потенциалов действия, а также характеристический вид электротонического сопряжения. Следует отметить, что электрически связанные нейроны были ранее описаны в педальном серотонинергическом кластере (Zakharov et al., 1995). Этот результат подразумевает возможную позитивную обратную связь в сети, в которую также входит нейрон Pd4.

Большую важность могло бы определить то, влияет ли подавление спонтанной активности в нейроне Pd4 на активность сети оборонительного поведения. К сожалению, париетальные командные нейроны обладают высоким порогом инициации потенциала действия и обычно находятся в молчащем состоянии. Мы не смогли отметить какие-либо изменения в мембранном потенциале или ответах на слабые стимулы по нерву (которые не вызывали сенситизации) в этих нейронах после гиперполяризации нейрона Pd4 (четыре эксперимента, данные не показаны). Мы не пробовали применять более сильные стимулы по нерву как тестирующие потому, что это активирует целую группу серотонинергических нейронов, и трактовки каких-либо изменений одновременно с гиперполяризацией Pd4 были бы арбитранными: изменения могли бы произойти из-за отсутствия спайков в нейроне Pd4, или же из-за депрессии активности в электрически сопряженных нейронах.

В пяти экспериментах мы пробовали найти эффекты долговременной (минуты) гиперполяризации ипсилатерального нейрона Pd4 на спонтанную активность гигантского плеврального нейрона, входящего в группу командных оборонительных нейронов, контролирующих втягивание головы (Balaban, 1979). Плевральные нейроны в этих экспериментах демонстрировали спонтанную активность низкого уровня. Прекращение гиперполяризации нейрона Pd4 вызывало появление спайков в нейронах оборонительного поведения, а деполяризация вызывала дополнительные спайки в нейроне Pd4 и в плевральных оборонительных нейронах. Этот результат был повторен во всех пяти экспериментах, где присутствовала начальная спонтанная активность в плевральных нейронах, что предполагает участие нейрона Pd4 в поддержании определенного уровня возбудимости в группе нейронов оборонительного поведения. Мы также не можем исключить влияние других серотонинергических нейронов, посылающих отростки в плевральные ганглии или образующих электрические связи с нейроном Pd4.

Изложенные выше наблюдения об ответах нейрона Pd4 на неприятные тактильные раздражители (Рис. 7.1.4С и 7.1.5А) соответствуют предполагаемой роли Pd4 в фасилитации избегательных рефлексов. Чтобы узнать, может ли воздействие других классов неприятных и нейтральных стимулов также активировать Pd4, мы проверяли эффект химической стимуляции (приятная – пища, неприятная – жидкость с хинином) на активность нейрона Pd4. Педальные нейроны обычно не отвечают значительным (более 20% от начального значения) увеличением разряда на аппликацию пищевых стимулов на губы на полуинтактных препаратах (6 животных, средняя частота разряда после аппликации стимула была $112 \pm 8\%$ от первоначальной). Зарегистрированные одновременно (как контроль состояния препарата) гигантские метациеребральные нейроны №1 отвечали на те же стимулы значительным увеличением частоты спонтанного спайкования. Аппликация на губы хинина, известного тем, что он вызывает оборонительную реакцию у *Helix*, вызывала хорошо различаемый разряд на всех исследованных семи препаратах. Среднее увеличение по отношению к престоимой частоте составило для нейрона Pd4 $480 \pm 54\%$ ($n = 7$; частота измерена 40 с до и через 40 с после начала аппликации стимула). Таким

образом, нейрон Pd4 отвечал разрядом на неприятные химические и тактильные раздражители, и не отвечал на нейтральную стимуляцию пищей, что подтверждает предположение о его участии в модуляции оборонительного поведения.

7.2 Структурно-функциональная организация сети серотонинергических нейронов наземной улитки.

Расширение и углубление наших представлений о том, как работает мозг, требует постоянного совершенствования методов отведения активности и увеличения числа одновременно регистрируемых нейронов для лучшего понимания коллективной работы нейронных сети и ансамблей нервной системы. Классические методы электрофизиологического исследования позволяют точно регистрировать как активность отдельных 2-5 нейронов для исследования мембранных потенциалов, токов и моносинаптических связей непосредственно внутриклеточным отведением, или же смешанную спайковую активность групп клеток или суммарные потенциалы экстраклеточным отведением с большим усилением и последующей дискриминацией сигнала с потерей деталей динамики мембранного потенциала. В нашей работе мы зарегистрировали активность компактной группы серотонинергических нейронов (до 56 одновременно) в ганглии наземного моллюска с использованием метода оптической регистрации, позволяющего наблюдать потенциалы действия нейронов, регистрировать их параметры, а также определять морфологию и положение нейронов. Мы выявили четкую кластеризацию в группе по динамике и наличию фазных и тонических составляющих в реакции нейронов на электрические и тактильные стимулы. Также мы показали, что идентифицируемый нейрон Pd2 может вызывать активацию значительного числа нейронов группы, в то время как нейрон Pd4 не вызывает такой активации, однако его реакция отставлена по времени от активации основной группы. Эти данные подтверждают предположение о возможности делегирования сетью одному нейрону интегративной функции.

Количество нейронов в мозге может составлять от 10-100 тысяч у простых животных (Gelperin & Tank 1990, Zaitseva 1991), и у высших

млекопитающих и человека доходить до 10^{11} (Williams & Harrup 1988), поэтому получение более детализованной информации особенно важно для построения максимально правдоподобной модели работы головного мозга и его отделов. Нервные системы брюхоногих моллюсков, содержат относительно небольшое число нейронов, многие из которых можно идентифицировать, а в сравнении с поведением млекопитающих поведение беспозвоночных довольно просто и стереотипно. Однако уже сейчас ясно, нервные системы простых животных не столь просты, и поведенческие акты беспозвоночных нельзя целиком свести к активности отдельного идентифицируемого нейрона или малой группы, доступной для внутриклеточного микроэлектродного отведения (Zacevic et al. 1989). На морских моллюсках *Aplysia* с использованием оптической регистрации потенциалов показано, что простейший рефлекс втягивания жабры в ответ на раздражение сифона задействует не менее половины нейронов абдоминального ганглия моллюска, а для воссоздания динамической кривой втягивания, необходимо сложить активность не менее 40 нейронов, активных в разные фазы сокращения (Zochowski et al., 2000). Мы использовали в работе подобную оптическую регистрацию активности нейронов, окрашенных витальным потенциал-зависимым красителем, апплицированным на ЦНС. Оптические методы регистрации потенциала успешно применялись для картирования колонок дирекционной избирательности *in vivo*, мониторинга эпилептиформной активности нейронных ансамблей в коре млекопитающих (Leike et al. 1989), одновременной регистрации спайковой активности многих нейронов в ганглии беспозвоночных, регистрации суммарного потенциала действия в нервах и комиссурах беспозвоночных (Cohen 1989), активности в обонятельном пути позвоночных (Cinneli & Kauer 1992), моллюсков (Delaney et al. 1994).

Моллюски часто служат оптимальной моделью для изучения работ нервных сетей благодаря их относительной простоте и меньшему числу хорошо идентифицируемых и доступных для регистрации нейронов. У наземного моллюска *Helix* известны преоторные командные нейроны оборонительного поведения (Balaban 1979), запускающие ясно различимый поведенческий акт, а также серотонинергические интернейроны,

модулирующие работу нейронных сетей оборонительного поведения (Zakharov et al. 1995). Ростро-медиальная серотонинергическая группа включает в себя около 100 нейронов, расположенных плотной группой в ростральной части правого и левого педальных ганглиев (Zakharov et al. 1995). Активация серотонинергических нейронов этой группы не запускает ясно выраженных форм поведения, однако модулирует поведенческие ответы на болевые раздражители. Стимуляция некоторых нейронов группы вызывает кратковременную фасилитацию синаптических потенциалов и облегчает возникновение потенциалов действия у командных нейронов оборонительного поведения (Balaban 2002). На основе исследования морфологии отростков и электрической активности этих нейронов высказано предположение, что серотонинергический (СЭ) нейрон Pd4 является выходным элементом сети СЭ нейронов, а другие нейроны ростромедиальной группы каким-то образом делегируют ему свои полномочия (Balaban et al., 2001).

Несмотря на растущее число данных, указывающих на участие серотонинергических нейронов ростромедиальной группы в оборонительном поведении, и экспериментальные свидетельства того, что в группе возможно делегирование функций отдельному нейрону сети, практически отсутствуют прямые данные о взаимодействии нейронов и внутренней активности в группе, необходимые для активации нейрона Pd4. В нашей работе мы выявляли структурно-функциональную организацию сети серотонинергических нейронов методом высокоскоростной оптической регистрации с использованием потенциал-зависимых красителей и пространственным разрешением, соответствующим размеру минимального нейрона группы.

7.2.1. Ответы нейронов ростромедиальной группы на электрическую стимуляцию n. cutaneus II.

На препарате изолированной ЦНС большинство серотонинергических нейронов ростромедиальной группы демонстрирует устойчивую спонтанную активность. С объективом ЛК х25 на различных препаратах регистрировали одновременно 24-56 отдельных нейронов, из

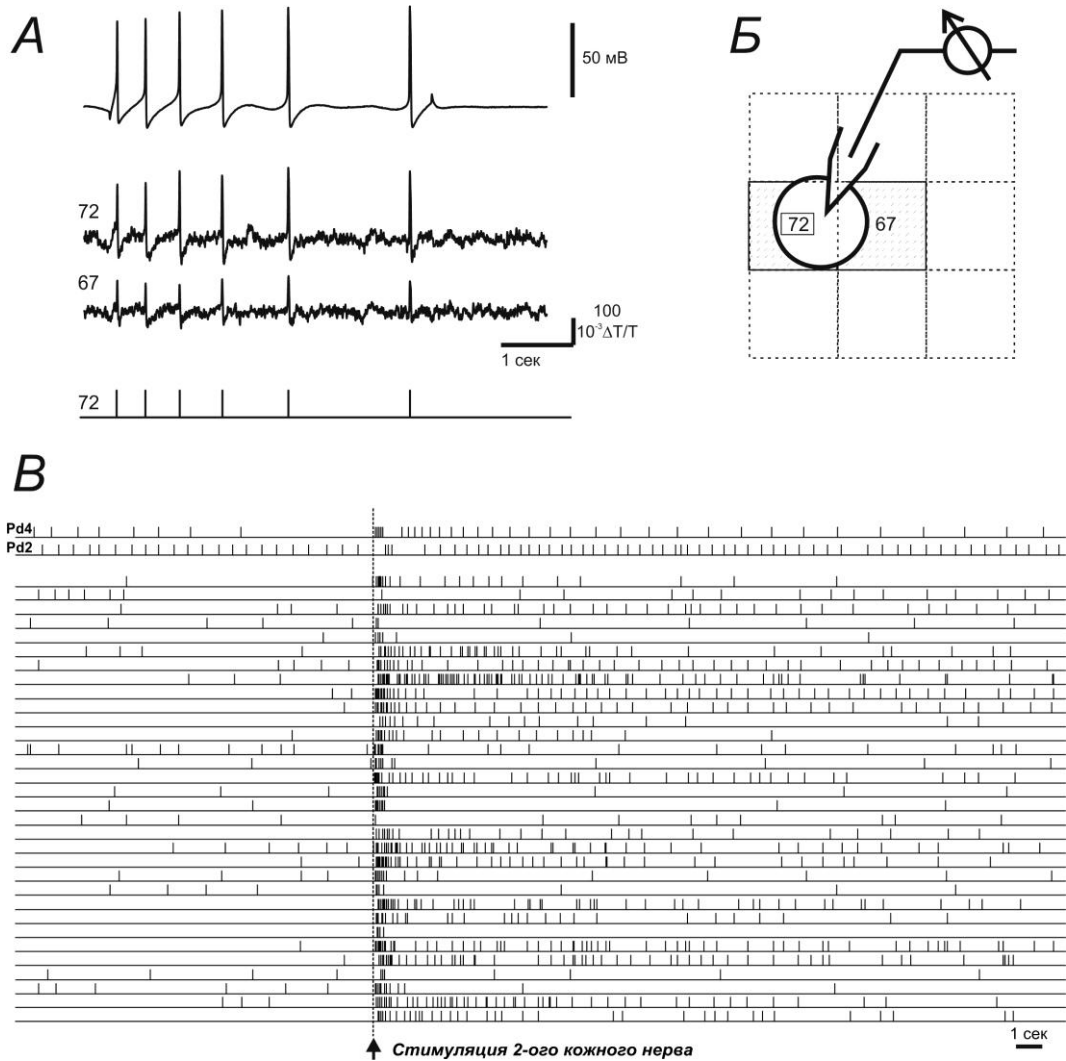


Рис. 7.2.1. Выделение спайковой активности отдельных нейронов по записям оптической регистрации с использованием потенциал-зависимого красителя. А – сопоставление внутриклеточного электрофизиологического отведения потенциала острым электродом (верхняя осциллограмма) с оптической регистрацией нейрона на двух каналах «72» и «67». Нижняя диаграмма показывает результат обработки спайковой активности нейрона в виде палочек, соответствующих каждому спайку этого нейрона. Б – Схема регистрации нейрона, активность которого представлена на «А». Контур нейрона занимает два канала «72» и «67». В – пример результата обработки многоклеточной активности многих нейронов одновременно на фоне стимуляции кожного нерва, вызывающей ответ этих нейронов.

которых 95-100% идентифицировали как серотониновые. Средняя частота спайков в отсутствие стимуляции варьирует в пределах 0-3 Гц. Стимуляция кожного нерва (n. cutaneus II) вызывала изменение активности в более чем половине нейронов ростромедиальной группы. Обычно спайковый разряд сочетался с подавлением и/или увеличением спонтанной активности (Рис. 7.2.1Б). В части нейронов группы также, по-видимому, регистрировался антидромный спайк. По характеру ответа реагирующие нейроны группы можно было разбить на следующие кластеры (Рис. 7.2.1Б):

реагирующие фазической реакцией, демонстрирующие разряд, длящийся 2-10 сек после начала стимуляции, заканчивающийся через 5-10 сек (располагаются преимущественно медиально, вблизи Pd2); тоническая реакция (в группе нейроны располагаются преимущественно латерально); смешанная фазно-тоническая реакция

На нескольких препаратах общий ответ на стимуляцию нерва был слабым, и выделить группы нейронов не представлялось возможным. Ответ группы фазических нейронов иногда происходил не однократно, а повторялся в виде нескольких фаз (см. пример на Рис. 7.2.3). В этих случаях повторяющаяся волновая активность в ответ на стимуляцию была наиболее выражена в медиальной части группы, и наименее – в латеральной (Рис 7.2.3). На препаратах также определяли гигантские идентифицируемые нейроны росто-медиальной группы (Pd1, Pd2, Pd4) по их расположению и характеру спонтанной и вызванной активности (Рис 7.2.1-3). Реакция нейрона Pd4 на стимуляцию нерва не сильно отличалась от реакции остальных нейронов группы (Рис 7.2.1, 7.2.2). У нейрона Pd2 наблюдалось отсутствие реакции или даже подавление активности (Рис. 7.2.1, 7.2.2). Впоследствии также проводили эксперименты по внутриклеточной стимуляции нейронов Pd2 и Pd4 с одновременной оптической регистрацией нейронов всей группы.

обработки. Каналы, соответствующие активности каждого определенного нейрона обведены прямоугольником. На схеме отмечены идентифицированные нейроны Pd1 и Pd2. РС –педальная комиссура. В – обработанные результаты активности нейроном ростромедиальной группы в ответ на стимул. Сверху показана активность идентифицированных нейронов. Неидентифицированные нейроны, располагающиеся более медиально (отмечены на «Б» белыми кружками) демонстрируют выраженный фазический ответ, в то время как нейроны латерального положения (отмечены на «Б» серыми кружками) демонстрируют более выраженную тоническую реакцию.

7.2.2. Ответы нейронов ростро-медиальной группы на тактильную стимуляцию кожи ноги

Стимуляция кожи ноги на полуинтактном препарате вызывала реакцию только в небольшой части нейронов педального ганглия. На 5 препаратах от 3 до 8 нейронов, фазически разряжающихся на нанесение тактильного стимула на кожу полуинтактного препарата. Первые спайки в ответ на стимул появлялись с латентностью от 2 до 4 секунд, и разряд длился не менее 5 секунд. Анализ фоновой активности и ее изменения провести не представлялось возможным, так как на препарате с интактной кожей ноги и сохраненной иннервацией, в отличие от препаратов изолированной ЦНС, фоновая активность во многих нейронах была слабой, а число зарегистрированных нейронов меньше, чем на изолированных препаратах. На повторное нанесение тактильного стимула той же интенсивности в ту же точку наблюдали активацию одного и того же числа клеток ($n = 5$ препаратов). Отмечено два случая, когда на первое предъявление ответа нейронов не наблюдали, а на второе предъявление появлялся спайковый разряд (Рис. 7.2.4). На последовательную стимуляцию трех точек, лежащих на одной прямой, регистрировали активацию одной и той же группы клеток ($n = 4$ препарата). В одном случае (из 4) стимуляция одной точки не вызывала реакции, а последующие две стимуляции вызывали фазический разряд группы нейронов. 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

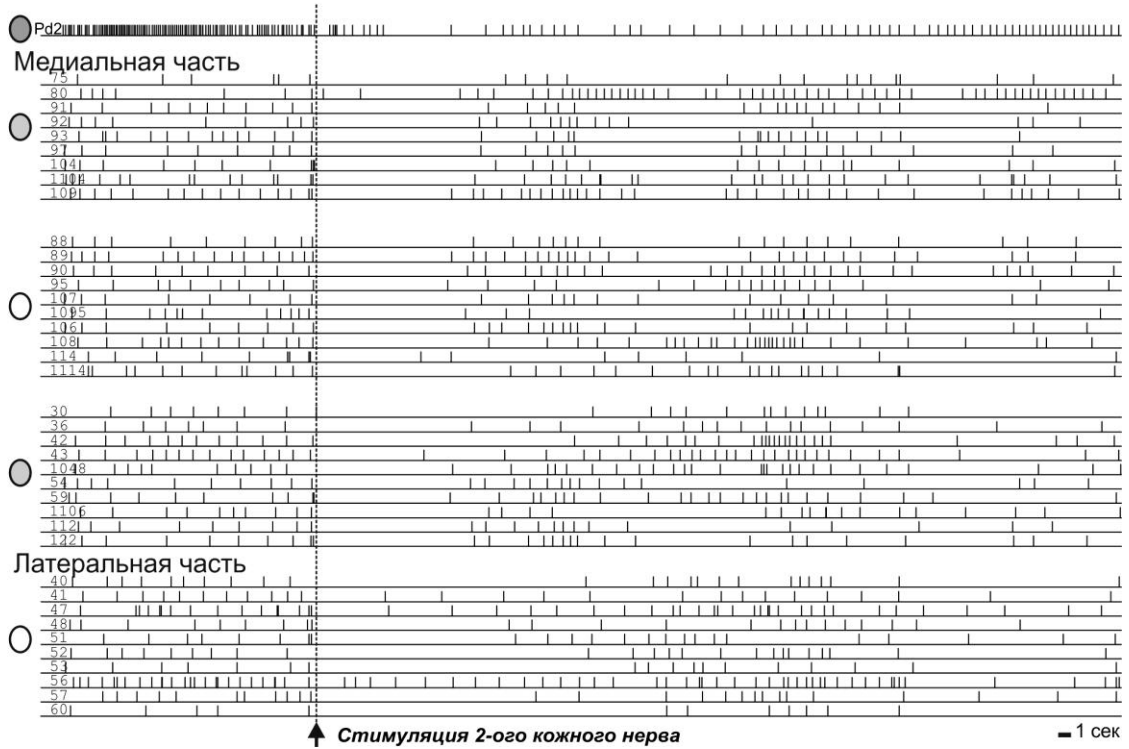
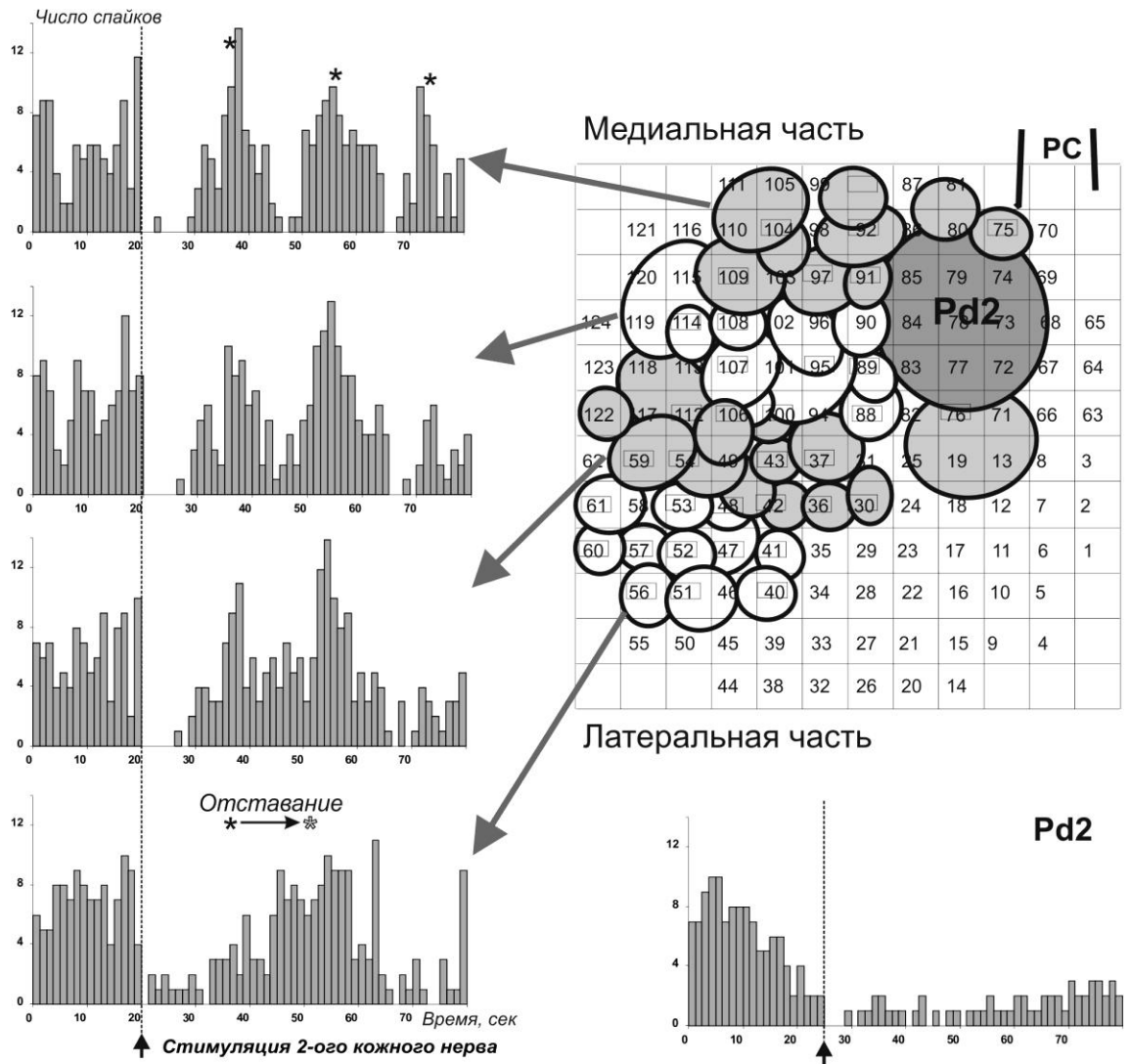


Рис. 7.2.3. Пример возникновения волновой активности медиальных нейронов ростро-медиальной группы в ответ на стимуляцию нерва. На диаграмме матрицы справа все зарегистрированные неидентифицированные нейроны разбили на четыре полосы в направлении от наиболее медиальной части к наиболее латеральной части. Стрелками показаны диаграммы суммарной спайковой активности соответствующей полосы нейронов и диаграмма активности Pd2. Снизу представлены детальные спайковые диаграммы активности каждого из соответствующих нейронов от медиальной части до латеральной части группы.

