

Российская Академия Наук  
Институт высшей нервной деятельности и  
нейрофизиологии

На правах рукописи  
УДК 612.822.3

Хахалин Арсений Сергеевич

**Анализ вкладов пре- и постсинаптических  
механизмов пластичности  
на ранних фазах длительной потенциации**

Специальность: 03.00.13 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2005

Работа выполнена в группе синаптической пластичности (при лаборатории нейрофизиологии обучения) Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, кандидат физико-математических наук

**А.А. Фролов**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук **П.М. Балабан**

кандидат биологических наук **И.Н. Шаронова**

**Ведущее учреждение:**

Биологический факультет Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова. Кафедра высшей нервной деятельности.

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ на заседании специализированного совета \_\_\_\_\_ при Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, по адресу: 117865, Москва, ул. Бутлерова, д. 5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (ул. Бутлерова, д. 5а).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2005 г.

Учёный секретарь специализированного совета,  
доктор биологических наук

О.Х. Коштоянц

# **Общая характеристика работы<sup>1</sup>**

## **Актуальность проблемы**

Феномен длительной потенциации (ДП) в синапсах пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа является наиболее известной электрофизиологической моделью памяти. Однако, несмотря на популярность модели, вопрос о механизмах поддержания ранних фаз ДП (от нескольких секунд до десятка минут) до сих пор дискутируется. Ряд исследователей предполагает, что поддержание ДП на ранних фазах происходит главным образом за счёт пресинаптических механизмов пластичности (изменения вероятности выброса медиатора из пресинапса; Kullmann 2003; Voronin & Cherubini 2003; Voronin & Cherubini 2004); другие относят основные эффекты ранних фаз ДП на счёт постсинаптических механизмов (встраивания в постсинаптическую мембрану новых АМПА-рецепторов, либо фосфорилирования уже имеющихся; Malinow & Malenka 2002; Isaac 2003).

Многие работы свидетельствуют о том, что на ранних фазах ДП пластические эффекты могут иметь место как в пресинаптическом, так и в постсинаптическом нейронах (Kullmann 2003; Palmer *et al.* 2004). Существует, однако, группа работ по исследованию феномена так называемых "молчащих синапсов", в которых все эффекты ранних фаз ДП интерпретируются исключительно с позиций постсинаптической гипотезы, а участие эффектов пресинаптической пластичности отрицается (Isaac 2003). Несмотря на то, что выводы этих работ противоречат результатам классических исследований пресинаптических эффектов на ранних фазах ДП (Voronin 1993; Voronin & Cherubini 2003), в последние 10 лет гипотеза молчащих синапсов приобрела заметную популярность. Гипотеза предполагает, что значительная часть синапсов гиппокампа не имеют АМПА-рецепторов на своей постсинаптической мембране и потому "молчат" в ответ на афферентную стимуляцию. Однако на постсинаптической мембране этих синапсов имеются НМДА-рецепторы, и потому в них возможен вызов ДП; в ходе ДП в постсинаптическую мембрану встраиваются АМПА-рецепторы из некоторых внутренних депо, благодаря чему "молчащий" синапс превращается в "обычный", активный.

Аргументация в поддержку данной гипотезы основана на результатах многих электрофизиологических экспериментов, однако внимательное изучение вопроса показывает, что большинство этих экспериментов являются модификациями и вариантами сравнительно небольшого числа "ключевых" экспериментальных ситуаций. К этим "ключевым" экспериментам относятся: 1) Наблюдения меньшей относительной вариабельности амплитуд и меньших величин парного

---

<sup>1</sup> Полный текст диссертации доступен на сайте ИВНД и НФ РАН по адресу: <http://www.ihna.ru/book.php?id=36>

отношения (ПО) НМДА-опосредованных постсинаптических токов (ПСТ) по сравнению с АМПА-опосредованными ПСТ в синапсах пирамид гиппокампа (Clark et al. 1994; Kullmann 1994; Poncer & Malinow 2001). Поскольку известно, что относительная вариабельность амплитуд ПСТ и величина ПО зависят от эффективности выброса передатчика, из наблюдения их несовпадения для АМПА- и НМДА-ПСТ был сделан вывод о том, что в части синапсов выбрасываемый передатчик действует только на НМДА, но не на АМПА-рецепторы, благодаря чему величины ПО и относительная вариабельность НМДА-ПСТ и оказывались меньше таковых для АМПА-ПСТ. 2) Прямые наблюдения "молчащих синапсов", в которых при потенциале покоя не удавалось зарегистрировать АМПА-опосредованные ПСТ, но при этом при деполяризации постсинаптической мембраны регистрировались НМДА-ПСТ (Isaac 1995); 3) Увеличение оценки тока отдельного канала (ТОК) АМПА-каналов после вызова ДП (Benke 1998), что интерпретировалось как следствие встраивания в мембрану части синапсов новых АМПА-рецепторов со свойствами, отличающимися от свойств АМПА-рецепторов, имевшихся на мембране к началу эксперимента.

Оказывается, однако, что интерпретация результатов "ключевых экспериментов" в пользу гипотезы о постсинаптических механизмах поддержания ранних фаз ДП возможна только при явном или неявном принятии двух специфических допущений. Во-первых, для такой интерпретации необходимо предположить, что деполяризация постсинаптической мембраны до +40-+50 мВ, использовавшаяся в 1 и 2 ключевых экспериментах при регистрации НМДА-опосредованных ПСТ (Clark et al. 1994; Kullmann 1994; Isaac 1995; Poncer & Malinow 2001), сама по себе не вносит существенных изменений в процесс генерации ПСТ: в частности, не влияет на вероятность выброса медиатора из пресинапса, вариабельность амплитуд ПСТ и величину ПО. Без этого предположения прямое сопоставление свойств ПСТ при различных мембранных потенциалах оказывается некорректным, поскольку неизвестно, чем вызываются изменения индексов синаптической передачи при деполяризации мембраны: разницей между параметрами АМПА- и НМДА-опосредованной передачи или изменениями в работе синапса. Выводы, основанные на сопоставлении свойств ПСТ при разных мембранных потенциалах, в этом случае могут терять свою обоснованность. И, во-вторых, при интерпретации экспериментов (Benke 1998) предполагалось, что возможное изменение количества участвующих в генерации ПСТ синапсов после вызова ДП не влияет на оценку ТОК методом нестационарного флюктуационного анализа (НСФА), и потому оценки ТОК до и после вызова ДП можно сравнивать непосредственно, без проведения каких-либо дополнительных проверочных процедур. Однако из литературных данных следует, что эти предположения вовсе не очевидны (Diamond 2001; Kullmann 2003; Voronin & Cherubini 2003; Хахалин и Воронин 2004). В то же время, анализ и прямая проверка этих

предположений до сих пор не проводились, что делает аргументацию, основанную на результатах экспериментов (1-3) уязвимой для критики.

### **Цель исследования**

Объяснить противоречия между результатами "ключевых экспериментов", свидетельствующих в пользу постсинаптической природы ранних фаз ДП, и классическими экспериментами по изучению пресинаптических механизмов пластичности на ранних фазах ДП. Где это возможно, провести верификацию экспериментов путём использования экспериментальных процедур, допускающих однозначную интерпретацию, а также путём применения математических методов для анализа параметров синаптической передачи.

