

ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РАН

На правах рукописи

Рогачевский Вадим Валерьевич

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ
ПОТЕНЦИАЦИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ
В ГИППОКАМПЕ КРЫС**

Специальность 03.00.02 - биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушкино - 2007

Работа выполнена в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН и в отделе биологических исследований Открытого университета Великобритании

Научный руководитель:
доктор биологических наук

Попов Виктор Иванович

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор
доктор биологических наук, профессор

Годухин Олег Викторович
Зинченко Валерий Петрович

Ведущая организация:
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Защита состоится «20» июня 2007 г. в 13³⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.093.01 в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН по адресу: 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д.3, ИТЭБ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной библиотеке НЦБИ РАН, г. Пущино.

Автореферат разослан «15» мая 2007 г.

ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат физико-математических наук



Н.Ф.Ланина

Актуальность проблемы

Обучение и память – это наиболее очевидные проявления пластичности нервной системы. Считается, что структурной основой пластичности являются синапсы, осуществляющие передачу сигналов от нейрона к нейрону. Однако попытки показать непосредственную связь между структурой отдельных синапсов и такими системными процессами, как получение, обработка, хранение и извлечение информации, пока не достигли успеха (Morris et al., 2003; Архипов, 2004; Segal, 2005). Большинство экспериментальных моделей, используемых при исследовании пластичности мозга (обучение, стресс и т.п.), не дают возможности регистрации временной динамики синаптической активности в изучаемых отделах нервной системы. Одной из форм синаптической пластичности, при изучении которой возможно сопоставление изменений биофизических, биохимических и структурных параметров синапсов с уровнем их электрической активности, является долговременная потенция (ДВП) (Bliss, Lomo, 1973; Bliss, Collingridge, 1993; Lynch, 2004).

ДВП проявляется как повышенная эффективность синаптической передачи вследствие кратковременной высокочастотной стимуляции. Различают раннюю (до 4 ч) и позднюю фазу ДВП (более 4 ч) (Abraham, 2003). Длительность ДВП критически зависит от экспрессии генов и синтеза белка. Если блокированы экспрессия генов и синтез новых белков, или физически изолированы тела нейронов, то в течение 1-4 ч ДВП затухает. Следовательно, обязательным условием длительного поддержания ДВП является появление в синапсах новых или дополнительных белков, что говорит в пользу высокой вероятности структурной трансформации синапсов (Adams, Dudek, 2005).

Механизмы запуска ДВП во многом изучены. Показано, что в первые минуты после тетанической стимуляции пластичность синаптических связей реализуется главным образом за счет изменения функциональных свойств ионных каналов и рецепторов нейромедиаторов (Malenka, Nikoll, 1999). Предпринимались неоднократные попытки выяснить, происходят ли в ходе ДВП изменения числа и/или морфологии синапсов; при этом чаще всего использовали ультраструктурный анализ и прижизненные наблюдения с применением конфокальной микроскопии. В подавляющем большинстве работ основное внимание уделено изучению синапсов в ранней фазе ДВП (от первых минут до 2-х ч). Как свидетельствуют результаты прижизненной микроскопии нейронов *in vitro*, в этот период дендритные шипики могут как появляться, так и исчезать (Engert, Bonhoeffer, 1999). Есть данные о том, что могут увеличиваться размеры дендритных шипиков, может меняться их форма (Fifkova, Van Harrefeld, 1977; Desmond, Levy, 1983). Описаны изменения размера и формы такого важного структурного компонента синапса, как постсинаптическое уплотнение (ПСУ) (Desmond, Levy, 1986; Мошков, Петровская, 1983). Но даже при использовании однотипных морфометрических подходов результаты разных исследователей довольно противоречивы (Yuste, Bonhoeffer, 2001). Несогласованность результатов с одной стороны может быть следствием отсутствия устойчивых морфологических изменений в ранней фазе

ДВП. С другой стороны, несогласованность может быть следствием анализа ультраструктуры синапсов на одиночных срезах, при этом результаты полученные на серийных срезах с использованием (3D) реконструкции синапсов сходны. Так, двумя независимыми группами исследователей было показано, что через 30 мин после запуска ДВП *in vivo* в зубчатой фасции (ЗФ) и спустя 2 ч в СА1 области гиппокампа *in vitro* достоверно не меняется ни количество синапсов в единице объема ткани (плотность синапсов), ни соотношение их типов, ни структурные характеристики (Trommald et al., 1996; Sorra, Harris, 1998). Достоверных данных об изменениях ультраструктуры синапсов в поздней фазе ДВП нет, хотя и предполагается, что именно в этот период структурные изменения наиболее вероятны (Luscher et al., 2000).

Несогласованность результатов исследований структуры синапсов в значительной степени обусловлена ограниченными возможностями методов. Ультраструктурные исследования показывают состояние объекта в отдельных точках процесса. Прижизненные наблюдения позволяют в динамике изучать структуру синапсов, но не выявляют ее деталей. Подавляющее большинство работ, посвященных поиску ультраструктурных коррелятов ДВП, выполнено на одиночных срезах, однако более адекватная оценка структуры синапса возможна только при использовании серийных срезов и 3D реконструкции. Использование срезов мозга или культур нейронов облегчает регистрацию синаптической активности и дает возможность прямого наблюдения за синапсами, но при этом всегда остается доля неопределенности, в какой степени структура синапсов *in vitro* соответствует структуре *in vivo*.

Хотя необходимость изменений структуры синапса для долговременного поддержания повышенной эффективности синаптической передачи является в большей мере интуитивно ожидаемым, нежели доказанным фактом, идея эта остается популярной. Примером тому может служить недавно предложенная модель долговременного сохранения памятного следа на группах близлежащих синапсов, модель «кластерной пластичности» (Govindarajan et al., 2006). Поэтому изучение морфологии синапсов в поздней фазе ДВП, которая критически зависит от синтеза новых белков, с использованием современных методов морфометрии может оказаться весьма информативным для понимания взаимосвязи между продолжительным сохранением высокой функциональной активности синапсов и их структурой.

Цель работы

Определить происходят ли изменения количества синапсов, соотношения синапсов разных типов и их морфологии в поздней фазе ДВП индуцированной в зубчатой фасции гиппокампа крыс *in vivo*.

Основные задачи исследования

1. Получить ДВП синапсов среднего молекулярного слоя ЗФ крыс путем тетанической стимуляции перфорантного пути гиппокампа.
2. Проанализировать разнообразие типов синапсов в среднем молекулярном слое ЗФ на основе 3D реконструкции.

3. Провести анализ плотности синапсов и определить соотношения типов синапсов в среднем молекулярном слое 3Ф в контроле, в поздней фазе ДВП и при стимуляции без индукции ДВП.

4. Определить ультраструктурные изменения синапсов в поздней фазе ДВП с использованием 3D реконструкции и анализа синапсов на серийных срезах.

Научная новизна

Впервые, на основе 3D реконструкции дендритных шипиков, показано, что в среднем молекулярном слое 3Ф гиппокампа крыс синапсы представлены теми же 4-мя типами синапсов, которые ранее были описаны на пирамидных нейронах коры и CA1 области гиппокампа: на грибовидных шипиках, на тонких шипиках, на пеньковых шипиках и ствольные – на стволах дендритов. Впервые установлено, что хотя в поздней фазе ДВП плотность синапсов в потенцированной области не отличается от контроля, меняется соотношение синапсов разных типов: увеличивается доля синапсов количественно доминирующего типа, на тонких шипиках, при уменьшении числа ствольных синапсов и синапсов на пеньковых шипиках. Впервые продемонстрировано, что в поздней фазе ДВП значительно увеличены объемы грибовидных и тонких шипиков, на 75% и 95% соответственно. Показано, что с увеличением объема шипиков увеличиваются объемы ПСУ грибовидных и тонких шипиков, у грибовидных – на 62%, у тонких – на 84%. Впервые установлено, что увеличение объема ПСУ связано с увеличением площади ПСУ экспонированной на поверхности шипика, а толщина ПСУ синапсов связана с уровнем их функциональной активности. Показано, что описанные ранее «свободные» ПСУ являются компонентом комплекса сортировки мембранных белков и обновления синапса. Совокупность выявленных изменений синапсов в поздней фазе ДВП позволяет говорить о наличии связи между поддержанием ДВП и увеличением размеров структур, ответственных за ее осуществление.

Научно-практическая ценность

Изучение взаимосвязи между ультраструктурой синапсов и их функциональной активностью необходимо для понимания фундаментальных механизмов работы мозга и механизмов развития патологий нервной системы, включая расстройства когнитивных функций. В этом отношении работа имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. Материалы диссертации могут быть использованы в рамках учебных курсов по нейроморфологии и физиологии нервной системы.

