

ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РАН

На правах рукописи

Рогачевский Вадим Валерьевич

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

**ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
03.00.02 – Биофизика**

**Научный руководитель:
д.б.н. Попов В.И.**

ПУЩИНО – 2007

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	1
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	4
1. Гиппокамп в исследованиях когнитивных функций	4
2. Анатомия и функциональные связи гиппокампа	4
2.1. анатомия гиппокампальной формации в целом	4
2.2. ламинарная структура и цитоархитектоника зубчатой фасции	6
2.3. функциональные связи зубчатой фасции	8
3. Долговременная потенция как форма синаптической пластичности	12
3.1. Предпосылки исследований синаптической пластичности	12
3.2. Открытие феномена долговременной потенции	13
3.3. Параметры индукции потенции	14
3.4. Механизмы индукции потенции	14
3.5. Фазы долговременной потенции	16
3.6. Мишени долговременной потенции	17
4. Методы анализа синапсов	18
4.1. Световая микроскопия	18
4.2. Электронная микроскопия	20
4.3. Морфометрический анализ	21
4.3.1. Стереологический анализ на одиночных срезах	21
4.3.2. Объёмная (3D) реконструкция на серийных срезах	23
5. Структура и функции синапса	26
5.1. Классификация дендритных шипиков	28
5.2. Дендритные шипики гранулярных нейронов зубчатой фасции	29
5.3. Классификация, распределение и соотношение типов синапсов	30
5.4. Постсинаптическое уплотнение	31
6. Организация постсинаптического отдела	33
6.1. Молекулярная организация постсинаптического уплотнения	33
6.2. Цитоскелет и транспорт в дендритных шипиках	40
6.3. Эндоплазматический ретикулум	45
6.4. Локальный синтез белка в дендритных сегментах	47

7. Функции дендритных шипиков	50
7.1. Модели пассивной и активной мембраны шипиков	50
7.2. Форма и функции шипиков	52
8. Морфологические изменения синапсов при долговременной потенциации	54
8.1. Изменения количества шипиков и синапсов	56
8.2. Изменения размеров шипиков	57
8.3. Изменения структуры постсинаптических уплотнений	58
8.4. Изменения кривизны синапса	60
 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	63
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
1. Животные и экспериментальные процедуры	63
2. Подготовка ткани для микроскопии	64
3. Световая микроскопия – измерение объемов гиппокампа и зубчатой фасции	64
4. Электронная микроскопия	66
4.1. Подготовка образцов для электронной микроскопии	66
4.2. Получение серийных ультратонких срезов	66
4.3. Получение и подготовка серийных изображений для анализа	67
4.4. Волюметрический анализ плотности и соотношения типов синапсов	68
4.5. Трехмерная реконструкция	69
5. Статистическая обработка	70
 Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	74
1. Параметры долговременной потенциации	74
2. Плотность расположения и соотношение типов синапсов	75
2.1. Морфология дендритных синапсов в среднем молекулярном слое 3Ф	75
2.1.1. Расположение и типы дендритных синапсов среднего молекулярного слоя зубчатой фасции	77
2.1.2. Синапсы на грибовидных шипиках	79
2.1.3. Синапсы на пеньковых шипиках	86
2.1.4. Синапсы на тонких шипиках и разветвленные шипики	90

2.1.5. Разнообразие типов синапсов	90
в среднем молекулярном слое зубчатой фассии	
2.2. Плотность расположения синапсов	91
2.2.1. Коррекция измерения плотности синапсов	92
2.2.2. Плотность расположения синапсов	95
2.3. Соотношения синапсов разных типов в норме и при ДВП	99
3. Анализ морфологии синапсов в контроле и при ДВП на основе 3D реконструкции	104
3.1. Морфометрия дендритных шипиков	104
3.2. Анализ постсинаптических уплотнений	111
3.2.1. Морфометрия постсинаптических уплотнений	111
3.2.2. Анализ корреляций объема ПСУ с толщиной и с площадью ПСУ	115
4. Ультраструктурные признаки обновления синапсов	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	133
ВЫВОДЫ	136
БИБЛИОГРАФИЯ	137

Часто используемые сокращения и аббревиатуры

АГ	аппарат Гольджи
БСС	белок синтезирующая система
ВПСП	возбуждающий постсинаптический потенциал
ГАМК	гамма-аминомасляная кислота
ДВП	долговременная потенция
ЗФ	зубчатая фасция
МВТ	мультивезикулярное тельце
ПД	потенциал действия
ПСУ	постсинаптическое уплотнение
ЦНС	центральная нервная система
ША	шипиковый аппарат
ЭК	энторинальная кора
ЭР	эндоплазматический ретикулум
2PLSM	двухфотонный лазерный сканирующий микроскоп (микроскопия)
3D	трехмерный (объемный)
AMPA	рецептор AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)
CA1-4	зоны/области гиппокампа
CaM	кальмодулин
CAM	молекула клеточной адгезии
CaMKII/IV	кальмодулин зависимая протеинкиназа (типы II, IV)
CREB	cAMP-responsive element binding protein
FRAP	восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания
FRET	резонансный перенос энергии флуоресценции
GFP	белок с зеленой флуоресценцией (mGFP – мембранный)
GKAP	белок ассоциированный с гуанилаткиназным доменом MAGUK
GluR1-4	субъединицы AMPAR
GRIP	белок из семейства MAGUK (GluR interacting protein)
HVEM	высоковольтная электронная микроскопия
IEG	гены раннего ответа
IP3R	рецептор инозитолтрифосфата
KIF	белки из семейства кинезинов
MAGUK	ассоциированные с мембраной гуанилаткиназы
mGluR	метаботропный рецептор глутамата
ML	молекулярный слой ЗФ; iML, mML, oML – внутр., средн., внешний
NCAM	молекула клеточной адгезии нейронов
NMDAR	рецептор NMDA (<i>N</i> -methyl-D-aspartate)
NR	субъединицы NMDAR
PDZ	структурный домен в белках семейства MAGUK

ВВЕДЕНИЕ

Обучение и память – это наиболее очевидные проявления пластичности нервной системы, структурной основой которой являются синапсы, передающие сигналы от нейрона к нейрону. 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. Одна из форм синаптической пластичности, которая позволяет сопоставлять изменения биофизических, биохимических и структурных параметров синапсов с уровнем их электрической активности – это 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. В первые минуты после индукции ДВП пластичность синапсов реализуется главным образом за счет изменения функциональных свойств рецепторов нейромедиаторов (Malenka, Nikoll, 1999). Неоднократно предпринимались 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 внимание уделено изучению синапсов в ранней фазе ДВП. В этот период могут увеличиваться размеры дендритных шипиков, может меняться их форма, шипики могут появляться и исчезать. Может меняться размер и формы такого важного компонента синапса, как постсинаптическое уплотнение. Но даже при использовании одностипных методов

результаты разных исследователей довольно противоречивы (Yuste, Bonhoeffer, 2001). Несогласованность результатов с одной стороны может быть следствием отсутствия устойчивых морфологических изменений в ранней фазе ДВП. При этом достоверных данных об изменениях ультраструктуры синапсов в поздней фазе ДВП также нет, хотя и предполагается, что именно в этот период структурные изменения наиболее вероятны (Luscher et al., 2000).

Несогласованность результатов в значительной степени может быть обусловлена ограниченными возможностями методов. Прижизненные наблюдения позволяют в динамике изучать структуру синапсов, но не выявляют ее деталей. 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*. Противоречивость результатов большинства работ, посвященных поиску ультраструктурных коррелятов ДВП, может быть следствием анализа синапсов на одиночных срезах, тогда как более адекватная оценка структуры синапса возможна при использовании серийных срезов и 3D реконструкции. При этом результаты полученные на серийных срезах с использованием трехмерной (3D) реконструкции синапсов сходны. 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 состояла в следующем: определить происходят ли изменения количества синапсов, соотношения синапсов разных типов и их морфологии в поздней фазе ДВП индуцированной в зубчатой фации гиппокампа крыс *in vivo*.

Исходя из этого, были определены основные задачи исследования:

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

Проведенная работа является первым детальным анализом ультраструктурных изменений постсинаптического отдела синапсов в поздней фазе ДВП и первым детальным анализом структуры различных типов синапсов на дендритах гранулярных нейронов зубчатой фасции в частности. Впервые, на основе 3D реконструкции дендритных шипиков, показано, что в среднем молекулярном слое 3Ф гиппокампа крыс синапсы представлены теми же 4-мя типами, которые ранее были описаны на пирамидных нейронах коры и СА1 области гиппокампа: синапсы на грибовидных шипиках, на тонких шипиках, на пеньковых шипиках и синапсы стволовые – 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 стволовых 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%. Совмещение 3D реконструкции с редактированием реконструированных элементов синапса впервые позволило напрямую оценить такие функционально значимые характеристики синапса как площадь контакта шипика с пресинаптическим бутоном и площадь активной зоны синапса. Вследствие этого, 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.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гиппокамп в исследованиях когнитивных функций

Обучение и память – это наиболее очевидные проявления пластичности нервной системы. История медицинской практики ренессанса (Gross, 1999) и нейробиологических исследований прошлого века привела к открытию специфической роли гиппокампа в различных формах обучения и памяти (Morris et al., 1982; Wallenstein et al., 1998; Eichenbaum, 2000; Vinogradova, 2001; Frankland, Bontempi, 2005). Усилия большого числа физиологов первой половины прошлого века были сосредоточены на поиске областей мозга вовлеченных в когнитивные процессы. Эксперименты проводились с применением довольно грубой техники удаления значительных объемов мозговых структур и тестированием животных в поведенческих экспериментах (Lashley, 1950). Прорыв наметился в начале 50-х, когда нейрохирург William Scoville прооперировал 10 пациентов страдающих тяжелыми формами эпилепсии, а впоследствии Scoville и Milner сообщили о потере памяти у человека после удаления гиппокампа (Scoville, Milner, 1957). У таких пациентов кратковременная память – способность извлекать или осознавать определенные факты только что привнесенные в сознание – остаётся интактной, не нарушаются также отдалённые детские воспоминания, и общие базовые знания, полученные в жизни ранее (Squire et al., 1993; Corkin, 2002; Squire et al., 2004). На основании этого было предположено, что гиппокамп играет важную роль в первичном формировании и закреплении памяти (Eichenbaum, 2000; Levy et al., 2004; Squire et al., 2004).

2. Анатомия и функциональные связи гиппокампа

2.1. Анатомия гиппокампальной формации в целом

Внутренние области височных долей коры больших полушарий головного мозга, именуемые *гиппокампальной формацией*, привлекали внимание нейроанатомов с самого начала описательных подходов к изучению нервной системы (Bennet, 1999). Общая площадь этой филогенетически более древней области коры или *археокортекса* крысы незначительно уступает площади новой коры (1,2 и 1,5 см² соответственно) (Amaral, Witter, 1995), и поэтому анатомически представляет собой наиболее легко идентифицируемую часть лимбической системы. На рис.1А показано расположение гиппокампа в мозге крысы. Ramon-y-Cajal (1911) разделял гиппокамп на два отдела: *fascia dentata* или зубчатую фасцию (ЗФ) (Рис. 1Б, В) и Аммонов рог (*cornu Ammonis*), а Аммонов рог (собственно гиппокамп) подразделял на верхнюю область (*regio superior*) с более мелкими пирамидными нейронами и нижнюю (*regio inferior*) область с более крупными

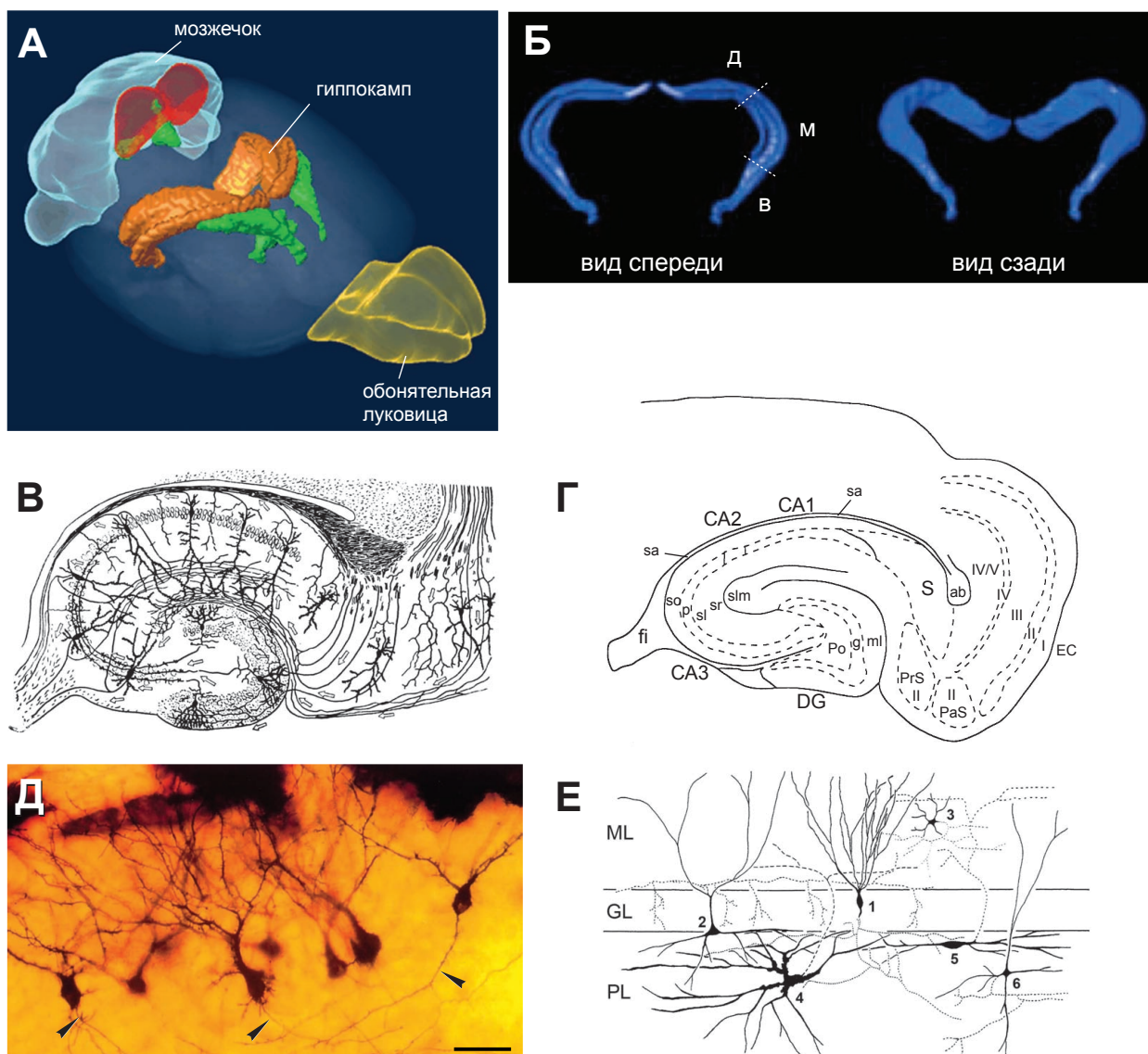


Рис. 1. Анатомия гиппокампальной формации и цитоархитектоника зубчатой фасции.

А. На 3D реконструкции мозга крысы полученной Bock et al. (2006) при магнитно-резонансном *in vivo* исследовании показано расположение CA2-CA3 областей гиппокампа. Заднюю (каудальную) кромку CA3 области охватывает зубчатая фасция (рис. Б).

Б. 3D реконструкция ЗФ выполнена на серийных срезах толщиной 50 мкм (Lein et al., 2005); ЗФ подразделяют на области: дорзальную (д), медиальную (м) и вентральную (в).

В. Схема гиппокампа и ЗФ с расположением клеток и связей выполненная Рамон-и-Кахалом (Ramon y Cajal, 1911).

Г. Схема отделов гиппокампальной формации в целом (по Amaral, Witter, 1995). Области собственно гиппокампа (CA1-CA3); зубчатая фасция (DG); субикулум (S); энторинальная кора (EC); угловой пучок (ab - angular bundle); пресубикулум (PrS); парасубикулум (PaS); слой полиморфных клеток ЗФ или хилус (Po); слой гранулярных клеток ЗФ (g); молекулярный слой ЗФ (ml); слои нейронов энторинальной коры (I, II, III, IV, IV/V). Слои собственно гиппокампа: stratum alveus (sa); str. oriens (so); str. pyramidale (p); str. lucidum (sl); str. radiatum (sr); str. lacunosum-moleculare.

Д. Окрашенные по методике Golgi гранулярные нейроны зубчатой фасции с базальными аксонами (отмечены стрелками) мшистых волокон (из Drakew et al., 1999); шкала 20 мкм.