Достижение этой цели потребовало решения следующих задач:

1. На математической модели проанализировать работу метода НСФА; обнаружить экспериментальные ситуации, которые могли бы приводить к искажению оценки ТОК; разработать методику, позволяющую на таких данных получать истинное значение ТОК.
2. Применить разработанную методику к анализу ранних фаз ДП АМПА-опосредованных ПСТ; проверить гипотезу об увеличении ТОК АМПА-каналов при ДП.
3. На математической модели проанализировать закономерности формирования НМДА-опосредованных ПСТ при различных потенциалах постсинаптической мембраны; выяснить, возможны ли изменения ПО и распределения амплитуд НМДА-опосредованных ПСТ при изменении потенциала постсинаптической мембраны не только за счёт пресинаптических, но и за счёт постсинаптических механизмов пластичности.
4. Сопоставить результаты моделирования с результатами физиологических экспериментов по регистрации НМДА-опосредованных ПСТ при разных потенциалах постсинаптической мембраны; проанализировать вклады пре- и постсинаптических механизмов пластичности в изменение параметров ПСТ при изменении потенциала мембраны.
5. Сопоставить результаты проведённого анализа с результатами известных экспериментов по изучению ранних фаз ДП на экспериментальной модели "молчащих синапсов"; проинтерпретировать результаты этих экспериментов с учётом полученной информации о проявлениях пресинаптических и постсинаптических механизмов пластичности при смене потенциала постсинаптической мембраны.

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

1. При использовании метода НСФА для оценки ТОК АМПА-опосредованных ПСТ необходим контроль количества

синапсов, участвующих в генерации ПСТ, поскольку изменение этого количества может приводит к значительному артефактному завышению оценки величины ТОК.

2. Деполяризация постсинаптической мембраны синапсов пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа приводит к увеличению вероятности выброса глутамата из пресинаптического окончания, причём этот процесс является НМДА-зависимым.
3. Деполяризация постсинаптической мембраны приводит к усилению эффектов насыщения и десенситизации постсинаптических НМДА-рецепторов, что сказывается на распределении амплитуд ПСТ и на значении ПО; в этих условиях величины ПО и относительная вариабельность амплитуд ПСТ могут существенно изменяться в отсутствие эффектов пресинаптической пластичности.
4. Перечисленные соображения существенно влияют на интерпретацию результатов ключевых экспериментов по изучению ранних фаз ДП с позиций парадигмы молчащих синапсов: их учёт не позволяет однозначно интерпретировать эти результаты с позиций гипотезы о постсинаптическом молчании синапсов, и делает более правдоподобной их интерпретацию с позиций гипотезы о пресинаптических механизмах пластичности.

### **Научная новизна**

В работе впервые подробно проанализирован метод НСФА, и выявлены некоторые слабые места этого метода. Разработан и успешно применён к анализу НМДА-опосредованных ПСТ оригинальный метод прямого определения величины ТОК (метод восстановления сигнала; МВС). Разработана и применена методика анализа структуры минимальных ПСТ, основанная на популярном статистическом методе анализа независимых компонент (АНК). На основе этого метода также разработана процедура выделения унитарных ПСТ (ПСТ от одного синапса) из выборки минимальных ПСТ. Разработана методика совместного применения методов НСФА и АНК, позволяющая адекватно оценивать величину ТОК в экспериментальных ситуациях, когда изолированное применение метода НСФА приводит к артефактному завышению оценки ТОК. Разработана методика совместного использования методов НСФА и метода мультивероятностного анализа (МВА), делающая возможным применение метода МВА к изучению НМДА-опосредованной синаптической передачи.

С помощью классических и вновь разработанных математических методов произведён подробный анализ эффектов синаптической пластичности АМПА- и НМДА-опосредованной синаптической передачи на временах, соответствующих ранним фазам экспрессии ДП (минуты).

Показано, что ряд описанных в литературе экспериментальных результатов, традиционно интерпретируемых с позиций гипотезы о постсинаптических механизмах синаптической пластичности (а также в поддержку этой гипотезы), может быть успешно объяснён с позиций гипотезы о пресинаптических механизмах пластичности.

Получены новые свидетельства в пользу значения эффектов расплёскивания медиатора и насыщения постсинаптических рецепторов для НМДА-опосредованной синаптической передачи. Показано, что пренебрежение этими эффектами может приводить к искажённой интерпретации результатов некоторых экспериментов по изучению механизмов синаптической пластичности.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Подробное описание и исследование ряда оригинальных методов и подходов (АНК в применении к анализу синаптического состава; совместное использование АНК и НСФА; МВС; совместное использование НСФА и МВА) делает настоящую работу полезным инструментом для практического применения математических методов к анализу ПСТ при исследовании эффектов синаптической пластичности.

Физиологические результаты настоящей работы позволяют во многом "реабилитировать" пресинаптическую теорию синаптической пластичности, поскольку показывают, что результаты экспериментов по исследованию молчащих синапсов не всегда могут быть интерпретированы однозначно. Кроме того, в работе предлагается и успешно применяется ряд новых критериев, позволяющих отличить эффекты пресинаптической от эффектов постсинаптической пластичности. В целом, результаты работы свидетельствуют в пользу гипотезы о пресинаптических механизмах поддержания ранних фаз ДП.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены на Юбилейной Международной конференции по нейрокибернетике, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Александра Борисовича Когана (Ростов-на-Дону 2002 г.); 3<sup>х</sup> конференциях молодых учёных Института ВНД и НФ РАН (2002, 2003 и 2004 гг.), конференции "Фундаментальные и клинические аспекты интегративной деятельности мозга", посвященной 100-летию со дня рождения Э.А. Асратяна (ИВНД и НФ РАН, 2003 г.) и 19<sup>м</sup> съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург 2004 г.). Диссертация апробирована 19 апреля 2005 года на совместном заседании лабораторий нейрофизиологии обучения, математической нейробиологии обучения и группы синаптической пластичности Института высшей нервной деятельности и физиологии РАН.

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 4 статьи в журналах и 3 тезиса.

## Структура работы

Работа состоит из введения, 4х глав ("Литературный обзор", "Модели и методы", "Результаты", "Обсуждение"), выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 190 страницах и включает 35 рисунков. Список цитируемой литературы включает 272 источника.

## Модели и методы исследования

### Модельные эксперименты

Модельные эксперименты выполнялись в среде Matlab версии 6.5 R13. С помощью оригинальной программы генерировались наборы из 50-1000 ПСТ; каждый ПСТ строился как сумма "элементарных" ПСТ от 1-20 независимых синапсов. Каждый элементарный ПСТ строился как результат стохастических открытий и закрытий многих независимых "ионных каналов". Ионные каналы могли закрываться с фиксированной средней частотой (вероятностью в расчёте на единицу времени, составлявшей  $0.9 \text{ мс}^{-1}$  при моделировании АМПА-каналов и  $0.2 \text{ мс}^{-1}$  при моделировании НМДА-каналов) и открываться с частотой, задававшейся как последовательность из ступеньки постоянной вероятности, продолжительностью 0-5 мс, и участка экспоненциального спада с постоянной времени 1-20 мс (максимальная частота открытия составляла  $0.4 \text{ мс}^{-1}$  для АМПА-каналов и  $0.05 \text{ мс}^{-1}$  для НМДА-каналов). Количество каналов рассчитывалось из соображений 10-20 каналов на активную зону; каждый синапс содержал 1-5 активных зон, выброс везикул передатчика в которых происходил в соответствии с биномиальной вероятностной моделью с вероятностью 0.1-1. Задержка латентности длиннолатентных синапсов по сравнению с наиболее коротколатентными составляла 0-3 мс. Средняя величина ТОК равнялась 1 пА; в части экспериментов вводился разброс ТОК отдельных каналов со средним отклонением 0-1 пА. Уровень фонового гауссова шума составлял 0-5 пА. При моделировании НМДА-каналов имитировался эффект "мерцания" магниевого блока канала; при этом частоты мерцания изменялись от 0 (отсутствия мерцания) до максимальной частоты, когда переключения состояния канала происходили на каждом отсчёте времени (0.1 мс). В большинстве экспериментов данные фильтровались фильтром Савицкого-Голея 3го порядка с охватом в 7 точек.