Апробация диссертации

Основные результаты диссертационной работы были представлены на заседании секции «Нейробиология и межклеточные взаимодействия» ученого совета ИТЭБ РАН (13 декабря 2006), а также на конференциях и симпозиумах: V чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова (Москва-Пушино. 13-20 ноября 2000); XVIII Российская конференция по электронной микроскопии. ЭМ'2000 (Черноголовка, 5-8 июня 2000); Колосовские чтения – 2002, IV Международная конференция по функциональной нейроморфологии

(Санкт-Петербург, 29-31 мая 2002); 3rd Forum of European Neuroscience (France, Paris, 2002 July 13–18); British neuroscience association 17th national meeting (Harrogate, 3-16 April 2003); 8-ая Пушкинская конференция молодых учёных (Пушино, 17-21 мая 2004); The World of the Synapse: Molecular Basis, Pathology and Drug Discovery. (Gif-sur-Yvette, France, December 9-10, 2004).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 24 работы, из них 9 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных данных и их обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы. Диссертация изложена на 178 страницах, материал иллюстрирован 23 рисунками. Библиография включает 789 ссылок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и экспериментальные процедуры

В работе использовали самцов крыс линии Sprague-Dawley весом 300-400 г. Крыс анестезировали уретаном (1,8 г/кг веса, внутривенно) и размещали в стереотаксическом аппарате. Для активации волокон перфорантного пути гиппокампа биполярный стимулирующий электрод (Rhodes SNE 100) погружали в угловой пучок левого полушария (4,4 мм от *lambda*). Стекланный регистрирующий электрод, заполненный искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей краситель (Pontamine Sky Blue), вводили в 3Ф левого полушария (AP=-4,1 и L=2,5 мм от *bregma*) (Paxinos, Watson, 1998). Глубину погружения электродов подбирали таким образом, чтобы получать максимальные ответы в гранулярном слое 3Ф. Тестирующие стимулы длительностью 60 мкс с силой постоянного тока 70-120 мкА подавали с интервалом в 30 с. Их интенсивность подбирали так, чтобы амплитуда популяционных спайков достигала 1-2 мВ. Тестирующие стимулы подавали 20 мин до индукции ДВП и в течение следующих 6 ч. ДВП у шести крыс вызывали тремя сериями по 50 имп с частотой 250 Гц с интервалами между сериями по 30 с. Контролем для ДВП служила 3Ф правого полушария мозга. Правую 3Ф не стимулировали, но в нее также вводили электроды (симметрично левому полушарию). Дополнительным контролем была левая 3Ф одной крысы, которая не получала тетанической стимуляции. В течение 6 ч с равными интервалами (0,04 Гц) она получала суммарно то же количество стимулов, что и при ДВП, а силу стимулов поднимали так, чтобы амплитуда ответов на них достигала значений ответов в ходе ДВП. Регистрацию пВПСП, времени и интенсивности стимуляции проводили под машинным контролем (программное обеспечение разработано Dr R. M. Douglas, University of British Columbia). Электрофизиологическая часть работы проведена д-ром Миком Эррингтоном в лаборатории проф. Тимоти Блисса (National Institute for

Подготовка образцов и микроскопия

Мозг фиксировали посредством интракардиальной перфузии раствором 3% параформальдегида и 0,5% глутарового альдегида. Для электронной микроскопии выделяли гиппокамп, дорзальную область рассекали на срезы толщиной 0,3-0,5 мм в плоскости перпендикулярной длинной оси. От каждого гиппокампа забирали по 4 среза на расстоянии 1-2 мм от зоны расположения отводящего электрода. Образцы ткани дополнительно фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде в течение 1-2 ч и 1-1,5 ч в 1% растворе OsO_4 содержащем 0,01% $\text{K}_2\text{Hr}_2\text{O}_7$. Образцы обезвоживали, заключали в смесь эпоксидных смол и полимеризовали. При помощи алмазного ножа Diatome на ультрамикротоме Ultracut-E (Reichert-Jung, Austria) получали серии срезов, не менее 70 срезов на серию. Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, изучали с использованием электронного микроскопа JEOL 1010 и фотографировали при увеличении 6000. Электронные микрофотоснимки оцифровывали с разрешением 900 dpi. Для компенсации нелинейных деформаций изображений проводили выравнивание с использованием программы SEM Align v.1.26b, разработанной Dr. J.C. Fiala (Fiala, Harris, 2001a; Boston University, USA, <http://www.synapses.bu.edu>). При выравнивании в качестве реперных точек использовали поперечно срезанные митохондрии и микротрубочки.

Анализ плотности расположения и соотношения типов синапсов

Волюметрический анализ плотности синапсов в исследуемом объёме среднего молекулярного слоя 3Ф проводили по методике разработанной Harris et al. (1992). Для анализа использовано 5 серий срезов из левой 3Ф от трех животных и 3 серии срезов правой 3Ф этих же крыс, а также 3 серии срезов от крысы со стимулированной, но не потенцированной 3Ф. Толщину срезов исходно светло-серого цвета проверяли согласно методу Fiala и Harris (2001b), обычно она составляла 60-70 нм. Синапсы идентифицировали по наличию ПСУ и присутствию возле него, по крайней мере, 2-3 пресинаптических везикул со стороны пресинаптического бутона. Каждому синапсу на последовательных изображениях присваивали индивидуальный номер и синапс относили к одному из четырех типов: на шипиках тонких, на грибовидных, на пеньковых и на стволах дендритов (согласно Peters, Kaiserman-Abramof, 1970 и Harris et al., 1992). Каждое сегментированное ПСУ учитывали как один синапс. Плотность синапсов выражали числом синапсов в 100 мкм^3 ткани, соотношение типов синапсов – в процентах от их общего количества.

Трехмерная реконструкция

Для 3D реконструкции использовали изображения, на которых проводился анализ плотности синапсов. При помощи программы IGL Trace 1.26b (Fiala, Harris, 2001a) на изображениях вручную очерчивали контуры дендритов, шипиков и их ПСУ. Сгенерированные по контурам 3D объекты сохраняли в WRML формате. Для регрессионного анализа параметров ПСУ использованы две серии срезов одного животного, одна из контрольной и одна из

тетанизированной ЗФ. Микрофотоснимки оцифровывали с разрешением 2400 dpi. Реконструированное ПСУ обрабатывали в программе 3D Studio Max: цитоплазматическую часть поверхности ПСУ удаляли, получая значение площади ПСУ, экспонированной на поверхности шипика. Толщину ПСУ получали как отношение объема ПСУ к площади, занимаемой ПСУ на поверхности шипика. Подсчёт объёмов и площадей поверхностей реконструированных объектов в обоих программных пакетах автоматизирован.

Статистическая обработка

Принадлежность групп полученных данных к нормальному распределению проверяли критерием Шапиро-Уилка (W_n), однородность дисперсий проверяли критерием Фишера. Однородность групп данных определяли по критериям Смирнова (D_s), Ван дер Вардена (X), Вилкоксона (W) и критерию знаков (S). Для малых выборок ($n=3$, $n=5$) значения статистик сравнивались с табличными критическими значениями (Большев, Смирнов, 1983). Для сравнения средних значений использовали дисперсионный анализ ANOVA (F) и нечувствительный к форме распределения T -критерий Крамера-Уэлча (Орлов, 2004). Для определения сил и форм связей групп данных проводили корреляционный и регрессионный анализ. Выбранный уровень значимости $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (σ). Для количественного анализа и графического представления результатов использовали статистические программные пакеты: Origin 7.0 (OriginLab Corp., <http://www.originlab.com>), Statistica 6.0 (StatSoft Inc., <http://www.statsoft.ru>), STADIA 7.0 (НПО «Информатика и компьютеры», МГУ, <http://statsoft.msu.ru>), SPSS 14.0 (SPSS Inc., <http://www.spss.ru>).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Параметры ДВП

У всех крыс сразу после индукции ДВП увеличение ответа составляло в среднем около 40% (Рис.1). Спустя 6 ч после индукции ДВП величина ответов как минимум на 20% превышала значения пВПСП до индукции ДВП (Рис.1). В интервале от 4 до 6 ч значения пВПСП практически не менялись. Следовательно, выполнено основное условие продолжительного поддержания повышенной эффективности синаптической передачи и высока вероятность появления в синапсах дополнительных или новых структурных компонентов.

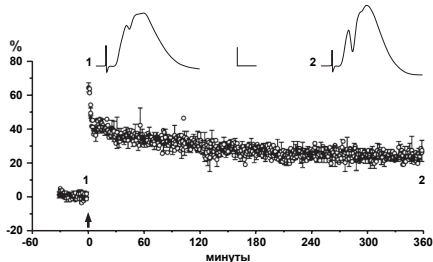


Рис.1. Значения пВПСП в гранулярном слое ЗФ в ходе эксперимента.

Средние значения скорости нарастания пВПСП (мВ/мсек) в ходе 6 ч эксперимента нормированы по средним значениям до индукции ДВП. Время запуска ДВП отмечено стрелкой. Вверху рисунка представлены примеры пВПСП непосредственно до индукции ДВП (1) и в конце эксперимента (2); калибровочная шкала 4мВ/4мсек.