Е. См. след. стр. →

пирамидными нейронами. Эта терминология в основном была замещена терминологией предложенной Lorente de No (1934), в которой гиппокампальная формация делилась на зубчатую фасцию и три подполя (CA1 – *regio superior*, CA2 и CA3 – *regio inferior*). В настоящее время термин *гиппокампальная формация* обычно используется для описания шести различных по цитоархитектонике областей. Эти области включают ЗФ и собственно гиппокамп (Рис. 1Г; Amaral, Witter, 1995). Не смотря на то, что термин *cornu Ammonis* (CA) встречается реже термина *hippocampus* (введенного Дж. Арантиусом в 1587 г. на основании сходства формы данной структуры с морским коньком) гиппокамп подразделяют на поля CA1 – CA3 (Хамильтон, 1984). Как исходная, так современная номенклатура отделов гиппокампальной формации используются и сегодня; при описании гиппокампа литературе встречаются термины, *cornu Ammonis*, *regio superior* и *regio inferior*, и CA4 для хилуса. К гиппокампальной формации часто относят и субикулярный комплекс, включающий пре- и парасубикулум, и энторинальную кору, которая в свою очередь подразделяется на две или большее количество областей. Границы отдельных областей гиппокампальной формации однозначно до сих пор не определены (Amaral, Witter, 1995; Lein et al., 2005).

2.2. Ламинарная структура и цитоархитектоника зубчатой фасции

Golgi дал первое детализированное описание ЗФ (Bennet, 1999). В отличие от коры больших полушарий мозга, ЗФ и CA1-CA3 области гиппокампа являются филогенетически более древними структурами и имеют только один слой нейронов. На коронарных срезах мозга, равноудалённых в стереотаксических координатах от *bregma* и *lambda* (Paxinos, Watson, 1998; см. также <http://braininfo.rprc.washington.edu>), ЗФ можно представить в виде зубца охватывающего CA3 область гиппокампа (Рис. 1Б, Г). Одна сторона этого зубца является скрытым внутренним (*suprpyramidal*, *upper*, *dorsal*, *inner*, *inferior*, *internal* или *buried blade*) листом, а вторая – наружным (*infrapyramidal*, *external* или *exposed blade*) листом (O'Keefe, Nadel, 1978, p.107; Scharfman et al., 2002). На рисунках 1Г, 1Е и 2Б показана ламинарная структура ЗФ. ЗФ состоит из трёх слоёв: 1) из молекулярного (ML), который в свою очередь подразделяется на внутренний (*inner* –

Е. Основные типы клеток ЗФ: гранулярные нейроны (1); пирамидные корзинчатые клетки (2); звездчатые клетки (3); мшистые клетки (4); веретеновидные клетки (5); клеточные типы расположенные глубоко в полиморфном слое образующие локальные аксо-аксонные связи (6). Слои ЗФ: молекулярный (ML), гранулярный (GL) и слой полиморфных клеток (PL) (по Amaral, Witter, 1995).

iML), средний (medial – mML) и внешний (outer – oML) слои, 2) из слоя гранулярных нейронов (гранулярный слой) и 3) слоя полиморфных клеток – хилуса – внутренней области между внутренним и наружным листами ЗФ. При описании ЗФ также используют термины суб- и супрагранулярный слой непосредственно под и над гранулярным слоем.

Основная клеточная масса ЗФ крысы сосредоточена в дорзальном и медиальном отделах гиппокампальной формации (Рис.1Б; Lein et al., 2005) и составляет по разным данным от 0,5 до 2,4 миллионов нейронов (Boss et al., 1985; West et al., 1988; Miki et al., 2005). На рисунках 1Д и 1Е схематически представлены принципиальные или основные типы клеток в ЗФ. Наиболее заметными клетками ЗФ являются клетки зёрна или гранулярные клетки с диаметром сомы ~7 мкм образующие гранулярный слой. На поперечных срезах ЗФ (вставка на Рис. 2А) можно видеть, что этот слой состоит из 4-6 рядов клеток. Дендритное дерево гранулярных клеток располагается в молекулярном слое, образуя униполярный конус апикальных дендритов (Рис. 1Д, Е) несколько сжатый в септо-темпоральной оси с диаметрами поперечного сечения в апикальной области около 300 и 180 мкм. Эти дендриты усеяны шипиками, тонкими выростами мембраны дендритов, на которых образуется большинство аксодендритных синапсов. Гранулярные клетки дают начало 1-4 апикальным дендритам, простирающимся на расстояние до 300 мкм, до верхней границы ЗФ. 2/3 ветвлений дендритов приходится на гранулярный слой и iML. При этом 30% длины дендритов располагается в mML и 40% в oML (Claiborne et al., 1990). Следует также отметить, что коническую организацию дендритного дерева можно наблюдать в обонятельной луковице у клеток зерен и у первичных дендритов митральных клеток, а так же у серповидных клеток пириформной коры (Price 1973; Schikorski, Stevens, 1999; Fiala, Harris, 1999). ЗФ и слой гранулярных клеток закладываются в эмбриогенезе значительно позднее СА областей (Stensaas, 1967a-e; 1968; см. также Skutella, Nitsch, 2001) и непрерывно обновляются в течение всей жизни организма, в том числе и у человека (Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1999). Униполярная, в филогенетическом плане наиболее простая, организация дендритного дерева гранулярных нейронов также свойственна нейронам коры больших полушарий земноводных и рептилий и ганглиям беспозвоночных: червей, моллюсков, ракообразных и насекомых (Ramon-y-Cajal, 1911, p.84). Базальные немиелинизированные аксоны гранулярных клеток (Рис. 1Д, Е), образуя параллельные пучки мшистых волокон, покидают гранулярный слой, входят в хилус и далее в СА3 (Claiborne et al., 1986; Henze et al., 2000).

Хилус или слой полиморфных клеток ЗФ располагается под слоем гранулярных клеток и граничит с СА3/4 областью гиппокампа. В ЗФ и хилусе присутствует также большое количество интернейронов с морфо-функционально различными

характеристиками (Рис. 1.Е; Freund, Buzsaki, 1996; Lubke et al., 1998). Наиболее заметные клетки хилуса – это два типа нейронов, корзинчатые и мшистые. Пирамидные корзинчатые клетки представляют собой одну из форм ГАМК-эргических интернейронов. Их аксон начинается на апикальном дендрите и даёт множественные ветвления, которые оканчиваются корзинчатыми сплетениями вокруг тел гранулярных клеток (Amaral, Witter, 1995). Мшистые клетки представляют собой крупные модифицированные пирамидные нейроны, с диаметром сомы 25-35 мкм; они не образуют более или менее организованного слоя, мультиполярно ориентируют свои дендриты и сильно варьируют по форме (Ribak et al., 1985; Amaral, 1987). Маленькие звёздчатые клетки, расположенные в ML, дают начало аксонам, которые также участвуют в образовании корзинчатых сплетений в гранулярном слое. Другие клетки образующие аксо-аксонные связи дают начало аксонам, которые оканчиваются на начальном аксонном сегменте гранулярных клеток (Amaral, Witter, 1995; Turner et al., 1998).

2.3. Функциональные связи зубчатой фации

На рис. 2 показаны функциональные связи ЗФ с другими отделами гиппокампальной формации. Гиппокампальная формация имеет прямые входы только от двух источников: 1) через бахромку от медиального септума и диагонального пучка Брока, и 2) от энторинальной коры (ЭК) (Хамильтон, 1984). Основным афферентным источником гиппокампа и ЗФ в частности являются глутаматэргические входы от нейронов III и главным образом II слоя ипсилатеральной ЭК (Steward, Scoville, 1976; Witter, Groenewegen, 1984; Witter et al., 1989; Germroth et al., 1989). Другой, менее мощный источник афферентной иннервации представлен перекрестными проекциями от ЭК к дорзальным отделам гиппокампа (Steward, 1976). Оба пути входят в гиппокамп в составе углового пучка (*angular bundle*) и, пронизывая субикулум, проникают в гиппокамп перпендикулярно его продольной оси. Часть аксонов следует в *str. moleculare* и *str. lacunosum* CA1-CA3 областей гиппокампа и образует *en passant* синапсы как на терминалах апикальных дендритов пирамидных нейронов (Lorente de No 1934; Habets et al., 1980; Steward, 1976), так и на интернейронах (Kunkel et al., 1988). Однако большая часть аксонов формирующих перфорантный путь (Van Hoesen, Pandya, 1975; Steward, Scoville, 1976) микропучками перпендикулярно оси гиппокампа пронизывает фиссуру и входит в молекулярный слой ЗФ, образуя *en passant* синапсы на дендритах гранулярных клеток (Отмахов, 1993). Топографически перфорантный путь организован таким образом, что из латеральной ЭК аксоны направляются во внешнюю треть молекулярного слоя, тогда как аксоны из медиальной области ЭК образуют синапсы в средней трети

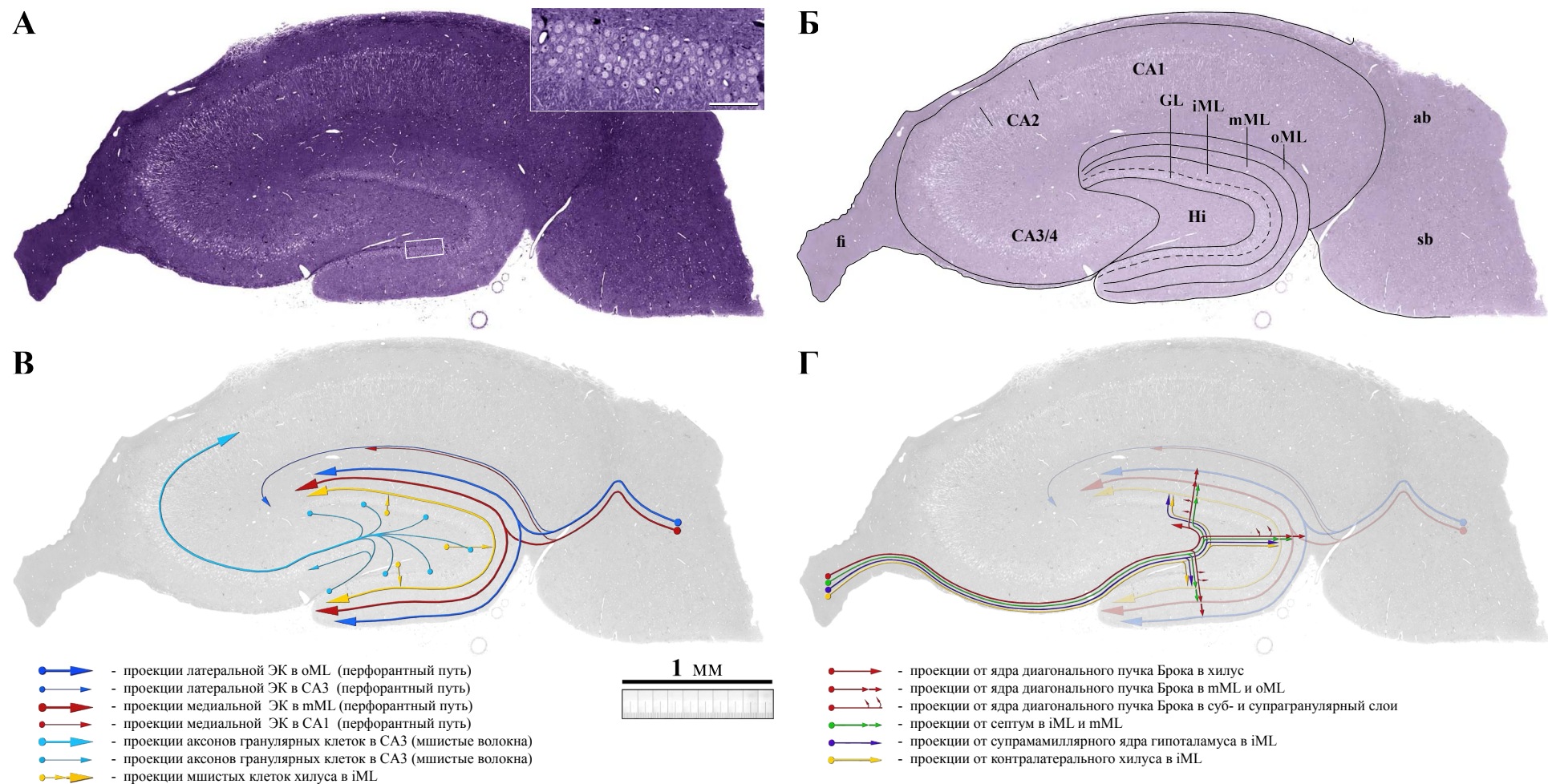


Рис. 2. Ламинарная организация зубчатой фассии и ее функциональные связи с другими отделами мозга.

А. Поперечный срез гиппокампальной формации крысы (окраска толуидиновым синим). Область, выделенная прямоугольником, увеличена на вставке. **Б.** Ламинарная организация зубчатой фассии; **В.** и **Г.** Ассоциативные и комиссуральные связи дорзального отдела зубчатой фассии. Шкала = 1 мм. Шкала на вставке 50 мкм. fi - фимбрия; CA1-4 - поля гиппокампа; Hi - хилус; GL - гранулярный слой; iML, mML и oML - соответственно внутренний, средний и наружный молекулярные слои зубчатой фассии; ab - угловой пучек; sb - субикулум.

молекулярного слоя (Hjorth-Simonsen, Jeune, 1972; Hjorth-Simonsen, 1972; Wyss, 1981). Эти проекции у крысы не богаты билатеральными компонентами, которые составляют не более 10% от ипсилатеральных проекций (Goldowitz et al., 1975; Steward, Scoville, 1976). Проекции ЭК занимают более 85% всех синапсов на гранулярных клетках ЗФ (Отмахов, 1993) и 90% всех синапсов во внешних 2/3 молекулярного слоя ЗФ (Steward, 1976; Steward, Vinsant, 1983). Стоит отметить, однако, что эти контакты образуются как на дендритах гранулярных клеток, так и на дендритах интернейронов (Deller et al., 1996). Гранулярные клетки ЗФ так же получают входы от контралатерального (комиссуральные) и ипсилатерального (ассоциативные) хилуса. Эти комиссуральные и ассоциативные волокна оканчиваются во внутренней трети молекулярного слоя и не перекрываются с энторинальными афферентами в средней и наружной трети молекулярного слоя (Gottlieb, Cowan, 1973; Deller et al., 1995; Deller, 1998; Jackson, Scharfman, 1996). Этот слой, внутренняя треть, получает достаточно большое количество входов от супрамамиллярного ядра гипоталамуса (Wyss et al., 1979).

Другой источник внешней иннервации ЗФ идет от септума, с диффузной иннервацией внутренних 2/3 молекулярного слоя. Ядро диагонального пучка Брока посылает аксоны (содержащие ACh или ГАМК) в ЗФ с относительно плотными терминалями в области наружных 2/3 молекулярного слоя и в хилус, с меньшей плотностью терминалей в суб- и супрагранулярных областях (Kohler et al., 1984; Freund, Antal, 1988; Dutar et al., 1995). За исключением маленьких перекрестных проекций септальные проекции в основном ипсилатеральные (Segal, Landis, 1974; Peterson, 1989). Другие источники иннервации исходят из ядер ствола мозга (ядер шва и голубых пятен моста) и локально расположенных интернейронов (Segal, Landis, 1974; Azmitia, Segal, 1978; Freund, Buzsaki, 1996; Deller, 1998).

Для гиппокампа энторинальная кора является основным источником разнообразной сенсорной информации получаемой организмом, в свою очередь эта информация попадает в гиппокамп главным образом через зубчатую фасцию. Четко организованная ламинарная структура ЗФ обеспечивает высокую специфичность входов из энторинальной коры. Описанная структура дорзального отдела зубчатой фасции и его функциональные связи, позволяет считать эту область мозга одним из наиболее удобных объектов для исследования пластичности центральной нервной системы (ЦНС) и синаптической пластичности в частности. Стоит также отметить, что представленная здесь в общих чертах организация связей гиппокампа и ЗФ ограничена объектом

исследования настоящей работы и характерна для дорзальной области гиппокампальной формации крысы. Организация связей других областей ЗФ в септо-темпоральной оси может несколько отличаться от вышепредставленной. Так, например, показано, что во всех отделах молекулярного слоя и на корзинчатых клетках хилуса вентральной области ЗФ обнаружены проекции нейронов IV-V слоев ЭК (Deller et al., 1996). Кроме того, структурно-функциональные отличия наблюдаются и между внешним и внутренним листами ЗФ (Scharfman et al., 2002; Lein et al., 2005). Существуют и значительные функциональные отличия дорзальных и вентральных отделов гиппокампальной формации (Bannerman et al., 1999; 2002). Кроме функциональных особенностей такой филогенетически консервативной области мозга существуют и межвидовые различия во внутренней организации полей гиппокампальной формации (van Groen, Wyss, 1988). Подобным образом физиология и организация лимбической системы различны у разных видов животных, например, тогда как основные нейротрансмиттеры сходны (глутамат и ГАМК), совершенно явные межвидовые различия проявляются по многим нейропептидам и кальций связывающим белкам (Lopes da Silva et al., 1990). Кроме того, существуют явные различия между линиями животных, связанные с нейрогенезом в ЗФ, которые проявляются в экспериментах по исследованию формирования памяти способности к обучению (Lipp et al., 1987; Kempermann et al., 1997; Kempermann, Gage, 2002).