(Рис. 7.2.1Б). По положению в ганглии, форме сомы и характеру активности нейрон идентифицировали как Pd4.

7.2.3. Ответы нейронов ростро-медиальной группы на стимуляцию идентифицируемых нейронов Pd2 и 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 наблюдали длительное увеличение спонтанной активности нейронов группы, хорошо выраженное на протяжении первых 10-25 секунд после стимуляции, но также иногда длящееся до 60-65 секунд ($n = 5$ препаратов, 102 нейрона). Более длинных записей, чем 60-65 секунд после стимуляции (+10-15 сек до стимуляции), не производили ввиду аппаратного ограничения на запись большего объема данных. Характер ответа на стимуляцию Pd2 на разных препаратах и на разных записях с повторной стимуляцией одного препарата варьировал, но увеличение активности в каждом случае было значительным (Рис. 7.2.4). На примере на Рис. 7.2.4А усредненная диаграмма по пяти записям одного препарата демонстрирует, что изменения активности нейронов статистически достоверны (ANOVA, $p < 0.05$). При усреднении по всем препаратам, повышение активности нейронов в ответ на стимуляцию Pd2 статистически недостоверно (ANOVA, $n=5$ препаратов, 102 нейрона, $p = 0.12$), и присутствует только тенденция к повышению спайковой активности, что можно объяснить разницей активности серотонинергических нейронов на разных препаратах.

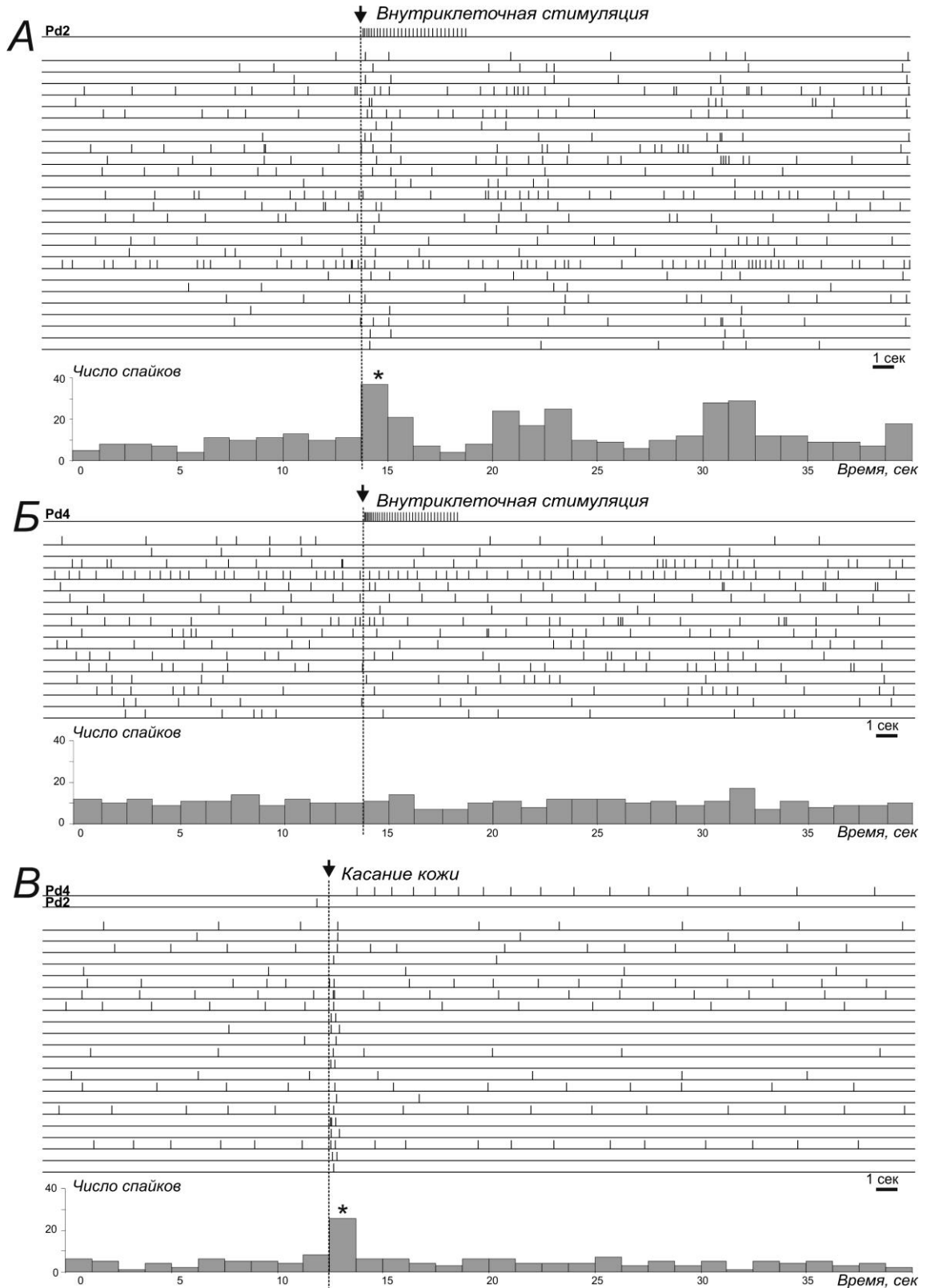


Рис. 7.2.4. Реакция нейронов ростромедиальной группы на стимуляцию идентифицированных нейронов Pd2 (А), Pd4 (Б) и стимуляцию кожи ноги (В). Снизу под каждой диаграммой нейронной спайковой активности приведена диаграмма суммарной спайковой активности группы.

7.2.4. Реакция нейронов ростромедиальной группы на серотонин

Аппликация серотонина на препарате изолированной ЦНС в общем случае вызывала активацию большинства нейронов ростромедиальной группы, выражавшуюся в учащении фоновой спайковой активности, или же появление активности ранее не регистрировавшихся нейронов (6 препаратов, пример на Рис. 7.2.5). В двух экспериментах в ответ на серотонин наблюдали в части медиально расположенных нейронов группы расширение спайка в 1.51 ± 0.23 раза, пропадавшее после отмыва серотонина (Рис. 7.2.5Б, В). В группе с расширением спайка наблюдали учащение частоты спонтанной спайковой активности в 1.41 ± 0.12 раза (118 нейронов, 6 препаратов). В группе с отсутствием расширения спайка не наблюдали учащения (изменение частоты в 0.98 ± 0.11 раз, 87 нейронов (6 препаратов)). Следует отметить, что расширение спайка не наблюдали ни у одного из гигантских идентифицируемых нейронов Pd1, Pd2, Pd4.

7.3. Фазозависимая координация двух моторных программ в буккальном ганглии крылоногого моллюска.

Ритмическая активность двух независимых структур пищевого аппарата *Clione limacina* - радулы и крючков - координируется нейронными сетями буккального ганглия в ходе пищевого поведения. Оптическая регистрация активности нейронов буккального ганглия, которая позволяет одновременно регистрировать большое количество нейронов, показала, что активность всех нейронов, разряжающихся залпами, можно отнести только к двум фазам одного ритма. Вместо теоретически возможных четырех фаз нейронной ритмической активности во всех экспериментах регистрировалась двухфазная активность, даже при электрической стимуляции церебро-буккальной коннективы, запускающей ритмические движения пищевого аппарата на препарате. Полученные данные указывают на фазозависимую координацию двух независимых ритмических пищедобывательных движений у клиона.

Синергичная координация активности нейронных сетей, контролирующая различные аспекты одного и того же сложного поведения

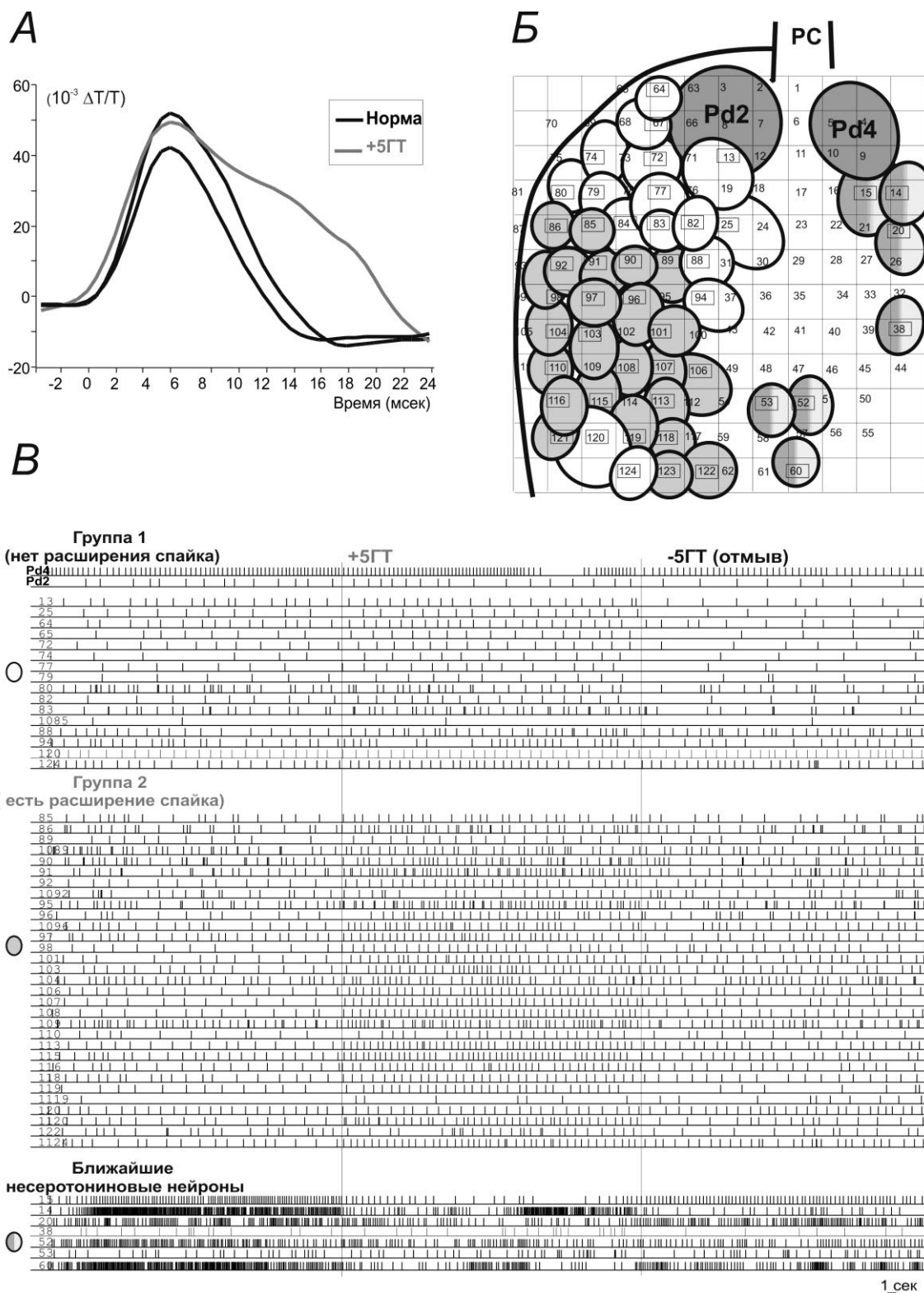


Рис. 7.2.5. Реакция нейронов ростромедиальной группы на серотонин. А – Форма спайка у нейронов группы 2 в которой присутствовало расширение спайка непосредственно после аппликации (+5ГТ, серая линия) по сравнению с контролем до аппликации и после отмыва серотонина (черные линии). Б – Диаграмма регистрирующей матрицы с нанесенными сверху контурами зарегистрированных нейронов. Белые кружки – нейроны ростромедиальной группы у которых

отсутствует расширение спайка в ответ на серотонин, серые кружочки – нейроны ростро-медиальной группы, у которых присутствует расширение спайка, серо-темные кружочки – ближайшие несеротониновые нейроны. Также обозначены идентифицируемые нейроны Pd2 и Pd4. В - детальные спайковые диаграммы активности каждого из нейронов ростромедиальной серотониновой группы и ближайших нейронов, не демонстрировавших окраски на серотонин.

является базовым принципом функционирования центральной нервной системы. Подобная координация обеспечивает последовательное развертывание любого сложного поведенческого акта и является основой функционирования центральной нервной системы позвоночных (Viala and Freton 1983) и беспозвоночных (McCrohan and Winlow 1985).

Сравнительно простая нервная система беспозвоночных позволяет в деталях исследовать вопрос координации двух паттерн-генерирующих нервных сетей, участвующих в одной и той же форме поведения. Небольшое число нейронов позволяет использовать оптическую регистрацию для описания активности всей сети. Крылоногий моллюск *Clione* (клион) представляет собой крайне специализированного хищного моллюска, который питается только двумя видами более мелких раковинных крылоногих моллюсков рода *Limacina* (Lalli 1970, Lalli and Gilmer 1989, Wagner 1885). Две основные структуры составляют буккальную массу клиона - хитиновые крючки и радула с большим числом мелких зубов. Управление движениями этих структур находится в буккальном ганглии. Радула есть у всех брюхоногих моллюсков и ее ритмические движения (фаза ретракции и фаза протракции) имеют целью подтянуть пищу к отверстию глотки. Хитиновые крючки, которые в норме находятся в сложенном виде в двух симметричных мешках, обнаружены только у клиона и отражают его пищевую специализацию (Arshavsky et al. 1989, Lalli 1970, Lalli 1989). Функциональная роль крючков заключается в вытягивании мягких тканей *Limacina* из раковины. Движения крючков также ритмичны, состоят из фаз протракции и ретракции и могут совершаться независимо от движений радулы.

Движения крючков и радулы контролируются нервными сетями, расположенными в парных буккальных ганглиях, которые находятся прямо на мышечной буккальной массе в месте отхождения пищевода и

специализированы для контроля пищедобывательных движений (Lalli and Gilmer 1989). Таким образом, паттерн-генерирующие нейроны буккальных ганглиев вовлечены в контроль ритмических движений радулы и крючков. Первым и единственным описанием ритмически активных нейронов в буккальном ганглии (без различения между нейронами, контролирующими радулу и крючки) является работа Ю.И. Аршавского с соавт. (Arshavsky et al, 1993), с использованием метода внутриклеточной регистрации активности нейронов. Существенным ограничением метода внутриклеточной регистрации является невозможность одновременной регистрации большого числа клеток. Появившийся сравнительно недавно метод оптической регистрации электрической активности нейронов с помощью потенциал-зависимых красителей позволяет регистрировать активность многих элементов сети и описать всю сеть (Antic et al. 1999).

В настоящей работе поставлена задача изучения методом оптической регистрации активности ритм-генерирующих нейронов буккального ганглия клиона с целью изучения механизмов синергии двух независимых нейронных сетей, управляющих элементами пищевого поведения.

7.3.1. Выявление фаз ритмической активности нейронов буккального ганглия во время генерации пищевого ритма.

Уровень спонтанной активности изолированных буккальных ганглиев после окраски потенциал-зависимым красителем был небольшим. Большая часть нейронов не обладала спонтанной активностью, однако всегда можно было зарегистрировать 4-5 нейронов, ритмически генерирующих потенциалы действия с частотой 0.1-4 Гц. Нельзя исключить влияние красителя на спонтанную активность. В связи с этим было необходимо каким-либо образом стимулировать ритм-генерирующие сети буккального ганглия. Одним из таких способов является модуляция активности со стороны центральных ганглиев, которые соединены с буккальными ганглиями коннективой. Мы использовали в наших экспериментах препарат изолированного буккального ганглия со стимулирующим электродом на церебро-буккальной коннективе. Электрическая стимуляция церебро-буккальной коннективы на препарате

“буккальная масса - буккальные ганглии” во всех экспериментах ($n = 12$) вызывала от 3 до 7 отчетливо выраженных движений протракции и ретракции радулы и крючков. По-видимому, стимуляция церебро-буккальной коннективы активирует мощные входы, запускающие пищевой ритм, что и обусловило использование этого вида стимуляции для активации ритм-генерирующих сетей во время оптической регистрации от изолированного буккального ганглия. Следует отметить, что при околопороговой стимуляции наблюдались независимые друг от друга отдельные движения протракции и ретракции радулы, не сопровождаемые движениями крючков. Это говорит о независимости моторных программ движений радулы и крючков.

Пример активности, регистрируемой от окрашенных потенциал-зависимым красителем буккальных ганглиев, показан на Рис. 7.3.1. В каждом эксперименте (всего 12 препаратов с числом регистрируемых нейронов более 6) записывалось также видеоизображение расположения нейронов на регистрируемой поверхности ганглия (пример на Рис. 7.3.2А). Полученные в каждом эксперименте файлы обрабатывали с помощью специальных программ (любезно предоставленных фирмой “Redshirtimaging”, USA) выделения одинаковых спайков по форме и активность каждого нейрона представляли в виде последовательности обнаруженных спайков и описывали числом детекторов, на которых отражалась активность данного нейрона. Таким образом, можно для каждого опыта получить карту расположения регистрируемых нейронов (пример на Рис. 7.3.1Б) и сравнить эту карту с видеоизображением.

Особенностью методики оптической регистрации с помощью абсорбционных потенциал-зависимых красителей является оптимальная регистрация электрической активности всех нейронов, находящихся в поле объектива в пределах глубины резкости данного объектива, что в наших условиях составляло около 100 мкм. Активность нейронов, находящихся на границе глубины резкости, ослаблялась на 20-50%, но также могла регистрироваться. Учитывая, что толщина буккального ганглия клиона не превышает 400 мкм, регистрация активности от нейронов дорзальной и вентральной поверхности (в ганглиях моллюсков основная часть клеток находится на поверхности ганглия, а отростки идут в середину) должна

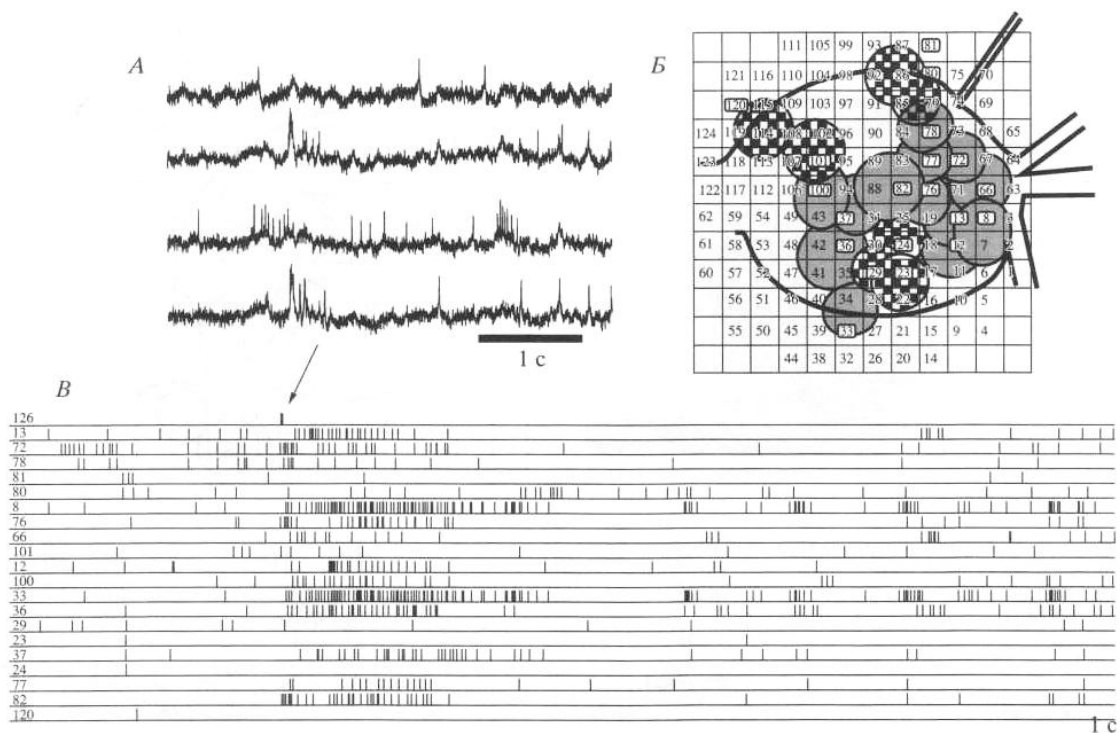


Рис. 7.3.1. Активность нейронов вентральной стороны буккального ганглия. *А* - пример оптической регистрации активности нейронов буккального ганглия; приведены записи от четырех детекторов; вертикальная калибровка не приводится, так как эти единицы условны и зависят от интенсивности света, пропускаемого через нейрон. *Б* - расположение регистрируемых буккальных нейронов на матрице (каждый детектор показан клеткой и цифрой); показан также приблизительный контур регистрируемого буккального ганглия; некоторые нейроны выходят за контур из-за светорассеяния на краю ганглия. *В* - растровое отображение активности всех регистрируемых нейронов (карта расположения показана на *Б*) на большом отрезке времени; детектор № 126 показывает начало и конец стимуляции нерва (отмечено стрелкой).