2. Плотность расположения и соотношение типов синапсов

2.1. Морфология дендритных синапсов в среднем молекулярном слое 3Ф

Популяции дендритных синапсов пирамидных нейронов коры больших полушарий (Peters, Kaiserman-Abramof, 1970) и CA1 области гиппокампа; (Harris et al., 1992) составляют синапсы четырех типов: на грибовидных шипиках, на тонких шипиках, на пеньковых шипиках и стволовые – на стволах дендритов. Детального анализа типов синапсов в 3Ф ранее не проводилось. Выполненные нами реконструкции показывают, что синапсы на дендритах среднего молекулярного слоя 3Ф также можно разделить на четыре вышеуказанных основных типа (Рис.2А). Характерным признаком самых крупных грибовидных шипиков является большая головка, наличие перфорированного ПСУ и шипикового аппарата, признак пеньковых шипиков – отсутствие ножки.

2.2. Плотность расположения синапсов

Для решения вопроса, меняется ли количество синапсов в поздней фазе ДВП, проведен анализ плотности синапсов на сериях срезов. Результаты анализа свидетельствуют о том, что в среднем молекулярном слое 3Ф плотность синапсов после 6 ч ДВП достоверно не отличается от плотности в контроле и составляет около 300 синапсов в 100 мкм^3 (Рис.2Б). Следовательно, общее число синапсов не является критическим для длительного поддержания высокой эффективности синаптической передачи при ДВП.

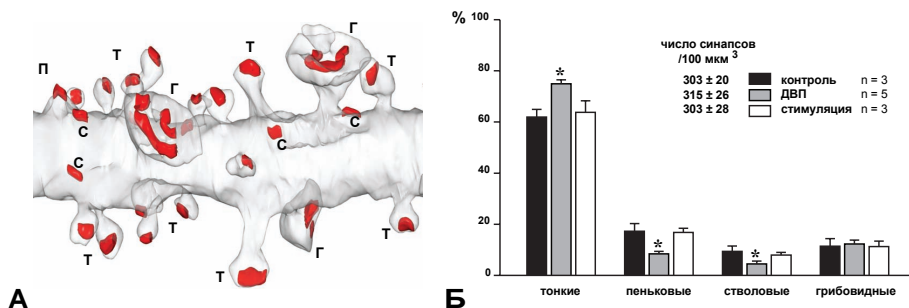


Рис. 2. Плотность и соотношение типов синапсов.

А. На 3D реконструкции сегмента дендрита представлены шипики грибовидные (г), тонкие (т), пеньковые (п) и синапсы стволовые (с), цветом выделены ПСУ. Б. Результаты анализа плотности синапсов и соотношения их типов. n – число серий срезов.

2.3. Соотношения синапсов разных типов в норме и при ДВП

Значение общей плотности синапсов мало информативно в отношении возможных функциональных перестроек синапсов, которые могли бы проявляться в изменении соотношения количества синапсов отдельных типов. Проведенный анализ соотношения отдельных типов синапсов подтверждает это предположение (Рис. 2Б). В среднем молекулярном слое 3Ф доминирующий тип синапсов – это синапсы на тонких шипиках. В контроле их доля составляла около 62%, на пеньковых шипиках – 17%, на грибовидных – 12%, а на стволах дендритов – 9%. Таким образом, соотношение типов

синапсов в среднем молекулярном слое ЗФ и в других отделах мозга (CA1 область гиппокампа, неостриатум) принципиально не различается (Harris et al., 1992; Sarani et al., 2001). После стимуляции ЗФ без индукции ДВП соотношение типов синапсов не менялось. Но в поздней фазе ДВП соотношение типов синапсов значительно отличалось от контроля: увеличено число синапсов на тонких шипиках (на 13%), уменьшено число синапсов на пеньковых шипиках (на 9%) и на стволах дендритов (на 5%). При этом доля синапсов на грибовидных шипиках не менялась (12%). Таким образом, поддержание высокой эффективности синаптической передачи в поздней фазе ДВП *in vivo* осуществляется на фоне значительных изменений соотношения синапсов разных типов.

3. Анализ морфологии синапсов на основе 3D реконструкций

3.1. Морфометрия дендритных шипиков

Поскольку рост числа синапсов на тонких шипиках сопровождается уменьшением доли пеньковых и стволовых синапсов, возможно, что синапсы одних типов превращаются в другие. Но без привлечения дополнительных данных однозначно полагать, что подобная трансформация синапсов сказывается на эффективности синаптической передачи в поздней фазе ДВП невозможно. Высокий уровень синаптической передачи при ДВП может быть связан с изменением функциональной активности существующих синапсов. Возникает вопрос: существуют ли в поздней фазе ДВП морфологические признаки повышенной функциональной активности синапсов, и в какой форме они проявляются у различных типов синапсов? Для решения данного вопроса мы реконструировали два предположительно различных по функциональной активности типа синапсов (Рис.3). Один из них это синапсы на тонких шипиках – численно преобладающий и наиболее пластичный тип, а второй – на шипиках грибовидных, наиболее стабильных и наиболее сложно организованных. Результаты анализа 3D реконструкций (Рис. 4 А-Б) свидетельствует о том, что к 6 ч ДВП размеры как тонких, так и грибовидных шипиков значительно увеличены. Объемы тонких шипиков увеличены на 95%, а объемы грибовидных – на 75%. Достоверно увеличены и площади поверхности шипиков: у тонких – на 68%, и у грибовидных – на 61%. Следовательно, в поздней фазе ДВП высокая эффективность синаптической передачи поддерживается на фоне увеличенных размеров синапсов.

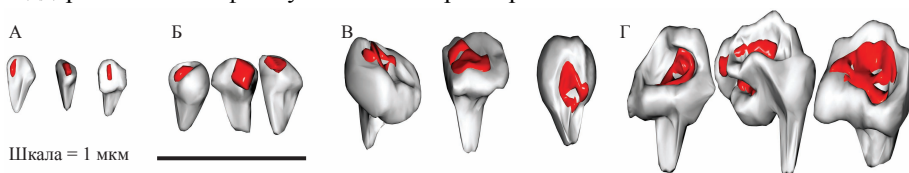


Рис. 3. Примеры реконструкций дендритных шипиков. А, Б – тонкие шипики; В, Г – грибовидные шипики; А, В – шипики в контроле; Б, Г – шипики при ДВП. Цветом отмечены проекции ПСУ на поверхности головок шипиков, которые при ДВП более вогнуты.

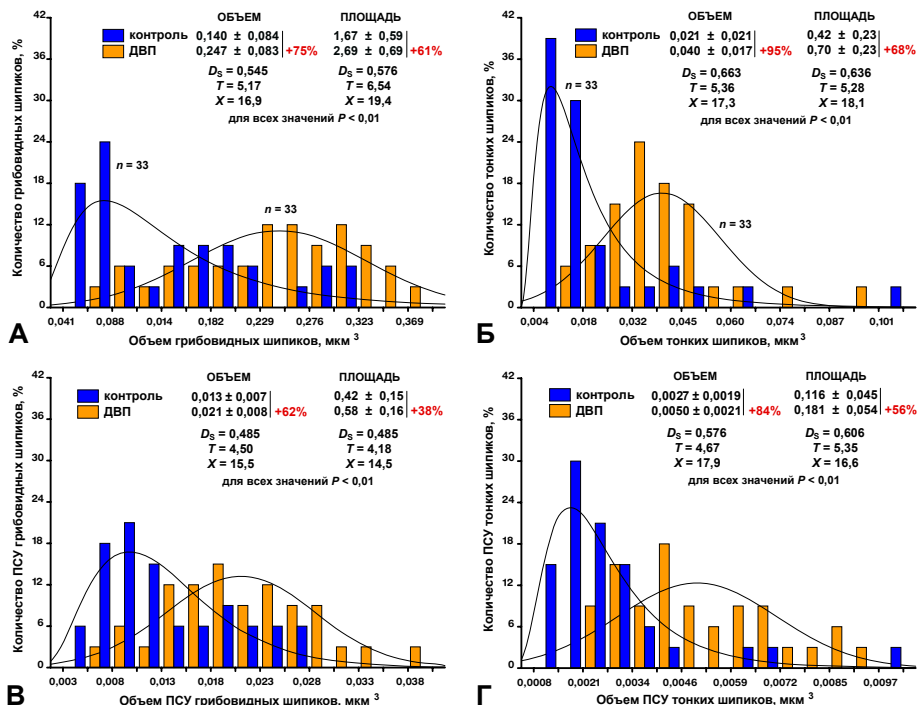


Рис.4. Гистограммы распределения параметров реконструированных шипиков (А, Б) и их ПСУ (В, Г) в контроле и ДВП. Подписи на рисунках содержат средние значения объемов и площадей и относительный прирост значений в процентах по отношению к контролю; n – число реконструированных шипиков.