3. Долговременная потенция как форма синаптической пластичности

3.1. Предпосылки исследований синаптической пластичности

Одной из главных задач нейробиологии является поиск структурных основ обучения и памяти, как наиболее очевидных проявлений изменчивости и пластичности нервной системы (Шмидт, Тевс, 1996; Segal, 2005). История поиска этих основ включает пионерские работы конца позапрошлого века С. Рамон-и-Кахала, Е. Танзи, Э. Люгаро, предполагавших, что структурные изменения в мозге могут лежать в основе обучения и памяти (Peccarisi et al., 1994; Berlucchi, 2002). Теория Д. Хебба, ученика К. Лэшли, явилась отголоском этих идей (Brown, Milner, 2003). Хебб предполагал, что одновременная пре- и постсинаптическая активность приводит к изменению эффективности синаптической передачи. Более точно он утверждал, что: «Если аксон клетки А достаточно близок к клетке В, чтобы ее возбудить, и повторно или постоянно вызывает ее возбуждение, то в одной или в обеих клетках происходят такие ростовые или метаболические изменения, что эффективность клетки А, как одной из клеток вызывающих возбуждение клетки В, возрастает» (Hebb, 1949, p.62). Хебб также конкретизировал область и форму таких изменений: «Я склонен считать, что разрастание синаптических узлов с нейробиотаксисом или без него является основой для облегчения [передачи сигнала] от одной клетки к другой...» (там же, p.65). Став популярной, гипотеза Хебба определила центральный постулат различных моделей ассоциативной памяти и когнитивных процессов (Levy, Desmond, 1985), а впоследствии синапсы, удовлетворяющие условиям постулата, то есть способные модифицироваться, стали именоваться «синапсами Хебба» (Rauschecker, Singer, 1981; Levy, Steward, 1983; Brown, Milner, 2003). Уже в предисловии к книге «Организация поведения: Нейропсихологическая теория» определяется перемена взглядов на структурные основы памяти от специфических областей мозга к небольшим нейрональным ансамблям: «Любая часто повторяющаяся стимуляция будет приводить к медленному развитию «клеточных ансамблей», неких диффузных образований представляющих собой группы клеток коры или промежуточного мозга ...» «... способных работать как закрытые системы, которые обеспечивают облегчение других таких систем ...» и «Действия каждого ансамбля может быть вызвано действием предыдущего ...» (Hebb, 1949). Одним из подтверждений этих идей послужило открытие феномена длительной потенциации; как оказалось, определенные свойства синапсов в системе связей ЭК→ЗФ удовлетворяют правилу Хебба (McNaughton, et al., 1978; Levy, Steward, 1979; Kelso et al., 1986; Sejnowski, Tesauero, 1989; McNaughton, 2003).

3.2. Открытие феномена долговременной потенциации

Первопроходцами в исследованиях потенциации можно назвать Ллойда (Lloyd, 1949) и Экклса и МакИнтайа (Eccles, McIntyre, 1953). Но одним из наиболее важных достижений в ранних исследованиях функциональных связей явилась разработка техники приготовления и поддержания жизнеспособности срезов мозга *in vitro*. В развитие этих методов вложили вклад многие группы ученых в 50-х начале 60-х прошлого века, без какого либо положительного успеха вплоть до середины 60-х, когда исследователи обратились к наиболее структурно простой области коры – к гиппокампу (Yamamoto, McIlwain, 1966; Collingridge, 1995). В это же время внимание норвежской группы под руководством Per Andersen было сосредоточено на изучении функциональных связей гиппокампа, и в частности на «частотной потенциации» перфорантного пути (Lømo, 2003). Было обнаружено, что непрерывно подаваемые тестовые стимулы активируют как меньшее число синапсов, так и большее в зависимости от интервала между стимулами (Andersen et al., 1966, p.457; Lømo, 1966; 1971). Было предположено, что наблюдаемый процесс может служить методом контроля нейрональной активности (Lømo, 1966). Изучение последствий кратковременной высокочастотной стимуляции перфорантного пути показало, что повышенная эффективность передачи сигнала в ответ на тестовый стимул может длиться часы и дни (Bliss, Lømo, 1973; Bliss, Garner-Medwin, 1973). Этот феномен вошел в терминологию как «продолжительная потенциация» (long-lasting potentiation) или как «длительная потенциация» (long-term potentiation, LTP или ДВП). Сейчас это явление в системе связей ЭК→ЗФ известно как гомосинаптическая ДВП (Николлс с соавт., 2003). Почти в это же время в отечественной науке ДВП была обнаружена в системе связей между мшистыми волокнами гранулярных клеток ЗФ и проксимальными дендритами пирамидных нейронов СА3 области гиппокампа; «хроническая потенциация» сохранялась в течение недели и более (Брагин, Виноградова, 1973). Позднее ДВП была показана в различных областях ЦНС, включая все отделы лимбической системы, базальные ядра, кору больших полушарий, мозжечок (мшистые волокна → клетки зерна), спинной мозг (для обз.: Lynch 2004) и даже ПНС (напр.: Baxter et al., 1985). Много работ посвященных ДВП было сделано на морской улитке *Aplysia*, но большая их часть – на ассоциативных связях гиппокампа (Malenka, Nicoll, 1999), образующих так называемую «трисинаптическую петлю» (ЭК→ЗФ→СА3→СА1→ЭК). Интерес к ДВП продолжает возрастать, например, поисковый запрос в PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) по ключевым словам «long-term potentiation» за последний год показывает, что в неделю выходит в печать около 10 работ связанных с ДВП.

3.3. Параметры индукции потенциации

Существуют различные протоколы индукции ДВП, но наиболее часто используется возбуждение входящих путей несколькими сериями высокочастотных электрических (100-400 Гц) стимулов. Длительность стимулов варьирует в диапазоне 150-250 мс; более короткие разряды более высокой частоты не вызывают патологической судорожной активности. Количество высокочастотных разрядов и интервалы между ними в различных экспериментах сильно варьируют. В ранних работах предполагалось, что более стойкая ДВП, продолжительностью до месяцев, может быть вызвана более мощной стимуляцией (Bliss, Garner-Medwin, 1973; Douglas, 1977). Впоследствии было показано, что более мощная и более стойкая ДВП возникает в том случае, если протокол индукции организован с учетом характеристик ЭЭГ гиппокампа при исследовательском поведении животного, при котором доминируют частоты порядка 4-7 Гц (O'Keefe, Nadel, 1978; Rose et al., 1983; Larson, Lynch, 1986; Larson et al., 1986; Staubli, Lynch, 1987). Несмотря на то что существуют отличия в методах стимуляции (использование мульти- или монополярных электродов, моно- или двухфазные стимулы), явных различий между вызванными эффектами стимуляции показано не было.

Еще в первых работах при использовании различных подходов в индукции ДВП было показано, что ДВП обладает рядом «классических» свойств (Bi, Poo, 2001). Условно ДВП разделяют на *ассоциативную* и *неассоциативную*. *Ассоциативность* ДВП проявляется при стимуляции нескольких входов к одному нейрону и представляет собой молекулярно-клеточный аналог ассоциативного обучения. Если два или большее число синапсов участвуют в активации (или повторной активации) нейрона, то ДВП проявляется в этих «связанных» синапсах безотносительно вклада каждого из них в индукцию ДВП (Barrionuevo, Brown, 1983) – *кооперативность* ДВП. И наоборот, ДВП и связанные с ней процессы не проявляются в синапсах, которые не участвуют в индукции ДВП – *входспецифичность* ДВП. Накоплено уже большое количество данных о молекулярных механизмах лежащих в основе ассоциативной ДВП. *Неассоциативная* ДВП возникает вследствие повторной стимуляции одного и того же входа. Считается, что пусковые механизмы ассоциативной и неассоциативной ДВП сходны.

3.4. Механизмы индукции потенциации

Одно из классических свойств ДВП – это ее *быстрый запуск*. Наиболее изученным механизмом запуска ДВП является NMDAR-зависимый. NMDAR-зависимая ДВП показана в гиппокампе, в частности на коллатеральных Шаффера, на терминалах

перфорантного пути в ЗФ, а также в других отделах мозга включая миндалину, новую кору и таламокортикальные проекции (Collingridge et al., 1983; Artola, Singer, 1987; Colino, Malenka, 1993; Castro-Alamancos et al., 1995; Liao et al., 1995; Rogan et al., 1997; Heynen, Bear, 2001; Sun et al., 2005). Стимуляция пресинаптических входов гиппокампа при обычной интенсивности синаптической передачи вызывает высвобождение нейротрансмиттеров, в частности глутамата, из терминали в синаптическую щель. Трансмиттер связывается в первую очередь с AMPA рецепторами/каналами (AMPA) постсинаптической мембраны. Отдельного стимула не достаточно для запуска ДВП. Стимуляция с достаточно высокой частотой приводит к постепенной деполяризации клетки-мишени вследствие суммации возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП). В постсинаптической мембране также находятся потенциалзависимые глутаматные NMDA рецепторы/каналы (NMDAR). В синапсах, проявляющих NMDAR-зависимую ДВП, прогрессирующая деполяризация при достижении порога удаляет ионы Mg^{2+} из устья NMDAR (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984), снимая блок проводимости для ионов Ca^{2+} и Na^{+} . Таким образом, NMDAR выступает в роли триггера, а в определенных формах ДВП и в роли детектора совпадения сигналов. Достаточный уровень ВПСП и связывание глутамата открывает ионный канал NMDAR. Входящий через канал Ca^{2+} быстро поднимает его внутриклеточную концентрацию ($[Ca^{2+}]_i$) и связывается с белком кальмодулином (CaM), который в свою очередь активирует кальмодулин зависимую протеинкиназу II (CaMKII). Активация CaMKII, по-видимому, является финальным звеном в запуске ДВП. Активная CaMKII 1) фосфорилирует потенциалзависимые калиевые каналы, повышая их чувствительность, 2) фосфорилирует AMPAR синаптической мембраны, повышая их проводимость, 3) фосфорилирует внутриклеточные AMPAR и активирует каскад активируемой митогеном протеинкиназы MAPK, облегчая встраивание и/или кластеризацию дополнительных AMPAR в постсинаптической мембране, и перераспределение NMDAR (для обз.: Malenka, Nicoll, 1999; Kennedy, 2000; Dineley et al., 2001; Malinow, Malenka, 2002; Esteban, 2003; Luthi, et al., 2004; Thomas, Huganir, 2004; Xia, Storm, 2005). Существуют доказательства ключевой роли и других киназ в генерации ДВП. К этим ферментам относятся, например, PKC, цАМФ-зависимая PKA, Src тирозинкиназы, и др. (Tanaka, Nishizuka, 1994; Brandon et al., 1997; Nestler, 2001; Salter, Kalia, 2004; Wong, Scott, 2004; Kennedy et al., 2005). Буквально в последние несколько лет значительно возрос интерес к семейству маленьких Rab ГТФаз, которые участвуют в сортировке мембранных белков (включая рецепторы и каналы) и регулируют их доставку и встраивание в постсинаптическую мембрану (Brown

et al., 2005; Gerges et al., 2005, 2006; Kennedy, Ehlers, 2006). Синапсы, не проявляющие зависимой от NMDA рецепторов ДВП, по-видимому, всегда содержат значительное количество AMPA рецепторов (Nusser et al., 1998; Takumi et al., 1999). В некоторых NMDAR-независимых формах ДВП в роли триггера выступают не NMDA рецепторы, а потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа; такая форма NMDAR-независимой ДВП была показана, например, в миндалине и СА3 гиппокампа (Weisskopf et al., 1999; Kapur et al., 1998). В гигантских синапсах СА3 области гиппокампа была так же показана NMDAR-, Ca^{2+} -независимая ДВП (Mellor, Nicoll, 2001).

3.5. Фазы долговременной потенциации

По временным параметрам ДВП разделяют на две фазы: 1) раннюю, продолжительностью 1-3 часа, и 2) позднюю, которая длится более 4 часов, дни и месяцы. Ранняя фаза ДВП обычно запускается высокочастотным тетанусом (например: 100 Гц, 1 с), тогда как поздняя фаза – тремя-четырьмя тетаническими разрядами (Bliss, Lomo, 1973; Frey, Morris, 1997; для обз. Frey, Morris, 1998; Josselyn et al., 2002; Abraham, 2003). Длительность ДВП критически зависит от экспрессии генов и синтеза белка *de novo*, тогда как одиночный тетанус запускающий раннюю фазу ДВП не вызывает экспрессии генов. 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). Синтез *de novo* мРНК и белков находится под управлением киназ, которые в свою очередь активируют факторы регуляции транскрипции генов. Считается, что первичным транскрипционным фактором в каскаде генной экспрессии приводящей к долговременным структурно-функциональным изменениям эффективности синапсов является CREB (см. раздел 6.4.). CREB-зависимая активация генной экспрессии наблюдается как при прямой стимуляции нейронов, так и в экспериментах связанных с обучением (Guzowski et al., 2001; Kang et al., 2001; Bozon et al., 2003). В активной форме CREB запускает транскрипцию множества генов, в первую очередь «генов раннего ответа» (IEG), таких как *Arc*, *c-fos*, *c-jun*, *zif268* и др. (Matsuo et al., 2000; Hong et al., 2004). Считается, что активация CREB1 необходима и достаточна для поддержания поздней фазы ДВП, а продукты CREB-зависимой транскрипции, модификации мРНК, белкового синтеза и созревания образуют новый строительный материал для усиления синаптических связей (Lonze, Ginty, 2002; Bozon et al., 2003).

3.6. Мишени долговременной потенциации

Одиночный тетанус вызывает затухающую раннюю фазу ДВП, но Dudek и Fields совместно с тетанизацией коллатералей Шаффера использовали дополнительную θ -стимуляцию (Larson et al., 1986) аксонов пирамидных клеток CA1 в *str. alveus* (Рис. 1Г) и показали, что антидромного потенциала действия (ПД), достигающего сомы нейрона, достаточно для активации MAPK и CREB каскадов запускающих транскрипцию IEG и для предотвращения затухания вызванной ранней фазы ДВП в *str. radiatum*, соответственно, и для поддержания поздней фазы ДВП (Dudek, Fields, 2002). Считается, что, в отличие от повторной тетанической стимуляции запускающей позднюю фазу ДВП, деполяризация дендрита, которая возникает при однократной активации синапсов, по направлению к соме затухает или достаточно слаба, чтобы вызвать ПД в области сомы (Golding, Spruston, 1998). Интересно, что в экспериментах Dudek и Fields блокада NMDAR-зависимых токов не влияла на активацию генной экспрессии, поэтому авторы считают, что в отличие от ретроградного ПД, сигнал *синапс*→*ядро*, запускаемый локальным повышением $[Ca^{2+}]_i$ в дендритных сегментах, не является ключевым в индукции поздней фазы ДВП. В таком случае ключевым звеном в индукции поздней фазы ДВП является не синтез белка в целом, а индукция транскрипции генов (Adams, Dudek, 2005). Существует определенная конкуренция за связывание маркеров (новосинтезированных молекул РНК или белков) в наиболее активных синапсах (Frey, Morris, 1997; Fonseca et al., 2004; Turrigiano, 2004). Поэтому, по мнению Adams и Dudek далеко не все потенцированные синапсы будут с одинаковой вероятностью захватывать маркеры (*de novo* синтезированные мРНК и белки), а способность захвата маркеров синапсами-мишенями скорее связана с количеством или частотой ПД генерируемых отдельными синапсами, чем с числом потенцированных синапсов (Adams, Dudek, 2005). Теоретически потенцированные синапсы в одном сегменте дендрита на которые будет приходить сигнал чаще или сильнее станут «сильнее», тогда как синапсам активированным однократно или активируемым реже придется вернуться к исходному или даже более низкому уровню активности, способности к постсинаптическому ответу.

4. Методы анализа синапсов

4.1. Световая микроскопия

Реакция серебрения, обнаруженная Камилло Гольджи в 1873 г (Mazzarello, 1999), долгое время была основным методом исследования дендритных шипиков. В процессе серебрения прокрашивается не более 10% всей популяции нейронов, что позволяет видеть организацию отдельных нейронов и проследить их отростки. В настоящее время, для анализа дендритных шипиков по-прежнему используется серебрение или хромирование нейронов по методу Гольджи, включая его модификации (напр.: Bock et al., 2004; Knafo et al., 2004; Hayashi et al., 2004; Johnson et al., 2004; Dhanrajan et al., 2004). С использованием этого метода было показано, что у естественных гибернаторов количество шипиков на дендритах нейронов гиппокампа значительно снижено в состоянии оцепенения (Штарк, 1970, с.155). Такой факт предполагает наличие довольно быстрых динамических изменений дендритных шипиков. Позднее были получены данные по обратимой ретракции дендритных шипиков в процессе зимней спячки (Popov et al., 1992a; Popov et al., 1992b). Также с использованием окраски по Гольджи были показаны циклические флуктуации плотности шипиков в эстральном цикле у крыс (напр.: Woolley et al., 1990; 1997).