охватывать существенную часть нейронов данного ганглия.

Два характерных эксперимента по изучению активности нейронов дорзальной и вентральной стороны буккального ганглия при стимуляции cerebro-буккальной коннективы приведены на Рис. 7.3.1 и 7.3.2. В этих экспериментах зарегистрирована активность 20 нейронов на вентральной стороне и 14 нейронов на дорзальной стороне. Учитывая, что по оценкам, приведенным в печати (Arshavsky et al. 1993), в буккальном ганглии всего около 70 нейронов, оптическая регистрация позволяет охарактеризовать значительную часть нейронов ганглия. Стимуляция cerebro-буккальной

коннективы (отмечено стрелкой) активировала в среднем по всем экспериментам ($n = 12$; 168 нейронов) 76% клеток и тормозила активность 9% зарегистрированных нейронов. В 15% нейронов не было отмечено заметных изменений активности нейронов. В качестве критерия наличия или отсутствия изменений принимались 20% от уровня активности до стимуляции. Если изменения активности не выходили за рамки 20% от начальной частоты, то считалось, что изменений не было. Таким образом, значительная часть зарегистрированных нейронов активировалась при стимуляции церебро-буккальной коннективы.

Через несколько секунд после стимуляции церебро-буккальной коннективы в 9 из 12 препаратов наблюдалось появление характерной залповой активности в части нейронов. В среднем залповая активность появлялась в 40-45% зарегистрированных нейронов, причем в относительно большем проценте в тех экспериментах, когда регистрировалась активность нейронов дорзальной стороны ганглия, что соответствует расположению нейронов, описанному в экспериментах с внутриклеточной регистрацией (Arshavsky et al. 1993). Детальный анализ паттерна активности нейронов в каждом эксперименте выявил наличие противофазной активности, особенно при регистрации нейронов дорзальной поверхности ганглия (Рис. 7.3.2Б). В каждом залпе можно было наблюдать 1-12 спайков в течение 1-2 с, затем период молчания 2-6 с. Эти характеристики залповой активности совпадали с характеристиками фаз протракции/ретракции на препарате “буккальная масса - буккальные ганглии” и с данными внутриклеточных исследований (Arshavsky et al. 1993). Особое внимание при анализе мы уделяли поиску залповых нейронов, активность которых была бы не синфазна активности других регистрируемых залповых клеток, однако таких нейронов не было обнаружено. Во всех случаях, когда можно было обнаружить залповую активность, залповые нейроны разбивались только на две группы, противофазные друг другу.

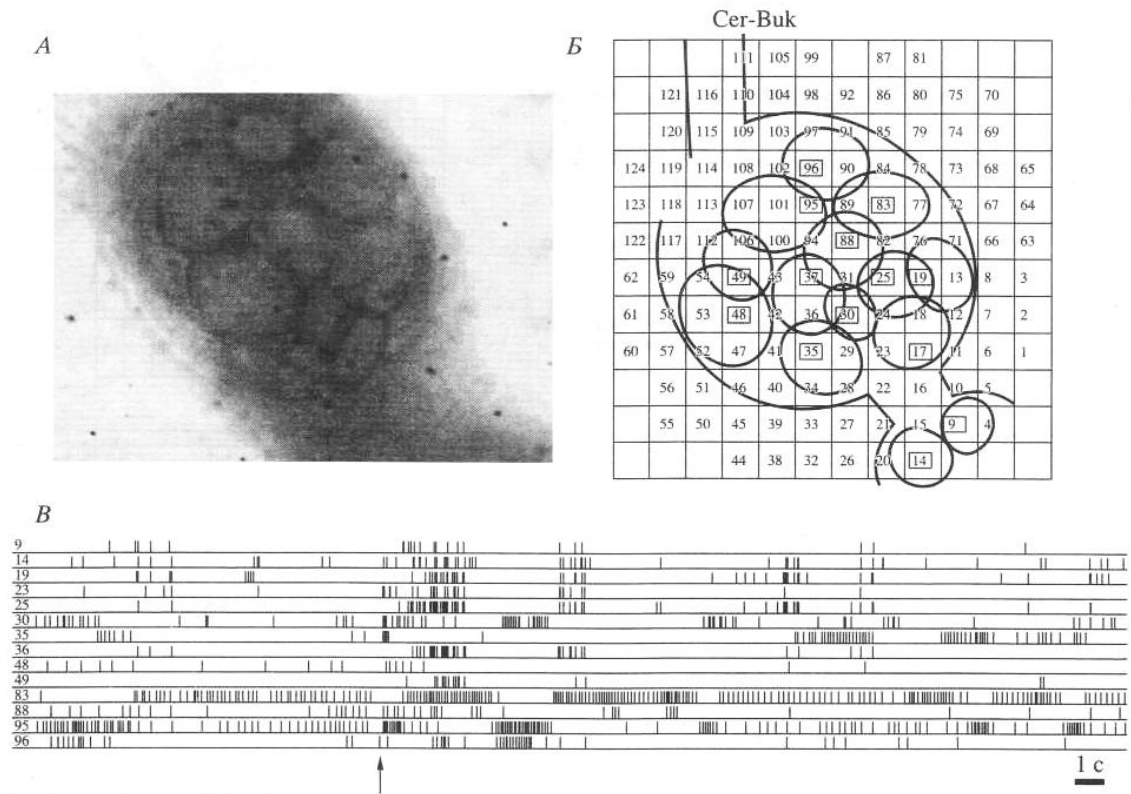


Рис. 7.3.2. Активность нейронов дорзальной стороны буккального ганглия. А - видеоизображение нейронов буккального ганглия данного эксперимента. Остальные обозначения как на Рис. 7.3.1.

7.4. Обсуждение.

7.4.1. Роль серотонина в оборонительном поведении.

Многочисленные исследования нескольких видов брюхоногих моллюсков выявили, что, наряду с участием в оборонительном поведении, нейротрансмиттер серотонин (5НТ) играет модуляторную роль в регуляции пищевого поведения (Kupfermann & Weiss, 1981; Gelperin, 1981). Серотонин также играет важнейшую роль в модуляции оборонительных реакций моллюсков (Kandel & Schwartz 1982; Balaban et al. 1987; Glanzman et al., 1989). Нейроны, содержащие серотонин, были описаны в pedalных ганглиях практически у всех известных видов гастропод (обзор в Croll, 1988). В отличие от гигантских церебральных серотонинергических клеток, участие которых в контроле пищевого поведения было описано у многих видов (Weiss & Kupfermann, 1976; Granzow & Kater, 1977; Gillette & Davis, 1977; Gelperin, 1981), включая *Helix* (Weiss & Kupfermann, 1976; Galanina et al., 1986), роль pedalных нейронов в поведении оставалась недостаточно изученной.

У моллюска *Helix* описаны три группы серотонинергических нейронов (Sedden et al., 1968; Zakharov & Balaban, 1987, 1991). Церебральная группа серотонинергических нейронов модулирует пищевое поведение (Balaban, 1991). Группа серотонинергических нейронов, расположенных на границе левого париетального и висцерального ганглиев, может участвовать в контроле активности сердца и висцерального тракта, хотя их основная функция пока точно не описана. Pedальные серотонинергические нейроны участвуют в модуляции оборонительного поведения (Zakharov et al., 1995) и, возможно, напрямую модулируют локомоцию, учитывая паттерны ветвления дерева их отростков.

Роль серотонина в оборонительном поведении наземных улиток была исследована с помощью экспериментального изменения уровня серотонина напрямую, посредством увеличения концентрации серотонина в растворе, омывающем ЦНС, или косвенно, подвергая специфической деградации терминали нервов с использованием 5,7-дигидрокситриптамина, инъецируемого в гемолимфу интактных животных (Balaban et al., 1987;

Vehovszky et al., 1989). Увеличение концентрации серотонина до уровня 5×10^{-5} М на полуинтактных препаратах вызывает сенситизацию поведенческих ответов на негативные раздражители с соответствующим усилением синаптических ответов в нейронах оборонительного поведения (Balaban et al., 1986; Zakharov & Balaban, 1991) и изменением в длительности потенциалов действия в сенсорных нейронах, отвечающих на неприятные раздражители (Balaban, 1987). Эти данные позволяют полагать, что серотонин играет роль облегчающего, фасилитирующего модуляторного транмиссера оборонительного поведения.

Инъекция нейротоксина 5,7-дигидрокситриптамина вызывала изменения в динамике оборонительных ответов у интактных животных и соответствующие изменения в числе спайков в оборонительных командных нейронах. Увеличение амплитуды закрытия пневмостома и соответствующее изменение в числе потенциалов действия в разряде оборонительных интернейронов во время ритмической тактильной стимуляции кожи всегда наблюдалось у контрольных животных (Balaban, 1983, 1991). Однако эта сенситизация отсутствовала у улиток, инъецированных 5,7-дигидрокситриптамином как на клеточном, так и на поведенческом уровнях (Balaban et al., 1987; Balaban, 1993; Balaban & Bravarenko, 1993). Эти данные подтверждают модуляторную роль серотонина в оборонительном поведении.

7.4.2. Педальные серотонинергические нейроны составляют функциональную нейромодуляторную группу.

Каждая группа серотонинергических нейронов имеет очерченные области-мишени, в районе которых отростки этих нейронов претерпевают наиболее значительные ветвления. За исключением хорошо изученной гигантской метацеребральной серотонинергической клетки (Osborne, 1984), церебральные и париетовесцеральные серотонинергические нейроны не были детально исследованы ранее. Морфология педальных серотонинергических клеток, описанная в настоящей работе, заставляет полагать, что эти нейроны формируют несколько гетерогенных популяций. Некоторые из них посылают единственный отросток, ветвящийся в

нейропиле плеврального ганглия. Только нейрон Pd4 из всей группы посылает ветвящийся нейрит в нейропиле париетального ганглия (Рис. 7.1.4). Неприятные тактильные стимулы вызывают увеличение фонового спайкования в серотонинергических модуляторных нейронах и соответствующее увеличение вызванного стимулом спайкового разряда в интернейронах оборонительного поведения. Хотя почти вся группа нейронов отвечает на неприятные раздражители, большинство отдельных нейронов сильнее отвечают на ипсилатеральную, чем на контралатеральную стимуляцию, демонстрируя различия в рецептивных полях. Сенсорные входы на предполагаемые модуляторные нейроны и характеристики их фоновой спайковой активности заслуживают особого внимания. Для того, чтобы вызвать фасилитацию оборонительных реакций, предполагаемый модуляторный нейрон должен получать информацию, соответствующую каждому неприятному раздражителю, воздействующему на животное. Кроме того, изменения, вызванные таким стимулом, должны длиться как минимум десятки секунд, потому, что поведенческая фасилитация занимает такое время. Очевидно, 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 и поведенческую сенситизацию (Рис. 7.1.5). Только некоторые из группы нейронов отвечают на адекватную стимуляцию одной области, тогда как внутренние связи между нейронами группы позволяют активировать большее число нейронов группы в ответ на большую силу раздражителя. Слабость электрических связей между серотонинергическими нейронами (Zakharov et al., 1995) не позволяет включаться большому числу нейронов группы в ответ на относительно слабые внешние стимулы, которые не несут угрозы животному. Тоническая манера их ответов показана на Рис. 7.4.1. Экстраклеточная стимуляция исследованных серотонинергических нейронов приводила к фасилитации спайкового ответа на неприятные раздражители в предполагаемых командных нейронах оборонительного поведения, что говорит в пользу их подкрепляющей роли в поведении.

Таким образом, педальные серотонинергические нейроны, очевидно, выполняют функцию модуляторной системы в оборонительном поведении,

которая усиливает синаптические ответы в нейронной сети, лежащей в основе этого поведения.

7.4.3. Отдельный нейрон может быть ответственен за модуляцию поведения.

Совпадающая по времени активация всего одного pedalного нейрона (Рис. 7.1.3) вызывает активацию синаптических входов на интернейроны оборонительного поведения, что сходно с фасилитацией, вызванной эндогенным серотонином (Balaban et al., 1986, 1991; Zakharov et al., 1995). Это также походит на фасилитацию, вызванную условной экстраклеточной активацией группы pedalных серотонинергических нейронов (Рис. 7.1.1). Эти результаты позволяют полагать, что активация индивидуального pedalного серотонинергического модуляторного нейрона Pd4 может вызвать подкрепление. Мы не можем полностью исключать того, что активация одного серотонинергического нейрона также активирует и другие серотонинергические нейроны.

Во время активации серотонинергических нейронов не было зарегистрировано постсинаптических потенциалов в париетальных нейронах. Это может происходить из-за удаленности синаптических соединений или же несинаптической природы выброса медиатора из варикозностей, характеризующих серотонинергические нейроны *Helix* (Osborne, 1984). Иммунохимическая характеристика серотонинергических волокон, окружающих сомю премоторного гигантского париетального нейрона и отсутствие синаптических специализаций предполагает модуляторную функцию серотонинергических входов (Vehovzsky et al., 1993). Хотя мы пока также не можем со всей достоверностью исключить наличие промежуточных нейронов. Однако, это кажется маловероятным, учитывая эффект прямой аппликации серотонина на синаптическую передачу, показанный на культуре идентифицированных нейронов (Wao et al., 1998). Также была показана необходимость серотонина для сенситизации у моллюсков (Glanzman et al., 1989). Перекрывающиеся нейриты нейрона Pd4 и гигантских париетальных нейронов (Рис. 7.1.4) предполагают, что серотонин, выделяемый нейроном Pd4, может влиять на сенсорные нейроны,

пресинаптические по отношению к интернейронам оборонительного поведения или синапсам между сенсорными нейронами и оборонительными интернейронами, наличие которых показано в нейропиле (Arakelov et al., 1991).

Участие отдельных модуляторных нейронов в модификации поведения было показано для различных беспозвоночных. Внутриклеточная стимуляция идентифицированного церебрального нейрона CB1 у *Aplysia* вызывала фасилитацию ВПСП от нейронов сифона на моторные нейроны, подразумевая участие этих индивидуальных серотонинергических нейронов в иницировании пресинаптической фасилитации (Maskey et al., 1989). Имеется несколько опубликованных примеров идентифицируемых нейромодуляторных нейронов, которые несут функцию подкрепления во время ассоциативного обучения. Октопаминергический нейрон VUMmx1, который вызывает подкрепление у пчел во время выработки обонятельного условного рефлекса, иннервирует нейропиле основных нейронов мозга своими аксодендритными разветвлениями. Этот нейрон отвечает на сахарозу (подкрепление) долговременным возбуждением, и его деполяризация заменяет подкрепление в обучении с одного предъявления (Hammer & Menzel, 1995). Было достаточно четко показано на культивированных нейронах *Aplysia*, что временное сочетание пресинаптической активности и аппликации серотонина усиливает фасилитацию в сенсомоторных нейрональных синапсах (Eliot et al., 1994; Bao et al., 1998). Активация идентифицированного модуляторного нейрона (медленного осциллятора) на *Lymnaea stagnalis* вызывала ассоциативное усиление фиктивного пищевого ответа (Kemenes et al., 1997).

Нейромодуляторная серотонинергическая клетка Pd4 у *Helix* иннервирует нейропиле педального, париетального 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 (Рис. 7.1.3), подразумевая усиление поведенческого ответа. Мы полагаем, что отдельные нейроны Pd4 у улитки могут включать аверзивное подкрепление. Эта клетка может рассматриваться как нейрон «делегат», представляя активность всей модуляторной серотонинергической группы нейронов, принимающих сенсорные входы практически от всех частей тела, но которые не посылают свои отростки напрямую в париетальный нейропиль мишени модуляции.

Отмеченные различия между сочетанными и несочетанными проявлениями можно отнести за счет зависящего от активности усиления пресинаптического выброса, принимая во внимание тот факт, что самостоятельная аппликация одного серотонина эффективна на изолированной нервной системе и нейрональных культурах моллюсков (Eliot et al., 1994; Bao et al., 1998). Также, продолжительная деполяризация в постсинаптическом нейроне может вносить вклад в потенциацию ответа из-за совпадения во времени активности в пре- и постсинаптическом нейронах по типу хэббовской пластичности. Дополнительные эксперименты могут потребоваться, чтобы определить, какая из этих альтернатив наиболее правдоподобна.

7.4.4 Динамическая структурно-функциональная организация модуляторных сети в контексте делегирования функции одному нейрону.

В настоящей работе мы применили метод оптической регистрации десятков серотонинергических нейронов, расположенных в ростральной части педальных ганглиев. Существенным отличием настоящей работы является то, что эксперименты поставлены на окрашенных естественным способом серотонинергических нейронах (Балабан и др. 1985). Следует отметить, что в нервной системе виноградной улитки описаны три группы серотонинергических нейронов, имеющих разное функциональное значение (Balaban 1993). Группа из нескольких десятков мелких нейронов вокруг гигантской серотонинергической клетки №1 церебральных ганглиев отвечает за активацию локомоции при пищевом поведении. Группа на

границе висцерального и правого париетального ганглия участвует в регуляции висцеральных функций. Наиболее многочисленна и хорошо изучена группа серотонинергических нейронов именно ростральной части pedalных ганглиев, для которой показано участие в модуляции активности нейронов оборонительного поведения (Balaban 1993, Zakharov et al. 1995). Функция серотонинергических нейронов, расположенных в других областях pedalного ганглия точно не установлена.

Было показано, что из всех серотонинергических нейронов pedalных ганглиев только Pd4 посылает отростки в плевропариетальный комплекс, и активация только одного этого нейрона может служить подкреплением для выработки пластических изменений ответов командных нейронов оборонительного поведения. Отдельные нейроны ростромедиальной серотониновой группы отвечают более сильным разрядом спайков в ответ на стимуляцию ипсилатеральной стороны ноги, чем на стимуляцию контрлатеральной стороны, и, по-видимому, имеют индивидуальные рецептивные поля (Zakharov et al. 1995). Если улиток *Helix* подвергнуть воздействию 5,7-дигидрокситриптамина, селективно подавляющего функцию серотониновых нейронов, то у них будет невозможно выработать обстановочный условный рефлекс и условную аверсию на предъявляемый вид пищи (Zakharov & Balaban 1991). Было показано, что внутриклеточная стимуляция одного идентифицируемого нейрона Pd4 этой группы может усиливать активность «командных» нейронов, запускающих оборонительное поведение.

Анализ ответов нейронов серотонинергической группы внутриклеточными методами поставил целый ряд вопросов о функционировании всей группы как единой сети модуляции оборонительного поведения с одним гигантским «выходным» нейроном (Pd4), которому остальные мелкие нейроны делегируют функцию общения с остальной нервной системой. Исследование активности десятков нейронов этой группы оптическими методами позволило ответить на многие вопросы.

В нашей работе мы продемонстрировали, что ответы pedalных серотонинергических нейронов изолированной ЦНС на стимуляцию кожного нерва отличаются (сильнее) от ответов этих же нейронов полуинтактного препарата ЦНС-кожи ноги на тактильную стимуляцию

кожи, иннервируемой этим нервом. По-видимому, интенсивность стимула прямого раздражения нерва соответствует предельной активации всех чувствительных элементов кожи, в то время как тактильная стимуляция происходит локально и затрагивает только малую часть кожи и иннервирующих ее чувствительных окончаний нейронов. Несколько неоднозначные результаты были получены в экспериментах со стимуляцией нейрона Pd2 когда в отдельных экспериментах со стимуляцией получали достоверное увеличение активности неидентифицируемых нейронов ростромедиальной группы, а в других опытах учащение было недостаточно выражено, что при суммации дало недостоверное увеличение активности. Возможно, в разных опытах возбудимость нейронов ростромедиальной группы была разной в связи с разным состоянием ЦНС исследованных животных. Кроме того нельзя исключить и разного влияния потенциал-зависимого красителя на нейронную активность т.к. окрашивание в разных экспериментах варьировало и, по-видимому, нейроны разных препаратов содержали разное количество краски, которая может влиять на активность нейронов.

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. Известно, что нейрон Pd4 может модулировать синаптические входы и активность идентифицируемых командных нейронов оборонительного поведения L/RPa2 и L/RPa3. 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 другие нейроны, в том числе командные нейроны оборонительного поведения плевропариетальной группы, и возможно, другие неизвестные нам премоторные нейроны.

Детализация активности нейронов группы в ответ на внутренние и внешние раздражители позволила получить более точные представления о роли и взаимодействии нейронов группы как модели анатомически компактной функционально связанной нейронной сети. Дополнительную ценность работе придает то, каждый зарегистрированный серотониновый нейрон был предварительно окрашен и определена принадлежность каждого нейрона к серотониновой группе.

7.4.5. Ритмическая фазовая активность в нейронной сети пищевого поведения.

Многие сложные формы поведения представляют собой комплекс простых поведенческих ответов или более простых поведенческих актов. Для того чтобы сформировался функционально значимый целостный поведенческий акт и животным была достигнута поставленная цель, все более простые составляющие должны быть синергичны, т.е. происходить в строго определенной последовательности, что подразумевает координацию нервных сетей для каждого элемента поведения. Принципы координации синергично работающих нервных сетей, т.е. принципы синергии, являются одним из важнейших моментов нейробиологии поведения.