3.2.1. Морфометрия постсинаптических уплотнений

Определяют ли размеры дендритных шипиков уровень эффективности синаптической передачи при ДВП? Увеличение размеров шипиков, сопряженное с повышением эффективности синаптической передачи, было показано давно, но при этом отмечалась обратимость наблюдаемых изменений (Fifkova, Van Harreveld, 1977). Однозначного решения вопроса о причинно-следственных связях между размерами шипиков и эффективностью синаптической передачи, по-видимому, не существует. Поэтому предпринята попытка поиска проявлений ДВП в структуре наиболее функционально значимого компонента синапса – ПСУ. Полученные данные свидетельствуют о том, что объемы ПСУ в поздней фазе ДВП достоверно увеличены: у грибовидных шипиков – на 62%, у тонких шипиков – на 84% (Рис. 4 В-Г). Следовательно, высокая эффективность синаптической передачи в поздней фазе ДВП реализуется на фоне значительного увеличения объемов ПСУ синапсов этих типов.

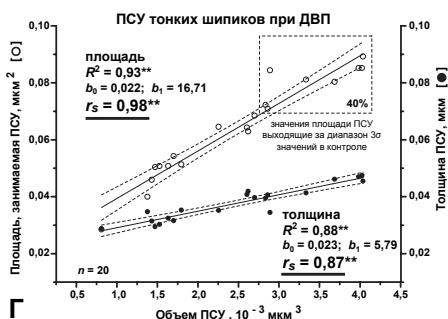
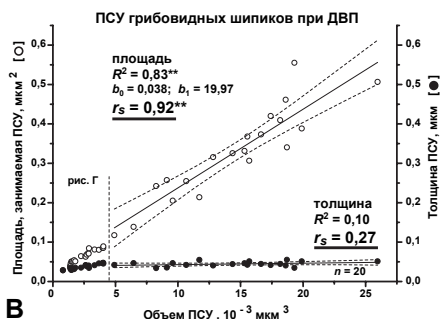
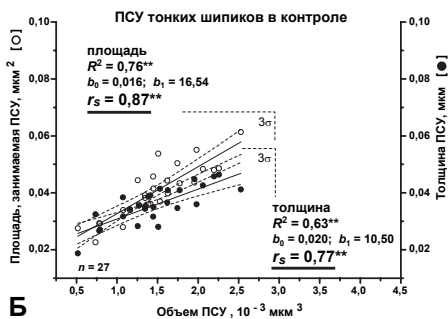
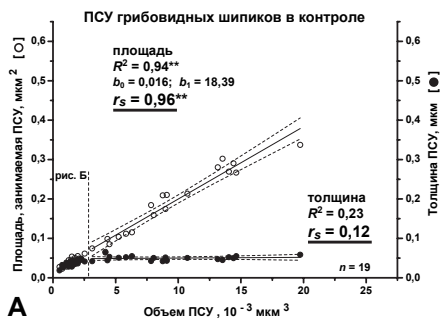


Рис. 5. Диаграммы рассеяния значений параметров PSU дендритных шипиков. R^2 – коэффициент детерминации линии регрессии $y=b_0+b_1x$ с 95% доверительным интервалом для среднего b_1 (пунктир) и коэффициентом корреляции Спирмена (r_s) с объемом PSU; x – объем PSU, y – площадь или толщина PSU. Пунктирной рамкой (Г) выделены значения площадей PSU тонких шипиков выходящих за диапазон 3σ в контроле (Б). n – число проанализированных синапсов. Средние значения в Таблице 1.

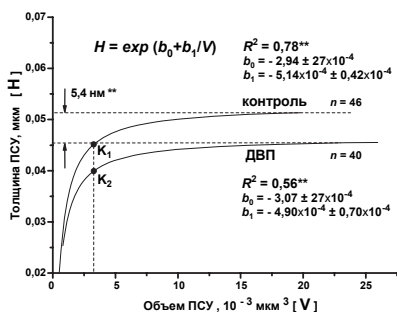


Рис. 6. Регрессионный анализ толщин PSU суммарно тонких и грибовидных шипиков в контроле и при ДВП.

Вертикальным пунктиром отмечена граница раздела объемов PSU тонких и грибовидных шипиков в контроле (см. рис. 5А), образующая точки K_1 и K_2 вблизи максимальной кривизны практически идентичных линий регрессий в контроле и при ДВП соответственно. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5.

Таблица.1. Параметры PSU синапсов на тонких и на грибовидных шипиках.

	объем, 10^{-3} мкм ³		площадь, 10^{-3} мкм ²		толщина, нм	
	контроль	ДВП	контроль	ДВП	контроль	ДВП
тонкие	1,5±0,5	2,5±0,9*	41±9	64±17*	36±6	38±6
грибовидные	9,3±4,6	14,5±5,2*	187±86	327±115*	50±6	44±6*

*- достоверные отличия значений параметров PSU при ДВП от значений в контроле.

3.2.2. Анализ корреляций объема ПСУ с толщиной и с площадью ПСУ

В изменения объема ПСУ вносят вклад два компонента: площадь ПСУ, экспонированная на поверхности шипика, и толщина. Отмечалось, что в ранней фазе ДВП площадь, занимаемая ПСУ, в одних случаях увеличивается, а в других нет; может увеличиваться и толщина ПСУ (Soga, Harris, 1998; Мошков, Петровская, 1983; Desmond, Levy, 1986). Однако взаимосвязь этих параметров до сих пор никто систематически не исследовал. Для ответа на вопрос, за счет чего увеличивается объем ПСУ, проведен корреляционный и регрессионный анализ соотношений объема, толщины и площади, занимаемой ПСУ, у тонких и грибовидных шипиков. Согласно полученным данным, форма связи объема ПСУ с занимаемой им площадью у двух типов синапсов достоверно не различается и в контроле и при ДВП и выражается линейной зависимостью объема от занимаемой площади (Рис. 5). Связь объема и толщины ПСУ у двух типов синапсов различна. У грибовидных шипиков с увеличением объема ПСУ толщина достоверно не меняется ни в контроле, ни при ДВП (Рис. 5А, В). Но у синапсов меньших размеров, на тонких шипиках, с увеличением объема ПСУ толщина ПСУ также увеличивается (Рис. 5Б, Г). Таким образом, в поздней фазе ДВП рост (на 62%) объемов ПСУ грибовидных шипиков связан исключительно с увеличением площади занимаемой ПСУ на поверхности шипика, но увеличение (на 84%) объемов ПСУ тонких шипиков связано как с увеличением толщины, так и с увеличением площади занимаемой ПСУ.

Характерно то, что тогда как параметры ПСУ тонких шипиков при ДВП (Рис.5Г) приближаются к параметрам ПСУ шипиков грибовидных в контроле (Рис.5А), вклад толщины ПСУ в увеличение объема значительно снижается. Связь толщин и объемов ПСУ суммарно тонких и грибовидных шипиков нелинейна и может быть описана экспоненциальной зависимостью и в контроле, и в поздней фазе ДВП (Рис. 6). Создается впечатление, что по мере роста ПСУ достигают некой конечной «эффективной» толщины ПСУ грибовидных шипиков. Однако тот факт, что спустя 6 ч ДВП толщина их ПСУ на 11% меньше, предполагает функциональную значимость этого параметра и заставляет обратить внимание на систему рециклинга и обновления компонентов синапса.

4. Ультраструктурные признаки обновления синапсов

ДВП сопровождается обновлением и реструктуризацией синаптической мембраны и ПСУ с участием компонентов системы рециклинга – эндоцитоза, сортировки и повторного встраивания мембранных белков (Kennedy, Ehlers, 2006). Участниками рециклинга считаются окаймленные везикулы, аморфные и трубчатые эндосомы, везикулы разного размера и формы, мультивезикулярные тельца и цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭР) (Cooney et al., 2002; Попов с соавт., 2003). Кроме этих органелл в дендритах и шипиках контрольных и стимулированной ЗФ очень часто встречаются структуры, первоначально описанные как «свободные» ПСУ (Попов, Петухов, 1982; Petukhov, Porov, 1986). Они представляют собой плотные группы мелких гранул/везикул диаметром 20-30 нм. «Свободные» ПСУ (сПСУ) часто

связаны с окруженными окаймленными везикулами эндосомами и мультивезикулярными тельцами, образуя единый комплекс (Рис. 7А), что позволяет предполагать участие сПСУ в обновлении синапсов. сПСУ часто ассоциированы с цистернами ЭР и шипикового аппарата в основании различных типов синапсов (Рис. 7Б, В). Но важно то, что сПСУ и классические ПСУ взаимосвязаны. сПСУ часто располагаются непосредственно под собственно ПСУ (Рис. 7 А, В), причем в структуре последних можно различить гранулы/везикулы тех же размеров, что и в составе сПСУ. Такая организация свойственна всем выявленным нами типам синапсов. Одним из участников селективного направленного транспорта мембранных белков является мультипротеиновый комплекс – экзоцист, который обеспечивает встраивание белков в плазматическую мембрану непосредственно в области ПСУ (Kennedy, Ehlers, 2006; Gerges et al., 2006). Размеры экзоциста и везикул образующих сПСУ совпадают (Hsu et al., 1998; Novick et al., 2006), поэтому нельзя исключать, что сПСУ являются комплексами везикул/экзоцист задействованных в транспорте синаптических белков. В поздней фазе ДВП мы наблюдали описанное ранее увеличенное число полирибосом в основаниях шипиков (Ostroff et al., 2002), но мы не видели в шипиках признаков усиленного эндо- или экзоцитоза. И эндосомы, и мультивезикулярные тельца встречались примерно с той же частотой, что и в контроле, однако «свободные» ПСУ отсутствовали. Если к 6 часам ДВП стабилизирована и рост синапсов завершен, то вполне закономерно то, что сПСУ мобилизованы и истощен их цитозольный запас.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенная работа нацелена на поиск морфологических коррелятов ДВП и является первым детальным анализом морфологических изменений дендритных синапсов, участвующих в долговременном сохранении высокой эффективности синаптической передачи *in vivo*.