Новые подходы облегчили функциональную идентификацию нейронов и синаптических связей. Благодаря развитию микроэлектродной техники через микропипетку можно инъецировать молекулы, полностью окрашивающие нейрон. Одним из таких подходов является внутриклеточная инъекция таких маркеров как пероксидаза хрена или биоцитин; после фиксации они образуют оптически плотный материал. Дополнительным подходом является иммуноцитохимические методы, например, гибридизация *in situ* (специфически меченые зонды маркируют мРНК нейрона, которая кодирует синтез канала, рецептора, передатчика или структурного элемента) или избирательное маркирование внутриклеточных или мембранных компонентов специфическими антителами (Vercelli et al., 2000). Широкое распространение получили методы флуоресцентного анализа (для обз. см. спец выпуск журнала *Nature Methods*. 2005. V.2. №.12.). Флуоресцентные маркеры, такие как люцифер жёлтый, позволяют увидеть самые тонкие отростки в живой клетке. Флуоресцентные карбоциановые красители при соприкосновении с мембраной нейрона растворяются и диффундируют по всей поверхности клетки. Разработаны уникальные методы прижизненного анализа дендритных шипиков с использованием двуфотонной лазерной конфокальной микроскопии (2PLSM) (для обз. см. Lichtman, 1994; Vercelli et al., 2000; Miesenbock,

Kevrekidis, 2005). Методы световой прижизненной световой микроскопии позволяют одновременно регистрировать электрофизиологических параметры нейронов (напр.: Engert, Bonhoeffer, 1999; Nagerl et al., 2004). Другим методом прижизненного исследования дендритных шипиков с использованием двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии (2PLSM) является экспрессия в нейронах гена флуоресцирующего белка GFP или его мутантов – GFP, YFP, BFP и т.д. (Lippincott-Schwartz, Patterson, 2003, конструкции на основе GFP белка *Aequorea victoria* и др.). В последнее десятилетие большое внимание уделяется таким подходам как восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (fluorescence recovery after photobleaching – FRAP) и резонансному переносу энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer – FRET) между GFP вариантами (Zhang et al., 2002). FRET GFP вариантов позволяет наблюдать активность ферментов и конформационные состояния исследуемых компонентов синапсов (напр.: Chew, 2002; Pologruto et al., 2004; Korkotian et al., 2004a, 2004b). Трансфицировать нейроны можно вирусами (Davidson, Breakefield, 2003), несущими ген GFP. В какой-то мере это представляет реминисценцию метода Гольджи (Tamamaki et al., 2000), поскольку концентрация вирусов подбирается таким образом, что только некоторые нейроны экспрессируют GFP (Maletic-Savatic et al., 1999; Malinow et al., 1999; D’Apuzzo, 2001). Однако, «окрашенные» инфицированные нейроны могут сохранять активность только в течение определённого промежутка времени, например, нескольких дней, что для продолжительного наблюдения потребовало разработки дополнительных подходов, в частности получение трансгенных линий животных экспрессирующих GFP. В настоящее время разработка новых генетических конструкций (индикаторов $[Ca^{2+}]$, NMDA рецепторов, CaMKII, белков ПСУ) на основе GFP белков выведение линий трансгенных животных экспрессирующих GFP способствует развитию новых подходов в изучении функций различных компартментов нейронов с использованием совмещённого с электрофизиологическими экспериментами 2PLSM-наблюдением (напр.: Zhang et al., 2002; Chew et al., 2002; Ebihara et al., 2003; Ehrlich, Malinow, 2004; Nimchinsky et al., 2004; Pologruto et al., 2004; Brecht et al., 2004). Последние технические достижения в этой области позволяют длительно наблюдать динамику дендритных шипиков *in vivo* в слоях коры мозга на глубине более 1 мм (напр.: Trachtenberg et al., 2002; Grutzendler et al., 2002; Majewska, Sur, 2003; Holtmaat et al., 2005; Helmchen, Denk, 2005). Другой подход, основанный на двухфотонном фотолизе связанных нейротрансмиттеров, в частности глутамата (Pettit et al., 1997; Korkotian et al., 2004a), позволяет манипулировать шипиком, наблюдая его морфо-функциональные изменения (Schiller et al., 1998; Wang et al., 2000a;

Wang et al., 2000b; Matsuzaki et al., 2001; Korkotian et al., 2004b, Tanaka et al., 2005; Sobczyk et al., 2005).

Светомикроскопические подходы необходимы как для изучения связей отделов мозга, так и для прижизненных исследований нейронов и синапсов. В таких экспериментах можно одновременно манипулировать объектом, регистрировать его электрическую активность, а в дополнение к тому наблюдать его структурные изменения от миллисекунд до месяцев *in vivo* (Brecht et al., 2004; Trachtenberg et al., 2002). Однако все методы обладают как преимуществами, так и ограничениями. В одном случае они требуют внедрения в клетку чужеродных агентов, что, само по себе может, нарушать исходную структуру и/или функции клетки, с другой это и высокая цитотоксичность возбуждающего света, «выгорание» флуоресцирующих агентов, нестабильный уровень активности генов флуоресцирующих белков в трансфицированных клетках, и возможность наблюдения подчас лишь отдельных компонентов синаптического комплекса, пре- или постсинапса. В отношении точности измерений и адекватности их интерпретаций можно сказать то, что в настоящее время дискутируется вопрос о равномерности распределения флуоресцирующих агентов между дендритом и его отдельными шипиками и компартментами дендроплазмы (Helmchen, 2002; De Simoni et al., 2004; Svoboda, 2004). Стоит отметить, что при изучении динамики и формы дендритных шипиков наилучшее разрешение достигается при использовании мембранно-связанных форм GFP (см. видеоприложение к работе Roelandse et al., 2003; см. также Richards et al., 2004, 2005). Однако, несмотря на широкое распространение флуоресцентных методов с использованием GFP, как правило, используются их цитоплазматические варианты.

4.2. Электронная микроскопия

Наряду бесспорными достоинствами, существенным недостатком любого светомикроскопического метода является относительно низкая разрешающая способность, которая теоретически не превышает $\frac{1}{2} \lambda$ (длины волны используемого света). Даже в лучшем случае, при использовании специальных компьютерных программ для чистки оптических шумов, разрешение конфокального микроскопа как правило не превышает 200 нм. Так, например, белок BFP (blue fluorescence protein) теоретически позволяет достигать максимального разрешения с λ возбуждения ~ 384 нм и λ эмиссии 448 нм; $448/2=224$ нм (Ellenberg et al., 1999; Feng et al., 2000; Zhang et al., 2002; см. также *Nature Methods* V.2. №.12. Dec. 2005). Дендритные шипики и многие компоненты синапса

слишком малы, чтобы можно было адекватно характеризовать их используя только конфокальную микроскопию. Например, такие компоненты синапса как пресинаптические везикулы или шипиковый аппарат находятся за пределами разрешения светового микроскопа, пограничные области пре- и постсинапса лежат в пределах 10-20 нм (Peters et al, 1991, pp.147,152). С началом эффективного использования электронной микроскопии в биологических исследованиях в 1950-х, с развитием техники ультрамикротомии и методов окрашивания ультратонких срезов были разработаны многие электронно-микроскопические методы: отенение тяжёлыми металлами, электронно-микроскопическая гистохимия, иммуноэлектронная микроскопия, электронно-микроскопическая автордиография, замораживание-скалывание, замораживание-травление, криофиксация и криоультратомия и др. (Миронов с соавт., 1994). С использованием этих методов было получено большое количество данных об ультраструктуре нейронов и, в частности, синапсов. Электронный микроскоп при использовании ультратонких срезов даёт обычно разрешение 2-3 нм. Возможные же артефакты при химической фиксации образцов мозга могут быть устранены параллельным использованием криофиксации и криоультратомии.

4.3. Морфометрический анализ

4.3.1. Стереологический анализ на одиночных срезах

Подходы для количественной оценки объемных характеристик изучаемых структур на основе анализа одиночных срезов разработаны еще в 40-х годах прошлого века (Floderus 1944; Abercrombie, 1946). Эти подходы «обусловленной» (assumption-based) или «модельной» (model based) стереологии имели серьезные недостатки, например, такие как необходимость введения поправочных коэффициентов в зависимости от формы и размера объекта, или наличие пограничного эффекта исследуемого объема (Williams, Rakic, 1988) вносящего значительные ошибки в измерения при подсчете числа элементов. Однако такие методы рекомендуются и продолжают использоваться в современной патологоанатомической и исследовательской практике (Автандилов, 2002, с.114-142; Marrone et al., 2003). В настоящее время для количественной оценки исследуемых структур в объёме широко используются подходы так называемой «согласованной» или «обоснованной» стереологии («design-based stereology»), которые разработаны для минимизации как временных затрат, так и систематических ошибок (Geuna, 2000; Gundersen et al., 1988; Schmitz, Hof, 2005; см. также Hedreen, 1999; Schmitz, Korr, 1999). «Согласованность» этих подходов заключается в том, что *a priori* не принимается во

внимание размер, форма, пространственная ориентация и распределение исследуемых структур. Для подсчета числа объектов существует целый набор стереологических формул, использование каждой из которых требует определенных условий (Colonnier, Beaulieu, 1985). *Расчёт объема* исследуемого объекта/области проводят, используя такие подходы как «нуклеатор» и «ротатор», в которых для подсчётов необходимо использовать срезы только с изотропным случайным распределением объектов. В обход этих ограничений был разработан «оптический ротатор», используемый для анализа толстых срезов при помощи 2PLSM (Tandrup et al., 1997) – подход так же ограниченный условиями подготовки материала, «усадкой» среза по z-оси. Другой подход, основанный на принципе Кавальери (Кавальери, 1940), заключается в суммировании площадей очерченных на каждом десятом, например, срезе интересующего объекта из серии, которая умножается на дистанцию между срезами (Michel, Cruz-Orive, 1988). *Площадь поверхности* объектов определяется с использованием так называемого метода «шпаг факира», при котором объект «пронзается» равномерной сетью линий лежащих во взаимоперпендикулярных плоскостях, а измерение площади производится на основе расстояний между «шпагами» сети и числом их пересечений с поверхностью объекта. Этот метод применим только на изотропных срезах или на срезах толстых по сравнению с измеряемым объектом. Измерение *линейных размеров* объектов, а так же длин протяжённых и извитых объектов, так же связано с необходимостью работы с изотропными срезами и так же требует определённой коррекции измерений (для обз. см. Schmitz, Hof, 2005; West, 1999, также см. комментарии в ж. *TINS* 1999. V. 22, № 8, с.345-347; Benes, Lange, 2001, также см. комментарии в ж. *TINS*. 2001. V. 24. № 7. с.374-380). В большинстве подходов для подсчёта числа объектов и приведения полученных значений к объёмным значениям используется так называемый номинальный объём подсчёта, часто именуемый «оптическим диссектором» или «расчетным боксом» (Williams, Rakic, 1988), содержащим виртуальное пространство внутри толщи среза эквивалентное произведению площади расчетной рамки на толщину среза. Но морфометрия и моделирование в частности синапсов на одиночных срезах, как показали Coggeshall и Lekan (1996), может давать очень большие ошибки, а сложная форма исследуемых структур на одиночных срезах порой даже не позволяет идентифицировать принадлежность сечения к конкретному типу объекта. Поэтому в качестве альтернативы при подсчёте числа синапсов используют анализ так называемого «физического» или «парного» диссектора (Sterio, 1984), анализируя область расчётной рамки на двух фокальных плоскостях в толстых срезах или на двух смежных тонких срезах.

4.3.2. Объёмная (3D) реконструкция на серийных срезах

Считается, что освобождение от необходимости учитывать сложность геометрии исследуемых объектов даёт более надёжные данные, поскольку в таком случае удаляются потенциальные источники систематических ошибок вычислений. Однако, по мнению многих исследователей само по себе использование этих стереологических подходов ставит под сомнение интерпретируемость получаемых результатов, не гарантирует непредвзятости подсчётов. Несмотря на это значение стереологического анализа обосновывается во многих работах (напр.: Saper, 1996; Coggeshall, Lekan, 1996; West, 1999). Целесообразность использования стереологических методов, которая порой определяется выражением «Do more less well» (Gundersen, Osterby, 1981), до сих пор порой вызывает бурные дебаты (Benes, Lange, 2001, см. также комментарии в ж. *TINS*. 2001. V. 24. № 7. с.374-380). В рамках этих дебатов упоминается необходимость сравнения результатов получаемых на основе стереологических подходов и световой микроскопии с результатами анализа на серийных срезах и 3D реконструкции, а последней и в особенности реконструкции на основе ультратонких срезов отводится стороннее место «золотого стандарта» в морфометрии (von Bartheld, 2001). Примером должного электронно-микроскопического контроля прижизненных наблюдений с использованием 2PLSM могли бы служить лишь единичные публикации (напр.: Trachtenberg et al., 2002; Zito et al., 2004; Holtmaat et al., 2005; Goldberg et al., 2003a). Кроме того, ни одиночные срезы, ни описанные диссекторы «*a priori*» не позволяют проводить качественный анализ объёмной ультраструктуры изучаемого объекта (Schmitz, Hof, 2005), играющей подчас решающую роль в интерпретации количественных данных. Часто при использовании стереологических расчетов (т.е. при пересчете данных полученных на одиночных срезах в объёмные значения) получаемые разными исследователями результаты довольно противоречивы, а подчас просто противоположны. Так, например, анализируя синапсы на одиночных срезах в ранней фазе ДВП по отношению к контролю, Chang и Greenough (1984) обнаружили уменьшение на 43% числа шипиков с вогнутыми головками, тогда как Desmond и Levy (1986a) обнаружили увеличение числа вогнутых шипиков на 48%. В ранней фазе ДВП Fifkova и Anderson (1981) и Мошков с соавт. (1977, 1980, 1983) отмечали увеличение толщины ножек шипиков, тогда как Chang и Greenough (1984) этого не наблюдали. Примеров таких много.

Начало анализа морфологии синапсов на основе 3D реконструкции было положено еще в начале 60-х прошлого века (напр. Westrum, Blackstad, 1962). Реконструкции

выполнялись из собираемых в стек вырезанных из парафина профилей дендритных шипиков на серийных срезах. Значительный вклад в изучение морфологии синапсов на основе 3D реконструкции внесли Джозеф Спачек (Spacek, Hartmann, 1983; Spacek, 1985a-c) и позднее, с развитием вычислительной техники, пальма первенства перешла к Кристен Харрис (Harris, Stevens, 1988). Однако в основе морфометрического анализа этих первых 3D реконструкций дендритных шипиков все же лежали планиметрические расчеты. В отличие от большинства стереологических подходов анализ структур на основе серийных срезов и компьютерная 3D реконструкция лежат в основе стереологического анализа, который можно назвать «объёмным диссектором» («volume disector», Sorra et al., 1998; или «volume-oriented analysis», Fiala, Harris, 2001a). Такой анализ имеет общие черты и с подходом Кавальери и с оптическим диссектором, однако использует все без исключения сечения объектов собранных в стек взаимовыровненных цифровых изображений срезов. Отличаются при этом и подходы к получению количественных данных. Например, при подсчете числа синапсов в единичном объеме нейропиля (волюметрический анализ плотности синапсов) учитываются всех без исключения обнаруженные синапсы, при этом исключается и повторный учет одного и того же синапса. Расчёт площади поверхности, объёма и линейных размеров оптимизированной триангуляционной сети реконструированного объекта не требует введения в расчёты поправочных коэффициентов и введения дополнительной геометрии, относительно которой проводятся измерения (отрезков, линий, эллипсоидов, сфер и т.п.), позволяя избежать множества ограничений накладываемых в рамках «обоснованной стереологии», а, следовательно, и большинства систематических ошибок. Потенциальные ошибки в таком случае сводятся к «потерянным верхушкам» объектов на верхней и нижней границе стека, подобно тому, как при использовании оптического диссектора (Andersen, Gundersen, 1999), что на больших сериях срезов легко нивелируется введением так называемой опасной зоны («guard zone»). Несмотря на то, что поверхность реконструированного объекта измеряется напрямую, сложением площадей всех треугольников поверхности, иногда можно встретить интересные анахронизмы работы. Например, в работах Кубиновой (Kubinova et al., 2004) описывается специально разработанная программа для измерения площади реконструированного 3D объекта при помощи метода «шпаг факира»... Необходимость анализа больших серий срезов и получения объёмных реконструкций в нейробиологических исследованиях проиллюстрирована многими публикациями (напр. Harris, 1994; Spacek, Harris, 1997; Sorra, Harris, 1998; Sorra et al., 1998; Spacek, Harris, 1998; Fiala, Harris, 2001a; Shoop et al., 2002; Stewart et al., 2005). Преимущества анализа синапсов

на серийных срезах по сравнению со стереологическими расчетами (например, подсчет числа синапсов в объеме нервной ткани) еще более очевидны. В последние годы увеличилось количество публикаций, в которых обсуждается роль синаптической передачи между астроцитами и нейронами (Bezzi et al., 2004; Jabs et al., 2005, см. также Conradi, 1969, рис. 12-16; Parpura et al., 1994; Zhang et al., 2004; Kreft et al., 2004; Montana et al., 2004; Volterra, Meldolesi, 2005). Отростки глиальных клеток имеют уникальную морфологию и на срезах нейропиля подчас неотличимы от отростков нейронов, тем более на одиночных срезах. Как отмечалось еще на заре электронно-микроскопической морфометрии синапсов (см. напр. Gray, 1959, p. 427), определить причастность синапсов к нейронам или глиальным клеткам возможно исключительно с использованием серийных срезов. Поскольку обычная стереология на одиночных срезах не позволяет дифференцировать синапсы, на нейрональные или глиальные, то и интерпретируемость результатов таких измерений как минимум сомнительна. Недавно было высказано предположение о возможном использовании высоковольтной микроскопии (HVEM) для реконструкции шипиков и синапсов (Lee et al., 2005) на толстых срезах (порядка 100-250 нм), с использованием стандартных методов контрастирования ткани для электронной микроскопии. Использование HVEM могло бы облегчить процесс реконструкции, сократив время выравнивания стека серийных срезов за счет выстраивания стеков оптических срезов. Однако как свидетельствуют и сами авторы, предлагаемый метод имеет как минимум несколько недостатков: низкий контраст изображений, высокий оптический шум, незначительный объем исследуемой ткани и, разумеется, материальные затраты HVEM-анализа. В отличие от широко используемых морфометрических методов, современные компьютерные технологии и программное обеспечение совместно с совершенствованием методов получения серийных срезов позволяют на базе персонального компьютера охарактеризовать напрямую такие пространственные характеристики как форма и объемы синаптических элементов, их пространственные взаимоотношения, площади их взаимодействующих поверхностей и т.д.