В экспериментах по подбору параметров метода АНК моделирование открытий ионных каналов не производилось; каждый из элементарных ПСТ представлялся как разность двух экспонент с добавлением шума:  $f = Amp \cdot (e^{-at} - b^{-bt}) + S_n$ .



## Физиологические эксперименты

Данные физиологических экспериментов любезно предоставлены доктором Mary J. Palmer и доктором Graham L. Collingridge (Bristol University); экспериментальные процедуры, осуществлявшиеся при изучении АМПА- и НМДА-опосредованных ПСТ подробно изложены в работах (Palmer *et al.* 2004) и (Хахалин 2004) соответственно. Записи выполнялись в режиме точечного отведения от проксимальных апикальных дендритов пирамидных клеток области CA1 гиппокампа крыс возраста 5-14 дней (Stuart *et al.* 1993; Benke *et al.* 1998), с использованием парной стимуляции. В серии экспериментов по регистрации АМПА-опосредованных ПСТ ДП вызывалась путём сочетания деполяризации постсинаптической мембраны до 0 мВ с афферентной стимуляцией (Benke *et al.* 1998). Регистрировалось 94-109 ПСТ до вызова ДП ("контроль") и еще 198-307 ПСТ после вызова ДП. Всего было зарегистрировано 13 пригодных для анализа протоколов.

Изучение НМДА-опосредованных ПСТ производилось по схеме, сходной с распространённым протоколом изучения молчащих синапсов (Kullmann *et al.* 1994; Isaac *et al.* 1995; Liao *et al.* 1995; Isaac 2003; Xiao *et al.* 2004), но в условиях низкой внеклеточной концентрации  $Mg^{2+}$  и фармакологической изоляции НМДА-рецепторов, что позволило упростить экспериментальную модель и регистрировать НМДА-опосредованные ПСТ не только при деполяризации, но и при гиперполяризации постсинаптической мембраны (Clark *et al.* 1994). При потенциале покоя (-70 мВ) на постсинаптической мембране записывались 100–160 контрольных ПСТ; затем потенциал постсинаптической мембраны смещался (до -110/+50 мВ; в большинстве экспериментов до +50 мВ), при смещённом потенциале регистрировалось 100-160 ПСТ; после чего восстанавливался потенциал -70 мВ. Помимо 10 протоколов описанного вида (на 6 нейронах), записанных в "базовых условиях", 15 протоколов (на 12 нейронах) были записаны при блокаде постсинаптических  $Ca^{2+}$ -зависимых процессов путём насыщения постсинаптического окончания быстрым кальциевым хелатором ВАРГА в высокой концентрации.

## Методы анализа

Все использованные в настоящей работе методы можно разделить на несколько групп: 1) методы, основанные на биномиальной модели выброса передатчика; 2) методы анализа структуры ПСТ; 3) метод парного отношения; 4) методы определения величины ТОК. Приведём их краткие описания:

*Методы, основанные на биномиальной модели выброса.*

Методы этой группы основаны на следующей модели: выброс везикул медиатора может происходить независимо и с равной вероятностью  $P$  в каждой из  $N$  активных зон, при этом каждая выброшенная везикула вызывает увеличение амплитуды ПСТ на  $Q$  пА. В этом случае среднее  $M$  и вариация  $D$  амплитуд ПСТ оказываются равны:

$$M = NPQ; \quad D = NP(1-P)Q^2. \quad (1)$$

Наряду с методами, дающими явные оценки величинам  $N$ ,  $P$  и  $Q$  (такими как квантовый анализ), существуют также методы, позволяющие оценивать лишь комбинации этих величин, например, средний квантовый состав синаптической передачи:

$$m = NP. \quad (2)$$

Изменение величины  $m$  может интерпретироваться как свидетельство в пользу активации пресинаптических механизмов пластичности (Voronin 1993). В настоящей работе используется два таких метода: метод обратного квадрата коэффициента вариации ( $KB^{-2}$ ) и метод, основанный на подсчёте частоты выпадений (ЧВ). Метод  $KB^{-2}$  (Воронин 1982, Redman 1990) состоит в вычислении отношения квадрата средней амплитуды ПСТ к вариации этих амплитуд, что при малых  $P$  даёт:

$$KB^{-2} = \frac{M^2}{D} = \frac{(NPQ)^2}{Q^2 NP(1-P)} = \frac{NP}{(1-P)} \rightarrow NP = m. \quad (3)$$

Метод вычисления ЧВ (частоты возникновения ситуации, когда в ответ на очередной стимул не происходит выброса передатчика, и, поэтому, не происходит генерации ПСТ) основывается на соображении том, что в описанной выше системе вероятность "невыброса" передатчика составляет  $P_0 = (1-P)^N$ , а потому (Redman 1990; Voronin 1993):

$$\ln(\text{ЧВ}) \approx \ln(P_0) = N \ln(1-P) \xrightarrow{P \rightarrow 0} -NP = -m. \quad (4)$$

Кроме того, в настоящей работе использовался метод мультивероятностного вариационного анализа (МВА), который заключается в нахождении средних значений  $M$  и вариаций  $D$  амплитуд ПСТ для разных участков экспериментального протокола с последующим откладыванием точек  $(M, D)$  в соответствующих координатах и аппроксимации полученного облака точек прямой  $D_j = QM_j$  (возможность аппроксимации следует из формул (1) в приближении  $P \rightarrow 0$ ; Reid & Clements 1999; Meyer *et al.* 2001).