В работе использована модель ДВП в 3Ф. В среднем молекулярном слое 3Ф глутаматэргические волокна перфорантного пути образуют более 90% всех дендритных синапсов (Steward, Vinsant, 1983). В свою очередь более 90% этих синапсов располагается на дендритных шипиках. Таким образом, подавляющее большинство дендритных синапсов получает одни и те же возбуждающие входы. Несмотря на это, как показывают выполненные нами 3D реконструкции, синапсы здесь различны и представлены четырьмя морфологическими типами, описанными в коре, в CA1 области гиппокампа и в подкорковых структурах (Peters, Kaiserman-Abramof, 1970; Harris et al., 1992; Capani et al., 2001).

Исследования синапсов с использованием конфокальной микроскопии показывают, что дендритные шипики лабильные структуры, и в ходе ДВП могут появляться и исчезать. Согласно нашим данным сохранение высокой эффективности синаптической передачи в поздней фазе ДВП *in vivo* не связано с увеличением общего числа синапсов, но сопровождается изменением соотношений их типов, и прежде всего увеличением доли синапсов на тонких

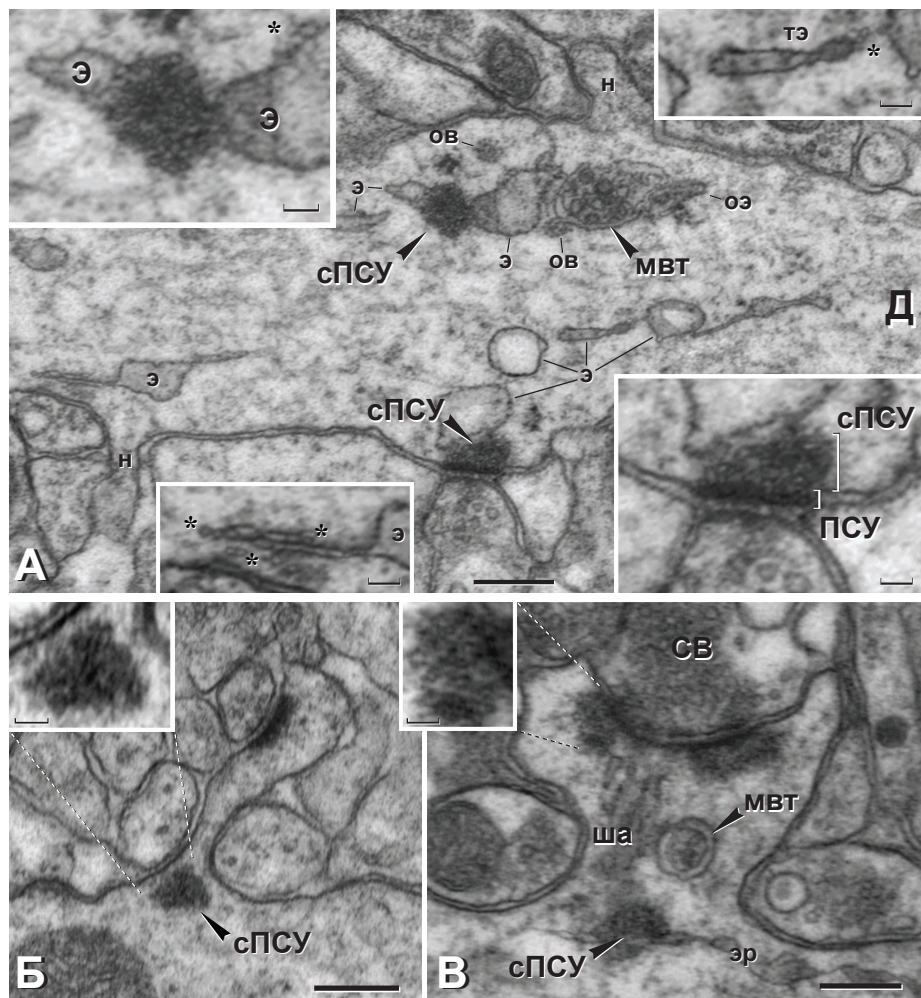


Рис. 7. Эндосомальный сортирующий комплекс и «свободные» ПСУ.

А. Эндосомальный сортирующий комплекс включает мультивезикулярное тело (МВТ), эндосомы (э), окаймленные везикулы (ов), окаймленные эндосомы (оэ) и трубчатые эндосомы (тэ). С эндосомами ассоциированы комплексы гранул/везикул диаметром 20-30 нм – «свободные» ПСУ (сПСУ). С эндосомами также связаны одиночные гранулы/везикулы (отмечены звездочками). **В** нижней части рисунка связанное с эндосомой сПСУ располагается непосредственно под собственно ПСУ, которое также содержит гранулярные компоненты. **Б.** сПСУ в основании тонкого шипика. **В.** В основании грибовидного шипика сПСУ ассоциировано с цистерной эндоплазматического ретикулаума (эр); морфологически идентичные комплексы гранул/везикул наблюдаются и в субсинаптической области, непосредственно под ПСУ. **Д** – дендрит; ША – шипиковый аппарат; СВ – пресинаптические везикулы; н – ножка шипика. Шкалы на А-В по 250 нм, шкалы на вставках по 50 нм.

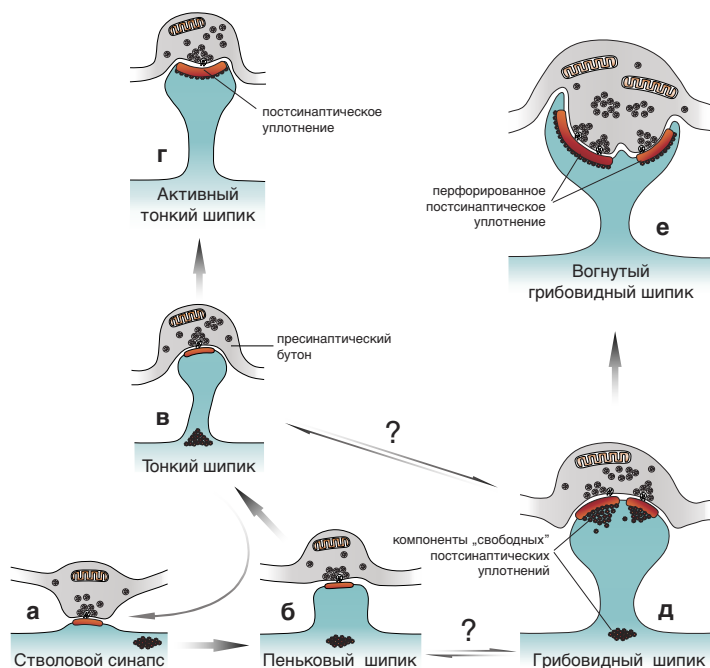


Рис. 8. Ультраструктурные изменения синапсов в поздней фазе ДВП *in vivo*. Синапсы стволовые (а) и синапсы на пеньковых (б), тонких (в) и грибовидных (д) шипиках в контроле; г и е синапсы на тонких и на грибовидных шипиках при ДВП. Стрелками показана направленность изменений при ДВП.