5. Структура и функции синапса

При описании нейронов их отростки дифференцируют на аксоны и дендриты. Дендриты являются специализированными отростками, которые получают и обрабатывают большую часть поступающей на нейрон информации (Fiala, Harris, 1999). Дендриты наблюдали Karl Deiters и Joseph von Gerlach однако четко визуализировать их удалось лишь Golgi в 1873 (Sotelo, 2003). В 1889 William His назвал эти отростки дендритами (Euler, Denk, 2001). Golgi наблюдал маленькие иголки на их поверхности, но считал их артефактом окраски. Ramon-y-Cajal назвал эти маленькие выросты шипиками (исп. *espina* – шипик) и предполагал, что шипики являются местом контакта аксонов и дендритов, аналогично щеточкам динамо-машины могут предавать электрические сигналы (Ramon y Cajal, 1911 p.61). Позднее, Фостер и Шеррингтон (Sherrington, 1897) для определения области функциональной связи между нейронами рефлекторной дуги ввели термин «synapsis» (Pearce, 2004). [Интересно, что в рамках английской грамматики множественным числом слова «synapsis» (от греч. συνάψις - соединение, от συνάπτω - скреплять) является «synapses», которое в обиходе превратилось в число единственное – «synapse» (Gibson, 2001; London et al., 2002; Martin, 2002)]. Данное определение исходно не несло структурной нагрузки, и лишь с использованием электронного микроскопа в 40-х – начале 50-х произошло овеществление «синапса». Термин «синапс» приобрёл значение особой структурной единицы (см. напр.: De Robertis, Bennett, 1955; Palay, 1956; Robertson, 1956).

При описании наиболее широко распространенного типа синаптических контактов ЦНС млекопитающих используют организацию синапса химического (напр.: Edwards, 1995; Шмидт, Тевс, 1996; Garner, Nash, 2001). Синапс представляет собой многокомпонентную динамическую систему, которую можно разделить на основные составляющие компартменты: 1) пресинаптические области аксонов – аксональные расширения и терминали; 2) постсинаптические элементы – в основном шипики, на которых располагается большинство возбуждающих синапсов; 3) синаптическую щель – специфически структурированное пространство между пре- и постсинаптической частью; и 4) отростки глиальных клеток (Edwards, 1995; Araque et al., 1999; Nimchinsky et al., 2002; Dityatev, Schachner, 2003; Ziv, Garner, 2004). В данной работе внимание сосредоточено на изучении постсинаптического отдела синапса и в большей мере на шипиковых синапсах.

Пресинаптический бутон выделен серым, сегмент дендрита и дендритные шипики – голубым, постсинаптические уплотнения – красным. А – актиновый цитоскелет; М – микротрубочки; Мит – митохондрии; ОП – каймленный пузырек; ОЯ – окаймленная ямка; ПВ – пресинаптические везикулы; Пол – свободные полирибосомы; ПСУ – постсинаптическое уплотнение; С – спинула; ША – шипиковый аппарат; ЩК – шелевой контакт; Эн – эндосома; Эр – эндоплазматический ретикулум.

5.1. Классификация дендритных шипиков

Исследования с использованием электронной микроскопии и 3D реконструкции показали, что выросты на поверхности дендритов имеют свои структурные особенности (Fiala, Harris, 1999). На их основе выделяется несколько производных дендритного ствола, из которых на дендритах гранулярных клеток 3Ф представлено лишь две формы: филоподии и шипики (Рис. 3). Филоподии представляют собой тонкие выросты мембраны дендрита длиной до 10 мкм заполненные микрофиламентами. Как это можно видеть *in vitro* они быстро появляются и исчезают. У взрослых животных филоподии практически не встречаются, но на основе результатов главным образом *in vitro* экспериментов предполагается, что филоподии играют роль в образовании новых шипиков в раннем постнатальном периоде *in vivo* (Dailey, Smith, 1996; Ziv, Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Maletic-Savatic et al., 1999; Capani, 2001; Hasbani et al., 2001; Portera-Cailliau et al., 2003; Petrak et al., 2005 для обз. см. Segal, 2001; Yuste, Bonhoeffer, 2001; Hering, Sheng, 2001;). Для обозначения выростов имеющих сходные черты и с филоподиями, и с шипиками часто используется термин «протошипик» (напр. Dailey, Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Drakew et al., 1999; Marrs et.al., 2001; Matus, 2001; Bonhoeffer, Yuste, 2002; Cohen-Cory, 2002; Попов с соавт., 2003; Yuste, Bonhoeffer, 2004).

Одно из первых описаний формы шипиков принадлежит Рамон-и-Кахалу, различавшему среди дендритных шипиков клеток Пуркинье мозжечка шипики толстые/пеньковые и тонкие/удлиненные (Ramon-y-Cajal, 1911, p.60). Более детальные характеристики шипиков были предложены Kaiserman-Abramof (1969). Peters и Kaiserman-Abramof (1969, 1970) обобщив данные световой (окраска по Golgi) и электронной микроскопии предложили относительно простую классификацию шипиков, выделив три основных типа: 1) тонкие шипики (thin spines), у которых длина шипиков превышает их диаметр; 2) грибовидные шипики (mushroom spines), имеющие длинную или короткую ножку с большой головкой, и 3) пеньковые шипики (stubby spines), у которых длина и диаметр практически совпадают (см. Рис.3). Используя эти критерии, Spacek и Hartmann (1983) положили начало морфометрии шипиков на основе 3D реконструкции, а 10 лет спустя Kristen Harris расширила классификацию Kaiserman-Abramof, исследуя морфологию синапсов в CA1 гиппокампа. Harris с коллегами описала их различные типы у новорожденных и взрослых крыс. На основе анализа шипиков CA1 области гиппокампа (Harris et.al., 1992; Sora, Harris, 1993), новой коры (Wilson et al., 1983) и 3Ф (Hama et al., 1989; Trommald et.al., 1996) был предложен пятый тип – разветвленные шипики с двумя-

три головками сидящими на одной ножке, но относительное количество их невелико. Иногда можно наблюдать мультисинаптические шипики, образующие контакт с несколькими пресинаптическими бутонами (напр. Попов с соавт., 2003). В основе номенклатуры для анализа шипиков с использованием конфокальной микроскопии (Koh et al., 2002), так же лежат критерии предложенные в работе Harris et al. (1992). В последние годы благодаря вкладу конфокальной микроскопии всё чаще встречается деление шипиков лишь на толстые и тонкие или большие и маленькие (Matsuzaki et al., 2004; Holtmaat et al., 2005). Считается, что субпопуляции тонких, грибовидных и пеньковых шипиков представляют собой функционально-временные экстремумы внутри одного непрерывного континуума форм (Fiala, Harris, 1999; Noguchi et al., 2005).

5.2. Дендритные шипики гранулярных нейронов зубчатой фации

Дендритное дерево нейронов гиппокампа и ЗФ обычно плотно усеяно шипиками; исключение могут составлять безшипиковые дендриты интернейронов (Lubke et al., 1998; Arabadzisz et al., 1999; Buckmaster et al., 1995; 2002; Roussignol et al., 2005). Считается, что в гиппокампе крысы на одной гранулярной/пирамидной клетке располагается около 10000 шипиков (Andersen et al., 1990). Плотность распределения шипиков варьирует как в пределах дендритного ствола, так и в различных зонах коры в значительном диапазоне (Peters et al., 1991; Jacobs et al., 2001; Elston et al., 2005). На апикальных дендритах пирамидных нейронов, наибольшее число шипиков наблюдается в молекулярном слое (Nimchinsky et al., 2002). Trommald и Hulleberg (1997) провели анализ шипиков в mML ЗФ с использованием 3D реконструкции и показали, что в mML на каждый микрон длины дендрита приходится от одного до трех шипиков, независимо от принадлежности шипиков к вышеописанным типам. Авторы не обнаружили разграничений между типами шипиков. Количество разветвленных шипиков составляло ~2% от всей популяции; из отдельные головки никогда не контактировали с одним и тем же пресинаптическим бутонем (см. также Harris, 2003). Ранее на гранулярных клетках ЗФ Laatsch и Cowan (1966) показали, что шипики в iML короче, а шипики, на более тонких дендритах в mML и oML длиннее и тоньше. С использованием HVEM Noma et al. (1989) провели анализ шипиков на дендритах молекулярного слоя ЗФ. Была подсчитана суммарная площадь поверхности шипиков в пересчете на 1 μm длины дендрита. Она составляла в iML, в mML и oML соответственно 4,18 μm^2 , 2,81 μm^2 и 2,40 μm^2 . Площадь поверхности шипиков составляла 1/2 от площади поверхности дендрита во всех отделах молекулярного слоя ЗФ.

5.3. Классификация, распределение и соотношение типов синапсов

Согласно классификации шипиков по Peters и Kaiserman-Abramof во многих работах выделяют 4 категории синапсов: тонкие, грибовидные, пеньковые и стволовые синапсы, соответственно на шипиках тонких, грибовидных, пеньковых и на стволах дендритов. Согласно специфике контактов образуемых между нейронами выделяют синапсы аксо-дендритные, аксо-аксонные, аксосоматические, дендро-дендритные и т.д. (Gray, 1959; Peters et al., 1991, p.150, 190-203). Предметом исследования в данной работе являются аксо-дендритные шипиковые и стволовые синапсы схематически представленные на Рис. 3. Gray (1959) и Colonnier (1968) на основе морфологии пре и постсинаптической области разделили синапсы на два типа. Согласно Gray и Colonnier в морфологически непрерывном континууме синапсов выделяются два экстремума; один соответствует асимметричным синапсам (предположительно возбуждающим или типу I), а второй – симметричным (предположительно тормозным или типу II). Beaulieu и Colonnier (1985; Colonnier, Beaulieu, 1985) подсчитали, что из всех синапсов зрительной коры возбуждающими являются 84%, тогда как 79% из них (~66% от всех синапсов) располагаются на шипиках, а 21% (~18% от всех синапсов) на дендритных стволах, и лишь 0,1% на сомах нейрона. Остаточные 16% синапсов морфологически были отнесены к тормозным, из которых 31% (~5% от всех синапсов) формировал синапсы на шипиках, 62% (~10% от всех синапсов) на дендритах, и оставшиеся 7% (~1% от всех синапсов) на сомах. Арифметика результатов Beaulieu и Colonnier приводит, к следующим выводам: 71% синапсов располагался на шипиках, 28% на дендритах, и лишь 1% на сомах пирамидных нейронов. Таким образом, из всех шипиковых синапсов 92% являются возбуждающими, а 8% – тормозными, поэтому предполагается более 90% всех возбуждающих синапсов ЦНС образуется на шипиках (Harris, Kater, 1994). Сходные данные недавно были получены для синапсов 3Ф у крыс; независимо от расположения синапсов на дендрите (стволовые или шипиковые) 90% синапсов составляли синапсы асимметричные (Dhanrajan et al., 2004).

В таблице 1 суммированы данные анализа соотношения типов синапсов, полученные независимыми группами исследователей при анализе синапсов на сериях срезов гиппокампа и неостриатума у крыс, мышей и сусликов. Значения представлены в процентах от общего числа учтенных синапсов. Как можно видеть значения различаются, что может быть связано с как с межвидовыми различиями, со спецификой организации синапсов в разных отделах мозга, с различиями обусловленными методикой эксперимента (*in vivo* или *in vitro*) или критериями идентификации шипиков. Тем не менее, во всех

случаях доминирующим типом синапсов являются синапсы на тонких шипиках. Вторыми в количественном отношении являются синапсы на шипиках грибовидных.

Таблица 1. Соотношение типов синапсов в норме

система	животные	область	Т	Г	П	С	автор/год
<i>in vivo</i>	крыса	мед. CA1	63	28	9	—*	Harris et al., 1992
<i>in vitro</i>	крыса	мед. CA1	54	24	18	4	Sorra, Harris, 1998
<i>in vivo</i>	суслик	дорз. CA1	76	12	6	6	Медведев, 2004
<i>in vivo</i>	крыса	дорз. CA1	83	11	4	2	Медведев, 2004
<i>in vitro</i>	мышь	дорз. CA1	79	14	3	4	Stewart et al., 2005
<i>in vivo</i>	крыса	CA1	62	35	3	—**	Capani et al., 2001
<i>in vivo</i>	крыса	неостриатум	64	33	3	—**	Capani et al., 2001

* – данные по стволовым синапсам отсутствуют (см. Harris et al., 1992, Fig.6 p.2693);

** – стволовые синапсы не учитывались (см. Capani et al., 2001, p.161);

мед., дорз. – дорзальный и медиальный отделы CA1 области гиппокампа.

Т, Г, П, С – соответственно синапсы на шипиках тонких, грибовидных, пеньковых и синапсы стволовые, на стволах дендритов.

5.4. Постсинаптическое уплотнение

Формы постсинаптических уплотнений

Одной из отличительных особенностей синапса, а также критерием его идентификации, является электронно-плотный материал, связанный с внутренней стороной мембраны шипика – постсинаптическое уплотнение (ПСУ) толщиной около 30-40 нм (Peters et al., 1991). Laatsch и Cowan (1966), исследуя организацию синапсов в 3Ф, на основе их случайно ориентированных профилей на одиночных срезах разделили все синапсы на «простые» и «сложные». С использованием серийных срезов и 3D реконструкции Peters и Kaiserman-Abramof (1969) опубликовали первое детальное описание форм ПСУ в коре мозга крысы. ПСУ были представлены широким многообразием форм от пятна (макулярные), до подковы и бублика или чернильной кляксы (перфорированные и сегментированные). Среди всех ПСУ с диаметром от 100 до 900 нм наличием перфораций отличались ПСУ с диаметром больше 250 нм, а все ПСУ с диаметром больше 500 нм непременно имели перфорации. Nieto-Sampedro с соавторами (1982) использовали классификацию Laatsch и Cowan (1966) и подсчитали, что в 3Ф 15-17% всех синапсов представлены «сложными» ПСУ (перфорированными и сегментированными) с отрицательной (согласно Dyson, Jones, 1980) кривизной. Впоследствии использование 3D реконструкции показало, что сегментированные и перфорированные ПСУ составляют 13% (5% и 8% соответственно) от всей популяции шипиков 3Ф в mML, а между площадью ПСУ и размерами шипиков прослеживается положительная корреляция (Trommald, Hulleberg, 1997). Такая же корреляция показана и в

других областях мозга (Peters, Kaiserman-Abramof, 1970; Lee et al., 1980; Wilson et al., 1983; Spacek, Hartman, 1983; Harris, Stevens, 1988, 1989; Harris, 1992, см. также Sorra, Harris, 1998 p.670). В зависимости от размеров дендритный шипик коры имеет от 1 до 5 ПСУ (Kaiserman-Abramof, 1969). Таким образом, различные формы ПСУ разделяют на два основных типа: 1) макулярные (с непрерывным ПСУ) и 2) ПСУ с перфорациями (перфорированные), которые на одиночных поперечных срезах порой выглядят как отдельные уплотнения. Сегментированные ПСУ считаются подтипом перфорированных (Sora, Harris, 1998 p.667). Свидетельством значительного интереса к функциональному значению перфорированных ПСУ является специальный обзор Calverley и Jones (1990). Peters и Kaiserman-Abramof (1969) предполагали, что образование перфорации на «сложных» шипиках представляет собой механизм позволяющий увеличить передающую область контакта за счет увеличения внешней границы ПСУ, а материалу ПСУ приписывали лишь адгезивные свойства подобно контактам эпителиальных клеток. Другие утверждали, что ПСУ участвуют в контроле или модуляции сигнала вызываемого рецепторами нейротрансммиттера (Blomberg et al., 1977). Эти же авторы предполагали, что наблюдаемые перфорации динамичны *in vivo*, непрерывно открываются и закрываются (Cohen et al., 1977; Cohen, Siekevitz, 1978; см. также Greenough et al., 1978). В противоположность (почему непонятно) этим взглядам Nieto-Sampedro et al. (1982) предположили, что «отщепление» частей «сложных» ПСУ посредством перфораций может отражать обновление синапсов или рециклинг компонентов ПСУ. С обоими этими предположениями согласуются и работы по латеральной диффузии синаптических рецепторных микродоменов (для обз. см. Choquet, Triller, 2003; Triller, Choquet, 2003; 2005). Однако впоследствии идея отщепления части ПСУ преобразовалась в идею «раскалывания» шипика и участия этого механизма в синаптогенезе (напр.: Carlin, Siekevitz, 1983; Dyson, Jones, 1984; Geinisman et al., 1987, 1993; Ganeshina et al., 2004).