Одной из целей исследования было изучение возможной координации между двумя ритм-генерирующими нервными сетями, которые контролируют синергичные элементы пищевого поведения крылоногого моллюска *Clione limacina* - движения радулы и крючков для захвата пищи.

Обе эти структуры, радула и крючки, представляют собой высокоспециализированные структуры для удержания и подтягивания пищи к глотке. Их ритмическая активность должна быть каким-то образом скоординирована для достижения поставленной цели. Обе ритм-генерирующие сети, контролирующие движения радулы и крючков, находятся в буккальных ганглиях, что доказано экспериментами на препарате “буккальная масса - буккальный ганглий”. Скорее всего, это единственные ритм-генерирующие сети в этих небольших ганглиях, так как других ритмических движений буккальной массы не отмечено. Основными типами движения радулы и крючков является протракция из буккальной

массы и ретракция. Таким образом, теоретически можно ожидать наличия четырех фаз ритмической активности при регистрации от нейронов буккального ганглия в условиях активации пищевого поведения. Это протракция и ретракция радулы и протракция и ретракция крючков. Однако в наших экспериментах были обнаружены только две фазы ритмической активности нейронов. Стимуляция церебро-буккальной коннективы эффективно вызывала ритмическую активность нейронов и, как это было показано в экспериментах на препарате “буккальная масса - буккальные ганглии”, ритмические движения радулы и крючков. Во всех без исключения случаях регистрировались только две противофазы одного ритма. Это позволяет предположить, что нейронные сети движений радулы и крючков жестко координированы зависимым от фазы способом. Из-за того, что нейронные сети движений радулы и крючков жестко координированы, в оптически регистрируемой активности нейронов даже теоретически мы можем увидеть только две фазы, так как таким способом методически невозможно отличить мотонейроны движений радулы от мотонейронов движений крючков.

Возможно предложить еще одно объяснение полученным данным. Буккальная масса у большинства изученных брюхоногих моллюсков состоит из мышц, контролирующих ритмические движения радулы, а крючки отсутствуют. У клиона кроме мышц радулы появляются мышечные мешки, управляющие протракцией и ретракцией крючков. Эти мышцы, управляющие движениями крючков, с очевидностью являются производными в филогенезе от мышц радулы. Возможно, что часть нервных управляющих сетей происходит от сетей, управляющих радулой у филогенетических предков. Все эти рассуждения ставят вопрос о том, насколько отличны друг от друга сети управления радулой и крючками у клиона. Возможно ли, что обе функционально независимые сети имеют общие интернейроны центрального генератора паттернов? Общие для различных сетей интернейроны показаны в нескольких экспериментальных объектах (Meuhand et al. 1994, Weimann et al. 1991, Wu et al. 1994). Теоретически возможны несколько способов установления синергических взаимоотношений между циклическими моторными системами. Самым простым способом является либо тормозное взаимодействие на уровне

центральных генераторов паттерна, либо общие интернейроны, оказывающие различные эффекты на разные группы подчиненных элементов.

Дополнительных экспериментов требует рассмотрение взаимоотношений ритм-генерирующих нейронов на внутриклеточном уровне и установление конкретных механизмов обеспечения синергии двух изученных нейронных сетей, управляющих пищевым поведением клиона.

7.5. Выводы.

Педальные серотонинергические нейроны выполняют функцию модуляторной системы в оборонительном поведении, которая усиливает синаптические ответы в нейронной сети, лежащей в основе этого поведения.

Активации одного нейрона серотониновой ростромедиальной группы *Helix* может быть достаточной для того, чтобы активировались другие нейроны этой группы.

Значительная часть нейронов ростромедиальной группы реагирует на аппликацию серотонина увеличением частоты спонтанной спайковой активности и расширением спайка.

В ответ на стимуляцию кожи реакция нейрона Pd4 у *Helix* отставлена от активации других нейронов и отличалась большей продолжительностью.

В сети нейронов буккального ганглия обнаружен только один ритм активности нейронов, что говорит о фазозависимой координации активности двух независимых структур пищевого аппарата *Clione limacina*, в ходе пищевого поведения.

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

Модельные системы позвоночных животных, например, таких как грызуны крысы и мыши, гораздо ближе к человеку, поэтому к ним закономерно 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 (Saneragi et al. 2008), хотя рознятся способы их доставки в нейрон. Обычно для доставки красителя в нейрон используют пассивную диффузию из пэч-пипетки. При этом сам нейрон подвергается перфузии, а внутриклеточное содержимое замещается на солевой раствор пипетки. В таких условиях эксперименты с нейрональной потенциацией ограничиваются десятками минут и через определенное время пластичность в нейроне пропадает (Frick et al. 2004). При этом для окраски только одного нейрона требуется продержать этот нейрон не менее получаса в пэч-клампе чтобы краска успела распространиться, и только после этого можно начинать эксперимент по оптической регистрации. В таких условиях будет затруднительно исследовать долговременные изменения при обучении, поэтому приобретает особую важность поиск оптимального способа доставки красителя, не наносящий ущерба пластичности и позволивший бы исследовать клеточные и субклеточные ответы на достаточно протяженном временном интервале. Для этой цели мы разработали специальный метод для потенциал-зависимых красителей в нейроны путем биолиственной доставки с помощью адаптированной генной пушки.

8.1. Библистическая доставка потенциал-зависимых красителей в клетки срезов живого мозга млекопитающих для оптической регистрации нейронной активности

В современных нейробиологических исследованиях для регистрации и стимуляции мозговой активности широко применяются оптические методы. Для регистрации электрической активности нейронов в качестве оптических зондов используют мономолекулярные потенциал-зависимые красители (ПЗК). Существующие на сегодняшний день способы доставки ПЗК в нервную ткань имеют серьезные ограничения, сильно сужающие область их применения (нерастворимость в воде, ядовитость других растворителей и самих ПЗК в высоких концентрациях для живой ткани). В нашей работе мы разработали новый метод доставки ПЗК путем выстреливания микрочастиц золота, покрытых красителем, в переживающие срезы мозга. Трёхмерная реконструкция флуоресцентного свечения нервной ткани на сканирующем конфокальном микроскопе показала, что при таком способе доставки краситель распространяется по клеточной мембране, полностью окрашивая клетку-мишень с отростками и не распространяясь на окружающие клетки по межклетнику или через клеточные контакты. Разработанный метод окрашивания нейронов может быть применен для дистанционного считывания оптической аппаратурой информации об электрической активности отдельных нейронов и распространении электрического потенциала по компартментам возбудимых клеток (аксонов и дендритов).

В современной клеточной нейрофизиологии активно применяются различные вещества-сенсоры, которые меняют свои флуоресцентные свойства при контакте с исследуемыми молекулами. Среди них флуоресцентные ионоселективные сенсоры ионов металлов: натрия, магния, калия, кальция, цинка, а также хлорида, протонов (pH) и других ионов, низко- и высокомолекулярных сигнальных молекул [Сулова и др. 2007, Baker et al. 2008, Bastian et al., 2007, Cannon et al. 2008, Domaille et al. 2008, Grewe et al. 2009, Kole et al. 2008, Kuner & Augustine 2000, Takahashi et al., 2007]. Применение флуоресцентных сенсоров позволяет проводить прямой мониторинг концентраций исследуемых веществ в живых клетках *in situ* (в месте нахождения) с высоким временным и пространственным разрешением

(при регистрации с использованием специальных люминесцентных или конфокальных сканирующих микроскопов). Особняком стоят флуоресцентные сенсоры, встраивающиеся в мембрану и меняющие свою конформацию и флуоресцентные свойства при изменении напряжённости электромагнитного поля на ней [Cohen & Salzberg 1978, Cohen et al. 1978]. В основе работы этих сенсоров лежат несколько разных механизмов изменения оптических свойств [Fluhler et al. 1985, Loew et al., 1985]: поворот диполей внутри молекулы, димеризация молекул, FRET и эффект электрохромизма. Наибольшее распространение получили сенсоры аминопиридинового ряда, их общепринятое название — быстрые потенциалзависимые красители, которое подчёркивает их отличительную черту от сенсоров, работающих по другим механизмам. Быстрые ПЗК аминопиридинового ряда представляют из себя амфифильные молекулы, встраивающиеся в плазматическую мембрану и меняющие свою ориентацию (или ориентацию части молекулы) под воздействием электрического поля высокой напряжённости. Эти структурные изменения молекул вызывают изменение их оптических свойств, а именно сдвиг спектра флуоресценции в более длинноволновую область — эффект электрохромизма [Loew et al. 1982, Loew et al. 1978, Loew et al. 1979]. В основном, быстрые потенциалзависимые красители показывают достаточно небольшие изменения флуоресценции при изменении потенциала на мембране (10^{-4} — 10^{-2} на 100 мВ). Тем не менее, эти красители имеют очень короткое время отклика, обычно в микросекундном диапазоне [Loew et al. 1982] и смещение спектра линейно пропорционально изменению напряжённости электрического поля [Gupta et al. 1981], что делает быстрые ПЗК весьма привлекательными для регистрации электрической активности в нервной ткани.

Потенциалзависимые красители широко используются в нейробиологии для мониторинга быстрой и медленной электрической активности мозга на различных уровнях его организации [Baker et al. 2005]. Так ПЗК с успехом используются для оптической регистрации суммарного ответа или фокальных потенциалов от больших нейронных популяций целиком [Ghosh et al. 2009]. В других экспериментальных подходах могут быть оптически записаны потенциалы действия и синаптические

потенциалы от групп отдельных нейронов одновременно, что даёт уникальную возможность исследователям-нейроэтологам для раскрытия клеточных механизмов поведения животных [Briggman&Kristan 2006, Taylor et al. 2003, Zelenin et al. 1997], методически недоступных другими техниками. Однако и на клеточном уровне возможности ПЗК не заканчиваются: они с успехом применяются в экспериментах по изучению динамики распространения электрических потенциалов по мембране сомы и отростков нейронов [Sacconi et al. 2006]. Использование ПЗК на культурах нервной ткани, переживающих срезах, а с появлением в арсенале учёных двухфотонных микроскопов и на целом мозге позволяет регистрировать нейриты: дендриты и аксоны и специфические компартменты нейрона: аксонный холмик, ствол дендритного дерева, шипики, бифуркации [Nakagawa et al. 2006, Sacconi et al. 2006, Zecevic 1996, Zhou et al. 2007]. Также есть работы свидетельствующие о применимости ПЗК для регистрации с молекулярным разрешением конформационных изменений в мембранных белках [Sonnleitner et al. 2002]. Резюмируя, можно сказать, что потенциалзависимые красители очень широко применяются для оптической регистрации электрофизиологических процессов.

Однако, несмотря на использование ПЗК практически в любой области нейробиологии, при работе с ними есть ряд проблем, которые решаются в порядке компромисса. Одна из главных проблем, связанных с применением потенциалзависимых красителей — это способ их доставки в клетку, т. к. аминопиридины по своей природе плохо растворимы в воде. В настоящее время широко применяются следующие техники доставки ПЗК [Bullen&Saggau 1999, Sinha&Saggau 1999]: 1) аппликация в раствор и пассивная диффузия красителя в мембрану; 2) ретроградное окрашивание по нерву; 3) микроинъекция в клетку. Кроме этих основных способов доставки, на горизонте исследований появились экзотические пока трансгенные белковые ПЗК [Baker et al. 2008, Muton et al. 2009, Perron et al. 2009, Tsutsui et al. 2008], в которых сенсором является потенциал-зависимый ионный канал, а изменения в флуоресценции происходят за счёт эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции (РПЭФ, FRET — Förster или Fluorescence Resonance Energy Transfer). Эти ПЗК производятся *in situ* белоксинтезирующим аппаратом клетки, и соответственно в доставке

нуждается не сам краситель, а генетический материал (прямая трансфекция в клетку в опыте или производство трансгенной линии животных). Пока методика их применения очень сложна и находится в состоянии разработки, кроме того, сам сенсорный ионный канал постоянно находящийся в мембране изменяет электрическую активность клетки, что может приводить к неверной интерпретации результатов.

Одним из сравнительно новых методов доставки веществ в клетки является направление, представленное биолистикой (термин, полученный от синтеза слов «биология» и «баллистика» предложен первооткрывателями [Christou et al. 1987, Klein et al. 1987, Sanford 1988]). Метод основан на придании частицам вещества высокой кинетической скорости в специальном пневматическом устройстве (биолистическая установка, gene gun, генная пушка или генный пистолет) для пробивания мембраны (которая мгновенно затягивается после момента «выстрела»). Для увеличения инерции частицы вещества обычно наносятся на более массивные сферические микрочастицы, изготовленные из тяжёлых металлов (золото, вольфрам, платина), а для уменьшения сопротивления среды для разгона микрочастиц вместо воздуха используется низкий вакуум или гелий. В России разработкой вариантов метода биолистической доставки занималась лаборатория И. А. Зеленина в Институте молекулярной биологии им. Энгельгардта (Москва). Усилиями этой лаборатории были разработаны протоколы трансфекции клеток в культуре и клеток мышечной ткани *in vivo* [Колесников и др. 1995, Kolesnikov et al. 1988, Zelenin et al. 1997]. Биолистическая установка работала по принципу огнестрельного оружия — взрыв пороха порождал образование и расширение газовой смеси, которая разгоняла в стволе вольфрамовые микропроектили. Одной из наиболее известных конструкций (в основном, благодаря её коммерческой доступности), является установка фирмы BioRad распространяемая под торговым названием Helios GeneGun.

В целом, конструкции, разработанные и широко применяемые в данный момент в разных областях биологических наук не рассчитаны на работу с клетками мозга, так как сильно повреждают нервную ткань. В некоторых случаях этого удаётся избежать (доставка нейротрейсеров в клетки зафиксированной ткани или плотные ганглионарные структуры

нервной системы) или этот момент не столь принципиален (исследование органотипических культур нервной ткани). Однако в большинстве случаев, когда необходимо произвести доставку в клетки живой нервной ткани

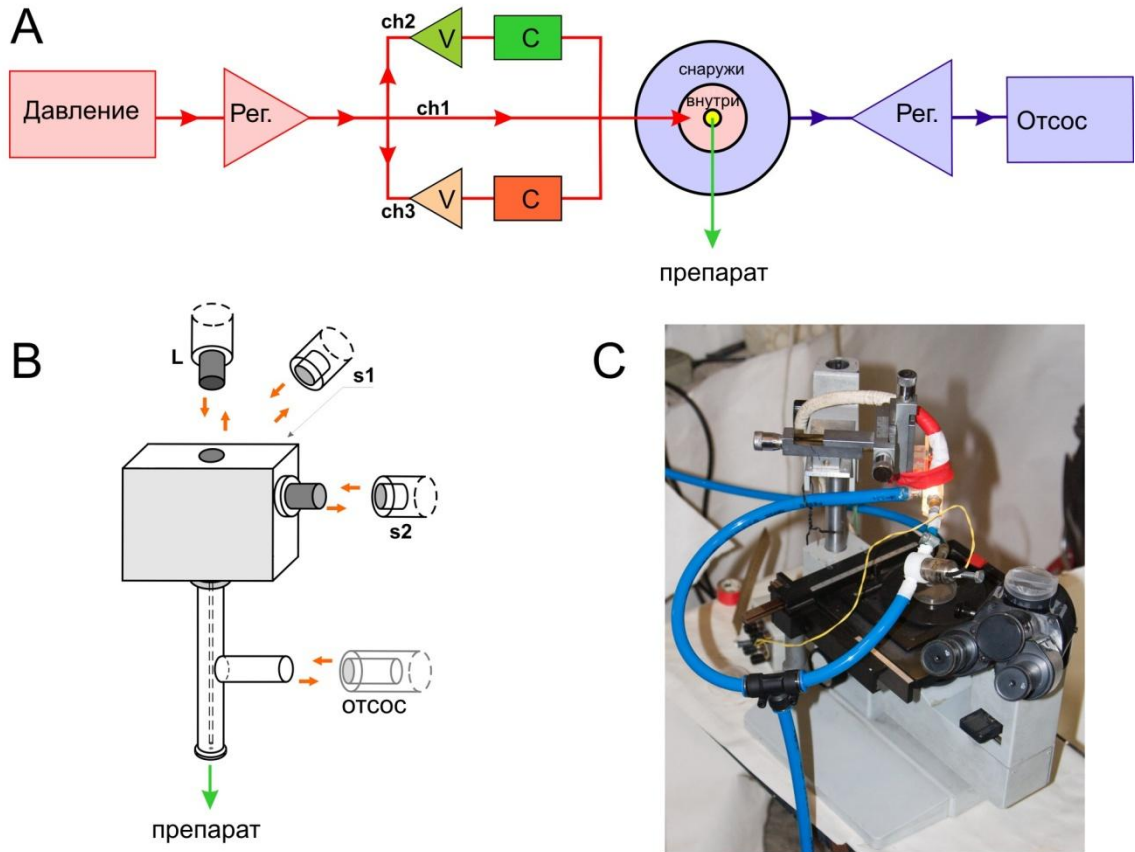


Рис. 8.1. Биолистическая установка. А. Модульная схема двухканальной биолистической установки выбранной конструкции с активным оттоком газовой смеси. На рисунке обозначены следующие модули установки: Давление — источник газовой смеси (воздуха, гелия или др.) с высоким давлением; Рег — регулятор давления на входе установки; V — электронные клапаны зарядных камер, независимы для каждого канала; С — зарядные камеры с независимой загрузкой микропрожестилей для каждого канала. Внутри — внутренний разгонный капилляр установки (ствол); Снаружи — внешний капилляр с диафрагмой, в котором создаётся отрицательное давление за счёт насоса (Отсос) с регулятором Рег. В. Эскиз подключения ствольной части и газового смесителя биолистической установки. С. Внешний вид установки, монтаж на базе инвертированного микроскопа для работы со срезами мозга.

(исследование генетических и физиологических программ нейронов методами трансфекции или молекулами-сенсорами), особенно её экранных структур (формирующие такие важные области мозга, как неокортекс или гиппокамп), существующие биолистические аппараты и протоколы не подходят.

Поэтому в настоящей работе была поставлена цель - разработать метод биолистической доставки в нервную ткань липофильного красителя, необходимый для оптической регистрации потенциал-зависимого сигнала в нервных отростках для дальнейшего изучения динамики распространения электрических потенциалов на мембране нейронов.

8.1.1. Биолистическая установка для доставки потенциал-зависимых красителей.

Собранная нами биолистическая установка (Рис.8.1) была смонтирована на базе инвертированного микроскопа «Биолам-П1», что позволило прицельно доставлять краситель в нужный участок среза. При юстировке установки на агарозных мишенях расчётная точность подтверждена в экспериментах — область поражения микропрожектилями представляет собой окружность 150 мкм. Глубина проникновения и плотность микропрожекtilей в мишени контролировалась параметрами выстрела — длительностью открытия электронного клапана и количеством загруженной навески микропрожекtilей (Рис. 8.2).

8.1.2. Окраска нейронов с помощью биолистической доставки красителя.

Эксперименты с живой нервной тканью проводились на переживающих срезах головного мозга крысы — окрашенными микропрожектилями бомбардировались локальные области в экранных структурах: гиппокампе и неокортексе. Использование ПЗК с высокой растворимостью в воде (di-2-ANEPEQ, di-4-ANEPPS) приводило к распространению этих красителей по межклетникам и вымыванию их из

клеток протоком физиологического раствора в течение нескольких минут. Как следствие, достигаемое соотношение оптического сигнала от мембран окрашенных нейронов к общему фону ткани было неприемлемым для дальнейших нейрофизиологических исследований, Рис.8.3.

Использование более липофильного ПЗК, di-8-ANEPPS, позволило добиться более высокого качества окрашивания ткани, уже позволяющего дальнейшие физиологические исследования, Рис. 8.3Н, видны два пирамидных нейрона с крупными апикальными дендритами. Наивысшее качество окрашивания продемонстрировано при использовании наиболее липофильных из всех исследованных ПЗК, di-12-ANEPPQ и di-8-ANEPPS. На Рис. 8.4А-В показан биолистически окрашенный этим красителем пирамидный нейрон зрительной коры, видны тонкие нейриты 2-3 порядка.

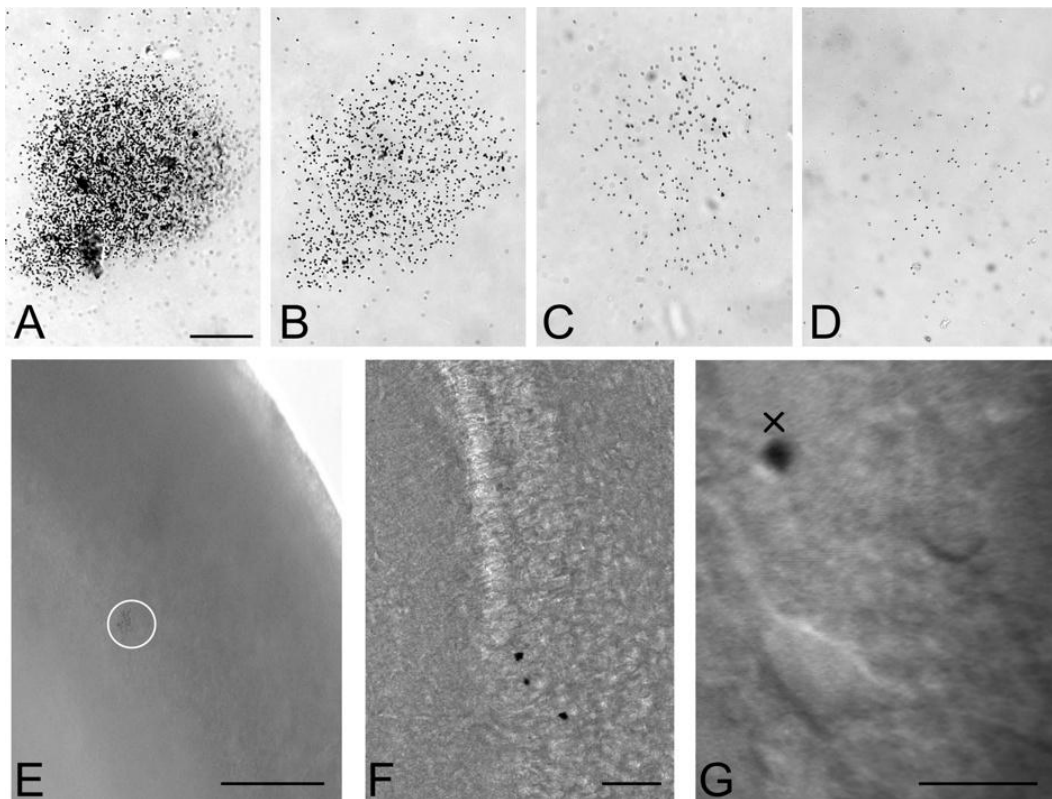


Рис. 8.2. Тестовые агарозные мишени. Приведена только область поражения, совпадающая с точкой прицела и равная диаметру диафрагмы — 150 мкм. Плотность и число микропрожектилей зависит от длительности выстрела: А — 30 мс, В — 50 мс, С — 150мс, D — 500мс. E-G – распределение микропрожектилей в срезе при возрастающем увеличении микроскопа 5x-10x-40x. Крестиком отмечено отдельное попадание вблизи пирамидного нейрона. Калибровка на А–D 50 мкм, E - 300 мкм, F - 80 мкм, G - 20 мкм.