дендритных шипиках. Мы не встречали в ЗФ взрослых животных филоподий, предшественников тонких шипиков в раннем постнатальном периоде (Fiala et al., 1998), поэтому предполагаем образование шипиков тонких из пеньковых, и пеньковых из синапсов стволовых (Рис.8а-в), что согласуется с данными Harris et al. (1992). Мы также не исключаем обратных взаимопереходов, элиминации одних синапсов и новообразование других без изменения их общего числа. Но такая форма синаптической пластичности, по-видимому, в меньшей степени затрагивает грибовидные шипики (Рис.8д), большинство из которых *in vivo* стабильны в течение месяцев (Holtmaat et al., 2005). Прояснить образуются ли грибовидные шипики из тонких или пеньковых возможно при электронномикроскопическом контроле прижизненных наблюдений. После стимуляции ЗФ без индукции ДВП соотношения синапсов разных типов не менялись. Но ранее, при изучении гибернации сусликов, на синапсах CA1 области гиппокампа мы показали, что выход из гипобиоза также сопровождается увеличением числа тонких шипиков, а доля грибовидных шипиков и общая плотность синапсов не меняются. Что общего между гибернацией и ДВП? В обоих случаях на фоне резкого подъема электрической активности происходит мощная активация белоксинтезирующей системы (Gordon et al, 1997; O'Hara et

al., 1999; Carey et al., 2003). По-видимому, только тогда, когда высокий уровень активности синапсов преобразуется в сигнал, запускающий экспрессию генов, создаются условия для наблюдаемой трансформации типов синапсов.

Хотя форму меняют как тонкие, так и грибовидные шипики, популяция грибовидных шипиков численно стабильна. Определяет ли это обстоятельство различия функциональной роли двух типов синапсов? Группой исследователей под руководством Kasai показано, что *in vitro* потенцияция одиночных синапсов на тонких и на грибовидных шипиках проявляется различным образом; шипики быстро увеличиваются в объеме, но размеры грибовидных вскоре возвращаются к исходным (Matsuzaki et al., 2004; Noguchi et al., 2005). Авторы развивают идею о том, что синапсы на тонких шипиках являются мишенями ДВП, тогда как синапсы на шипиках грибовидных исходно потенцированы и представляют материальную основу долговременной памяти, обеспечивая стабильность работы мозга (Kasai et al., 2003). Наши результаты свидетельствуют о том, что в поздней фазе ДВП *in vivo* высокая эффективность синаптической передачи также сохраняется на фоне увеличенных размеров в большей мере тонких шипиков, чем грибовидных. При сходной форме реакции механизм ее в ранней и поздней фазе ДВП различен: по-видимому, в первые минуты объем шипиков растет за счет осмотических процессов и перестройки цитоскелета, в дальнейшем преобладают биосинтетические процессы. Определяют ли большие размеры тонких шипиков стабильность ДВП – вопрос открытый. Но с другой стороны, согласно нашим результатам и результатам других исследователей, с размерами шипика связан размер наиболее функционально значимого компонента синапса – ПСУ. Полученные нами данные говорят о том, что объемы ПСУ в поздней фазе ДВП значительно увеличены, причем в большей степени опять-таки у тонких шипиков (Рис.8г,е).

ПСУ шипиков является структурой в которой сконцентрированы рецепторы нейромедиаторов. NMDA рецепторы (NMDAR) обеспечивают запуск ДВП и встраивание в ПСУ дополнительных компонентов, в частности AMPA рецепторов, отвечающих за быстрые постсинаптические токи (Lynch, 2004; Dingledine et al., 1999). Блокада встраивания AMPA рецепторов в ПСУ блокирует и ДВП (Park et al., 2004). ПСУ практически всех шипиковых синапсов несут NMDAR, но не все имеют AMPA рецепторы (AMPAR). ПСУ занимающие большую площадь поверхности шипика имеют пропорционально большее число AMPAR (Nusser, 2000). ПСУ небольшого размера могут не иметь вовсе AMPAR и считаются синапсами «молчащими» (Liao et al., 1995; Malinow et al., 2000). Запуск ДВП в 3Ф также NMDAR-зависимый процесс, но исследований числа AMPAR в ПСУ синапсов 3Ф не проводилось. Тем не менее, в синапсах различных областей мозга механизмы поддержания ДВП сходны и связаны с встраиванием в ПСУ дополнительных AMPAR (Liao et al., 1995; Rumpel et al., 2005; Sun et al., 2005). Естественным было предположить, что увеличение объемов ПСУ в поздней фазе ДВП в 3Ф, может быть связано с разрастанием ПСУ в плоскости мембраны, соответственно и с увеличением синаптической области мембраны шипика. Результаты анализа на основе 3D

реконструкций показали, что так оно и есть. Несмотря на то, что результаты, полученные на одном животном предварительны, соотношения толщины и площади ПСУ имеют ярко выраженный характер. Наблюдаемое увеличение площади занимаемой ПСУ отличается от результатов полученных спустя 1-2 ч ДВП (Sorra, Harris, 1998; Desmond, Levy, 1986). Это позволяет считать, что устойчивое увеличение площади занимаемой ПСУ происходит именно в поздней фазе ДВП и связано с повышением вероятности участия синапсов в генерации ВПСП за счет увеличения числа AMPAR в ПСУ. При этом с ростом объема ПСУ предположительно «молчащих» и количественно доминирующих синапсов на тонких шипиках зависимость объема ПСУ от толщины уменьшается. Получается, что при базовом уровне активности ламинарная структура ПСУ «молчащих» синапсов недоукомплектована для высокоэффективной синаптической передачи. В то же время, очевидно, что устойчивость ДВП невозможно свести лишь к увеличению числа AMPAR. Это сложный системный процесс, в котором задействованы многие сигнальные и эффекторные системы. По результатам анализа паттерна генов, уровень экспрессии которых значительно возрастает вследствие активации NMDAR (Hong et al., 2004) или индукции поздней фазы ДВП в ЗФ *in vivo* (Matsuo et al., 2000), пока невозможно утверждать, что продукты новоэкспрессированных генов являются основными структурными компонентами ПСУ (Peng et al., 2004). Большая часть этих генов связана с внутриклеточной сигнализацией, метаболизмом, выживанием, регуляцией транскрипции, синтеза и процессинга белка. По-видимому, синтез большинства структурных компонентов ПСУ, гены которых экспрессируются конститутивно, подвержен этой регуляции.

Каким образом при ДВП происходит рост поверхности шипиков и размеров ПСУ? Наиболее активно обсуждается роль рециклинга глутаматных рецепторов (Kennedy, Ehlers, 2006). Активация рециклинга убедительно показана в ранней фазе ДВП; он проявляется в транслокации эндосом из дендритов в шипики (Park et al., 2006), однако точные механизмы и область встраивания неизвестны. Считается, что этот процесс происходит в экstrasинаптической области мембраны шипика и доставка белков реализуется за счет латеральной диффузии в мембране (Derkach et al., 2007). По-видимому, существуют и альтернативные механизмы обновления синапсов. В ранних ультраструктурных работах обсуждалось участие в синаптической передаче телец Tax1 (Taxi, 1961) – цитоплазматических компонентов синапса (Косицын, 1969), но отсутствие информации о молекулярной структуре синапса позволяло высказывать лишь общие положения. Механизм направленного везикулярного транспорта опосредованный экзоцистами (Gerges et al., 2006) на уровне ультраструктуры слабо исследован вследствие малых размеров таких везикул. Недавно Kirov et al. (2004) показали, что понижение синаптической активности *in vitro* вследствие охлаждения связано с уменьшением электронной плотности ПСУ и появлением в дендроплазме «свободных» ПСУ. сПСУ наблюдали при посттетанической потенциации (Попов, Петухов, 1982) и в ранней фазе ДВП (Petukhov, Popov, 1986). В шипиках и дендритах ЗФ мы наблюдали сПСУ в

контроле и после стимуляции (Рис.8а-в, д), но не в поздней фазе ДВП (Рис.8г, е). О составе и функциональной роли их пока ничего не известно, и заложенная в названии аналогия с ПСУ требует доказательств. Тем не менее, взаимодействие сПСУ с эндосомами и ПСУ указывает на то, что сПСУ могли бы участвовать в направленном транспорте готовых мембранных фрагментов непосредственно в синаптическую область в дополнение к механизму доставки путем латеральной диффузии из экстрасинаптической области. Согласно размерам везикулы сПСУ могли бы нести лишь единичные мембранные белки и на этапе стабилизации ДВП обеспечивать тонкую подстройку синапсов в зависимости от уровня пресинаптической активности.