Спикулы

Основанием для идеи «раскалывания» шипика послужило наблюдение гребневидных выростов мембраны шипика, которые могли бы продавливать пресинаптический бутон в области перфорации (см. Рис. 3) и разделять ПСУ и пул пресинаптических везикул, с образованием «совершенно отдельных» синапсов (Geinisman et al., 1993; Ganeshina et al., 2004). Однако впервые именуемые спинулами (иглолочками) эти выросты шипиков были описаны в *striatum radiatum* CA1 гиппокампа (Westrum, Blackstad, 1962) и с использованием серийных срезов авторы показали, что спинулы располагаются как в области перфораций, так и на головках и ножках разных

типов шипиков и прорастают внутрь аксонального бутона, но не обязательно пресинаптического, а также располагаются и на поверхности дендрита. Вслед за Westrum и Blackstad Tarrant и Routtenberg (1977) исследовали спинулы в ЗФ. Спинулы значительно варьируют по форме и размерам; в среднем ~10-150 нм в диаметре и ~75-800 нм в длину (Westrum, Blackstad, 1962; Spacek, Harris, 2004). Спинулы лишены компонентов присущих ПСУ, а синаптическая щель в области спинул обычно сужается до 10 нм, подобно тому в экстрасинаптической области (Chicurel, Harris, 1992). На одиночных срезах вырост мембраны в области перфорации легко принять за поперечно срезанную гребневидную структуру, а перфорированное ПСУ – за два отдельных синапса. Действительно, спинулы нередко можно видеть в области перфораций; 40% спинул грибовидных шипиков располагаются в области перфораций (Spacek, Harris, 1997; Spacek, Harris, 2004). Sorra et al. (1998) показали что в области перфораций ПСУ располагаются только 13% спинул или не более 2% всех шипиков имеют спинулу в области перфорации. Trommald и Hulleberg (1997) при изучении синапсов ЗФ с использованием 3D реконструкции также не наблюдали каких-либо гребневидных структур, которые разделяли бы ПСУ на совершенно отдельные области, и отмечали, что теория «раскалывания» лишена какого-либо смысла (тоже см. у Harris et al., 2003). Кроме того, наряду с грибовидными шипиками, большое количество головок тонких шипиков также имеет спинулы рядом с макулярными ПСУ. «Продавливая» близлежащую клетку, спинулы образуют двухмембранные структуры, на кончиках которых наблюдаются окаймлённые везикулы. Предполагается, что спинулы участвуют в транссинаптических эндоцитозе и сигнализации (Tarrant, Routtenberg, 1977; Spacek, Harris, 1997; 2004), но литературные данные о молекулярных особенностях спинул отсутствуют.

6. Организация постсинаптического отдела

6.1. Молекулярная организация постсинаптического уплотнения

Масс-спектрометрия фракции ПСУ переднего мозга показывает, что ПСУ включают почти четыре сотни белковых компонентов (Peng et al., 2004; Cheng et al., 2006), и являются, таким образом, сложными динамическими системами. Все белковые компоненты ПСУ можно разделить на несколько основных категорий: 1) мембранные компоненты – молекулы клеточной адгезии (CAM), интегрины, рецепторы и/или каналы; 2) поддерживающие белки (scaffolding proteins), участвующие в транспорте синаптических рецепторов; 3) сигнальные молекулы ПСУ; и 4) кросслинкеры поддерживающих белков ПСУ, цитоскелетные и моторные белки (Ziff, 1997; Zhang, Benson, 2000; Sheng, Sala, 2001; Ziv, Garner, 2001; Scheiffele, 2003).

Компоненты адгезии

Часть интегральных и полуинтегральных белков представлена молекулами обеспечивающими транссинаптическую адгезию и сигнализацию. Она включает нейролигины (NL-1, -2, -3 и -4) взаимодействующие с β -неурексином пресинаптического бутона Ca^{2+} -зависимым образом, которые индуцируют кластеризацию PSD-95 и встраивание NMDARs в ПСУ (Graf et al., 2004; Nam, Chen, 2005; Hussain, Sheng, 2005; Chih et al., 2005; Dean, Dresbach, 2006). Эфрины (EphA и EphB) и их рецепторы (14 рецепторов двух типов) участвуют в морфогенезе шипиков и отвечают за нейроглиальное взаимодействие в области синапса (Murai et al., 2003; Yamaguchi, Pasquale, 2004). CAM представляют молекулы несущие Ig-домены: CAM нейронов (NCAM), CAM синапсов (SynCAM), «белки-братки» (sidekicks или Sdk) и нектины. Как показывают *in vitro* эксперименты, NCAM могут аккумулировать транс-Golgi компартменты в нейритах (Sytnyk et al., 2002). Большое значение в транссинаптической сигнализации отводится PSA-NCAM (Kiss et al., 2001). SynCAM – Ca^{2+} -независимые CAM; участвуют в формировании функциональной активной зоны (Biederer et al., 2002). Sdk белки – молекулы ламина-специфического узнавания; сконцентрированы в синапсах, регулируют синаптогенез и являются предметом активного изучения (Yamagata et al., 2002). Нектины участвуют в инициации организации активной зоны, а по мере созревания синапса совместно с кадгеринами – в организации *puncta adhaerentia*, контакта подобного десмосомам эпителиальных клеток (Spacek, 1985a; Rose et al., 1995; Spacek, Harris, 1998; Mizoguchi et al., 2002; Shapiro, Colman, 1998; Takai, Nakanishi, 2003). В широко распространенных кадгеринах – Ca^{2+} -зависимых липопротеиновых CAM – выделяют 2 класса: классические и протокадгеринины (Fields, Itoh, 1996; Conacci-Sorrell et al., 2002). Первые, посредством главным образом гомофильного взаимодействия, участвуют в структурной организации синапса, морфогенезе и пластичности шипиков, а протокадгеринины, обладающие вариабельными экстраклеточными доменами, являются участниками транссинаптической сигнализации (Huntley, 2002; Scheiffele, 2003). Другой класс CAM, несущих Ig-домены, в области синапса – это интегрины, Ca^{2+} -независимые рецепторы молекул экстраклеточного матрикса (Fields, Itoh, 1996). Представленные гереродимерами молекулы интегринов регулируют встраивание субъединиц NMDA рецепторов в мембрану и участвуют в регуляции функций пресинапса, а их цитоплазматические домены вовлечены в различные пути внутриклеточной сигнализации (Chavis, Westbrook, 2001). Особое место среди интегральных белков ПСУ занимают старгазин из группы NARP-белков и NARP (**n**eural **a**ctivity–**r**egulated **p**entraxin) (Tomita

et al., 2003; Vandenberghe et al., 2005). Старгазин, проявляя определенную степень гомологии с γ -1 субъединицей кальциевого канала (Bredt, Nicoll, 2003), контролирует встраивание в мембрану AMPARs и каинатных рецепторов, их количество, кластеризацию и активность (Schnell et al., 2002; Vandenberghe et al., 2005; Tomita et al., 2005). В организации ПСУ могут участвовать и другие рецепторные комплексы: молекулы главного комплекса гистосовместимости класса I, синдеканы, Trk рецепторы, рецепторы инсулина, неурегулин и др. (для обз. см. Dityatev, Schachner, 2003; Scheiffele, 2003; Ziv, Garner, 2004; Waites et al., 2005).

Рецепторы глутамата

Другие и наиболее важные компоненты сконцентрированные в ПСУ шипиков – это рецепторы возбуждающих нейротрансмиттеров. Успехи в понимании молекулярной организации синапсов ЦНС достигнуты именно благодаря изучению этих рецепторов и взаимодействующих с ними белков (Nakanishi, 1992; Hollmann, Heinemann, 1994). Функционально их можно разделить на ионотропные и метаботропные рецепторы (Dingledine et al., 1999). Большая часть рецепторов ПСУ представлена ионотропными рецепторами глутамата, подразделяемыми на основе фармакологии и гомологии: NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) рецепторами (NMDAR), рецепторами AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) (AMPA) и каинатными рецепторами (Garner, Nash 2001; Sheng, 2001; Yuzaki, 2002a). NMDAR образован гетеромультимерами из 4-5 трансмембранных субъединиц, включающих одну NR1, и 3-4 NR2 (от NR2A до NR2D) или NR3A-NR3B субъединицы (Cull-Candy et al., 2001; Matsuda et al., 2002; 2003; Erreger et al., 2005; см. также van Zundert et al., 2004; Liu et al., 2004; Schell 2003). Во взрослом организме AMPAR представлены субъединицами GluR1-3, которые объединяются в функциональные димеры димеров (GluR1/GluR2 и GluR2/GluR3) (Wenthold et al., 1996; Shi et al., 2001). Гомомеры GluR1 проницаемы для Ca^{2+} подобно NMDAR, но как правило они ассоциированы с GluR2 субъединицами. Ca^{2+} -проводимость GluR2-содержащих рецепторов почти в 100 раз ниже, таким образом AMPAR проницаемы в первую очередь для одновалентных катионов (Dingledine et al., 1999). Точные механизмы олигомеризации субъединиц AMPAR в ЭР пока неизвестны, по-видимому, в них задействованы экстраклеточные N-концевые домены (Kuusinen et al., 1999; Leuschner, Hoch, 1999). Каинатные рецепторы представлены гомомерами GluR5–GluR7 субъединиц или гетеромерными ансамблями субъединиц GluR и KA1 или KA2 (Erreger et al., 2004).

Количество и распределение AMPAR и NMDAR в ПСУ

Внешний диаметр глутаматных рецепторов не превышает 10-15 нм и обычно количество рецепторов интегрированных в мембрану ПСУ значительно меньше того, которое могло бы быть при их плотной упаковке (см. напр. Kennedy, 2000). Поэтому в ПСУ достаточно места для встраивания дополнительных компонентов. Однако с использованием иммуно-электронной микроскопии показано, что распределение NMDAR и AMPAR в ПСУ шипиков связано с размерами ПСУ. Количество NMDAR слабо коррелирует с площадью ПСУ, коэффициент корреляции r лежит в диапазоне 0,05-0,21 (Takumi et al., 1999; Racca et al., 2000). В среднем лишь около 12% синапсов содержит AMPAR, но практически все проявляют наличие NMDAR (Racca et al., 2000). Синапсы, в ПСУ которых отсутствуют AMPARs, считаются «молчащими» синапсами (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995; 1999; 2001; Kullmann, 2003; Voronin, Cherubini, 2004). С другой стороны показано, что бóльшие по размеру шипики и ПСУ имеют пропорционально большее количество AMPAR (Nusser et al., 1998; Nusser, 2000; Matsuzaki et al., 2001; Ganeshina et al., 2004). В зависимости от размера ПСУ число рецепторов варьирует; считается, что ПСУ с диаметром ~400 нм содержит около 50 NMDAR, а количество AMPAR варьирует в диапазоне от 0 (в ПСУ с диаметром <180 нм) до 50, с линейной зависимостью (r достигает 0,8) от диаметра ПСУ (Takumi et al., 1999). С данными полученными Takumi et al. в CA1 гиппокампа согласуются и результаты работы Kharazia и Weinberg (1999) на синапсах II-III слоя нейронов сенсомоторной коры. В работе Racca et al. (2000) с анализом числа AMPAR на единицу площади мембраны шипика занимаемой ПСУ коэффициент корреляции достигает почти 0,9. AMPAR в гиппокампальных шипиковых синапсах распределены равномерно или ближе к периметру ПСУ. Они так же располагаются и в экстраинаптической области мембраны шипика, в ЭР (Rubio, Wenthold, 1999; Shi et al., 1999) и в ША. NMDAR чаще располагаются в центре ПСУ (Somogyi et al., 1998a; Somogyi et al., 1998b; Kharazia, Weinberg 1999; Kennedy 2000; см. также Koranitsa 1997; Adesnik et al., 2005). Однако в потенцированных синапсах взаиморасположение NMDAR и AMPAR может меняться (Fux et al., 2003). Дифференциальное распределение подтипов NMDAR (NR2A/NR2B) наблюдается и между популяциями шипиков (Sobczyk et al., 2005). Потенциалзависимая кооперация NMDAR, AMPAR и их подтипов играет ключевую роль в процессах длительной потенциации и депрессии (Shi et al., 1999; Hrabetova et al., 2000; Wang et al., 2002; Liu et al., 2004; Bliss, Schoepfer 2004; Barria, Malinow 2005; Lynch, 2004, p.98-99). ДВП связана с экспрессией новых или дополнительных AMPAR в синаптической мембране. При

активации синапсов рецепторы, содержащие GluR1 субъединицы, по-видимому, играют роль авангарда и первыми встраиваются в ПСУ, в которых до запуска ДВП AMPAR отсутствовали (Shi et al., 1999; Hayashi et al., 2000; Shi et al., 2001). Вслед за этим между ПСУ и цитоплазматическим пулом рецепторов следует конститутивный рециклинг субъединиц AMPAR. В ходе него GluR1 замещаются GluR2-содержащими рецепторами, которые уже независимо от уровня активности могут освобождать и занимать области/слоты ПСУ исходно занимаемые GluR1-содержащими рецепторами (Barry, Ziff, 2002; Sutton et al., 2006; для обз. Sutton, Schuman, 2006). GluR1/GluR2 рецепторы, по-видимому, являются очень мобильными элементами и быстро проходят процессинг, тогда как GluR2/GluR3 дольше задерживаются в ЭР (для обз. Esteban, 2003). При блокаде спонтанных миниатюрных потенциалов полная замена GluR1 на GluR2 в синапсах происходит в течение 12-24 ч (Sutton et al., 2006).

Перисинаптические рецепторы

Каинатные рецепторы широко распространены в ЦНС, как в возбуждающих, так и в тормозных синапсах, однако их синаптическая локализация и функции требуют дальнейших исследований (Frerking, Nicoll, 2000; Reid, Bliss, 2000; Lerma, 2003; Erreger et al., 2004). Подобным образом обстоит дело с исследованиями структурно-функциональных аспектов глутаматных дельта рецепторов (δ или orphan) (Yuzaki, 2003b; Hirai et al., 2005). Метаботропные рецепторы глутамата, представленные mGluR1-mGluR8 субъединицами, часто ассоциированы в виде гомодимеров (Kunishima et al., 2000). 9 подтипов из более чем 1000 идентифицированных различных mGluR разделены на 3 группы на основе их гомологии, фармакологии и функций (Conn, Pin, 1997; Nakanishi et al., 1998; Schoepp, 2001). Наибольшая плотность mGluR в мембране шипиков в CA1 наблюдается в перисинаптической области и убывает при удалении от границы ПСУ (Baude et al., 1993; Lujan et al., 1996; Somogyi et al., 1998a). Экстраклеточные N-концевые домены mGluRs отвечают за связывание глутамата и других лигандов, а цитоплазматические, эффекторные, области полипептидной цепи ассоциированы с G-белками. mGluR составляют звено не прямой синаптической передачи. Благодаря взаимосвязи с ЭР шипика и активации G-белков mGluR запускают высвобождение вторичных мессенжеров (Carman, Benovic, 1998; Hermans, Challiss, 2001), а посредством субъединиц G-белков модулируют проводимость и потенциалзависимость ионных каналов (Colwell, 1996; Zamponi, Snutch, 1998; Seeburg et al., 1998).