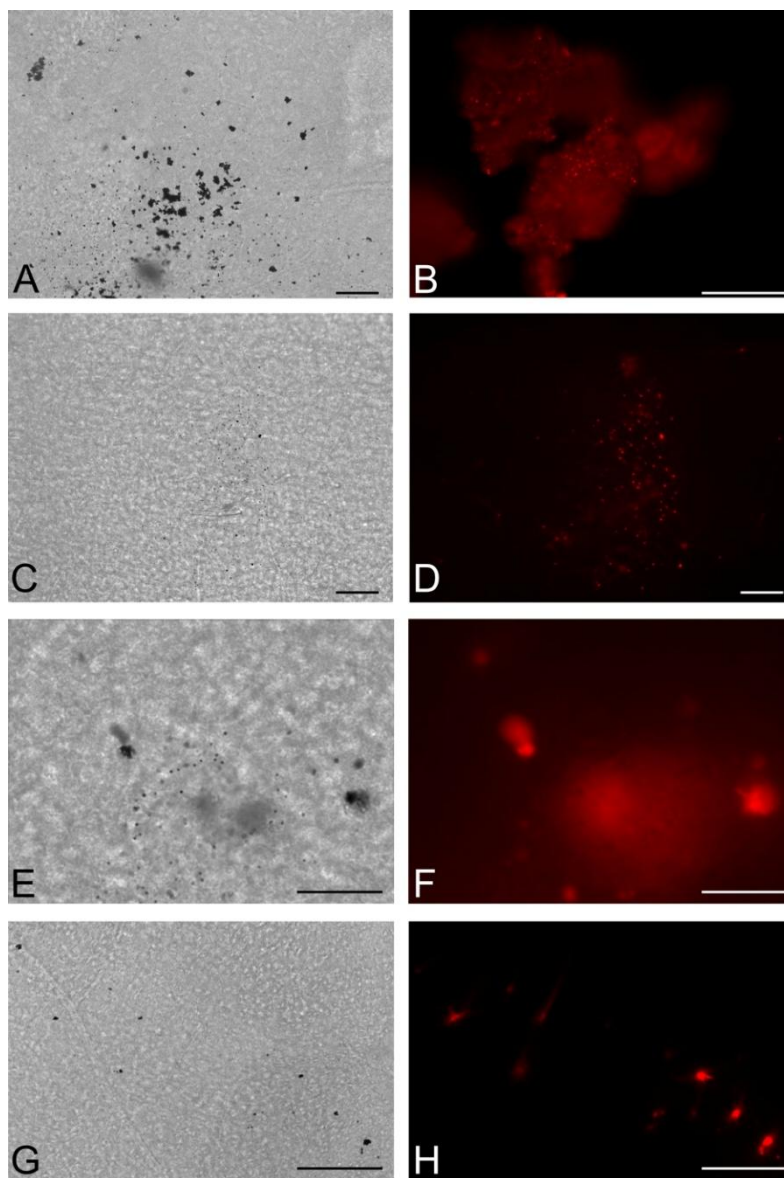


Рис. 8.3. Биолистическое окрашивание живых срезов коры мозга крысы ПЗК с разной липофильностью. Картинки в проходящем свете (левая сторона) и соответствующие им флуоресцентные фотографии (правая сторона) за исключением А и В которые от разных препаратов. С-Н – микропроектили подвергались обработке ультразвуком перед экспериментом. А-Д - di-8-ANEPPS, Е- F - di-2-ANEPQ, G-Н - di-8-ANEPPS. Калибровка 50 мкм.

Оптический срез через сому нейрона показывает (срав. Рис. 8.4С-Д), что красители с более выраженными гидрофобными свойствами, применяемые для биолистической доставки, демонстрируют меньшую степень интернализации, что должно благотворно сказаться на соотношении сигнал-шум, поскольку полезный сигнал дает только та порция красителя,

которая находится в мембране, но не в цитоплазме. Применение гидрофобных красителей для окрашивания через пэч-пипетку сильно затруднено ввиду необходимости их растворять во внутриклеточном замещающем растворе и сложности их диффузии в другие кроме сомы компартменты нейрона.

8.1.3. Оптическая регистрация электрической активности нейронов коры с использованием потенциал-зависимых красителей.

Чтобы продемонстрировать эффективность биолистической доставки ПЗК для целей оптической регистрации мембранного потенциала мы проводили одновременные электрофизиологическую и оптическую регистрации нейрона, окрашенного di-8-ANEPPS или di-12-ANEPPQ. Всего было зарегистрировано 14 биолистически окрашенных нейронов с использованием метода пэч-кламп. Контрольные оптические записи были проведены с использованием красителя di-1-ANEPPQ, доставленного через пэч-пипетку внутриклеточно (3 нейрона), с использованием тех же параметров стимуляции. Мы использовали очень короткие (2 мс) ступеньки достаточно сильного тока (1-2 нА) чтобы вызывать потенциалы действия в регистрируемых нейронах. Стимуляция подбиралась таким образом, чтобы вызвать 100 мВ пик потенциала в режиме фиксации тока. В этих экспериментах ступени тока подавались сериями по пять с межстимульным интервалом 100 мс. Потенциалы действия усреднялись.

Значительный сигнал в ответ на вызванные потенциалы действия регистрировали как с биолистически доставленным красителем, так и при окрашивании через пэч-пипетку (Рис. 8.5). Оптический сигнал, вызванный отдельными потенциалами действия в соме пирамидных нейронов, окрашенных di-12-ANEPPQ, составил $3.6 \pm 1.2 \% \Delta F/F$ ($n = 4$ клетки, $S/N \sim 1-5$), в дендритах – 6.4 ± 1.7 ($n = 3$ клетки). Это сравнимо с вызванным потенциалами действия сигналом в нейронах, окрашенных обычными методами и полученными с использованием схожей системы с возбуждающей ксеноновой лампой (3 - 4%; Antic, 2003). Большой сигнал, полученный с использованием красителя di-12-ANEPPQ можно объяснить его малой интернализацией как следствием его более гидрофобных свойств.

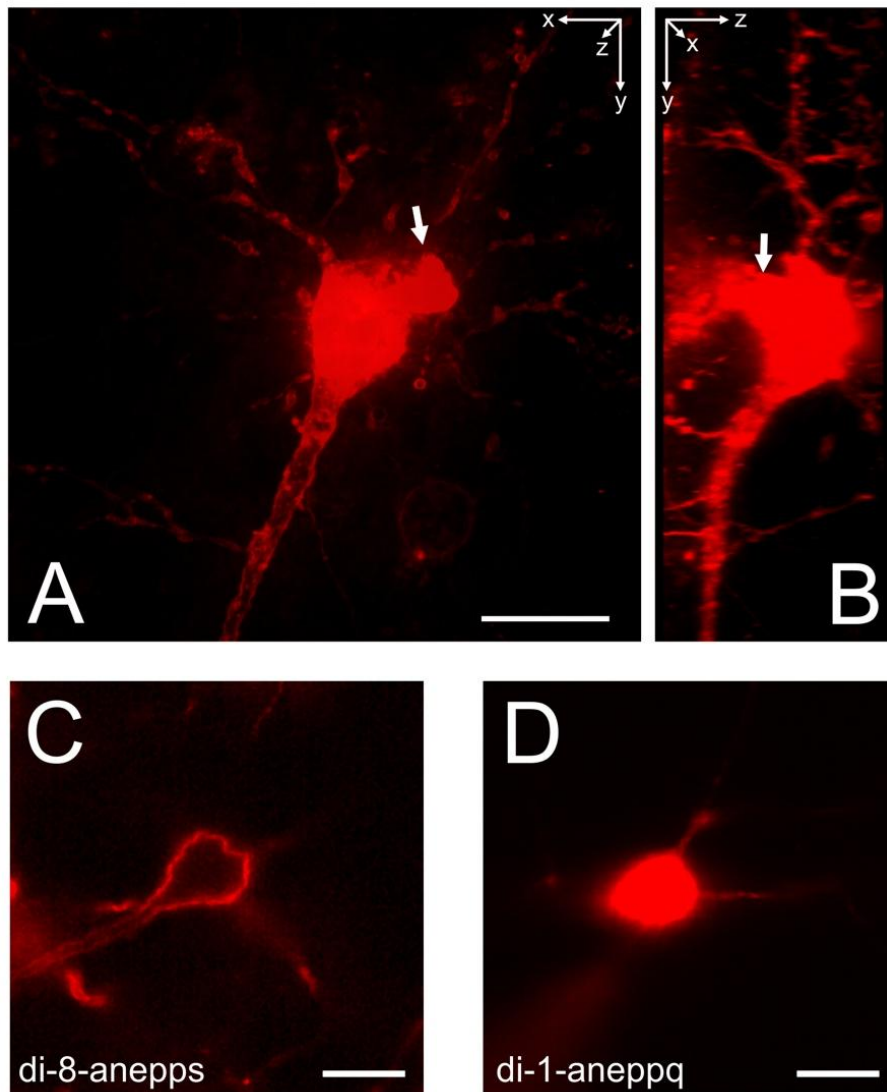


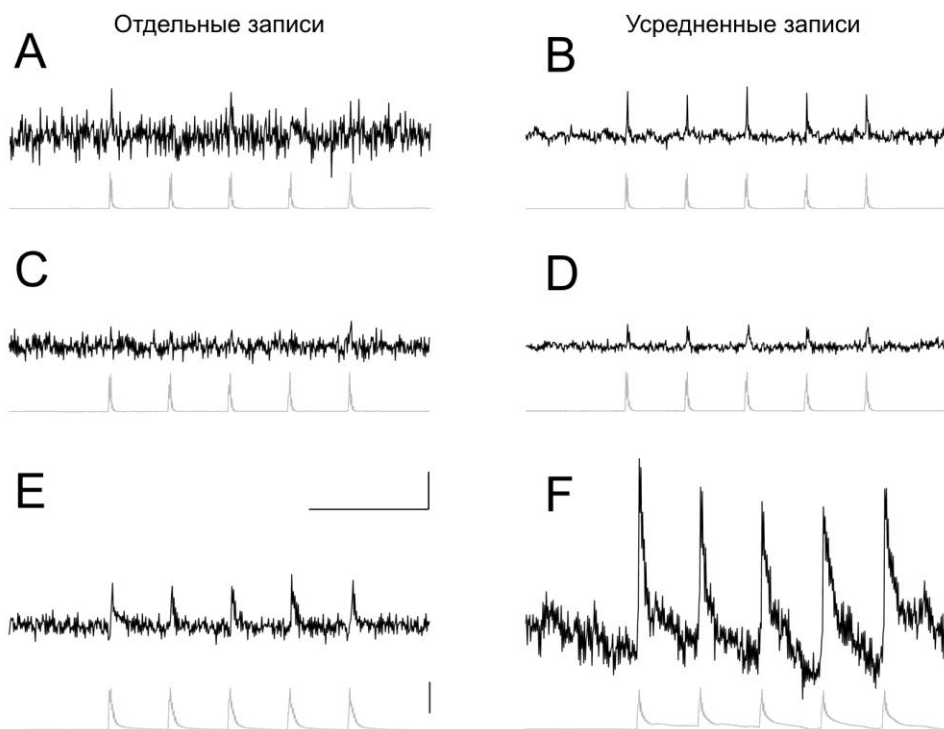
Рис. 8.4. Конфокальные изображения пирамидных нейронов, окрашенных биолистически в коре больших полушарий. Двумерные проекции X-Y (A) и Y-Z (B) трехмерной реконструкции (стек из 60 плоских изображений с шагом 0.6 мкм) с микропроектилью, касающейся сомы нейрона (стрелка). Окрашено di-8-ANEPPS. Калибровка 20 мкм. (C) Оптический срез пирамидного нейрона 5-ого слоя, окрашенного биолистически липофильным красителем di-8-ANEPPS. (D) Оптический срез пирамидного нейрона 5-ого слоя, окрашенного биолистически амфифильным красителем di-1-ANEPPQ через пэч-пипетку. Активность и состояние обоих нейронов было подтверждено с помощью использования пэч-кламп для регистрации потенциала.

8.2. Обсуждение.

В контексте данной работы мы впервые предложили использовать метод биолистической доставки веществ в клетки для целей клеточной нейрофизиологии, а именно оптической регистрации динамики распространения потенциалов по мембране компартментов нейрона. Нами был подобран оптимальный для такого способа доставки ПЗК, di-12-ANEPPO, и разработан протокол его нанесения на микропрожектили. Поскольку биолистическая доставка липофильных веществ в клетку уже была продемонстрирована ранее для морфологических красителей карбоцианового ряда (DiO, DiI, DiA и пр.; Gan et al. 2000) то нам пришлось лишь незначительно модифицировать сам протокол нанесения. Однако, сама процедура биолистической доставки значительно отличается от стандартной, поскольку с целью наименьшего повреждения нервной ткани в нашей установке были использованы активный отток газовой смеси (аналогичный предложенному Rinberg et al. 2005) и фокусирующая диафрагма, уменьшающая площадь биологической ткани, подвергаемую воздействию газовой смеси. Кроме того, для обеспечения возможности оптического прицеливания с высокой точностью нами была использована схема прямого оптического прицела «сквозь ствол», не дающая параллактической ошибки (Shefi et al. 2006). Использование в конструкции инвертированного микроскопа со сменными объективами позволило нам проводить прицеливание и доставку микропрожектилей в нужный участок среза прицельно и быстро, что важно для дальнейшей работы со срезом живой ткани.

Результаты наших экспериментов с разными красителями аминопиридинового ряда хорошо согласуются с известным рядом водорастворимости-липофильности этих красителей (Bullen&Saggau 1999, Sinha et al. 1999). Биолистическая доставка значительно расширяет возможности использования красителей с высокой липофильностью, поскольку единственный доступный на данный момент способ их доставки в нервную ткань — ретроградная загрузка — невозможна для большинства нейрофизиологических препаратов (срезы новой коры и гиппокампа в том

числе). В то же время, высокая липофильность красителя означает и



высокую аффинность его молекул к жирам клеточной мембраны, и как

Рис. 8.5. Сравнение усредненных оптических сигналов, вызванных в соматическом компартменте биолистически окрашенных нейронов, с сигналами нейронов, окрашенных через пэч-пипетку. Слева – отдельные записи вызванных потенциалом действия сигналов. Справа – соответствующие им усредненные записи. (A) и (B) – записи от нейрона, окрашенного через пэч-пипетку красителем di-1-ANEPPQ. (C) и (D) – окрашено di-8-ANEPPS; (E) и (F) – окрашено di-12-ANEPPQ. Верхняя запись на каждой панели – оптическая регистрация, нижняя – одновременная электрофизиологическая регистрация нейрона в режиме фиксации тока. (B) и (D) – усреднение 5 записей, сделанных со скоростью 1000 кадров/сек; (F) – усреднение 10 записей, сделанных со скоростью 5000 кадров/сек.

следствие, высокое отношение сигнал/шум при оптической регистрации электрических потенциалов (Bullen&Saggau 1999).

8.3. Выводы.

Биолистическая доставка позволяет быстро и с высокой точностью доставить потенциал-зависимый краситель (ПЗК) в нужный участок ткани

мозга млекопитающего без классического перфузирования нейрона через пэч-пипетку, а также возможность работать с липофильными ПЗК с высокой амплитудой сигнала. Отсутствие перфузирования вместе с возможностью регистрации активности не только от сомы, но и от специфических компартментов нейрона млекопитающего делает метод потенциально очень перспективным для изучения субклеточных механизмов пластичности. К недостаткам метода относится достаточно высокая трудоемкость и сложность отладки под конкретный объект.

9. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В настоящей работе было впервые продемонстрировано, что несинаптические изменения, лежащие в основе следов памяти, могут вызывать локальные компартиментализованные 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 компартиментализованного 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 компартиментализованными 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 участии 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.

10. 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 деполяризации мембраны и увеличения постоянного неинактивируемого натриевого тока, сохраняющиеся 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 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 (standard error of the mean) – стандартная ошибка среднего

AP (action potential) – ПД (потенциал действия)

4-AP (4-АП) – 4-аминопиридин

PC – процеребрум

ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал

ТПСП – тормозный постсинаптический потенциал

5,7-DHT – 5,7-дигидрокситриптамин

5-НТ – серотонин

NMDG – N-митил-D-глукамин

CGC (cerebral giant cell) – гигантская церебральная клетка

MtC3 (metacerebral cell #3) – третья метациеребральная 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 (artificial cerebrospinal fluid) – искусственная церебро-спинальная жидкость

ПЗК – потенциал-зависимый краситель

HVA (high voltage activated) – высокопороговые кальциевые каналы

INa(P) – медленно инактивируемый натриевый ток

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

УС / БС – условный стимул / безусловный стимул

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи автора по теме диссертации в реферируемых журналах из списка ВАК.

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. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. 62(1):100-7

2. Асеев Н.А., Ушаков В.Л., Никитин Е.С., Рошин М.В., Иерусалимский В.Н., Балабан П.М. (2012) Разработка метода биолистической доставки потенциалзависимых красителей в клетки срезов живого мозга млекопитающих для оптической регистрации нейронной активности. Ядерная физика и инжиниринг. - Москва: МАИК "Наука/Интерпериодика", 2011. - стр. 472-478.

3. Никитин Е. С., Н. А. Асеев, П. М. Балабан. (2013) Усовершенствованная оптическая регистрация нейрональной активности с использованием потенциал-зависимых красителей. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. 6 (63): 656-66.

4. Никитин Е.С. Балабан П.М. (2011) Структурно-функциональная организация сети серотонинэргических нейронов наземной улитки. Журнал высшей нервной деятельности 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 клылоногого 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.

Тезисы конференций по теме диссертации.

1. НИКИТИН Е.С. (1999) Активность нейронной сети процеребрума наземного моллюска *Helix* кодирует информацию о запахе. Тезисы конференции молодых ученых по проблемам высшей нервной деятельности, посвященной 90-летию со дня рождения чл.-корр АН и АПН СССР Л.Г. Воронина. С.18.

2. Никитин Е.С. (2001) Нейронные механизмы втягивания щупальца виноградной улитки в ответ на запах. Тезисы конференции молодых ученых ИВНДиНФ и МГУ им. М.В.Ломоносова. Москва.

3. Никитин Е.С. (2002) Анализ информации о запахе и центральная регуляция втягивания щупальца у виноградной улитки *Helix*. Тезисы конференции молодых ученых ИВНДиНФ и МГУ им. М.В.Ломоносова. Москва. С. 18.

4. Никитин Е.С. (2007) Роль долговременной деполяризации и несинаптической пластичности в ассоциативной памяти. Тезисы доклада Москва Тезисы докладов XX Съезда Физиологического Общества Имени И.П. Павлова, 4-8 июня 2007.

5. Nikitin E.S. (2000) Optical Recording of Odor-Evoked Responses in the Olfactory Brain 6th Eastern Europe conference of ISIN: "Simpler Nervous Systems". Pushino, Russia, September 2000.

6. Nikitin E.S. (2001) Optical Recording of Odor-Evoked Responses in the Olfactory Brain of the Naive and Aversively-Trained Terrestrial Snails. Scloss Elmau, Germany. P.100.

7. Nikitin E.S. (2001) Odor-evoked response in the olfactory brain of the terrestrial snail. School and conference on chemical senses: from molecules to perception.

8. Nikitin E., Zakharov., Balaban (2003) Regulation of tentacle length in snails by odor concentration. 6th IBRO World Congress, Prague, Czech Republic, July 2003.

9. Nikitin E., Kiss T., Kemenes I., O'Shea M., Benjamin P. R. & Kemenes G. (2004) The Effect of Classical Reward Conditioning on The Persistent Sodium Current of a Modulatory Neuron Contributing to Associative Plasticity in a Molluscan Feeding Network. 4th Forum of European Neuroscience, Lisbon, Portugal, July 2004.

10. Nikitin E, Kiss T, O`Shea M, Benjamin P.R. and Kemenes G.A (2005) cAMP-responsive persistent sodium current in a state-setting molluscan modulatory interneuron 18th National Meeting of the British Neuroscience Association, Brighton, UK, 3rd – 6th April, 2005, ISSN 1345-8301 2005, p 30.

11. E.Nikitin, T.Kiss; K.Staras; M.O'Shea; P.R.Benjamin; G.Kemenes (2005) Increase in A Persistent Sodium Current And Maintained Membrane

Depolarization After Camp Injection In A State-Setting Molluscan Modulatory Interneuron. Proceedings of the 35th SFN Annual Meeting, Washington DC, USA, November. Program No. 151.1

12. Vavoulis D.V., E.S. Nikitin, G. Kemenes, J. F. Feng, P. R. Benjamin (2006) Neuronal plasticity in a molluscan feeding CPG: computational modelling of the Cerebral Giant Cells in *Lymnaea* (2006) Proceedings of the 36th SFN Annual Meeting, Atlanta, October.

13. E.S. Nikitin, P. M. Balaban, G. Kemenes (2007) Somal depolarization leads to the potentiation of single axonal spikes in a state-setting molluscan modulatory neuron. Proceedings of the 37th Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, program No. 364.14.