ВЫВОДЫ

1. С использованием анализа синапсов на серийных срезах и 3D реконструкции показано, что в среднем молекулярном слое зубчатой фации гиппокампа крыс синапсы представлены теми же 4-мя основными типами, которые ранее были описаны на дендритах пирамидных нейронов коры и СА1 области гиппокампа: синапсы на грибовидных шипиках, на тонких шипиках, на пенечковых шипиках и стволовые, на стволах дендритов.
2. В поздней фазе ДВП, через 6 ч после индукции путем тетанической стимуляции перфорантного пути гиппокампа, в среднем молекулярном слое зубчатой фации не выявлено изменений плотности синапсов (количества синапсов в 100мкм^3 ткани).
3. Подсчет числа синапсов показал, что в поздней фазе ДВП меняется соотношение типов синапсов. Значительно, с 62% до 75% увеличивается доля синапсов на тонких шипиках. При этом доля стволовых синапсов уменьшается с 9% до 5%, а доля синапсов на пенечковых шипиках уменьшается с 17% до 9%. Доля самых крупных, грибовидных шипиков, не меняется (12%).
4. В результате 3D реконструкции выявлены изменения структуры синапсов в поздней фазе ДВП. Существенно увеличены объемы шипиков: грибовидных на 75%, тонких на 95%. Увеличены также объемы ПСУ шипиков: у грибовидных на 62%, у тонких на 84%. Установлено, что увеличение объема ПСУ зависит от увеличения площади ПСУ, экспонированной на поверхности шипика, а толщина ПСУ связана с типом синапсов и с уровнем функциональной активности синапсов на тонких шипиках.
5. Совокупность выявленных ультраструктурных изменений позволяет говорить о наличии корреляции между поддержанием повышенной эффективности синаптической передачи и увеличением размеров структур, ответственных за ее осуществление. По всей вероятности именно увеличение размеров ПСУ, соответственно и содержания в них глутаматных рецепторов, обеспечивает высокую эффективность синаптической передачи в поздней фазе ДВП в системе перфорантный путь – гранулярные нейроны зубчатой фации.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 05-04-49635-а).

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Попов В.И., Медведев Н.И., Рогачевский В.В., Игнатьев Д.А., Стьюарт М.Г., Фесенко Е.Е. Трёхмерная организация синапсов и астроглии в гиппокампе крыс и сусликов: Новые структурно-функциональные парадигмы работы синапса. *Биофизика*, 2003 т.48, вып.2, с. 289-308.
2. Попов В.И., Деев А.А., Клименко О.А., Краев И.В., Кузьминых С.Б., Медведев Н.И., Патрушев И.В., Попов Р.В., Рогачевский В.В., Хуцян С.С., Стьюарт М.Г., Фесенко Е.Е. Трёхмерные реконструкции синапсов и дендритных шипиков в гиппокампе крыс и сусликов: новые структурно-функциональные парадигмы работы синапса. *Журнал высшей нервной деятельности*, 2004, том.54, №1, с. 131-140.
3. Popov V.I., Davies H.A., Rogachevsky V.V., Patrushev I.V., Errington M.L., Gabbott P.L., Bliss T.V., Stewart M.G. Remodelling of synaptic morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation (LTP): a serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat. *Neuroscience*, 2004, v.128(2), pp. 251-262.
4. Stewart M.G., Davies H.A., Sandi C., Kraev I.V., Rogachevsky V.V., Peddie C.J., Rodriguez J.J., Cordero M.I., Donohue H.S., Gabbott P.L., Popov V.I. Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience*, 2005, v.131(1), pp. 43-54.
5. Игнатьев В.И., Гордон Р.Я., Воробьев В.В., Рогачевский В.В. Сравнительный анализ процессов восстановления электроэнцефалографической и белоксинтезирующей активности неокортекса и гиппокампа зимнеспящих (суслики) и незимнеспящих (крысы) животных при выходе из гипотермии. *Биофизика*, 2005, т.50, вып.1, с. 140-151.
6. Гордон Р.Я., Игнатьев Д.А., Рогачевский В.В., Медведев Н.И., Краев И. В., Патрушев И.В., Хуцян С.С., Попов В.И. Изменение активности белоксинтезирующей системы нейронов головного мозга суслика *Citellus undulatus* при зимней спячке и гипотермии *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2006 г, т.42, №3, с. 237-243.

Тезисы докладов

7. Попов В.И., Шибаев Н.В., Медведев Н.И., Рогачевский В.В., Хуцян С.С., Садовников В.Б. Методика получения больших серий ультратонких срезов для количественного стереологического анализа синапсов ц.н.с. и для трёхмерных реконструкций. V чтения, посвящённые памяти академика Ю.А.Овчинникова «Биоорганика-2000». Москва-Пушино, 13-20 ноября 2000г. Тезисы докладов, с.98.
8. Попов В.И., Рогачевский В.В., Хуцян С.С., Медведев Н.И., Шибаев Н.В., Садовников В.Б. Трёхмерная реконструкция нейрональных структур гиппокампа позвоночных с использованием 90-150 серийных ультратонких

срезом. XVIII Российская конференция по электронной микроскопии. «ЭМ'2000». Черноголовка, 5-8 июня 2000 года. Тезисы докладов, с. 294.

9. Медведев Н.И., Патрушев И.В., Рогачевский В.В., Краев И.В., Клименко О.А., Попов В.И., Хуцян С.С., Шibaев Н.В., Садовников В.Б., Мурашев А.Н. Анализ трёхмерной организации аксодендритных шипиков в полях СА1 и СА3 гиппокампа гипотермных и эутермных сусликов и крыс. Филиал ИБХ. Отчётная конференция 2001. Пущино, 22-23 ноября 2001г.

10. Гордон Р.Я., Игнатьев Д.А., Краев И.В., Попов В.И., Рогачевский В.В., Хуцян С.С. Исследование адаптационных способностей мозга грызунов при естественном и искусственном гипобиозе. РАН. Колосовские чтения – 2002, IV Международная конференция по функциональной нейроморфологии. С.-Пб., 29-31 мая 2002г. Тезисы докладов, с. 89-90.

11. Попов В.И., Медведев Н.И., Патрушев И.В., Рогачевский В.В., Краев И.В., Клименко О.А., Игнатьев Д.А., Хуцян С.С., Stewart M.G. Количественный стереологический анализ и 3D реконструкции дендритных синапсов гиппокампа крысы и суслика в зависимости от эффективности синаптической передачи. РАН. Колосовские чтения – 2002, IV Международная конференция по функциональной нейроморфологии. С.-Пб., 29-31 мая 2002г. Тезисы докладов, с. 230-231.

12. Stewart M. G, Popov V. I, Davies H. A., Rogachevsky V.V., Errington M. L., Bliss T. V. P. Remodelling of synapse and dendritic spine morphology 6 hours after induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of rat hippocampus in vivo: a 3-dimensional quantitative study. 3rd Forum of European Neuroscience 2002, Paris, 2002 July 13–18; FENS Abstr. vol 1, A082.10.

13. Popov V.I., Davies H.A., Rogachevsky V.V., Errington M. L., Bliss T.V.P., Stewart M.G. Serial ultrathin section and 3D reconstructions of synapses during long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. 17th National Meeting of British Neuroscience Association. Harrogate, 13th-16th April 2003. Abstract Book, p. 49.

14. Краев И.В., Медведев Н.И., Патрушев И.В., Рогачевский В.В. Сравнительная трехмерная организация дендритных шипиков *in vivo* в различных полях гиппокампа грызунов с использованием серийных ультратонких срезов. 8-ая Пущинская конференция молодых учёных. Пущино, 17-21 мая 2004 года. Сборник тезисов, с. 92.

15. Popov V.I., Kraev I.V., Rogachevsky V.V., Patrushev I.V., Morenkov E.D., Stewart M.G. Three-dimensional world of synapse: 3D-reconstructions of hippocampal synapses using serial ultrathin sections for demonstration of multiple-synapses in both dendritic spines and presynaptic boutons. The World of the Synapse: Molecular Basis, Pathology and Drug Discovery. Gif-sur-Yvette. France. Abstr. 2004. p. 138.

Список источников литературы

Отечественные издания

- Архипов В.И. Дискуссионные вопросы в современных исследованиях механизмов памяти // Журн. высш. нервн. деят. 2004. Т.54. №1. С.5-10.
- Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. 3-е изд. – М.: Наука, 1983. – 416 с.
- Косицын Н.С. Особые виды аксо-дендритических синапсов с субсинаптической полоской в ретикулярной формации рептилий // Доклады Академии Наук СССР. 1969. Т.189. №6. С.1404-1406.
- Мошков Д.А., Петровская Л.Л. Изменение во времени структуры синапсов поля СА3 гиппокампа после их потенцирования // Цитология. – 1983. Т.25. №5. С.500-506.
- Орлов А.И. Прикладная статистика: Учебник. – М.: Изд-во «Экзамен», 2004. – 656 с.
- Попов В.И., Петухов В.В. Некоторые особенности ультраструктурных изменений в синапсах поля СА-3 гиппокампа при различных функциональных состояниях in vitro // Доклады Академии Наук СССР. 1982. Т.256. №4. С.1005-1009.
- Попов В.И., Медведев Н.И., Рогачевский В.В., Игнатьев Д.А., Stewart M.G., Фесенко Е.Е. Трехмерная организация синапсов и астроглии в гиппокампе крыс и сусликов: Новые структурно-функциональные парадигмы работы синапса // Биофизика. 2003. Т.48, №2. С.289-308.