#### *Методы анализа структуры ПСТ.*

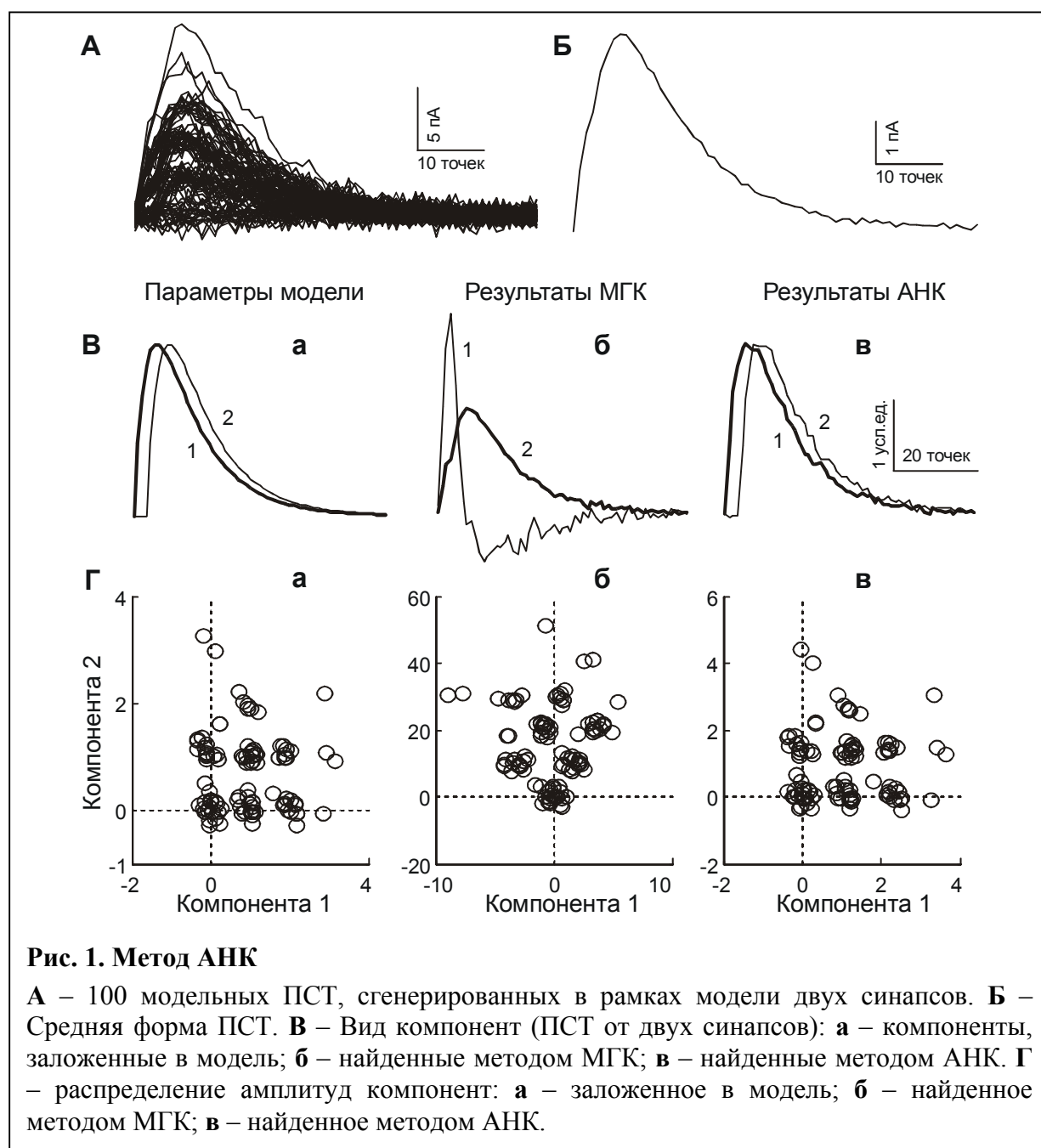
В работе использованы два метода анализа структуры ПСТ: метод компонентного анализа (КА) и разработанный в рамках настоящего исследования метод, основанный на известном статистическом принципе анализа независимых компонент (АНК). Оба метода предназначены для решения обратной задачи восстановления вектора скрытых параметров системы (компонент)  $\mathbf{s}$  по вектору наблюдаемых значений  $\mathbf{x}$ , в предположении, что векторы  $\mathbf{s}$  и  $\mathbf{x}$  связаны линейным соотношением:

$$\mathbf{x} = \mathbf{A}\mathbf{s}, \quad (5)$$

(где  $\mathbf{A}$  – некоторая "матрица смешения"), и при этом компоненты вектора  $\mathbf{s}$  статистически независимы (Hyvärinen 1999; Hyvärinen & Oja 2000; Хахалин и Фролов 2005; рис. 1). Различие методов состоит в том, что КА

требует участия человека для интерактивного поиска решения с помощью системы графической визуализации (Astrelin *et al.* 1998), тогда как АНК находит решение без участия человека.

В нашей задаче в качестве вектора наблюдаемых значений  $x$  выступал набор всех зарегистрированных ПСТ; в качестве вектора скрытых компонент  $s$  – элементарные ПСТ отдельных синапсов, участвующих в генерации наблюдаемых суммарных ПСТ; а в качестве матрицы смешения  $A$  – "вклады" этих элементарных ПСТ в каждый из зарегистрированных ПСТ. Поскольку размерность вектора  $x$  была достаточно велика (анализировалось порядка 100 временных отсчётов каждого ПСТ), на практике перед поиском решения (5) мы переходили от самих сигналов к их представлениям в пространстве главных компонент (что эквивалентно переходу от строки В к строке Г на рис. 1). В этом



случае работе метода АНК сводилась ко "вращению" облака амплитуд (переходу от рис. 1Гб к рис. 1Гв), а предположение о независимости искомым скрытых компонент приобретало ясный физиологический смысл, превращаясь в предположение о независимости работы каждого из синапсов (независимости амплитуд элементарных ПСТ).

Таким образом, с помощью методов КА-АНК можно отличить набор ПСТ, сгенерированных в одном синапсе, от набора ПСТ, сгенерированных при одновременной работе нескольких синапсов; можно независимо изучать распределения амплитуд элементарных ПСТ в каждом из синапсов, а также выделять унитарные, однокомпонентные ПСТ из выборок суммарных ПСТ.

#### *Метод парного отношения*

Метод парного отношения (ПО) представляет собой классический метод изучения параметров синаптической передачи путём сравнения средних амплитуд двух последовательных ПСТ с малой временной задержкой между ними (Voronin 1993). В формирование величины ПО вносят вклады как пресинаптические (Zucker & Regehr 2002), так и постсинаптические (Hashimoto & Kano 1998) процессы. В большинстве случаев (в частности, при анализе АМПА-опосредованных ПСТ) постсинаптическими процессами можно пренебречь; в этом случае изменение ПО рассматривается как свидетельство активации пресинаптических процессов пластичности.

#### *Методы вычисления тока отдельного канала (ТОК)*

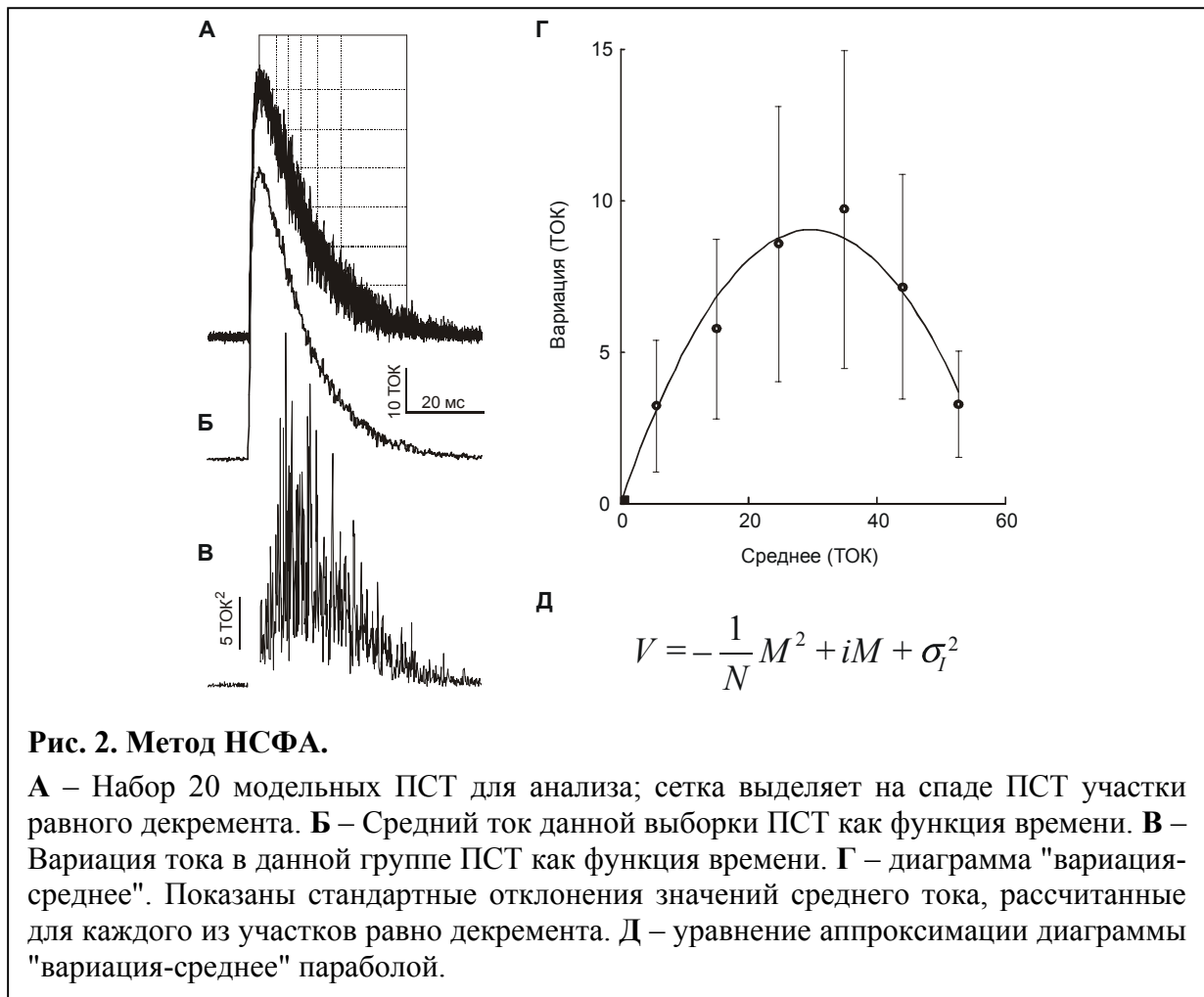
В настоящей работе используется два метода вычисления величины ТОК: стандартный метод нестационарного флюктуационного анализа (НСФА; Sigworth & Neher 1980; Benke *et al.* 2001) и оригинальный, разработанный в рамках настоящего исследования, метод восстановления сигнала (МВС), пригодный для вычисления ТОК НМДА-каналов.