14. Nikitin E.S. Balaban P.M. Optical Recording Axonal spike processing and its alterations concomitant with long-term memory. Proceedings of Topical Problems of Biophotonics-2009” 19 – 24 Jun 2009 Nizhny Novgorod, Samara. p 257

15. Nikitin E.S. Balaban P.M. Kemenes G. Axonal spike processing in *Lymnaea* may be related to memory retrieval. Abstracts of the IXth International Society of Invertebrate Neurobiology Meeting, St. Petersburg, 9-13 Sept. 2009.

16. Nikitin E.S. Malyshev A.Y. Balaban P.M. Baranauskas G. Chistiakova M. Volgushev M. (2009) Temperature dependence of action potential generation in neurons and models. Proceedings of the 39th Meeting of the Society for Neuroscience. Society for Neuroscience, Chicago, IL, USA, 2009.

17. Volgushev M.A. Malyshev M.Y. Nikitin E.S. (2011) Temperature dependence of action potential initiation in neocortical neurons and conductance based models. Proceedings of the 41th Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, USA, program No. 239.11.

18. Nikitin E.S. Korshunova T.A. Balaban P.M. Kemenes G. (2011) Learning-induced alterations of axonal spike processing and long-term associative memory in *Lymnaea*. Proceedings of the 41th Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, USA, program No. 766.25.

19. Vavoulis, DV., Nikitin, ES., Feng, J. Benjamin, P.R. and Kemenes, G. (2007) Computational model of a modulatory cell type in the feeding network of the snail, *Lymnaea stagnalis*. BMC Neuroscience, 8 ((Suppl 2)): P113.

20. Volgushev M.A. Ilin V., Nikitin E. (2013) Network Interactions: Signal Propagation. Proceedings of the 43th Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, program No. 520.15.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Балабан П.М., Захаров И.С., Мац В.Н. (1985) Прижизненное избирательное окрашивание серотонинергических нервных клеток 5,7-диокситриптамином. ДАН СССР. Т.283№ 3, С.735-737.

2. Барский И.Я., Поляков Н.И., Якубенас В.А. Контактная микроскопия. М.: Медицина, 1976.

3. Колесников В. А., Зеленина И. А., Семенова М. Л., Shafei R., Зеленин А. В. Баллистическая трансфекция клеток млекопитающих *in vivo*. Онтогенез 1995. 26(6): 467-80.

4. Сулова Е. А., Чудаков Д. М. Генетически кодируемые внутриклеточные сенсоры на основе флуоресцентных белков (обзор). Биохимия 2007. 72(7): 837-856.

5. Akemann W., Mutoh H., Perron A., Rossier J., Knöpfel T. Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. Nat Methods. 2010. 7(8): 643-649.

6. Aldenhoff JB, Hofmeier G, Lux HD, and Swandulla D. (1983) Stimulation of a sodium influx by cAMP in *Helix* neurons. Brain Res 276: 289–296.

7. Alexander J Jr, Audesirk TE, Audesirk GJ (1984) One-trial reward learning in the snail *Lymnaea stagnalis*. J Neurobiol 15(1):67–72.

8. Alle H., Geiger J.R. Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. Science. 2006. 311(5765):1290-3.

9. Alzheimer C, Schwindt PC, and Crill WE. (1993) Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. J Neurosci 13: 660–673.

10. Amaya F., Wang H., Costigan M., Allchorne A.J., Hatcher J.P., Egerton J., Stean T., Morisset V., Grose D., Gunthorpe M.J., Chessell I.P., Tate S., Green P.J., Woolf C.J. The voltage-gated sodium channel Na_v1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. J. Neurosci. 2006. 26:12852–12860.

11. Antic S., Cohen L.B., Lam Y.W. et al. (1999) Fast multisite optical measurement of membrane potential: three examples. FASEB J. V. 13. Suppl 2. P. 271- 276.

12. Antic S., Major G., Chen W.R., Wuskel J., Loew L., Zecević D. Fast voltage-sensitive dye recording of membrane potential changes at multiple sites on an individual nerve cell in the rat cortical slice. *Biol Bull.* 1997. 193(2): 261.
13. Antic S., Major G., Zecevic D. Fast optical recordings of membrane potential changes from dendrites of pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 1999. 3(82): 1615-1621.
14. Antic S., Zecevic D. Optical signals from neurons with internally applied voltage-sensitive dyes. *J. Neurosci.* 1995. 15: 1392-1405.
15. Antic SD. Action potentials in basal and oblique dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 2003;550:35–50.
16. Antic, S., Wuskell, J.P., Loew, L., and Zecevic, D. (2000). Functional profile of the giant metacerebral neuron of *Helix aspersa*: temporal and spatial dynamics of electrical activity in situ. *J. Physiol.* 527, 55–69.
17. Antonov, I., Antonova, I., Kandel, E.R., and Hawkins, R.D. (2003). Activity-dependent presynaptic facilitation and hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in *Aplysia*. *Neuron* 37, 135–147.
18. Arakelov, G. G., Marakjueva, I. V., & Palikhova, T. A. (1991). Structural and functional analysis of monosynaptic connections between identified neurons of *Helix lucorum*. In D. A. Sakharov & W. Winlow (Eds.), *Simple nervous systems* (pp. 258–269). New York: Manchester Univ. Press.
19. Arshavsky Y.I., Deliagina T.G., Gamkrelidze G.N. et al. (1993) Pharmacologically induced elements of the hunting and feeding behavior in the pteropod mollusc, *Clione limacina*. I. Effects of GABA . *J. Neurophysiol.* V. 69. P. 512-521.
20. Arshavsky Y.I., Deliagina T.G., Orlovsky G.N., Panchin Y.V. (1989) Control of feeding movements in the ptero- pod mollusc, *Clione limacina* II. *Exptl. Brain Res.*. V. 78. P. 387-397.
21. Astman N, Gutnick MJ, and Fleidervish IA. (1998) Activation of protein kinase C increases neuronal excitability by regulating persistent Na⁺ current in mouse neocortical slices. *J Neurophysiol* 80: 1547–1551.
22. Atema, J. (1995) Chemical signals in the marine environment: dispersal, detection, and temporal signal analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 62–66.

23. Awatramani, G.B., Price, G.D., and Trussell, L.O. (2005). Modulation of transmitter release by presynaptic resting potential and background calcium levels. *Neuron* 48, 109–121.
24. Bailey CH, Bartsch D, and Kandel ER. (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13445–13452.
25. Baker B. J., Kosmidis E. K., Vucinic D., Falk C. X., Cohen L. B., Djuricic M., Zecevic D. (2005) Imaging brain activity with voltage- and calcium-sensitive dyes. *Cell Mol Neurobiol.* 25(2): 245-82.
26. Baker B. J., Mutoh H., Dimitrov D., Akemann W., Perron A., Iwamoto Y., Jin L., Cohen L. B., Isacoff E. Y., Pieribone V. A., Hughes T., Knopfel T. (2008) Genetically encoded fluorescent sensors of membrane potential. *Brain Cell Biol.* 36(1-4): 53-67.
27. Balaban P.M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. (2002) *Neurosci Biobehav Rev.* 26(5):597-630
28. Balaban, P. M. (1979). A system of command neurons in snail's escape behavior. *Acta Neurobiologine Experimentalis*, 39, 97–107.
29. Balaban, P. M. (1983). Postsynaptic mechanism of withdrawal reflex sensitization in the snail. *Journal of Neurobiology*, 14, 365–375.
30. Balaban, P. M. (1987). Serotonin-induced changes of the action potential duration in functionally different neurons of the snail. *Neurophysiologia*, 19, 316–322.
31. Balaban, P. M. (1991). Command neurones, command function and decision making. In D. A. Sakharov & W. Winlow (Eds.), *Simple nervous systems* (pp. 360–374). New York: Manchester Univ. Press.
32. Balaban, P. M. (1993) Behavioral neurobiology of learning in terrestrial snails. *Prog. Neurobiol.* 41: 1-19
33. Balaban, P. M. (1993). Behavioral neurobiology of learning in terrestrial snails. *Progress in Neurobiology*, 41, 1–19.
34. Balaban, P. M., Zakharov, I. S., & Matz, V. N. (1985). Selective vital staining of serotonergic cells by 5,7-dihydroxytryptamine. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 283, 735–738.

35. Balaban, P. M., Zakharov, I. S., Maksimova, O. A., & Chistyakova, M. V. (1986). Serotonin significance in formation of defensive conditioned reflex to food in snail, *Neurophysiologia*, 18, 291–298.
36. Balaban, P., & Bravarenko, N. (1993). Long-term sensitization and environmental conditioning in terrestrial snails. *Experimental Brain Research*, 96, 487–493.
37. Balaban, P., Zakharov, I., & Chistyakova M. (1991). Integrative role of serotonin in withdrawal and feeding behavior in the terrestrial snail. In W. Winlow, O. S. Vinogradova, D. A. Sakharov (Eds.), *Signal molecules and behavior* (pp. 77–100). New York: Manchester Univ. Press.
38. Balaban, P.M., Vehovszky, A., Maximova, O.A., Zakharov, I.S. (1987) Effect of 5,7-dihydroxytryptamine on the food-aversive conditioning in the snail *Helix lucorum L.* *Brain Res.* 24; 404(1-2): 201-10.
39. Balaban, P.M., Zakharov, I. S. (1992). *Learning and development: Common basis of two phenomena.* Moscow: Nauka (in Russian).
40. Bao, J.-X., Kandel, E. 7., Hawkins, 7. D. (1998). Involvement of presynaptic and postsynaptic mechanisms in a cellular analog of classical conditioning at *Aplysia* sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture. *Journal of Neuroscience*, 18, 458–466.
41. Bastian C., Li Y. V. Fluorescence imaging study of extracellular zinc at the hippocampal mossy fiber synapse. *Neurosci Lett* 2007. 419(2): 119-24.
42. Benjamin PR, Staras K, Kemenes G (2000) A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. *Learn Mem* 7:124–131
43. Benjamin, P.R., Kemenes, G., and Kemenes, I. (2008). Non-synaptic neuronal mechanisms of learning and memory in gastropod molluscs. *Front. Biosci.* 13, 4051–4057.
44. Blum R, Kafitz KW, and Konnerth A. (2002) Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature* 419: 687–693.
45. Borst A., Heck D., Thomann M. Voltage signals of individual Purkinje cell dendrites in rat cerebellar slices. *Neurosci. Lett.* 1997. 238(1-2): 29-32.
46. Branco T., Staras K., Darcy K.J., Goda Y. Local dendritic activity sets release probability at hippocampal synapses. *Neuron.* 2008. 59(3): 475-485.

47. Bravarenko N.I., Ierusalimsky V.N., Korshunova T.A., Malyshev A.Y., Zakharov I.S., Balaban P.M. Participation of GABA in establishing behavioral hierarchies in the terrestrial snail. *Exp. Brain Res.* 2001. 141(3): 340-348.
48. Bravarenko, N. I., Gusev, P. V., Balaban P. M., Voronin, L. L. (1995). Postsynaptic induction of long-term synaptic facilitation in snail central neurons. *Neuroreport*, 6, 1182–1186.
49. Brembs, B., Lorenzetti, F.D., Reyes, F.D., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2002). Operant reward learning in *Aplysia*: neuronal correlates and mechanisms. *Science* 296, 1706–1709.
50. Brezina V, Orekhova IV, and Weiss KR. (2003) Neuromuscular modulation in *Aplysia*. II. Modulation of the neuromuscular transform in behavior. *J Neurophysiol* 90: 2613– 2628.
51. Brezina V., Orekhova I.V., Weiss K.R. Neuromuscular modulation in *Aplysia*. I. Dynamic model. *J. Neurophysiol.* 2003. 90(4): 2592-612.
52. Briggman K. L., Kristan W. B., Jr. Imaging dedicated and multifunctional neural circuits generating distinct behaviors. *J Neurosci* 2006. 26(42): 10925-33.
53. Bullen A., Saggau P. Optical recording from individual neurons in cell culture, in *Modern techniques in neuroscience research*, H. Johanson and U. Windhorst, Editors. 1999, Springer-Verlag: Heidelberg. 89-125 pp.
54. Bullen, A. & Saggau, P. (1999) High-speed random-access fluorescence microscopy. II. Fast quantitative measurements with voltage-sensitive dyes. *Biophys. J.*, 76, 2272–2287.
55. Canepari M., Vogt K., Zecevic D. Combining voltage and calcium imaging from neuronal dendrites. *Cell Mol. Neurobiol.* 2008. 58: 1079–1093.
56. Cannon M. B., Remington S. J. Redox-sensitive green fluorescent protein: probes for dynamic intracellular redox responses. A review. *Methods Mol Biol* 2008. 476: 51-65.
57. Carr DB, Cooper DC, Ulrich SL, Spruston N, and Surmeier DJ. (2002) Serotonin receptor activation inhibits sodium current and dendritic excitability in prefrontal cortex via a protein kinase C-dependent mechanism. *J Neurosci* 22: 6846–6855.

58. Chao TI, Alzheimer C. (1995) Effects of phenytoin on the persistent Na⁺ current of mammalian CNS neurons. *Neuroreport*. 11: 1778–1780.
59. Charlton, M.P., and Atwood, H.L. (1977). Modulation of transmitter release by intracellular sodium in squid giant synapse. *Brain Res.* 134, 367–371.
60. Chase, R. & Hall, B. (1996) Nociceptive inputs to C3, a motoneuron of the tentacle withdrawal reflex in *Helix aspersa*. *J. Comp. Physiol.A*, 179, 809–818.
61. Chase, R. & Tolloczko, B. (1989) Interganglionic dendrites constitute an output pathway from procerebrum of the snail *Achatina fulica*. *J. Comp. Neurol.*, 283, 143–152.
62. Chase, R. (1981) Electrical responses of snail tentacle ganglion to stimulation of the epithelium with wind and odors. *Comp. Biochem. Physiol.* 70A: 149-155.
63. Chase, R. and B. Tolloczko (1993) Tracing neural pathways in snail olfaction: from the tip of the tentacles to the brain and beyond. *Microscopy Res. Tech.* 24: 214-230.
64. Chase, R. and R. P. Croll (1981) Tentacular function in snail olfactory orientation. *J. Comp. Physiol.* 143: 357-362.
65. Christie, J.M., Chiu, D.N., and Jahr, C.E. (2011). Ca²⁺-dependent enhancement of release by subthreshold somatic depolarization. *Nat. Neurosci.* 14, 62–68.
66. Christou P., Murphy J. E., Swain W. 8. Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987. 84(12): 3962-6.
67. Cinneli, A. R. and J. S. Kauer (1992) Voltage-sensitive dyes and functional activity in the olfactory pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 15: 321-351.
68. Clay JR. (2003) On the persistent sodium current in squid giant axons. *J Neurophysiol* 89: 640–644.
69. Cohen L. B., Salzberg B. M., Grinvald A. Optical methods for monitoring neuron activity. *Annu Rev Neurosci* 1978. 1: 171-82.
70. Cohen L.B. More light on brains. *Nature*. 1988. 331: 112-113.
71. Cohen L.B., Salzberg B.M. Optical measurement of membrane potential. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1978. 83: 35-88.

72. Cohen, L. B. (1988) More light on brains. *Nature*, 331: 112-113.
73. Cohen, L. B. (1989) Optical measurement of action potential activity in invertebrate ganglia. *Ann. Rev. Physiol.* 51: 527-541.
74. Cohen, L.B. (1988) More light on brains. *Nature*, 331, 112–113.
75. Cohen, L.B. (1989) Optical measurement of action potential activity in invertebrate ganglia. *Ann. Rev. Physiol.*, 51, 527–541.
76. Colwill RM, Goodrum K, Martin A (1997) Pavlovian appetitive discriminative conditioning in *Aplysia californica*. *Anim Learn Behav* 25:268–276.
77. Connor JA and Hockberger P. (1984) A novel membrane sodium current induced by injection of cyclic nucleotides into gastropod neurones. *J Physiol* 354: 139–162.
78. Cooke, I., R. and A. Gelperin (2001) In vivo recording of spontaneous and odor-modulated dynamics in the *Limax* olfactory lobe. *J. Neurobiol.* 46: 126-141.
79. Crill, W.E. (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 349–362.
80. Croll, R. and R. Chase (1980) Plasticity of olfactory orientation to foods in snail *Achatina fulica*. *J. Comp. Physiol.* 136: 267-277.
81. Croll, R.P. (1988). Distribution of monoamines within the central nervous system of the juvenile pulmonate snail, *Achatina fulica*. *Brain Research*, 460, 29–49.
82. Cummins, T.R., Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Akopian, A.N., Wood, J.N., and Waxman, S.G. (1999). A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J. Neurosci.* 19, RC43.
83. Daoudal G and Debanne D. (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10: 456–465.
84. Darbon, P., Yvon, C., Legrand, J.C., and Streit, J. (2004). INaP underlies intrinsic spiking and rhythm generation in networks of cultured rat spinal cord neurons. *Eur. J. Neurosci.* 20, 976–988.
85. Davidson M.W. *Microscopy basics: numerical aperture*. Nikon MicroscopyU. 2010. Address online on the web: <http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasna.html>

86. Davis, W.J., Gillette, R., Kovac, M.P., Croll, R.P., and Matera, E.M. (1983). Organization of synaptic inputs to paracerebral feeding command interneurons of *Pleurobranchaea californica*. III. Modifications induced by experience. *J. Neurophysiol.* 49, 1557–1572.
87. Debanne D., Guérineau N.C., Gähwiler B.H., Thompson S.M. Action-potential propagation gated by an axonal I(A)-like K⁺ conductance in hippocampus. *Nature.* 1997. 389:286-289.
88. Debanne, D., Daoudal, G., Sourdet, V., and Russier, M. (2003). Brain plasticity and ion channels. *J. Physiol. (Paris)* 97, 403–414.
89. Delaney, K. R., A. Gelperin, M. S. Fee, J. A. Flores, R. Gervais, D. W. Tank, and D. Kleinfeld (1994) Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 669-673.
90. Dib-Hajj S, Black JA, Cummins TR, and Waxman SG. Na_v1.9: a sodium channel with unique properties. (2002) *Trends Neurosci* 25: 253–259.
91. Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Black JA, and Waxman SG. (1998) Na_v, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8963–8968.
92. Dib-Hajj, S.D., Fjell, J., Cummins, T.R., Zheng, Z., Fried, K., LaMotte, R., Black, J.A., and Waxman, S.G. (1999). Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 83, 591–600.
93. Djuricic M., Antic S., Chen W.R., Zecevic D. Voltage imaging from dendrites of mitral cells: EPSP attenuation and spike trigger zones. *J. Neurosci.* 2004. 24(30): 6703-6714.
94. Domaille D. W., Que E. L., Chang C. J. Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals. *Nat Chem Biol* 2008. 4(3): 168-75.
95. Dombeck D.A., Sacconi L., Blanchard-Desce M., Webb W.W. Optical Recording of Fast Neuronal Membrane Potential Transients in Acute Mammalian Brain Slices by Second-Harmonic Generation Microscopy. *J. Neurophysiol.* 2005. 94: 3628–3636.

96. Drake P.F. and Treistman SN. (1981) Mechanisms of action of cyclic nucleotides on a bursting pacemaker and silent neuron in *Aplysia*. *Brain Res* 218: 243–254.
97. Dudai Y. The cAMP cascade in the nervous system: molecular sites of action and possible relevance to neuronal plasticity. (1987) *CRC Crit Rev Biochem* 22: 221–281.
98. Eaton, R. C. (1984). Neural mechanisms of startle behavior. New York: Plenum.
99. Egan, M., E. and A. Gelperin (1981) Olfactory inputs to a bursting serotonergic interneuron in a terrestrial mollusc. *J. moll. Stud.* 47: 80-88.
100. Eliot, L. S., Hawkins, 7. D., Kandel, E. R., Schacher, S. (1994). Pairing-specific, activity-dependent presynaptic facilitation at *Aplysia* sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture. *Journal of Neuroscience*, 14, 368–383.
101. Elliott AA and Elliott JR. (1993) Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol* 463: 39– 56.
102. Engelmann R. Faster than real-time: confocal linescan systems provide ideal conditions for millisecond-resolution physiological imaging. *Nat. Methods.* 2006. 3: III-V.
103. England S, Bevan S, and Docherty RJ. (1996) PGE2 modulates the tetrodotoxinresistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurons via the cyclic AMP- protein kinase A cascade. *J Physiol* 495: 429–440.
104. Ermentrout, B., D.Flores, and A. Gelperin (1998) Minimal model of oscillation and waves in the *Limax* olfactory lobe with tests of model's predictive power. *J. Neurophysiol.* 79: 2677-2689.
105. Evans, C.G., and Cropper, E.C. (1998). Proprioceptive input to feeding motor programs in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 18, 8016–8031.
106. Evans, C.G., Jing, J., Rosen, S.C., and Cropper, E.C. (2003). Regulation of spike initiation and propagation in an *Aplysia* sensory neuron: gating in via central depolarization. *J. Neurosci.* 23, 2920–2931.
107. Fleidervish IA, Lasser-Ross N, Gutnick MJ, Ross WN. Na⁺ imaging reveals little difference in action potential-evoked Na⁺ influx between axon and soma. *Nat. Neurosci.* 2010. 13(7):852-60.