Ламинарная организация ПСУ – поддерживающие (scaffolding) белки

Сложная интеграция компонентов ПСУ обеспечивает структурную стабильность синапса и эффективность синаптической передачи; за динамическую стабильность ПСУ отвечают как латеральные взаимодействия мембранных компонентов (рецепторов, каналов, CAM), так и поддерживающих (scaffolding) и цитоскелетных белков (Bredt, Nicoll, 2003; Choquet, Triller, 2003; Shouval, 2005). В последнее десятилетие наблюдается значительный прогресс в понимании структурно-функциональной организации ПСУ. Была предложена «ламинарная» модель его молекулярной организации, в которой компоненты ПСУ организованы в последовательные слои двумерных белковых сетей параллельно постсинаптической мембране (Kennedy, 2000; Valtschanoff, Weinberg, 2001), которые напрямую или опосредованно связаны с рецепторами и локально и специфически реагируют на сигналы, поступающие с поверхности постсинаптической мембраны. В массовом отношении большая часть белков во фракциях ПСУ представлена поддерживающими белками из семейства ассоциированных с мембраной гуанилат киназ (MAGUK) лишенных ферментативной активности. Они организуют первый слой под синаптической мембраной. Все белки данной группы богаты PDZ (PSD-95, Discs large, Zonula occludens) доменами. Это белки PSD-95, PSD-93, SAP97, SAP102, GRIP и др. (Kim, Sheng, 2004). Их PDZ домены способны связывать карбоксильные цитоплазматические хвосты молекул адгезии и рецепторов и обеспечивают их кластеризацию (Kornau et al., 1997; O'Brien et al., 1998; Garner et al., 2000). Посредством такого же механизма контролируется количество AMPAR в мембране ПСУ при ДВП (Schnell et al., 2002; Ehrlich, Malinow, 2004). SH3 домены MAGUK обеспечивают связывание киназных рецепторов. GK домены MAGUK являются связующим звеном со вторым слоем ПСУ. Посредством GKAP (белков ассоциированных с гуанилат киназным доменом MAGUK) рецепторные кластеры объединяются вторым слоем поддерживающих белков, несущими компонентами которого являются белки Shank. Shank может ассоциировать сам с собой через SAM-домены с образованием гомомультимера и формировать трёхмерную сеть из мультимеров Shank и димеров белка Homer. Одновременно удерживая комплексы GKAP/(PSD-95/NMDAR) в ПСУ, Shank посредством белка Homer с одной стороны связан с mGluR в мембране прилегающей к ПСУ, а с другой – с IP₃R на мембранах внутриклеточных хранилищ Ca²⁺ и шипикового аппарата (Tu et al., 1998; Xiao, 2000). Shank может и напрямую взаимодействовать с комплексом GRIP/AMPA. Таким образом второй слой ПСУ представляет собой систему (главным образом белков группы Shank) связующую компоненты первого, рецепторного слоя ПСУ (Triller, Choquet, 2003). Shank

связан с цитоскелетом через два белка ассоциированных с актином – кортактином (cortactin) и мозговым спектрином – фодрином (α -fodrin) (Zhang, Wang, 2003). NR1 субъединицы NMDAR сами могут взаимодействовать с f-актином; эта связь опосредована α -актенином, ионами Ca^{2+} , кальмодулином (CaM) и дребрином (Shirao, Sekino, 2001). Недавно были получены данные об их стехиометрических отношениях во фракции ПСУ (Peng et al., 2004; Cheng et al., 2006). Согласно результатам масс-спектрометрии белков ПСУ в молярном отношении количество PSD-95 на порядок превышает количество NMDA рецепторов и в несколько раз превышает количество таких белков как GKAP и Shank. При этом количество цитоскелетных компонентов составляет около 20%, из которых к актиновому цитоскелету относятся лишь 12%. Интересно, что и некоторые регуляторные белки, например SynGAP, также могут выступать в роли поддерживающих белков (Kim et al., 2003; Cheng et al., 2006). Класс поддерживающих белков ассоциированных с множеством сигнальных компонентов включает несколько семейств которым посвящены специализированные обзоры (напр.: Sheng, Kim, 2000; Sheng, Sala, 2001; Bezprozvanny, Maximov, 2001; Jelen et al., 2003; Sierralta, Mendoza 2004; Kim, Sheng, 2004; см. также Luscher, Keller, 2004).

Сигнальные компоненты

В глутаматэргических синапсах поддерживающие белки выполняют и структурные, и сигнальные функции, регулируя эффективность синаптической передачи (Tomita et al., 2001; Ehrlich, Malinow, 2004). ПСУ так же содержит и другие сигнальные компоненты, включая протеин киназы и фосфатазы, вовлеченные в сигнальные пути (для обз. см. Sheng, Kim, 2002; Hardingham, Bading, 2003; Thomas, Huganir, 2004; Salter, Kalia 2004; Wong, Scott, 2004; DiAntonio, Hicke, 2004; Kennedy et al., 2005). Запуск ДВП в значительной мере зависит от активации Ca^{2+} /кальмодулин зависимой протеинкиназы II (CaMKII), которая составляет 2% от всего количества белка в гиппокампе (Hudmon, Schulman, 2002; Xia, Storm, 2005). Она представляет собой большой гетеромультимер из двух близкородственных каталитических субъединиц α и β (Kolodziej et al., 2000; Morris, Torok, 2001). В переднем мозге количество α субъединиц в три раза больше субъединиц β . CaMKII β преимущественно связана с f-актином, тогда как CaMKII α является цитозольной субъединицей (Shen et al., 1998). Холофермент в виде двух зубчатых колец с диаметром около 20 nm и гексагональной осевой симметрией привязывается к цитозольным хвостам NR2B субъединиц (Omkumar et al., 1996; Strack, Colbran, 1998; Leonard et al., 1999; Bayer et al., 2001; Leonard et al., 2002). Каталитический домен CaMKII располагается вблизи устья NMDAR, что теоретически позволяет фосфорилировать несколько близлежащих белков,

включая AMPAR и другие сигнальные молекулы ПСУ (Barria et al., 1997; Kennedy 2000; Leonard et al., 2002; Barria, Malinow 2005). Интересно, что в группу субстратов CaMKII, которая насчитывает около 30 синаптических белков, входит старгазин и постсинаптический миозин-V (Walikonis et al., 2000; Cheney, Rodriguez, 2001; Karcher, 2001; Tomita et al., 2005). То, что *in vivo* во фракции ПСУ концентрация CaMKII может достигать 50%, небесспорно (Colbran, 2004, см. также Cheng et al., 2006). По другим данным, отдельный шипик содержит ~10 молекул CaMKII (Holcman et al., 2004). Тем не менее, на сегодняшний день достоверно известно, что CaMKII является ключевым звеном синаптической пластичности связанной с ДВП (Giese et al., 1998; Shen et al., 2000; Lisman et al., 2002). Обладая уникальными ауторегуляторными свойствами, она устойчиво активируется в ответ синаптическую стимуляцию вызывающую ДВП и сохраняет активность в течение часа, как минимум (Soderling et al., 2001; Miller et al., 2005). Аутофосфорилирование CaMKII также повышает ее афинность к NR1 и к NR2A субъединицам (Bayer, Schulman, 2001). С одной стороны фосфорилирование компонентов ПСУ отвечает за быструю фазу усиления эффективности синаптической передачи (минуты), а за более длительную – активация компонентов локальной трансляции мРНК (CPEB) и активации транскрипции ДНК (CREB) (Soderling, 2000; Wells et al., 2000; Soderling et al., 2001; Klann, Dever, 2004). Интересно, что слабая стимуляция, в отличие от тетанической, приводит к активации CaMKII лишь в отдельных шипиках (Ouyang et al., 1997; Inagaki et al., 2000). При химической ДВП CaMKII аккумулируется в шипиках, а доставка и встраивание CaMKII в ПСУ регулируется актиновым цитоскелетом (Strack, Colbran, 1998; Shen et al., 1998; Otmakhov et al., 2004).

6.2. Цитоскелет и транспорт в дендритных шипиках

Актиновый цитоскелет

Цитоскелет шипиков организован главным образом микрофиламентами из β и γ актина (Kaech et al., 1997). В центральной области головки шипика и в ножке цитоскелет образован пучками филаментов, а на периферии – сетью сплетенных нитей связанных с ПСУ и часто расположенных параллельно уплотнению (Fifkova, Delay, 1982; Landis, Reese, 1983; Fifkova, 1985; Rao, Craig, 2000). Концентрация актина в шипиках значительно выше, чем в дендритах; микротрубочки обычно отсутствуют – исключение составляют шипики молодых животных и большие специализированные синапсы (Westrum et al., 1980; Chicurel, Harris, 1992; Kaech et al., 1997; см. также Fiala et al., 2003). Несмотря на отсутствие микротрубочек дендритные шипики богаты белками ассоциированными с

микротрубочками MAP1B и MAP2, которые колокализированы в шипиках с актином и ПСУ (Caceres et al., 1983; см. также Yuen et al., 2005). Фосфорилирование MAP2 может модулировать стабильность актина (Ozer, Halpain 2000; Sanchez et al., 2000; Sanchez Martin et al., 2000; Rodriguez et al., 2003). Актин существует в двух формах – фибриллярной (f-) и глобулярной (g-) – а между f- и g-актином существует определенный баланс. Недавно с использованием FRAP и FRET было показано, что большая часть актина (~85%) цитоплазматической сети шипиков нестабильна и находится в состоянии непрерывной перегруппировки, а время реконструкции сети не зависит от размера шипиков (~44 с) (Star et al., 2002). При этом высокочастотная стимуляция нейронов приводит к аккумуляции актина в шипиках и сдвигает баланс в сторону образования f-актина. В качестве одного из вариантов быстрой стабилизации актиновой сети при активации NMDAR предлагается Ca^{2+} -зависимое связывание актина гелсолином (Furuyashiki et al., 2002; Fukazawa et al., 2003; Okamoto et al., 2004). Интересно так же то, что при активации стабилизация актина может выступать основным энергосберегающим фактором в клетке при таком энергоёмком процессе как проведение сигналов (Bernstein, Bamburg, 2003). В этом отношении интересна работа Capani et al. (2001). С использованием фотоокисления комплекса эозин/фаллоидин и 3D реконструкции шипиков было показано, что f-актин сконцентрирован в головке и между цистернами ША преимущественно грибовидных шипиков. Причем показано, что пучки f-актина связанные с ША могут контактировать как с периферией ПСУ, так и с областью перфорации ПСУ (Capani et al., 2001).

Стабильность синапса может быть опосредована и взаимодействием актиновой сети с NCAM в ПСУ посредством α -катенинов (Abe et al., 2004). Было показано, что деполяризация нейронов приводит к транслокации β -катенина из дендритов в шипики, где он связывает N-кадгерины (Murase et al, 2002). Факторы трансляции и мРНК в шипиках ассоциированные с f-актином также находятся под контролем CAM (Smart et al., 2003), а регуляция катенинов опосредована тирозинкиназной активностью (Fadel et al., 2001). С актином связано множество других актин связывающих белков, например: Arp2/3, профилин, кофилин, фодрин (α - и β -спектрин), неурабин, синаптоподин, актинфиллин, дребрин, гелсолин, кальпонин, кальдесмон, кортактин, аддуцин и другие (для обз. см. Ethell, Pasquale, 2005). Взаимодействие актин связывающих белков с одной стороны стабилизирует структуру синапса, а с другой регулирует её динамическую стабильность, встраивание, обновление и регуляцию активности рецепторов ПСУ (Schulz et al., 2004). Так, например, недавно Fukazawa с соавторами показали, что ингибирование полимеризации актина латрункулином-A, нарушающим реорганизацию актина, купирует

позднюю фазу ДВП *in vivo* (Fukazawa et al., 2003). α -актинин и кальмодулин – регулируют взаимодействие актина с NMDAR и транспорт AMPAR в шипиках (Shirao, Sekino, 2001; Leonard et al., 2002; Walikonis et al., 2001; Schulz et al., 2004); спинофилин – регулирует фосфорилирование/активацию AMPAR (Hsieh-Wilson et al., 2003). Рецепторные кластеры GluR стабилизируются цитоскелетом различным образом и в различных клетках. Разрушение актиновой сети не влияет на кластеризацию NMDAR, в отличие от AMPAR (Allison et al., 2000), а кластеры AMPAR менее чувствительны к деполимеризации актина в интернейронах (Allison et al., 1998). С другой стороны и сами NMDAR могут влиять на стабильность f-актина; например, кратковременная аппликация NMDA в культуре нейронов приводит к деполимеризации f-актина, а этот эффект блокируется кальциневрином (Halpain et al., 1998; см. также Fischer et al., 2000; Furuyashiki et al., 2002).

Моторные белки и транспорт синаптических рецепторов

Другую группу белков взаимодействующих с цитоскелетом представляют моторные белки из двух родственных семейств – миозинов и кинезинов (Brown, Bridgman, 2003; Lawrence et al., 2004; Dagenbach, Endow, 2004; см. также Kull et al., 1998). Кинезины не наблюдаются в шипиках, но в дендритах участвуют в транспорте цистерн ЭР, компонентов ПСУ и мРНК для локального синтеза белка (Bannaï et al., 2004). Подклассы кинезинов KIF5 и KIF1A отвечают за транспорт везикул содержащих AMPAR (Schnapp, 2003). KIF5, также известный как кинезин-I, в зависимости от взаимодействия с различными кинезин связывающими белками может менять направление движения, и при связывании GRIP1/GluR2 направляется в сторону дендрита (Setou et al., 2002, см. также Rongo, 2001; Verhey et al., 2001; Molloy, Schmitz, 2005; Carter, Cross, 2006). KIF5s так же транспортирует большие мультимолекулярные комплексы несущие мРНК для CaMKII и Arc, везикулы содержащие GAP43 и, как и KIF1B – митохондрии (Kanaï et al., 2004; Steward, Worley, 2001; Hirokawa, Takemura, 2005). Подкласс кинезинов KIF17 транспортируют везикулы содержащие NR2B субъединицы NMDAR (Guillaud et al., 2003). Кинезин KIFC2 в дендритах транспортирует мультивезикулярные тельца (MBT) (Kanaï et al., 2004). Близкородственные кинезины KIF21B и KIF21A могут доставлять везикулы в дистальные дендриты (Marszalek et al., 1999). Как при anterograde транспорте и экзоцитозе, так и при endocytosis и retrograde транспорте взаимодействие моторных белков с везикулами опосредовано адаптерными и поддерживающими белками или их комплексами (Hirokawa, Takemura, 2005). Так, например, транспорт GluR1 и GluR2/3 субъединиц опосредован связыванием KIF5 с адаптерными белками SAP-97, LIN-10 и GRIP, ABP, PICK1, ASF, соответственно, а в транспорте NMDAR посредством KIF17

участвуют PSD-93, PSD-95, SAP-97, SAP-102, mLIN-2, mLIN-7 и mLIN-10 (Setou et al., 2000; Kneussel, 2005; Glodowski et al., 2005). Транспорт окаймленных везикул так же обеспечивается взаимодействием кинезинов с адаптерными белками (Nakagawa et al., 2000; Bonifacino, Traub 2003; Owen et al., 2004). Некоторые кинезины, например KIF1B α , обеспечивают транспорт лишь поддерживающих белков (PSD-95, SAP-97 и др.) (Mok et al., 2002; Prybylowski, Wenthold, 2004).

В последние несколько лет очень активно обсуждается роль транспортной системы синапсов в рециклинге глутаматных рецепторов – их эндоцитоза, сортировки и повторного встраивания в синаптическую мембрану (Kennedy, Ehlers, 2006). Активация рециклинга недавно убедительно показана в ранней фазе ДВП; он проявляется в транслокации эндосом из дендритов в шипики (Park et al., 2006b). Предполагается, что встраивание рецепторов в мембрану и их эндоцитоз происходит в перисинаптической области, например, в области основания шипика. Однако пока однозначно не определены ни области встраивания рецепторов, ни функции адаптерных белков в инициации этих процессов. (Bredt, Nicoll, 2003; Washbourne et al., 2004; Ashby et al., 2004; Kneussel, 2005; Adesnik et al, 2005; Корес et al, 2006; Kennedy, Ehlers, 2006; Derkach et al., 2007). В этом отношении интересны недавно полученные данные Gerges et al. (2004, 2006) об участии в селективном направленном транспорте синаптических рецепторов комплекса белков везикулярного экзоцитоза – экзоциста. Маленькие Rab ГТФазы (Rab 5, 8, 11) и белок eхo70 экзоциста обеспечивают доставку и встраивание AMPAR в плазмамембрану непосредственно в области ПСУ (Kennedy, Ehlers, 2006; Gerges et al., 2005, 2006), но механизм везикулярного транспорта опосредованный экзоцистом пока слабо исследован.

Несмотря на то, что кинезины в шипиках отсутствуют, биполярный транспорт обеспечивают миозины. В дендритных компартментах нейронов обнаружены миозины групп I (MYO1D), II (A и B), V (a и b) и VI. Например, миозин-II интегрирован в цитоскелет шипиков, а миозин IIb и в ПСУ (Husi et al., 2000; Cheng et al., 2000). Поскольку этот белок ассоциирован с мембранными компонентами, включая ША, предполагается, что он участвует в поддержании формы шипика и регулирует его подвижность. Однако реальная роль миозина-II в развитии и функциях шипиков не выяснена, поскольку до периода их формирования мутантные по миозину-IIb мыши погибают (Brown, Bridgman, 2003; Ethell, Pasquale, 2005). Функциональная роль в шипиках отводится только миозином V и VI (Brown, Bridgman, 2003). Миозин-V, обладая структурными особенностями, способен транспортировать цистерны ЭР на большие

расстояния, связываться с GKAP и активировать CaMKII в ПСУ, поставляя ей CaM (Costa et al., 1999; Naisbitt et al., 2000; Vale, 2003; Mallik, Gross, 2004). Считается, что миозин-V в шипиках может участвовать в транспорте компонентов синапса через ножку шипика (Langford, 2002). Шипики мозжечка животных мутантных по миозину-Va не содержат цистерн ЭР (Miyata et al., 2000). Сложилось мнение, что миозин-V может или активно затягивать цистерны ЭР в шипики или, привязывая цистерны ЭР к мембране, делать это пассивно в процессе образования или вытягивания шипика (Wagner, Hammer III 2003). Миозину-V так же отводится роль участника в транспорте белков и мРНК в шипик, а также в ресайклинге рецепторов M4 mAChR, что в свою очередь также требует связи миозина-V с ретикулумом (Volpicelli et al., 2002). Миозин-VI является уникальным; в отличие от других белков своего семейства он движется к «-» концу актиновой нити (Cramer, 2000), т.е. в направлении противоположном движению миозина-V – в сторону ножки шипика. Наибольшая его концентрация в шипиках наблюдается в ПСУ. Поскольку он связан с комплексом AMPAR/SAP97/AP2, предполагается, что миозин-VI обеспечивает эндоцитоз окаймленных везикул несущих AMPAR (Buss et al., 2004; Qiu, 2005 Osterweil et al., 2005).