Метод НСФА основан на предположении о том, что в процессе генерации ПСТ ионные каналы открываются стохастически, независимо и с вероятностью  $p(t)$ , равной для всех каналов в каждый момент времени. В этом случае, если ТОК всех каналов одинаковы и равны  $i$ , средний ток  $M(t)$  и вариация тока  $D(t)$ , как функции времени, оказываются равны:

$$M(t) = iNp(t); \quad D(t) = i^2 Np(t) \cdot (1 - p(t)) + \sigma_I^2. \quad (6)$$

Здесь  $N$  – количество каналов,  $\sigma_I^2$  – вариация фонового шума. Тогда точки  $(M(t), D(t))$ , отложенные в соответствующих координатах, могут быть приближены параболой, причём коэффициенты параболы связаны с параметрами системы простыми соотношениями:

$$D = -\frac{1}{N} M^2 + iM + \sigma_I^2. \quad (7)$$



Таким образом, нахождение величин (6) для нескольких участков спада ПСТ и построение аппроксимирующей параболы типа (7) позволяет оценить величину ТОК.

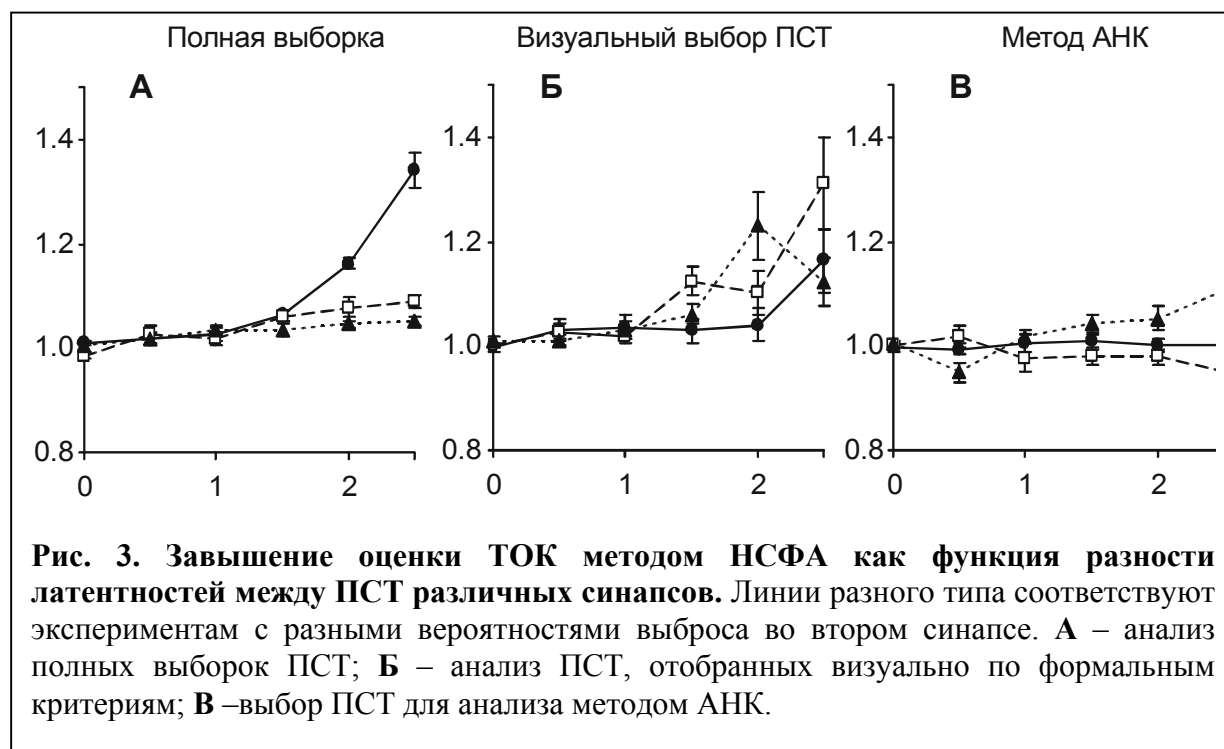
Другой метод, МВС, пригоден лишь для нахождения величины ТОК НМДА-каналов по набору минимальных и относительно малозумных НМДА-опосредованных ПСТ, зарегистрированных по схеме дендритного отведения. Метод заключается в приближении минимальных ПСТ ступенчатой функцией (с помощью стандартных процедур вейвлет-приближения), построении "гистограммы всех точек" (частоты встречаемости различных значений суммарного тока) и спектрального анализа данной гистограммы. В ситуации, когда генерация ПСТ обеспечивалась небольшим числом каналов с относительно большими (по сравнению с уровнем шума) величинами ТОК, гистограмма всех точек оказывалась периодической (за счёт того что значения тока, кратные величине ТОК, встречаются чаще), и спектральный анализ позволял оценить период появления пиков на гистограмме (величину ТОК).