108. Fluhler E., Burnham V. G., Loew L. M. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* 1985. 24(21): 5749-55.
109. Foust A., Popovic M., Zecevic D., McCormick D.A. Action potentials initiate in the axon initial segment and propagate through axon collaterals reliably in cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 2010. 30(20):6891-902.
110. Foust, A.J., Yu, Y., Popovic, M., Zecevic, D., and McCormick, D.A. (2011). Somatic membrane potential and Kv1 channels control spike repolarization in cortical axon collaterals and presynaptic boutons. *J. Neurosci.* 31, 15490–15498.
111. Franceschetti S, Taverna S, Sancini G, Panzica F, Lombardi R, and Avanzini G. (2000) Protein kinase C-dependent modulation of Na⁺ currents increases the excitability of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 528 Pt 2: 291–304.
112. French, C.R., Sah, P., Buckett, K.J., and Gage, P.W. (1990). A voltage dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J. Gen. Physiol.* 95, 1139–1157.
113. Frick, A., Magee, J., and Johnston, D. (2004). LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat. Neurosci.* 7, 126–135.
114. Friedrich, A. and T. Teyke (1998) Identification of stimuli and input pathway mediating food-attraction conditioning in the snail, *Helix*. *J. Comp. Physiol.* 183: 247-254.
115. Frost, W. (2006). Memory traces: Snails reveal a novel storage mechanism. *Curr. Biol.* 16, R640–R641.
116. Fulton, D., Kemenes, I., Andrew, R.J., and Benjamin, P.R. (2005). A single time-window for protein synthesis-dependent longterm memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1347–1358.
117. Gainutdinov, K.L., Chekmarev, L.J., and Gainutdinova, T.H. (1998). Excitability increase in withdrawal interneurons after conditioning in snail. *Neuroreport* 9, 517–520.
118. Galanina, C. N., Zakharov, I. S., Maximova, O. A., & Balaban, P. M. (1986). The role of the giant cerebral serotonergic cell in organization of

feeding behavior in the snail. *Journal Vyssh. Nervn. Deyat.*, 36, 110–115 (in Russian).

119. Gan W. B., Grutzendler J., Wong W. T., Wong R. O., Lichtman J. W. Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron* 2000. 27(2): 219-25.

120. Garrido J.J., Giraud P., Carlier E., Fernandes F., Moussif A., Fache M.P., Debanne D., Dargent B. A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science*. 2003. 300(5628):2091-4.

121. Gelperin A. (1981) Synaptic modulation by identified serotonin neurons. In B. L. Jacobs & A. Gelperin (Eds.), *Serotonin neurotransmission and behavior* (pp. 288–307). Cambridge, MA: MIT Press.

122. Gelperin A. (1994) Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*, 396: 61-63.

123. Gelperin, A. (1989) Neurons and networks for learning about odors. *Perspectives in Neural Systems and Behavior*. © 1989 Alan R. Liss, Inc. 121-136.

124. Gelperin, A. (1998) Computational analysis of olfactory learning and waves. The 2nd R.L.E.C. International Symposium. March 16–18, Sendai, Japan.

125. Gelperin, A. and D. W. Tank (1990) Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*, 345: 437-440.

126. Gelperin, A., J. Flores, F. Raccuia-Behling and I. R. C. Cooke (2000) Nitric oxide and carbon monoxide modulate oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. *J. Neurophysiol.* 83: 116-127.

127. Gelperin, A., J. P. Kao and I. R. C. Cooke (2001) Gaseous oxides and olfactory computation. *Amer. Zool.* 41: 332-345.

128. Gervais, R., D. Kleinfeld, K. R. Delaney, and A. Gelperin (1996) Central and reflex neuronal responses elicited by odor in a terrestrial mollusc. *J. Neurophysiol.* 76: 1327-1339.

129. Ghosh A., Sydekum E., Haiss F., Peduzzi S., Zorner B., Schneider R., Baltes C., Rudin M., Weber B., Schwab M. E. Functional and anatomical reorganization of the sensory-motor cortex after incomplete spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci* 2009. 29(39): 12210-9.

130. Giese, K.P., Peters, M., and Vernon, J. (2001). Modulation of excitability as a learning and memory mechanism: A molecular genetic perspective. *Physiol. Behav.* 73, 803–810.
131. Gillette, 7., & Davis, W. J. (1977). The role of the metacerebral giant neuron in the feeding behavior of Pleurobranchaea. *Journal of Comparative Physiology*, 116, 125–159.
132. Gilly WF, Gillette R, and McFariane M. (1997) Fast and slow activation kinetics of voltage- gated sodium channels in molluscan neurons. *J Neurophysiol* 77: 2373–2384.
133. Glanzman, D. L., Mackey S. L., Hawkins, 7. D., Dyke, A. M., Lloyd, P. E., Kandel, E. 7. (1989). Depletion of serotonin in the nervous system of *Aplysia* reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as the heterosynaptic facilitation produced by tail shock. *Journal of Neuroscience*, 9, 4200–4013.
134. Gold, M.S., Reichling, D.B., Shuster, M.J., and Levine, J.D. (1996). Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1108–1112.
135. Granzow, B., & Kater, S. B. (1977). Identified higher-order neurons controlling the feeding motor program of *Helisoma*. *Neuroscience*, 2, 1049–1063.
136. Gray, C.M. & Skinner, J.E. (1988) Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the walking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. *Exp. Brain. Res.*, 69, 378–386.
137. Grewe B. 8., Helmchen 8. Optical probing of neuronal ensemble activity. *Curr Opin Neurobiol* 2009. 19(5): 520-9.
138. Grimaldi M., Atzori M., Ray P., Alkon D.L. Mobilization of calcium from intracellular stores, potentiation of neurotransmitter-induced calcium transients, and capacitative calcium entry by 4-aminopyridine. *J Neurosci.* 2001 21(9):3135-43.
139. Grinvald A., Salzberg B.M., Lev-Ram V., Hildesheim R. Optical recording of synaptic potentials from processes of single neurons using intracellular potentiometric dyes. *Biophys. J.* 1987. 51(4): 643-651.
140. Grubb M.S., Burrone J. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* 465(7301):1070-1074.

141. Gründemann J., Häusser M. Neuroscience: A plastic axonal hotspot. *Nature*. 465(7301):1022-1023.
142. Gupta R. K., Salzberg B. M., Grinvald A., Cohen L. B., Kamino K., Leshner S., Boyle M. B., Waggoner A. S., Wang C. H. Improvements in optical methods for measuring rapid changes in membrane potential. *J Membr Biol* 1981. 58(2): 123-37.
143. Hammer, M., & Menzel, 7. (1995). Learning and memory in the honeybee. *Journal of Neuroscience*, 15, 1617–1630.
144. Harris, K.D., Henze, D.A., Hirase, H., Leinekugel, X., Dradol, G., Czurko, A. & Buzsaki, G. (2002) Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in hippocampal pyramidal cells. *Nature*, 417, 738–741.
145. Hawkins, R.D., and Schacher, S. (1989). Identified facilitator neurons L29 and L28 are excited by cutaneous stimuli used in dishabituation, sensitization, and classical conditioning of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 9, 4236–4245.
146. Hawkins, R.D., Castellucci, V.F., and Kandel, E.R. (1981). Interneurons involved in mediation and modulation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. I. Identification and characterization. *J. Neurophysiol.* 45, 304–314.
147. Hernadi, L., Elekes, K., & S.-Rozsa, K. (1989). Distribution of serotonin-containing neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. Comparison of immunocytochemical and 5,6-dihydroxytryptamine labelling. *Cell and Tissue Research*, 257, 313–323.
148. Herzog, R.I., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2001). Persistent TTX-resistant Na⁺ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 1351–1364.
149. Him, A., and Dutia, M.B. (2001). Intrinsic excitability changes in vestibular nucleus neurons after unilateral deafferentation. *Brain Res.* 908, 58–66.
150. Hopfield J.J. (1999) Odor space and olfactory processing: Collective algorithms and neural implementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12506–12511
151. Hopfield, J.J. (1991) Olfactory computation and object perception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6462–6466.
152. Horikawa, K. & Armstrong, W.E. (1988) A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Meth.*, 25, 1–11.

153. Horikawa, K. & Armstrong, W.E. (1991) A biocytin-containing compound N-(2-aminoethyl) biotinamide for intracellular labeling and neuronal tracing studies: comparison with biocytin. *J. Neurosci. Meth.*, 37, 141–150.
154. Hu SJ, Song XJ, Greenquist KW, Zhang JM, and LaMotte RH. (2001) Protein kinase A modulates spontaneous activity in chronically compressed dorsal root ganglion neurons in the rat. *Pain* 94: 39–46.
155. Hu W., Tian C., Li T., Yang M., Hou H., Shu Y. Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat. Neurosci.* 2009. 12(8): 996-1002.
156. Inoue, T., Inokuma, Y., Watanabe, S. & Kirino, Y. (2004) In vitro study of odorevoked behavior in a terrestrial mollusk. *J. Neurophysiol.*, 91, 372–381.
157. Inoue, T., S. Watanabe and Y. Kirino (2001) Serotonin and NO complementary regulate generation of oscillatory activity in the olfactory CNS of the terrestrial mollusk. *J. Neurophysiol.* 85: 2634-2638.
158. Iwamoto T, Uehara A, Nakamura TY, Imanaga I, and Shigekawa M. (1999) Chimeric analysis of Na(+)/Ca(2+) exchangers NCX1 and NCX3 reveals structural domains important for differential sensitivity to external Ni(2+) or Li(+). *J Biol Chem* 274: 23094–23102.
159. Janvier N.C., Harrison S.M., and Boyett MR. (1997) The role of inward Na(+)/Ca(2+) exchange current in the ferret ventricular action potential. *J Physiol* 498: 611–25.
160. Jin L., Han Z., Platasa J., Wooltorton J.R., Cohen L.B., Pieribone V.A. Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron.* 2012. 75(5): 779-785.
161. Jones, N. (2001) The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51, 5–19.
162. Jones, N., Kemenes, G., and Benjamin, P.R. (2001). Selective expression of electrical correlates of differential appetitive classical conditioning in a feeding network. *J. Neurophysiol.* 85, 89–97.
163. Jones, N.G., Kemenes, I., Kemenes, G., and Benjamin, P.R. (2003). A persistent cellular change in a single modulatory neuron contributes to associative long-term memory. *Curr. Biol.* 13, 1064–1069.

164. Kampa, B.M., and Stuart, G.J. (2006). Calcium spikes in basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons during action potential bursts. *J. Neurosci.* 26, 7424–7432.
165. Kandel, E. R., Schwartz, J. H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*, 218, 433–443.
166. Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030–1038.
167. Kauer, J.S. & Moulton, D.G. (1974) Responses of olfactory bulb neurones to odour stimulation of small nasal areas in the salamander. *J. Physiol.*, 243, 717–737.
168. Kawahara, S., S. Toda, Y. Suzuki, S. Watanabe, and Y. Kirino (1997) Comparative study on neural oscillation in the procerebrum of the terrestrial snails *Incilaria bilineata* and *Limax marginatus*. *J. Exp. Biol.* 200: 1851-1861.
169. Kay, A.R., Sugimori, M., and Llinas, R. (1998). Kinetic and stochastic properties of a persistent sodium current in mature guinea pig cerebellar Purkinje cells. *J. Neurophysiol.* 80, 1167–1179.
170. Kemenes I, Kemenes G, O'Shea M, and Benjamin PR. (2001) Conditioning-induced changes in the electrical activity of a molluscan modulatory neuron can account for the expression of a long-term memory trace. *Soc Neurosci Abstr* 27: 644.6.
171. Kemenes, G., Rozsa, K.S., Stefano, G., and Carpenter, D.O. (1992). Distinct receptors for Leu- and Met-enkephalin on the metacerebral giant cell of *Aplysia*. *Cell. Mol. Neurobiol.* 12, 107–119.
172. Kemenes, G., Staras, K., and Benjamin, P.R. (2001). Multiple types of control by identified interneurons in a sensory-activated rhythmic motor pattern. *J. Neurosci.* 21, 2903–2911.
173. Kemenes, G., Staras, K., Benjamin, P. 7. (1997). In vitro appetitive classical conditioning of the feeding response in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurophysiology*, 78, 2351–2362.
174. Kemenes, I., Kemenes, G., Andrew, R.J., Benjamin, P.R., and O'Shea, M. (2002). Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *J. Neurosci.* 22, 1414–1425.

175. Keyhani, K., Scherer, P.W. & Mozell, M.M. (1997) A numerical model of nasal odourant transport for the analysis of human olfaction. *J. Theor. Biol.*, 186, 279–301.
176. Kimura, T., H. Suzuki, E. Kono and T. Sekiguchi (1998a) Mapping of interneurons that contribute to food aversive conditioning in the slug brain. *Learn. Mem.* 4: 376-388.
177. Kimura, T., S. S. Toda, T. Sekiguchi, Y. Kirino (1998c) Behavioral modulation induced by food odor aversive conditioning and its influence on the olfactory responses of an oscillatory brain network in the slug *Limax marginatus*. *Learn. Mem.* 4: 365-375.
178. Kimura, T., S. Toda, T. Sekiguchi, S. Kawahara, and Y. Kirino (1998b) Optical recording analysis of olfactory response of the procerebral lobe in the slug brain. *Learn. Mem.* 4: 389-400.
179. Kiss T. (2003) Evidence for a persistent Na-conductance in identified command neurones of the snail, *Helix pomatia*. *Brain Res* 989: 16–25.
180. Kits, K.S., and Mansvelder, H.D. (1996). Voltage gated calcium channels in molluscs: classification, Ca²⁺ dependent inactivation, modulation and functional roles. *Invert. Neurosci.* 2, 9–34.
181. Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., Sanford J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 1987. 327(6117): 70-73.
182. Kleinfeld, D., K. R. Delaney, M.S. Fee, J. A. Flores, D. W. Tank and A. Gelperin (1994) Dynamics of propagating waves in the olfactory network of a terrestrial mollusc: an electrical and optical study. *J. Neurophysiol.* 72: 1402-1419.
183. Koehl, M.A., Koseff, J.R., Crimaldi, J.P., McCay, M.G., Cooper, T., Wiley, M.B. & Moore, P.A. (2001) Lobster sniffing: antennule design and hydrodynamic filtering of information in an odour plume. *Science*, 294, 1948–1951.
184. Kojima, S., Nanakamura, H., Nagayama, S., Fujito, Y., and Ito, E. (1997). Enhancement of an inhibitory input to the feeding central pattern generator in *Lymnaea stagnalis* during conditioned taste-aversion learning. *Neurosci. Lett.* 230, 179–182.

185. Kole M.H. First node of Ranvier facilitates high-frequency burst encoding. *Neuron*. 2011. 71(4):671-82.
186. Kole M.H., Ilshner S.U., Kampa B.M., Williams S.R., Ruben P.C., Stuart G.J. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat. Neurosci.* 2008. 11(2): 178-186.
187. Kolesnikov V. A., Titomirov A. V., Zelenin A. V. [Genetic transformation of cultured animal cells using the high-velocity mechanical DNA poration]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1988. 302(5): 1236-8.
188. Konnerth, A. (1996) Localized postsynaptic Ca²⁺ signals and their possible role in coincidence detection. *Coincidence detection in the Nervous System*, © Human Frontier Science Program, Strasbourg, 86-95.
189. Kononenko NI, Kostyuk PG, and Shcherbatko AD. (1983) The effect of intracellular cAMP injections on stationary membrane conductance and voltage and time- dependent ionic currents in identified snail neurons. *Brain Res* 268: 321–338.
190. Kononenko, N.I., Medina, I., and Dudek, F.E. (2004). Persistent subthreshold voltage-dependent cation single channels in suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscience* 129, 85–92.
191. Kovac, M.P., Davis, W.J., Matera, E.M., Morielli, A., and Croll, R.P. (1985). Learning: neural analysis in the isolated brain of a previously trained mollusc, *Pleurobranchaea californica*. *Brain Res.* 331, 275–284.
192. Kuba H.Y., Oichi Y., Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na⁺ channel distribution at the axon initial segment. *Nature*. 465(7301): 1075-1078.
193. Kuner T., Augustine G. J. A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 2000. 27(3): 447-59.
194. Kupfermann I. Feeding behavior in *Aplysia*: a simple system for the study of motivation. *Behav. Biol.* 1974. 10(1): 1-26.
195. Kupfermann, I., and Weiss, K.R. (1982). Activity of an identified serotonergic neuron in free moving *Aplysia* correlates with behavioral arousal. *Brain Res.* 241, 334–337.
196. Kupfermann, I., Weiss, K. (1978). The command neuron concept. *Behavioral and Brain Sciences*, 1, 3–15.

197. Kupfermann, I., Weiss, K. 7. (1981). The role of serotonin in arousal of feeding behavior in *Aplysia*. In B. L. Jacobs & A. Gelperin (Eds.), *Serotonin neurotransmission and behavior* (Chap. 9, pp. 255–288). Cambridge, MA: MIT Press.
198. Lalli C.M. Structure and function of the buccal apparatus of *Clione limacina* (Phipps) with a review of feeding in Gymnosomatous pteropods II (1970) *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* V. 4. P. 101-118.
199. Lalli C.M., Gilmer R.W. (1989) *Pelagic Snails II The Biology of Holoplanktonic Gastropod Mollusks*. Stanford, Stanford: Univ.Press, P. 167-213.
200. Lam Y., Cohen L.B., Zochowski M.R. Effect of odorant quality on the three oscillations and the DC signal in the turtle olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 2003. 17(3): 436-446.
201. Laurent, G. & Davidowitz, H. (1994) Encoding of olfactory information with oscillating neural assemblies. *Sci. Wash.*, 265, 1872–1875.
202. Leão R.N., Mikulovic S., Leão K.E., Munguba H., Gezelius H., Enjin A., Patra K., Eriksson A., Loew L.M., Tort A.B., Kullander K. OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nat. Neurosci.* 2012. 15(11): 1524-1530.
203. Lemaire, M. & Chase, R. (1998) Twitching and quivering of the tentacles during snail olfactory orientation. *J. Comp. Physiol. A*, 182, 81–87.
204. Lewin MR and Walters ET. (1999) Cyclic GMP pathway is critical for inducing long-term sensitization of nociceptive sensory neurons. *Nat Neurosci* 2: 18–23.
205. Lieke E.E., Frostig R.D., Arieli A., Ts'o D.Y., Hildesheim R., Grinvald A. (1989) Optical imaging of central activity: real time imaging using extrinsic dye-signals and high resolution imaging based on slow intrinsic-signals. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 543-559.
206. Lim D.H., Mohajerani M.H., Ledue J., Boyd J., Chen S., Murphy T.H. In vivo Large-Scale Cortical Mapping Using Channelrhodopsin-2 Stimulation in Transgenic Mice Reveals Asymmetric and Reciprocal Relationships between Cortical Areas. *Front Neural. Circuits.* 2012. 6: 11.
207. Loew L. M. Design and characterization of electrochromic membrane probes. *J Biochem Biophys Methods* 1982. 6(3): 243-60.

208. Loew L. M., Bonneville G. W., Surow J. Charge shift optical probes of membrane potential. *Theory. Biochemistry* 1978. 17(19): 4065-71.
209. Loew L. M., Cohen L. B., Salzberg B. M., Obaid A. L., Bezanilla 8. Charge-shift probes of membrane potential. Characterization of aminostyrylpyridinium dyes on the squid giant axon. *Biophys J* 1985. 47(1): 71-7.
210. Loew L. M., Scully S., Simpson L., Waggoner A. S. Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential. *Nature* 1979. 281(5731): 497-9.
211. Loew L.M. Design and Use of Organic Voltage Sensitive Dyes. *Membrane Potential Imaging in the Nervous System: Methods and Applications*. Eds Canepari M., Zecevic D. New York, Heidelberg: Springer, 2011.13-23.
212. London J.A., Zecevic D., Cohen L.B. Simultaneous optical recording of activity from many neurons during feeding in Navanax. *J. Neurosci.* 1987. 7(3): 649-661.
213. London, J., A., D. Zecevic, L.B. Cohen (1987) Simultaneous optical recording of activity from many neurons during feeding in Navanax. *J. Neurosci.* 7(3): 649-661.
214. London, J.A., and Gillette, R. (1986). Mechanism for food avoidance learning in the central pattern generator of feeding behavior of *Pleurobranchaea californica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4058–4062.
215. Lorenzetti, F.D., Mozzachiodi, R., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2006). Classical and operant conditioning differentially modify the intrinsic properties of an identified neuron. *Nat. Neurosci.* 9, 17–19.
216. Losonczy, A., Makara, J.K., and Magee, J.C. (2008). Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452, 436–441.
217. Ludwar, B.Ch., Evans, C.G., Jing, J., and Cropper, E.C. (2009). Two distinct mechanisms mediate potentiating effects of depolarization on synaptic transmission. *J. Neurophysiol.* 102, 1976–1983.
218. Mackey, S. L., Kandel, E. 7., & Hawkins, 7. D. (1989). Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of *Aplysia* produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 9, 4227–4235.

219. Magee, J.C., and Johnston, D. (2005). Plasticity of dendritic function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 334–342.
220. Malyshev AY, Balaban PM (2002) Identification of mechanoafferent neurons in terrestrial snail: response properties and synaptic connections. *J Neurophysiol* 87(5):2364–2371.
221. Malyshev, A., Bravarenko, N., and Balaban, P. (1997). Dependence of synaptic facilitation postsynaptically induced in snail neurons on season and serotonin level. *NeuroReport* 8, 1179–1182.
222. Marder, E., Abbott, L.F., Turrigiano, G.G., Liu, Z., and Golowasch, J. (1996). Memory from the dynamics of intrinsic membrane currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13481–13486.
223. Marinesco S., Kolkman K.E., and Carew T.J. (2004) Serotonergic modulation in *Aplysia*. I. Distributed serotonergic network persistently activated by sensitizing stimuli. *J Neurophysiol* 92: 2468–2486.
224. McCrohan C.R., Winlow W. Interganglionic coordination and bilateral symmetry in the nervous systems of gastropod molluscs II Coordination of motor behavior / Eds Bush B.M.H., Clarac F. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1985. P. 33-62.
225. McCrohan CR and Gillette R. (1988) Cyclic AMP-stimulated sodium current in identified feeding neurons of *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res* 438: 115–123.
226. McCrohan, C.R., and Benjamin, P.R. (1980). Patterns of activity and axonal projections of the cerebral giant cells of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 85, 149–168.
227. McCrohan, C.R., and Kyriakides, M.A. (1989). Cerebral interneurons controlling feeding motor output in the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 147, 361–374.
228. Meyrand P., Simmers J., Moulins M. (1994) Dynamic construction of a neural network from multiple pattern generators in the lobster stomatogastric nervous system. *J. Neurosci.* V. 14. P. 630-644.
229. Milner, B., Squire, L.R., and Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445–468.