Зарубежные издания

- Abraham W.C. How long will long-term potentiation last? // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003. V. 358, №. 1432. P. 735-44.
- Adams J.P., Dudek S.M. Late-phase long-term potentiation: getting to the nucleus // Nat Rev Neurosci. 2005. V. 6, №. 9. P. 737-43.
- Bliss T.V., Collingridge G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus // Nature. 1993. V. 361, №. 6407. P. 31-9.
- Bliss T.V., Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path // J Physiol. 1973. V. 232, №. 2. P. 331-56.
- Capani F., Martone M.E., Deerinck T.J., Ellisman M.H. Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study // J Comp Neurol. 2001. V. 435, №. 2. P. 156-70.
- Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // Physiol Rev. 2003. V. 83, №. 4. P. 1153-81.
- Cooney J.R., Hurlburt J.L., Selig D.K., Harris K.M., Fiala J.C. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane // J Neurosci. 2002. V. 22, №. 6. P. 2215-24.
- Derkach V. A., Oh M.C., Guire E.S., Soderling T.R. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity // Nat Rev Neurosci. 2007. V. 8, №. 2. P. 101-13.
- Desmond N.L., Levy W.B. Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus // J Comp Neurol. 1986. V. 253, №. 4. P. 476-82.
- Desmond N.L., Levy W.B. Synaptic correlates of associative potentiation/depression: an ultrastructural study in the hippocampus // Brain Res. 1983. V. 265, №. 1. P. 21-30.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. The glutamate receptor ion channels // Pharmacol Rev. 1999. V. 51, №. 1. P. 7-61.

- Engert F., Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity // *Nature*. 1999. V. 399, №. 6731. P. 66-70.
- Fiala J.C., Feinberg M., Popov V. , Harris K.M. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1 // *J Neurosci*. 1998. V. 18, №. 21. P. 8900-11.
- Fiala J.C., Harris K.M. Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes // *J Am Med Inform Assoc*. 2001(a). V. 8, №. 1. P. 1-16.
- Fiala J.C., Harris K.M. Cylindrical diameters method for calibrating section thickness in serial electron microscopy // *J Microsc*. 2001(6). V. 202, №. Pt 3. P. 468-72.
- Fifkova E., Van Harrevelde A. Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area // *J Neurocytol*. 1977. V. 6, №. 2. P. 211-30.
- Gerges N.Z., Backos D.S., Rupasinghe C.N., Spaller M.R., Esteban J.A. Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane // *Embo J*. 2006. V. 25, №. 8. P. 1623-34.
- Gordon R.Y., Bocharova L.S., Kruman, II, Popov V. I., Kazantsev A.P., Khutzhian S.S., Karnaukhov V. N. Acridine orange as an indicator of the cytoplasmic ribosome state // *Cytometry*. 1997. V. 29, №. 3. P. 215-21.
- Govindarajan A., Kelleher R.J., Tonegawa S. A clustered plasticity model of long-term memory engrams // *Nat Rev Neurosci*. 2006. V. 7, №. 7. P. 575-83.
- Harris K.M., Jensen F.E., Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation // *J Neurosci*. 1992. V. 12, №. 7. P. 2685-705.
- Holtmaat A.J., Trachtenberg J.T., Wilbrecht L., Shepherd G.M., Zhang X., Knott G.W., Svoboda K. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo // *Neuron*. 2005. V. 45, №. 2. P. 279-91.
- Hong S.J., Li H., Becker K.G., Dawson V. L., Dawson T.M. Identification and analysis of plasticity-induced late-response genes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. V. 101, №. 7. P. 2145-50.
- Hsu S.C., Hazuka C.D., Roth R., Foletti D.L., Heuser J., Scheller R.H. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments // *Neuron*. 1998. V. 20, №. 6. P. 1111-22.
- Kasai H., Matsuzaki M., Noguchi J., Yasumatsu N., Nakahara H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines // *Trends Neurosci*. 2003. V. 26, №. 7. P. 360-8.
- Kennedy M.J., Ehlers M.D. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity // *Annu Rev Neurosci*. 2006. V. 29. P. 325-62.
- Kirov S.A., Petrak L.J., Fiala J.C., Harris K.M. Dendritic spines disappear with chilling but proliferate excessively upon rewarming of mature hippocampus // *Neuroscience*. 2004. V. 127, №. 1. P. 69-80.
- Liao D., Hessler N.A., Malinow R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice // *Nature*. 1995. V. 375, №. 6530. P. 400-4.
- Luscher C., Nicoll R.A., Malenka R.C., Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane // *Nat Neurosci*. 2000. V. 3, №. 6. P. 545-50.
- Lynch M.A. Long-term potentiation and memory // *Physiol Rev*. 2004. V. 84, №. 1. P. 87-136.
- Malenka R.C., Nicoll R.A. Long-term potentiation--a decade of progress? // *Science*. 1999. V. 285, №. 5435. P. 1870-4.
- Malinow R., Mainen Z.F., Hayashi Y. LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic // *Curr Opin Neurobiol*. 2000. V. 10, №. 3. P. 352-7.
- Matsuo R., Murayama A., Saitoh Y., Sakaki Y., Inokuchi K. Identification and cataloging

of genes induced by long-lasting long-term potentiation in awake rats // *J Neurochem.* 2000. V. 74, №. 6. P. 2239-49.

- Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G.C., Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines // *Nature.* 2004. V. 429, №. 6993. P. 761-6.
- Morris R.G., Moser E.I., Riedel G., Martin S.J., Sandin J., Day M., O'Carroll C. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003. V. 358, №. 1432. P. 773-86.
- Noguchi J., Matsuzaki M., Ellis-Davies G.C., Kasai H. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites // *Neuron.* 2005. V. 46, №. 4. P. 609-22.
- Novick P., Medkova M., Dong G., Hutagalung A., Reinisch K., Grosshans B. Interactions between Rabs, tethers, SNAREs and their regulators in exocytosis // *Biochem Soc Trans.* 2006. V. 34, №. Pt 5. P. 683-6.
- Nusser Z. AMPA and NMDA receptors: similarities and differences in their synaptic distribution // *Curr Opin Neurobiol.* 2000. V. 10, №. 3. P. 337-41.
- O'Hara B.F., Watson F.L., Srere H.K., Kumar H., Wiler S.W., Welch S.K., Bitting L., Heller H.C., Kilduff T.S. Gene expression in the brain across the hibernation cycle // *J Neurosci.* 1999. V. 19, №. 10. P. 3781-90.
- Ostroff L.E., Fiala J.C., Allwardt B., Harris K.M. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices // *Neuron.* 2002. V. 35, №. 3. P. 535-45.
- Park M., Penick E.C., Edwards J.G., Kauer J.A., Ehlers M.D. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP // *Science.* 2004. V. 305, №. 5692. P. 1972-5.
- Park M., Salgado J.M., Ostroff L., Helton T.D., Robinson C.G., Harris K.M., Ehlers M.D. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes // *Neuron.* 2006. V. 52, №. 5. P. 817-30.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. 1998, Acad. Press.
- Peng J., Kim M.J., Cheng D., Duong D.M., Gygi S.P., Sheng M. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry // *J Biol Chem.* 2004. V. 279, №. 20. P. 21003-11.
- Peters A., Kaiserman-Abramof I.R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines // *Am J Anat.* 1970. V. 127, №. 4. P. 321-55.
- Petukhov V. V., Popov V. I. Quantitative analysis of ultrastructural changes in synapses of the rat hippocampal field CA3 in vitro in different functional states // *Neuroscience.* 1986. V. 18, №. 4. P. 823-35.
- Rumpel S., LeDoux J., Zador A., Malinow R. Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning // *Science.* 2005. V. 308, №. 5718. P. 83-8.
- Segal M. Dendritic spines and long-term plasticity // *Nat Rev Neurosci.* 2005. V. 6, №. 4. P. 277-84.
- Sorra K.E., Harris K.M. Stability in synapse number and size at 2 hr after long-term potentiation in hippocampal area CA1 // *J Neurosci.* 1998. V. 18, №. 2. P. 658-71.
- Steward O., Vinsant S.L. The process of reinnervation in the dentate gyrus of the adult rat: a quantitative electron microscopic analysis of terminal proliferation and reactive synaptogenesis // *J Comp Neurol.* 1983. V. 214. P. 370-386.
- Sun X., Zhao Y., Wolf M.E. Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons // *J Neurosci.* 2005. V. 25, №. 32. P. 7342-51.
- Taxi J. Étude de l'ultrastructure des zones synaptiques dans les ganglions sympathiques de la Grenouille // *Des seances de l'académie des sciences.* 1961. V. 252. №. 1. P. 174-176.

- Trommald M., Hulleberg G., Andersen P. Long-term potentiation is associated with new excitatory spine synapses on rat dentate granule cells // Learn Mem. 1996. V. 3, №. 2-3. P. 218-28.
- Yuste R., Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity // Annu Rev Neurosci. 2001. V. 24. P. 1071-89.

Заказ № 101/05/07 Подписано в печать 11.05.2007 Тираж 100 экз. Усл. п.л.1,25



ООО "Цифровичок", тел. (495) 797-75-76; (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru