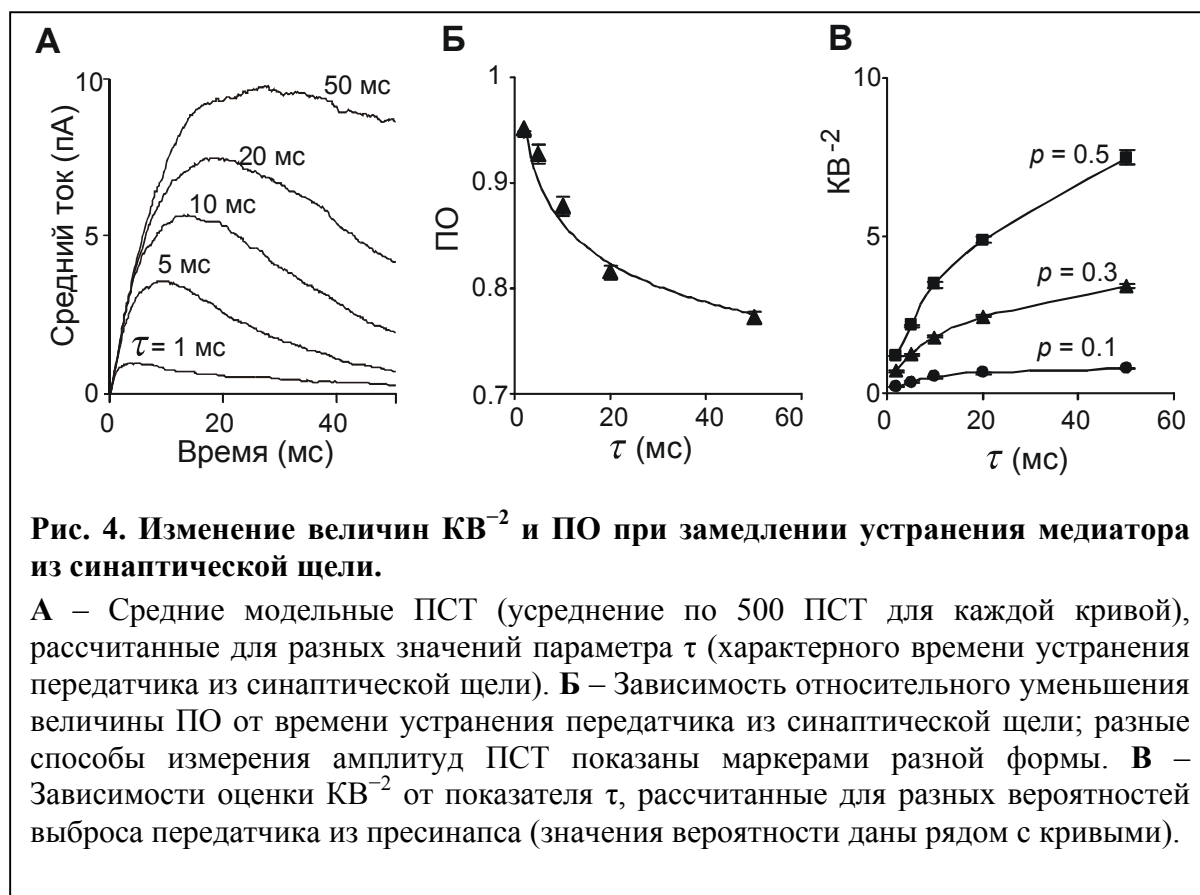
## Результаты и обсуждение

### Результаты модельных экспериментов

В первой серии модельных экспериментов была произведена адаптация метода АНК в реализации (Hyvarinen & Oja 1997; Hyvarinen 1999) для задач нашего исследования. Оптимальные параметры метода были подобраны на модельных данных. При этом для подбора оптимальных параметров было разработано специальное "тестирующее приложение", автоматически определявшее результативность метода АНК в каждом из тестовых экспериментов.

Затем был произведён подробный анализ методов НСФА и МВС; изучена зависимость получаемой с их помощью оценки ТОК от параметров этих методов, параметров модельной системы, уровня шума в системе, параметров фильтрации сигнала, амплитудной сортировки ПСТ для анализа, количества ПСТ, отобранных для анализа и т.д. Наиболее интересным результатом этих исследований оказался тот факт, что оценка ТОК АМПА-подобных модельных ПСТ сильнее всего зависела от того, являлись ли ПСТ унитарными (сгенерированными в одном синапсе) или суммарными (сгенерированными как сумма элементарных ПСТ от нескольких синапсов): рис. 3А. Было обнаружено, что завышение оценки ТОК увеличивалось при переходе от унитарных ПСТ к суммарным и мало зависело от количества синапсов, участвующих в генерации ПСТ, если только этих синапсов было больше одного. Метод НСФА оказался также весьма чувствителен к появлению малого количества суммарных ПСТ в выборке преимущественно унитарных ПСТ: оценка ТОК значительно увеличивалась при включении в выборку из нескольких десятков унитарных ПСТ лишь нескольких суммарных ПСТ. Во всех случаях





величина завышения ТОК возрастала по мере нарастания разницы в параметрах элементарных ПСТ от разных синапсов (рис. 3А). Было также показано, что метод визуального отбора "хороших" ПСТ для анализа по формальным критериям (малая латентность, узкий пик, отсутствие перегибов переднего фронта; Venke *et al.* 1998; Venke *et al.* 2001) не приводит к исчезновению ошибки в определении ТОК (рис. 3Б).

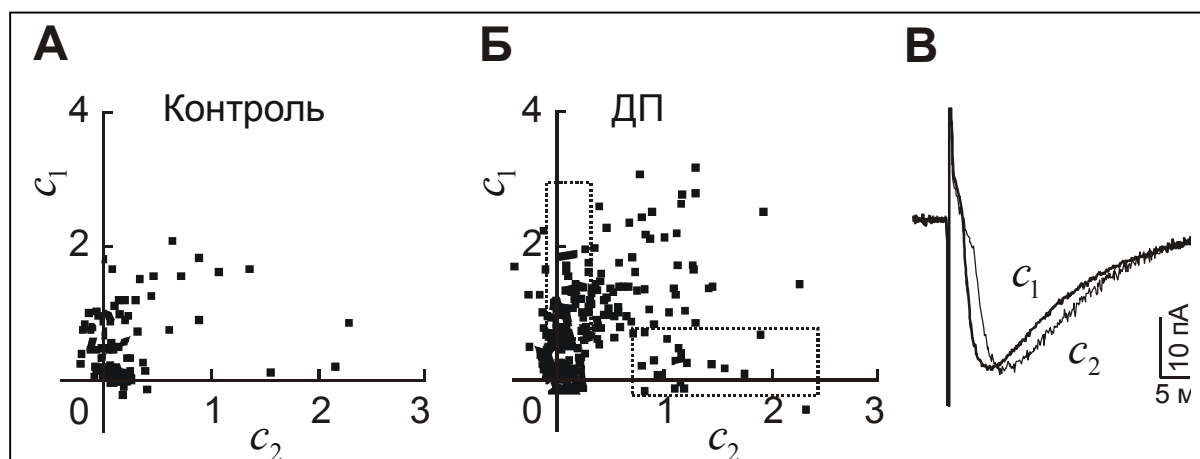
Выяснилось, однако, что применение метода АНК для анализа модельных выборок ПСТ, сгенерированных при одновременной активности нескольких синапсов, позволяло выделять подвыборки "чистых", унитарных ПСТ из полных выборок ПСТ. При анализе унитарных ПСТ методом НСФА удавалось получить адекватную оценку ТОК (рис. 3В).

Наконец, при моделировании НМДА-опосредованной передачи была изучена зависимость индексов  $KV^{-2}$  и ПО от скорости удаления глутамата из синаптической щели. Было показано, что замедление удаления глутамата из синаптической щели может приводить к повышению степени насыщения постсинаптических НМДА-рецепторов, что, в свою очередь, приводит к уменьшению величины ПО и увеличению величины  $KV^{-2}$  (рис. 4). При этом важно отметить, что изменение обеих величин оказалось опосредовано исключительно постсинаптическими механизмами.