230. Milojkovic B.A., Radojicic M.S., Antic S.D. A strict correlation between dendritic and somatic plateau depolarizations in the rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 2005. 25(15): 3940-3951.
231. Mozzachiodi, R., and Byrne, J.H. (2010). More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends Neurosci.* 33, 17–26.
232. Mutoh H., Perron A., Dimitrov D., Iwamoto Y., Akemann W., Chudakov D. M., Knopfel T. Spectrally-resolved response properties of the three most advanced FRET based fluorescent protein voltage probes. *PLoS One* 2009. 4(2): e4555.
233. Nakagawa T., Oghalai J. S., Saggau P., Rabbitt R. D., Brownell W. E. Photometric recording of transmembrane potential in outer hair cells. *J Neural Eng* 2006. 3(2): 79-86.
234. Nakamura, H., Kobayashi, S., Kojima, S., Urano, A., and Ito, E. (1999). PKA-dependent regulation of synaptic enhancement between buccal motor neurons and its regulatory interneuron in *Lymnaea stagnalis*. *Zool. Sci.* 16, 387–394.
235. Nargeot, R., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (1999). In vitro analog of operant conditioning in *Aplysia*. II. Modifications of the functional dynamics of an identified neuron contribute to motor pattern selection. *J. Neurosci.* 19, 2261–2272.
236. Nguyen PV and Woo NH. (2003) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol* 71: 401–437.
237. Nirenberg M, Wilson S, Higashida H, Rotter A, Krueger K, Busis N, Ray R, Kenimer JG, and Adler M. (1983) Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate. *Science* 222: 794–799.
238. Nolen, T. G., & Hoy, R. (1984). Initiation of behavior by single neurons: the role of behavioral context. *Science*, 226, 992–994.
239. Osborne, N. N. (1984). Putative neurotransmitters and their coexistence in gastropod mollusks. In V. Chan-Palay & S. L. Palay (Eds.), *Coexistence of neuroactive substances in neurons* (pp. 395–410). New York: Wiley.

240. Palmer L.M., Clark B.A., Gründemann J., Roth A., Stuart G.J., Häusser M. Initiation of simple and complex spikes in cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* 2010. 588(10): 1709-1717.
241. Palmer L.M., Stuart G.J. (2006) Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 26(6):1854-63.
242. Palmer L.M., Stuart G.J. (2009) Membrane potential changes in dendritic spines during action potentials and synaptic input. *J. Neurosci.* 29(21): 6897-6903.
243. Perron A., Mutoh H., Akemann W., Gautam S. G., Dimitrov D., Iwamoto Y., Knopfel T. (2009) Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins for monitoring membrane potential. *Front Mol Neurosci.* 2: 5.
244. Plummer, M.R., and Kirk, M.D. (1990). Premotor neurons B51 and B52 in the buccal ganglia of *Aplysia californica*: synaptic connections, effects on ongoing motor rhythms, and peptide modulation. *J. Neurophysiol.* 63, 539–558.
245. Popovic M.A., Foust A.J., McCormick D.A., Zecevic D. The spatio-temporal characteristics of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons: a voltage imaging study. *J. Physiol.* 2011. 589: 4167-4187.
246. Prechtel J.C., Cohen L.B., Pesaran B., Mitra P.P., Kleinfeld D. Visual stimuli induce waves of electrical activity in turtle cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. 94: 7621-7626.
247. Prescott, S.A., Gill, N. & Chase, R. (1997) Neuronal circuit mediating tentacle withdrawal in *Helix aspersa*, with specific reference to the competence of the motor neuron C3. *J. Neurophysiol.*, 78, 2951–2965.
248. Pusch M, Bertorello L, and Conti F. (2000) Gating and flickery block differentially affected by rubidium in homomeric KCNQ1 and heteromeric KCNQ1/KCNE1 potassium channels. *Biophys J* 78: 211–226.
249. Raman IM and Bean BP. (1997) Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 17: 4517–4526.
250. Raman IM and Bean BP. (2001) Inactivation and recovery of sodium currents in cerebellar Purkinje neurons: evidence for two mechanisms. *Biophys J* 80: 729–737.
251. Ratte, S. Chase, R. (1997) Morphology of interneurons in the procerbrum of the snail *Helix aspersa*. *J. Comp. Neurol.*, 384, 359–372.

252. Ratte, S. Chase, R. (2000) Synapse distribution of olfactory interneurons in the procerebrum of the snail *Helix aspersa*. *J. Comp. Neurol.*, 417, 366–384.
253. Rhines L.D., Socolove P.G., Flores J., Tank D.W., Gelperin A. (1993) Cultured olfactory interneurons from *Limax maximus*: optical and electrophysiological studies of transmitter-evoked responses. *J. Neurophysiol.* 69.6: 1940-1947.
254. Ribeiro MJ, Serfozo Z, Papp A, Kemenes I, O’Shea M, Yin JCP, Benjamin PR, and Kemenes G. (2003) Cyclic AMP response element-binding (CREB)-like proteins in a molluscan brain: cellular localization and learning-induced phosphorylation. *Eur J Neurosci* 18: 1223–1234.
255. Rinberg D. A., Simmonet C., Groisman A. Pneumatic capillary gun for ballistic delivery of microparticles. (2005) *Applied Physics Letters*. 87: 014103.
256. Ross, S.T., and Soltesz, I. (2001). Long-term plasticity in interneurons of the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8874–8879.
257. Ross, W. N. (1989) Changes in intracellular calcium during neuron activity. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 491-506.
258. Saab CY, Cummins TR, and Waxman SG. (2003) GTP gamma S increases Nav1.8 current in small-diameter dorsal root ganglia neurons. *Exp Brain Res* 152: 415–419.
259. Sacconi L., Dombeck D. A., Webb W. W. Overcoming photodamage in second-harmonic generation microscopy: real-time optical recording of neuronal action potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. 103(9): 3124-9.
260. Sachse, S., Rappert, A. & Galizia, C.G. (1999) The spatial representation of chemical structure in the antennal lobe of honeybee: steps toward the olfactory code. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 3970–3982.
261. Sahley, C., A. Gelperin, and J. W. Rudy (1981a) One-trial associative learning modifies food preferences of a terrestrial mollusk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 640-642.
262. Sahley, C., J. W. Rudy, and A. Gelperin (1981b) An analysis of associative learning in a terrestrial mollusk. I. Higher-order conditioning, blocking and transient Pre-exposure effect. *J. Comp. Physiol.* 144: 1-8.

263. Sakharov, D. A. (1974). Genealogy of a neurone. Moscow: Nauka (in Russian).
264. Sakmann BF, Spindler AJ, Bryant SM, Linz KW, and Noble D. (2000) Distribution of a persistent sodium current across the ventricular wall in guinea pigs. *Circ Res* 87: 910–914.
265. Sanford J. C. The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 1988. 6(12): 299-302.
266. Schutt, A., E. Bazar and T. H. Bullock (1999a) Power spectra of ongoing activity of the snail brain can discriminate odorants. *Comp. Biochem. Physiol. [A]* 123: 95-110.
267. Schutt, A., T. H. Bullock and E. Bazar (1999b) Odorant-induced low-frequency activities of the *Helix* pedal ganglion are odorant-specific and related to behavior. *Comp. Biochem. Physiol. [A]* 124: 297-311.
268. Sedden, C. B., Walker, J. J., & Kerkut, G. A. (1968). The localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in neurons of *Helix aspersa*. *Symposia of the Zoological Society of London*, 22, 19–32.
269. Shefi O., Simonnet C., Baker M. W., Glass J. R., Macagno E. R., Groisman A. (2006) Microtargeted gene silencing and ectopic expression in live embryos using biolistic delivery with a pneumatic capillary gun. *J Neurosci*. 26(23): 6119-23.
270. Sheu SS, Sharma VK, and Uglesity A. Na⁺Ca²⁺ exchange contributes to increase of cytosolic Ca²⁺ concentration during depolarization in heart muscle. (1986) *Am J Physiol Cell Physiol* 250: C651–656.
271. Shimozone, S.S., Watanabe, S., Inoue, T. & Kirino, Y. (2001) Identification and characterization of an output neuron from the oscillatory molluscan olfactory network. *Brain Res.*, 921, 98–105.
272. Shu Y., Hasenstaub A., Duque A., Yu Y., McCormick D.A. Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature*. 2006. 441(7094):761-5.
273. Sinha S., Saggau P. Optical recording from populations of neurons in brain slices, in *Modern techniques in neuroscience research*, H. Johanson and U. Windhorst, Editors. 1999, Springer-Verlag: Heidelberg. 459-486 pp.

274. Smith TG, Jr., Barker JL, and Gainer H. (1975) Requirements for bursting pacemaker potential activity in molluscan neurones. *Nature* 253: 450–452.
275. Sokolov EN (1963) Perception and the conditioned reflex. Pergamon, Oxford.
276. Sonleitner A., Mannuzzu L. M., Terakawa S., Isacoff E. Y. Structural rearrangements in single ion channels detected optically in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. 99(20): 12759-64.
277. Spencer, G.E., Syed, N.I., and Lukowiak, K. (1999). Neural changes after operant conditioning of the aerial respiratory behavior in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci.* 19, 1836–1843.
278. Stafstrom, C.E. (2007). Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Curr.* 7, 15–22.
279. Staras K., Gyori J., Kemenes G. Voltage-gated ionic currents in an identified modulatory cell type controlling molluscan feeding. *Eur. J. Neurosci.* 2002. 15:109-119.
280. Staras, K., Gyori, J., and Kemenes, G. (2002). Voltage-gated ionic currents in an identified modulatory cell type controlling molluscan feeding. *Eur. J. Neurosci.* 15, 109–119.
281. Staras, K., Kemenes, G., and Benjamin, P.R. (1998). Pattern-generating role for motoneurons in a rhythmically active neuronal network. *J. Neurosci.* 18, 3669–3688.
282. Staras, K., Kemenes, I., Benjamin, P.R., and Kemenes, G. (2003). Loss of self-inhibition is a cellular mechanism for episodic rhythmic behavior. *Curr. Biol.* 13, 116–124.
283. Steinmetz P.N., Roy A., Fitzgerald P.J., Hsiao S.S., Johnson K.O., Niebur E. (2000) Attention modulates synchronized neuronal firing in primate somatosensory cortex. *Nature.* 404: 187-189.
284. Straub VA, Kemenes I, O’Shea M, Benjamin PR (2006) Associative memory stored by functional novel pathway rather than modifications of preexisting neuronal pathways. *J Neurosci* 26(15):4139–4146.
285. Straub, V.A., and Benjamin, P.R. (2001). Extrinsic modulation and motor pattern generation in a feeding network: a cellular study. *J. Neurosci.* 21, 1767–1778.

286. Straub, V.A., Styles, B.J., Ireland, J.S., O'Shea, M., and Benjamin, P.R. (2004). Central localization of plasticity involved in appetitive conditioning in *Lymnaea*. *Learn. Mem.* 11, 787–793.
287. Styles, B. (2004). Learning and sensory processing in a simple brain. PhD thesis, University of Sussex, Brighton, East Sussex, United Kingdom.
288. Sudlow LC, Huang RC, Green DJ, and Gillette R. (1993) cAMP-activated Nacurrent of molluscan neurons is resistant to kinase inhibitors and is gated by cAMP in the isolated patch. *J. Neurosci* 13: 5188–5193.
289. Suzurikawa J., Tani T., Nakao M., Tanaka S., Takahashi H. Voltage-sensitive-dye imaging of microstimulation-evoked neural activity through intracortical horizontal and callosal connections in cat visual cortex. *J Neural Eng* 2009. 6(6): 066002.
290. Swandulla D. (1987) Cationic membrane conductances induced by intracellularly elevated cAMP and Ca²⁺: measurements with ion-selective microelectrodes. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 898–903.
291. Swandulla, D., and Lux, H.D. (1984). Changes in ionic conductances induced by cAMP in *Helix* neurons. *Brain Res.* 305, 115–122.
292. Takahashi N., Sasaki T., Usami A., Matsuki N., Ikegaya Y. Watching neuronal circuit dynamics through functional multineuron calcium imaging (fMCI). *Neurosci Res* 2007. 58(3): 219-25.
293. Taylor A. L., Cottrell G. W., Kleinfeld D., Kristan W. B., Jr. Imaging reveals synaptic targets of a swim-terminating neuron in the leech CNS. *J Neurosci* 2003. 23(36): 11402-10.
294. Teyke T, Weiss KR, and Kupfermann I. (1990) Appetitive feeding behavior of *Aplysia*: behavioral and neural analysis of directed head turning. *J Neurosci* 10: 3922–3934.
295. Teyke, T. Gelperin, A. (1999) Olfactory oscillations augment odour discrimination not odour identification by *Limax* CNS. *Neuroreport*, 10, 1061–1068.
296. Thompson, R.F. (2005). In search of memory traces. *Annu. Rev. Psychol.* 56, 1–23.
297. Timofeev, I., Grenier, F., and Steriade, M. (2004). Contribution of intrinsic neuronal factors in the generation of cortically driven electrographic seizures. *J. Neurophysiol.* 92, 1133–1143.

298. Tsau, Y., Falk, C. X., Cohen, L, Wu, J.-Y., & Zecevic, D. (1993). Multi-neuronal measurement of spike activity in invertebrate ganglia: complexity in a simple system. *Concepts in Neuroscience*, 4, 89–104.
299. Tsutsui H., Karasawa S., Okamura Y., Miyawaki A. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat Methods* 2008. 5(8): 683-5.
300. Urbani A, Belluzzi O. (2000) Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur j Neurosci* 12: 3567–3574.
301. Vavoulis, D.V., Straub, V.A., Kemenes, I., Kemenes, G., Feng, J., and Benjamin, P.R. (2007). Dynamic control of a central pattern generator circuit: A computational model of the snail feeding network. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2805–2818.
302. Vehovsky A., Kemenes G., Hiripi L., Hernadi L. (1988) Reversible effect of 5'6-DHT treatment on *Helix*: a combined behavioral, electrophysiological and biochemical study /*Symposia Biologica Hungarica*. 36: 403-414.
303. Vehovzsky, A, Hernadi, L., Elekes, K., & Balaban, P. (1993). Serotonergic input on identified command neurons in *Helix*. *Acta Biologica Hungarica*, 44, 97–101.
304. Vervaeke, K., Hu, H., Graham, L.J., and Storm, J.F. (2006). Contrasting effects of the persistent Na⁺ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* 49, 257–270.
305. Viala D., Freton E. (1983) Evidence for respiratory and loco-motor pattern generators in the rabbit cervico-thoracic cord and for their interactions. *Exptl. Brain Res.*. V. 49. P. 247-256.
306. Vickers, N.J. (2000) Mechanisms of animal navigation in odour plumes. *Biol. Bull.*, 198, 203–212.
307. Vickers, N.J., Christensen, T.A., Baker, T.C. & Hildebrand, J.G. (2001) Odour plume dynamics influence the brain's olfactory code. *Nature*, 401, 466–470.
308. Wagner N. *Die Wirbellosen des Weissen Meeres: Zoologische Forschungen an der Kuste des Solowetzkiſchen Meerbusens in den Sommermonaten der Jahre*. Leipzig: Verlag Von Wilhelm Engelmann, 1885. 168s.

309. Watanabe, S., Kawahara, S. & Kirino, Y. (1998) Morphological characterization of the bursting and nonbursting neurons in the olfactory center of the terrestrial slug *Limax marginatus*. *J. Exp. Biol.*, 201, 925–930.
310. Weimann J.M., Meyrand P., Marder E. Neurons that form multiple pattern generators: identification and multiple activity patterns of gastric/pyloric neurons in the crab stomatogastric system. (1991) *J. Neurophysiol.* V. 65. P. 111-122.
311. Weiss KR, Koch UTJ, Mandelbaum DE, and Kupfermann I. (1981) Neural and molecular mechanisms of food induced arousal in *Aplysia californica*. *Adv Physiol Sci* 23: 305–344.
312. Weiss, K.R., & Kupfermann, I. (1976). Homology of the giant serotonergic neurons (metacerebral cells) in *Aplysia* and pulmonate mollusks. *Brain Research*, 117, 33–49.
313. White, J., Mail, S. & Kauer, J.S. (2002) Using biology to guide development of an artificial olfactory system. In Ayers, J., Davis, J.L. & Rudolph, A. (Eds), *Neurotechnology for Biomimetic Robots*. MIT Press, Cambridge.
314. Wiersma, C. A. G., & Ikeda, K. (1964). Interneurons commanding swimmeret movements in the crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 12, 509–525.
315. Wiersma, C. A. G., (1938). Function of the giant fibers of the central nervous system of the crayfish. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 38, 661–662.
316. Williams RW, Herrup K. "The control of neuron number". *Annual Review of Neuroscience*. 1988. 11: 423–53.
317. Willows A. O. D. (1967). Behavioral acts elicited by stimulation of single identifiable brain cells. *Science*, 157 570–574.
318. Wojtowicz, J.M., and Atwood, H.L. (1984). Presynaptic membrane potential and transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J. Neurophysiol.* 52, 99–113.
319. Wu J.Y., Cohen. L.B., Falk C.X. (1994) Neuronal activity during different behaviors in *Aplysia*: a distributed organization? *Science*. V. 263. P. 820-823.
320. Wu J.Y., Lam Y.W., Falk C.X., Cohen L.B., Fang J., Loew L., Prechtel J.C., Kleinfeld D., Tsau Y. Voltage-sensitive dyes for monitoring

multineuronal activity in the intact central nervous system. *Histochem J.* 1998. 30(3): 169-187.

321. Wu, Z.Z., Li, D.P., Chen, S.R., and Pan, H.L. (2009). Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel beta subunit. *J. Biol. Chem.* 284, 36453–36461.

322. Yan P., Acker C.D., Zhou W.L., Lee P., Bollensdorff C., Negrean A., Lotti J., Sacconi L., Antic S.D., Kohl P., Mansvelder H.D., Pavone F.S., Loew L.M. Palette of fluorinated voltage-sensitive hemicyanine dyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. 109(50): 20443-20448.

323. Yeoman MS, Kemenes G, Benjamin PR, and Elliott CJH. (1994b) Modulatory role for the serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of the snail, *Lymnaea*. II. Photoinactivation. *J Neurophysiol* 72: 1372–1382.

324. Yeoman MS, Pieneman AW, Ferguson GP, Ter Maat A, and Benjamin PR. (1994a) Modulatory role for the serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of the snail, *Lymnaea*. I. Fine wire recording in the intact animal and pharmacology. *J Neurophysiol* 72: 1357–1371.

325. Yeoman, M.S., Brierley, M.J., and Benjamin, P.R. (1996). Central pattern generator interneurons are targets for the modulatory serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 75, 11–25.

326. Yu, Y., Maureira, C., Liu, X., and McCormick, D. (2010). P/Q and N channels control baseline and spike-triggered calcium levels in neocortical axons and synaptic boutons. *J. Neurosci.* 30, 11858–11869.

327. Zaitseva, O. V. (1991) Structural organization of the tentacular sensory system in land pulmonates. *Simpler nervous systems*, Manchester University Press. 238-257.

328. Zakharov I.S., Ierusalimsky V.N., Balaban P.M. (1995) Pedal serotonergic neurones modulate the synaptic input of withdrawal interneurons of *Helix*. *Invertebrate Neurosci.* 1: 41-52.

329. Zakharov IS, Balaban PM (1987) Neural mechanisms of age-dependent changes in avoidance behaviour of the snail *Helix lucorum*. *Neuroscience* 23(2):721–729.

330. Zakharov, I. S., Balaban, P. M. (1987). Serotonin and aversive conditioning in adult and juvenile snails. In C. Woody, D. Alkon, & J. McGaugh

(Eds.), Cellular mechanisms of conditioning and behavioral plasticity (pp. 105–108). New York: Plenum.

331. Zakharov, I. S., Balaban, P. M. (1991). Serotonergic modulation of withdrawal behavior in *Helix*. In D. A. Sakharov & W. Winlow (Eds.), Simple nervous systems (pp. 316–329). New York: Manchester Univ. Press.

332. Zakharov, I. S., Ierusalimsky, V. N., & Balaban, P. M. (1995). Pedal serotonergic neurons modulate the synaptic input of withdrawal interneurons in *Helix*. *Invertebrate Neuroscience*, 1, 41–51.

333. Zakharov, I.S., Matz, V.N. & Balaban, P.M. (1982) Role of the giant cerebral neuron in control of the defensive behavior of *Helix lucorum*. (in Russian). *Neurofisiologiya*, 14, 262–266. 2844.

334. Zecevic D. Multiple spike-initiation zones in single neurons revealed by voltage-sensitive dyes. *Nature* 1996. 381(6580): 322-5.

335. Zecevic D., Wu J. Y., Cohen L. B., London J. A., Hopp H. P., Falk C. X. Hundreds of neurons in the *Aplysia* abdominal ganglion are active during the gill-withdrawal reflex. *J Neurosci* 1989. 9(10): 3681-9.

336. Zelenin A. V., Kolesnikov V. A., Tarasenko O. A., Shafei R. A., Zelenina I. A., Mikhailov V. V., Semenova M. L., Kovalenko D. V., Artemyeva O. V., Ivaschenko T. E., Evgrafov O. V., Dickson G., Baranovand V. S. Bacterial beta-galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection. *FEBS Lett* 1997. 414(2): 319-22.

337. Zhang F., Wang L.P., Brauner M., Liewald J.F., Kay K., Watzke N., Wood P.G., Bamberg E., Nagel G., Gottschalk A., Deisseroth K. (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*. 446(7136): 633–639.

338. Zhang, W., and Linden, D.J. (2003). The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 885–900.

339. Zhang, Y., Lu, H., and Bargmann, C.I. (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 438, 179–184.

340. Zhou W.L., Yan P., Wuskell J.P., Loew L.M., Antic S.D. Intracellular long-wavelength voltage-sensitive dyes for studying the dynamics of

action potentials in axons and thin dendrites. *J. Neurosci. Methods*. 2007. 164(2): 225-239.

341. Zochowski M., Cohen L.B., Fuhrmann G., Kleinfeld D. (2000) Distributed and partially separate pools of neurones are correlated with two different components of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 20(22): 8485-8492.