## Результаты физиологических экспериментов

В экспериментах по изучению потенциации АМПА-опосредованных ПСТ наблюдалось значимое увеличение оценки ТОК АМПА-каналов методом НСФА после вызова ДП по сравнению с контролем (от  $0.42 \pm 0.05$  пА в контроле до  $0.79 \pm 0.14$  пА при ДП;  $P < 0.05$ ;  $n = 13$ ) при отборе ПСТ для анализа по критериям, сформулированным в работах (Benke *et al.* 1998; Benke *et al.* 2001). Однако было обнаружено, что во многих случаях синаптический состав ПСТ до и после вызова ДП был различен: в контроле (до вызова ДП) генерация ПСТ происходила в основном в одном синапсе, тогда как после вызова ДП активными оказывались 2 и более синапсов (рис. 5). В соответствии с этим, было высказано предположение, что, возможно, часть наблюдавшегося увеличения оценки ТОК методом НСФА была связана с артефактным завышением ТОК при переходе от унитарных к суммарным ПСТ, обнаруженным в наших модельных экспериментах. При совместном применении методов АНК и НСФА (при отборе унитарных ПСТ для анализа методом АНК) изменения ТОК АМПА-каналов при ДП обнаружено не было (оценка ТОК составляла  $0.34 \pm 0.03$  пА в контроле и  $0.39 \pm 0.04$  после вызова ДП). Таким образом, по крайней мере часть экспериментальных результатов по наблюдению увеличения оценки ТОК методом НСФА после вызова ДП может быть объяснена переходом от анализа унитарных ПСТ к анализу суммарных ПСТ (а не действительным увеличением ТОК АМПА-каналов).

В экспериментах по изучению НМДА-опосредованной синаптической передачи деполяризация постсинаптической мембраны приводила к увеличению величины  $KV^{-2}$  (от  $2.08 \pm 0.59$  в контроле до



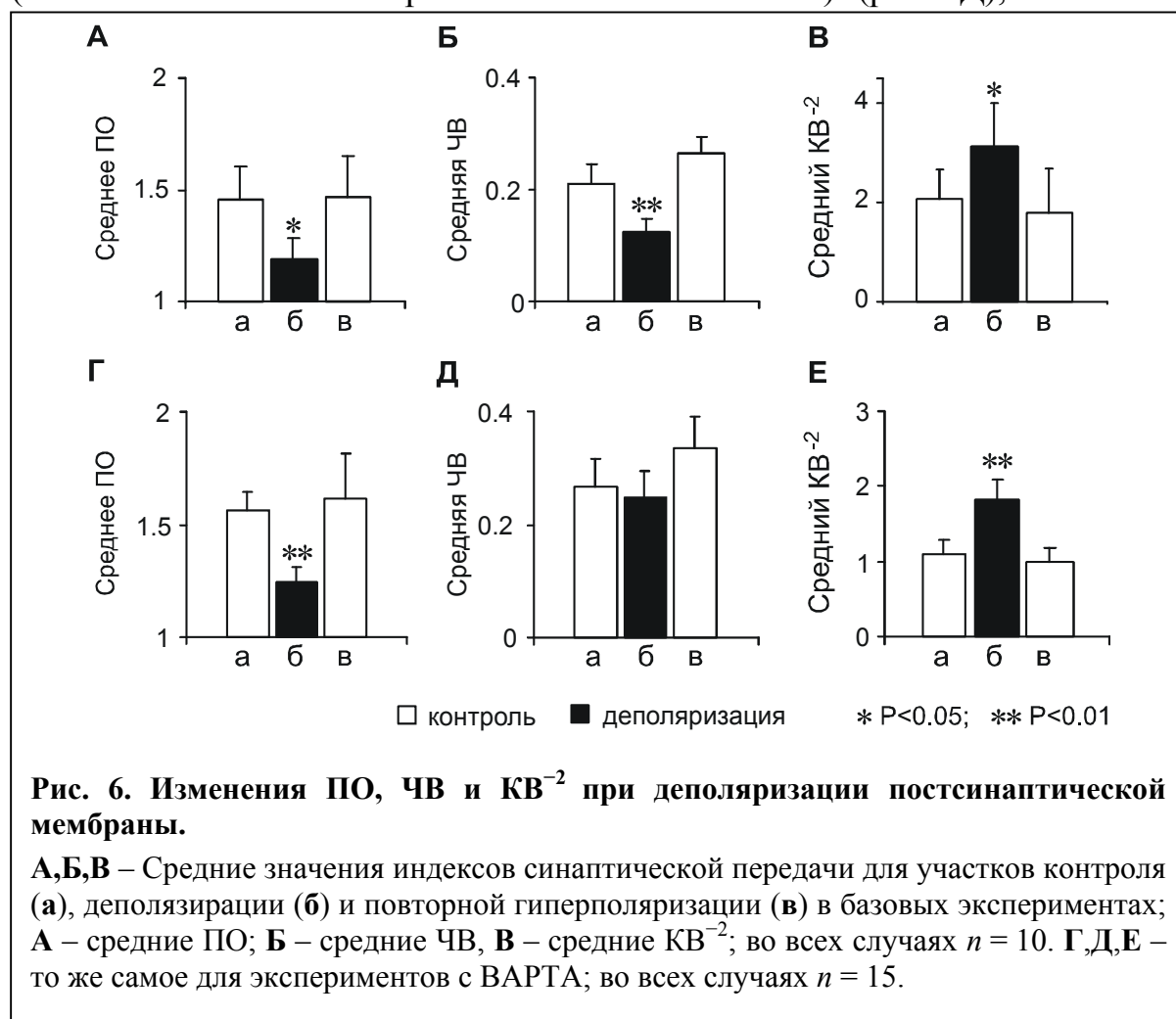
**Рис. 5. Пример совместного применения методов АНК и НСФА к физиологическим данным.**

**А** – Графическое представление результатов метода АНК для ПСТ, зарегистрированных в контроле ( $n = 109$ ). **Б** – то же для участка проявления ДП ( $n = 281$ ). Пунктирными прямоугольниками выделены точки, соответствующие ПСТ, принимаемым за чистые, унитарные ПСТ ( $n = 53$  для компоненты 1,  $n = 16$  для компоненты 2). **В** – средние ПСТ для групп, выделенных на **Б** прямоугольниками.



$3.14 \pm 0.86$  при деполяризации;  $P < 0.05$ ;  $n = 10$ ), а также уменьшению величин ПО (от  $1.46 \pm 0.15$  в контроле до  $1.19 \pm 0.10$  при деполяризации;  $P < 0.02$ ;  $n = 10$ ) и ЧВ (от  $0.22 \pm 0.04$  в контроле до  $0.13 \pm 0.03$  при деполяризации;  $P < 0.01$ ;  $n = 10$ ) (рис. 6А-В). Такое изменение индексов свидетельствовало в пользу активации механизмов пресинаптической потенциации и увеличения вероятности выброса глутамата из пресинапса. Об активации механизмов пресинаптической потенциации свидетельствовали и результаты применения методов НСФА и МВА: было обнаружено, что среднее количество активированных НМДА-рецепторов увеличивалось при деполяризации постсинаптической мембраны ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ ), а точки, соответствующие различным участкам отдельных экспериментальных протоколов, хорошо ложились на прямую на диаграмме "вариация-среднее" метода МВА. Среднее количество НМДА-каналов, открывающихся в ответ на выброс одного кванта медиатора, по результатам метода МВА, составило  $1.28 \pm 0.24$ . При этом результаты метода НСФА во всех случаях контролировались с помощью метода МВС (и были весьма сходны с ними).

В экспериментах с введением хелатора ВАРТА в постсинапс величина ЧВ переставала изменяться при деполяризации мембраны (составляя  $0.27 \pm 0.05$  при  $-70$  мВ и  $0.25 \pm 0.05$ ) (рис. 6Д), что также



**Рис. 6. Изменения ПО, ЧВ и  $KV^{-2}$  при деполяризации постсинаптической мембраны.**

**А,Б,В** – Средние значения индексов синаптической передачи для участков контроля (**а**), деполяризации (**б**) и повторной гиперполяризации (**в**) в базовых экспериментах; **А** – средние ПО; **Б** – средние ЧВ, **В** – средние  $KV^{-2}$ ; во всех случаях  $n = 10$ . **Г,Д,Е** – то же самое для экспериментов с ВАРТА; во всех случаях  $n = 15$ .

согласовывалось с гипотезой о вызове кратковременной пресинаптической НМДА-зависимой потенциации в базовых экспериментах. Однако величины  $KV^{-2}$  и ПО продолжали изменяться и в экспериментах с блокадой НМДА-зависимых процессов (соответственно, от  $1.11 \pm 0.17$  до  $1.81 \pm 0.27$ ;  $P < 0.01$  для  $KV^{-2}$  и от  $1.56 \pm 0.08$  до  $1.24 \pm 0.07$ ;  $P < 0.01$  для ПО;  $n = 15$ ; рис. 6Г,Е). Это дало основание утверждать, что в формирование этих величин вносят свой вклад и постсинаптические компоненты. Было также обнаружено, что при деполяризации постсинаптической мембраны увеличивалось постоянная времени спада ПСТ, что было более заметно в серии экспериментов с ВАРТА (постоянная времени изменялась от  $128 \pm 30$  мс в контроле до  $184 \pm 20$  мс при деполяризации для ПСТ1;  $P < 0.05$ ;  $n = 15$ ), хотя для ПСТ2 эффект наблюдался и в базовых экспериментах. Кроме того, деполяризация постсинаптической мембраны приводила к появлению отрицательной корреляции между амплитудами 1го и 2го ПСТ при парной стимуляции ( $n = 10$ ,  $P < 0.05$  для базовых;  $n = 15$ ,  $P < 0.001$  для экспериментов с ВАРТА). Сравнение этих данных с описанными выше результатами моделирования эффектов насыщения НМДА-рецепторов позволило утверждать, что наблюдавшиеся закономерности изменения индексов синаптической передачи могут объясняться активацией известного механизма подавления трансмембранного транспорта глутамата при деполяризации постсинаптической мембраны (Barbour *et al.* 1994; Wadiche *et al.* 1995; Diamond 2001) с последующим усилением эффектов насыщения и десенситизации постсинаптических НМДА-рецепторов. В пользу этого предположения свидетельствовал и анализ корреляций между относительными изменениями индексов синаптической передачи и их начальными значениями.

## **Выводы**

1. При математическом моделировании типичных экспериментов (при физиологически адекватном выборе параметров модели) обнаружена возможность артефактного завышения оценки ТОК при анализе суммарных АМПА-опосредованных ПСТ методом НСФА.
2. Разработан оригинальный метод анализа структуры ПСТ и автоматизированного выбора унитарных ПСТ, основанный на методе АНК; на модели показано, что совместное применение методов АНК и НСФА позволяет получить истинное значение ТОК в ситуации, когда изолированное применение метода НСФА приводит к получению завышенной оценки ТОК.
3. Совместное применение методов АНК и НСФА к физиологическим данным показало, что результаты описанных в литературе экспериментов по сравнению величин ТОК АМПА-опосредованных ПСТ до и после вызова ДП могут быть интерпретированы не только с позиций постсинаптической, но и с позиций пресинаптической гипотезы о механизмах поддержания ранних фаз ДП.
4. Анализ НМДА-опосредованных ПСТ, зарегистрированных при различных потенциалах постсинаптической мембраны, показал, что деполяризация постсинаптической мембраны может влиять на выброс передатчика из пресинаптического окончания (увеличивать вероятность выброса), причём этот эффект является НМДА-зависимым.
5. Путём сопоставления физиологических данных с результатами моделирования показано, что деполяризация постсинаптической мембраны может увеличивать степень насыщенности постсинаптических НМДА-рецепторов, а также выраженность эффекта их десенситизации, что приводит к уменьшению величины ПО и изменению распределения амплитуд ПСТ; этот процесс не является НМДА-зависимым.
6. Интерпретация описанных в литературе экспериментов по изучению ранних фаз ДП с учётом вновь полученных данных позволяет предположить, что по крайней мере часть результатов, традиционно трактуемых в пользу гипотезы о постсинаптических механизмах поддержания ДП, могут быть адекватно объяснены с позиций гипотезы о пресинаптических механизмах поддержания ДП.

7. К изучению НМДА-опосредованных ПСТ были впервые применены методы мультивероятностного вариационного анализа и оригинальный метод прямого измерения величины ТОК НМДА-каналов; при этом результаты обоих методов свидетельствовали в пользу активации пресинаптических механизмов пластичности (увеличения выброса медиатора из пресинаптического окончания) при деполяризации постсинаптической мембраны, а не в пользу активации механизмов фосфорилирования постсинаптических НМДА-рецепторов.

## **Публикации по теме диссертации**

### **Статьи:**

1. "Исследование механизмов синаптической пластичности в синапсах гиппокампа: совместное применение методов компонентного и нестационарного флюктуационного анализа"; А.С. Хахалин и Л.Л. Воронин; *Нейрокомпьютеры: разработка, применение*; издательство "Радиотехника"; 2004, №2-3, с. 4-20.
2. "Новый вид обработки сигналов в синапсах головного мозга: положительная эфептическая внутрисинаптическая обратная связь"; М.С. Лемак, А.С. Хахалин, В.В. Максимов, П.В. Максимов, Л.Л. Воронин; *Нейрокомпьютеры: разработка, применение*; издательство "Радиотехника"; 2004, №2-3; с. 21-32.
3. "Квантовый состав вызванных постсинаптических токов нейрона при неизменной вероятности выброса передатчика"; А.С. Хахалин; *Доклады Академии наук*; 2004, т. 399, №2, с. 1-4.
4. "Совместное применение методов анализа независимых компонент и нестационарного флюктуационного анализа для изучения механизмов ранней фазы долговременной потенциации в гиппокампе крысы". А.С. Хахалин, А.А. Фролов; *Журнал Высшей Нервной Деятельности*; 2005, т. 55, №3, с. 306-317.

### **Выступления на конференциях:**

1. "Критерии применимости нестационарного флюктуационного анализа к определению параметров синаптической передачи"; "Проблемы нейрокибернетики" (материалы Юбилейной Международной конференции по нейрокибернетике, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Александра Борисовича Когана); Ростов-на-Дону 2002 г.; Том 2. с. 290-291.
2. "Определение параметров синаптической передачи методом нестационарного флюктуационного анализа на основе записи минимальных вызванных постсинаптических токов"; А.С. Хахалин; тезисы научной конференции молодых ученых (Институт ВНД и НФ РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова); Москва 2002 г.; с. 27-28.
3. "Совместное применение нестационарного флюктуационного анализа и компонентного анализа к изучению параметров синаптической передачи в нейронах гиппокампа"; А.С. Хахалин; тезисы конференции "Фундаментальные и клинические аспекты интегративной деятельности мозга", посвященной 100-летию со дня рождения Э.А. Асратяна; Институт ВНД и НФ РАН; Москва 2003; с. 217-219.

4. Хахалин А.С. (2003). "Исследование механизмов синаптической пластичности в синапсах гиппокампа: совместное применение методов компонентного и нестационарного флюктуационного анализа". Конференция молодых сотрудников института ВНД и НФ РАН (7-9 октября 2003 г).
5. Алтынбаев Р.Ш., Хахалин А.С., Шерозия М.Г., Воронин Л.Л. (2004). "Молчащие синапсы: роль в синаптической пластичности". Рос. физиол. журн. им. Сеченова, Т. 90, № 8, С. 228. (Материалы 19 съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова, г. Екатеринбург, 19-24 сентября 2004 г.).
6. А.С. Хахалин (2004). "Новый метод выявления вкладов отдельных НМДА-каналов в вызванных постсинаптических токах, записанных при точечном дендритном отведении в условиях минимальной стимуляции". Тезисы научной конференции молодых учёных (6 октября 2004); Москва, ИВНД и НФ РАН, с. 30-31.