В шипиках наблюдается высокая концентрация другого моторного белка – динеина. Динеин присутствует в ПСУ, но в количественном отношении наибольшая концентрация динеина наблюдается вблизи цистерн ША. С одной стороны, динеин связан с комплексом GKAP/PSD-95, а с другой он способен взаимодействовать с миозином-V; предполагается, что динеин шипиков является адаптерной молекулой между везикулами и миозином шипика (Naisbitt et al., 2000). Высокая концентрация динеина наблюдается в области межклеточных контактов в эпителиальных клетках, где он непосредственно связан β -катенином и регулирует взаимодействие актинового цитоскелета с микротрубочками (Ligon et al., 2001). Несмотря на отсутствие микротрубочек в шипиках в области ПСУ наблюдается высокая концентрация β -катенина, которая повышается в ответ на активацию синапса (Murase et al., 2002). Этот факт не отрицает возможности участия динеина в локальной транспортировке синаптических белков в непосредственной близости к ПСУ или в перегруппировке липопотеиновых кластеров синаптической мембраны.

6.3. Эндоплазматический ретикулум

Распределение и функции

Ключевую роль в процессах активации синапсов играет динамика ионов Ca^{2+} (Malenka et al., 1988). Цистерны гладкого ЭР являются участвуют в поддержании ионного баланса клетки, в выбросе, захвате и депонировании Ca^{2+} (Meldolesi, 2001). Согласно одним данным, ~50% шипиков гиппокампа содержат цистерны ЭР (Spacek, Harris 1997; Harris 1999), а по другим данным ЭР можно обнаружить во всех шипиках (Harris, Kater, 1994). Локализация ионов Ca^{2+} в ЭР связана как с уровнем активности шипика, так и гетерогенной способностью цистерн ЭР к секвестрации Ca^{2+} (Ungar et al., 1981; Fifkova et al., 1983; Andrews et al., 1988; Buchs, Muller, 1996; Pozzo-Miller et al., 1997; Toni et al., 1999; Pozzo-Miller et al., 2000; Papp et al., 2003). Так, например, быструю секвестрацию Ca^{2+} в стволовых синапсах интернейронов обеспечивает специфическая организация ЭР (Goldberg et al., 2003a). Участие в регуляции концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитоплазме шипиков и дендритов определяется наличием в мембранах ЭР IP_3R и рианодиновых рецепторов (RyR), непосредственных участников CICR (Ca^{2+} -зависимого высвобождения Ca^{2+}) (Villa et al., 1991; Walton et al., 1991; Albrecht et al., 2002; для обз. см. Berridge 1998; Yuste et al., 2000; Fagni et al., 2000; Augustine et al., 2003; Verkhratsky 2005). Между объемом ЭР, площадью ПСУ и объемом шипиков наблюдается положительная корреляция, а сам ЭР занимает 10-20% объема шипика (Harris, Stevens, 1988). Предполагалось, что непосредственная связь цистерн ЭР шипиков и дендритов обеспечивает механизм, посредством которого Ca^{2+} -сигнал, возникающий в синапсе, может передаваться на сотни микрон в сому и индуцировать экспрессию генов (Spacek, Harris, 1997; см. так же Dolmetsch et al., 1998).

Шипиковый аппарат и компоненты системы рециклинга

Многие дендритные шипики содержат специфически организованную органеллу – шипиковый аппарат (ША) – которая наблюдается в 80% крупных шипиков (Gray, 1959, Spacek, Harris, 1997). Уплотненные цистерны ША морфологически напоминают диктиосомы аппарата Гольджи (АГ), однако между цистернами ША присутствует электронно-плотный материал связанный с *puncta adhaerentia* (Spacek, 1985a; Spacek, Harris, 1998). ША у крыс обычно появляется на третьей неделе после рождения (Adinolfi, 1972; Spacek, Harris, 1997). ША, являясь непосредственным продолжением ЭР, дендрита часто располагается в ножках шипиков, в их основаниях или в непосредственной близости к стволовым синапсам. Причем ША можно наблюдать не только в сегментах дендритнов, но и в первичных сегментах аксонов (Gray, Guillery, 1963; Jones, Powell, 1969b; 1969a;

Fifkova, van Harreveld, 1977; Spacek, 1985b; Spacek, Harris, 1997). Предполагается, что в образовании уплощенных цистерн участвуют микротрубочки (Westrum et al., 1980). Хотя роль ША по настоящее время не определена (Steward, Schuman, 2003), накоплены данные, позволяющие предполагать, что ША с одной стороны является хранилищем и даже местом синтеза мембранных белков, а с другой – играет роль подобную АГ. АГ обычно достаточно удален от дендритных шипиков и локализован в перинуклеарной области нейронов и в области проксимальных дендритов, однако апикальные дендриты обладают собственным набором компонентов для процессинга (созревания/гликозилирования) белка (Torre, Steward, 1996; Steward, Schuman, 2003). С цистернами ША часто ассоциированы полирибосомы, а цистерны ЭР и ША шипиков содержат элементы транслоконов (Gray, Guillery, 1963; Steward, Reeves, 1988; Pierce et al., 2000; Pierce et al., 2001; Schnell, Hebert, 2003). В ША присутствуют NMDAR и AMPAR, особенно это заметно в больших шипиках, имеющих большой ША (Nusser et al., 1998; Racca et al., 2000). Интересно, что количество GluR в ША некоторых шипиков превышает количество GluR в ПСУ. В работе Nusser et al. (1998) отмечено наибольшее количество GluRs крупных шипиков локализовано в экстрасинаптической области мембраны (ножка шипика) и в ША. Поэтому предполагается, что в цистернах ША происходит реорганизация и мультимеризация субъединиц рецепторов ПСУ (Nusser et al., 1998; McBain et al., 1999). Поддерживающие белки ПСУ, цитоскелет шипиков и моторные белки структурно связаны с ША, что могло бы обеспечивать интеграцию новосинтезированных компонентов синапса в ПСУ (Naisbitt et al., 2000). Неоднократно отмечалось расположение ША в непосредственной близости к ПСУ и, что особенно важно, связь ША с мембраной ПСУ посредством цистерн ЭР (Dyson, Jones, 1984; Geinisman et al., 1987; Spacek, Harris, 1997; Toni et al., 2001). Однако кроме пространных замечаний об участии в перераспределении мембранных компонентов каких-либо интерпретаций такого феномена не предлагалось. Цистерны ЭР могут располагаться в непосредственной близости к *puncta adhaerentia* в экстрасинаптической области плазматической мембраны шипика (Spacek, Harris, 1998). С ША ассоциированы эндосомы и МВТ, которые наряду с окаймленными везикулами, глубокими инвагинациями плазматической мембраны, аморфными и трубчатыми эндосомами, везикулами разного размера и формы и цистернами ЭР считаются участниками рециклинга синаптических белков (Rosenbluth, Wissig, 1964; Spacek, Harris, 1997; Toni et al., 2001; Cooney et al., 2002; Washbourne et al., 2004; Park et al., 2004; Racz et al., 2004; Park et al., 2006b). Важно то, что все эти органеллы, располагаясь по периферии дендроплазмы в непосредственной близости к стволовым и шипиковым ПСУ,

взаимосвязаны, образуя единую сеть, о чем убедительно свидетельствуют 3D реконструкции ЭР (Spacek, Lieberman, 1980; Spacek, 1985b; Martone et al., 1993; Spacek, Harris, 1997; Cooney et al., 2002).

Интересно, что шипики клеток Пуркинье лишенные цистерн ЭР и ША не способны поддерживать ДД (Miyata et al., 2000), а редукция ДВП в CA1 гиппокампа и нарушения пространственного обучения также связаны с отсутствием ША в шипиках мутантных животных (Deller et al., 2003). Следовательно наличие в шипиках развитой сети ЭР и ША, которые содержат потенциалзависимые каналы, IP_3R , RyR , ионообменники ионные помпы, является важным признаком активности синапса (Yuste et al., 2000; Fagni et al., 2000; Maximov et al., 2003).

6.4. Локальный синтез белка в дендритных сегментах

Считается, что ассоциированные с ЭР рибосомы отвечают за синтез интегральных белков, тогда как цитоплазматический пул рибосом отвечает за синтез белков цитоплазматических. Gray и Guillery (1963) наблюдали скопления рибосом ассоциированных с ША в дендроплазме, но не в дендритных шипиках. В работах конца 70-х начала 80-х годов было показано присутствие полирибосом и в дендритных шипиках различных отделов ЦНС (напр.: Steward, Levy, 1982; Steward, 1983). Полисомы шипиков обычно представлены небольшими кластерами из 3-7 гранул (Chicurel, Harris, 1992). В процессе развития кластеры полисом встречаются значительно чаще, чем у взрослых животных; на 7-й постнатальный день 60% шипиков в основаниях имеют полисомы. Однако вслед за этим частота ассоциации полирибосом с шипиками уменьшается. Было показано, что при регенеративном синаптогенезе, после перерезки эфферентов, количество полисом вблизи дендритных шипиков утраивается (Steward, 1983). Steward и Falk (1986) предположили, что полирибосомы являются маркером растущих шипиков. С использованием 3D реконструкции Steward и Reeves подсчитали, что ~25% шипиков 3Ф в основаниях имеют полисомы, которые связаны с цистернами ЭР проникающими в шипик. В основаниях шипиков гранулярных клеток 3Ф располагалось около 80% полирибосом шипиков (Steward, 1988). Около 60% от всех полирибосом дендритных сегментов располагалось в основаниях шипиков, а половина из них связана с цистернами ЭР. В стволовых синапсах рибосомы располагаются непосредственно под ПСУ (Steward et al., 1996). Полученные данные свидетельствовали о том, что полисомы и цистерны ЭР в основании шипиков, а также ША являются компонентами системы синтеза и процессинга белков связанных с работой синапса (Steward, Reeves

1988; см. так же Steward et al., 1997; Steward, Shuman, 2001). Недавно сотрудниками лаборатории Harris было показано, что в ранней фазе ДВП происходит транслокация рибосом из дендроплазмы в шипики, а количество шипиков содержащих рибосомы возрастает более чем в 3 раза (Ostroff et al., 2002). Авторы считают, что наличие рибосом в шипиках может служить маркером активных синапсов/шипиков участвующих в поддержании ДВП.

В последние годы, проделана огромная работа по выявлению ответа белок синтезирующей системы (БСС) дендритов и шипиков на синаптическую активацию, как на уровне транскрипции, так и на уровне регуляции трансляции. По временным характеристикам ответа БСС многие мРНК относят к мРНК генов раннего ответа (Immediate Early Gene – IEG) (напр.: Abraham et al., 1994; Steward et al., 1998; см. также Josselyn et al., 2002; Cavallaro et al., 2002; Barco et al., 2005; Burke, Barnes, 2006 - [nrm1809.pdf](#)). Активация экспрессии IEG запускается с активации CaMKII. Одним из субстратов CaMKII фосфорилируемых при ДВП является родственный фермент CaMKIV (Kasahara et al., 2001; Kang et al., 2001). В тоже время увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в поздней фазе ДВП увеличивает продукцию цАМФ за счет аденилатциклазы-1 (AC1) (Wang, Storm 2003) и, соответственно, активацию PKA, регулирующей в свою очередь активность MAPK (Huang et al., 2000). В ядре нейрона CaMKII, CaMKIV, PKA и MAPK участвуют в активации цАМФ-зависимого фактора инициации транскрипции ДНК (cAMP-responsive element binding protein или CREB) (Impey et al., 2004; Lonze, Ginty 2002; Bailey et al., 2004). Считается, что CREB1 является первичным транскрипционным фактором в каскаде генной экспрессии приводящей к долговременным структурно-функциональным изменениям эффективности синапсов (Alberini et al., 2005). На трансгенных мышах с постоянно активным аналогом CREB (VP16-CREB) было показано, что даже слабая активация синапсов в CA1 способна вызывать и поддерживать позднюю фазу ДВП. Роль конститутивно активного CREB связывается с экспрессией определенных генов, в частности генов продинорфина, BDNF и CAM (Barco et al., 2005). Считается, что запуск экспрессии IEG является достаточным для поддержания поздней фазы ДВП (Jones et al., 2001; Bozon et al., 2003). Одним из наиболее показательных ответов на локальную стимуляцию дендритов 3Ф является селективный и быстрый синтез и направленный транспорт Arc мРНК из сомы нейронов в стимулированные сегменты дендритов (Steward et al., 1998; Palacios, Johnston 2001; Steward, Worley 2001). Увеличение концентрации IEG мРНК отмечено уже спустя 15 мин после активации; концентрация IEG

мРНК достигает порога в дендритах в течение 2-4 часов и затем снижается, к 8-12 часам возвращаясь к исходному уровню (Steward et al., 1998; Wallace et al., 1998).

Доставляемая в дендритные сегменты мРНК существует в неактивной форме (Huang et al., 2003), а локальный синтез белка обеспечивается регуляцией трансляции, как на этапе инициации, так и элонгации. Poly-A последовательность 3'-нетранскрибируемой области мРНК (3'UTR) необходима для активации трансляции (Wells et al., 2001). Используя трансгенных животных с подменой 3'UTR мРНК для CaMKII α Miller с соавторами показали необходимость локального синтеза этого белка в дендритах для нормальной работы синапсов и поддержания поздней фазы ДВП (Miller et al., 2002; см. также Ouyang et al., 1999; Steward, 2002). Совсем недавно, было показано, что уже через 5 мин после индукции ДВП в дендритах возрастает количество белка eEF1A (фактора элонгации) и сохраняется в течение 3-х часов. При этом воздействие блокатора синтеза белка анизомицина, блокирующего локальный синтез eEF1A, купирует и позднюю фазу ДВП, снижая вызванные ответы до уровня сходного со слабой активацией (Tsokas et al., 2005; см. также eIF2A у Costa-Mattioli et al., 2005 и Klann, Dever, 2004).

Поскольку между шипиками и дендритами не наблюдается дифференциального распределения мРНК и транспорта гранул содержащих мРНК при активации дендритных сегментов, считается, что мРНК присутствует не только в дендритах, но и в шипиках (Kuhl, Skehel, 1998; Tiruchinapalli et al., 2003). Различными методами показано, что дендриты и шипики содержат мРНК для множества белков, включая компоненты ПСУ, цитоплазматические, цитоскелетные и мембранные белки, том числе и белки участвующие в запуске и поддержании ДВП, факторы регуляции трансляции и процессинга белка (напр.: Tiedge, Brosius, 1996; Martone et al., 1996; Gazzaley et al., 1997; Gardiol et al., 1999; Tiruchinapalli et al., 2003; Raymond et al., 2000). Еще в ранних работах отмечалось, что шероховатый и гладкий ЭР представлены неразрывными разветвленными цистернами (напр. Gray, Guillery, 1963; Spacek, 1970, fig.15, p.439 и Рис.3), но важно то, что компоненты локального синтеза белка, компартменты транс-Гольджи сети и компоненты системы рециклинга синаптических белков связаны в единую систему, расположенную в основаниях синапсов (Spacek, 1985b p.235; Spacek, Harris, 1997; Cooney et al., 2002).

В настоящее время значительное внимание уделяется исследованию нетранслируемых микро-РНК в БСС дендритов (Martin, Kosik, 2002; Schratt et al., 2006). Несмотря на значительные успехи, многие детали механизмов участвующих в селективной локализации компонентов БСС дендритных сегментов и шипиков не

раскрыты. Тем не менее, накоплено достаточное количество фактов подтверждающих наличие локального синтеза белка. На физически и оптически изолированных дендритах было показано встраивание предшественников аминокислот (Torre, Steward, 1992; 1996), и синтез GFP белков (Aakalu et al., 2001; Job, Eberwine, 2001a; Sutton et al., 2004). Исследованиям локального синтеза белка в дендритных сегментах посвящены специальные обзоры (Schuman, 1999; Wells et al., 2000; Smith et al., 2001; Job, Eberwine, 2001b; Steward, Shuman, 2001; Jiang, Schuman, 2002; Steward, Schuman, 2003; Kelleher III et al., 2004).

7. Функции дендритных шипиков

«Какова функция шипиков? До сих пор у нас не было абсолютно никаких предположений» (Cajal, 1911, p.61). Рамон и Кахал рассуждал о том, что шипики могли бы представлять некое подобие корневых волосков растений, способствующих питанию дендритов, а если бы шипики аккумулировали электрические сигналы, то увеличение числа шипиков увеличивало бы рецептивную поверхность дендрита, обеспечивая более плотное взаимодействие дендритов с аксонами (там же). С тех пор ключевая роль шипиков обсуждается в рамках передачи синаптических сигналов. Дендритным шипикам приписывалось более 20 различных функций. Эти предположения и теории строились на основе морфологических и биофизических исследований, математических моделей, данных электрофизиологии, биохимии или прижизненных наблюдений при помощи лазерной микроскопии (для обз см. Shepherd, 1996).

7.1. Модели пассивной и активной мембраны шипиков

Дендритные шипики столь малы и столь интегрированы в нейропиль, что прямое электрофизиологическое изучение электрических свойств их мембран *in situ* практически невозможно. Первые теоретические модели предполагали пассивность постсинаптической мембраны. Особое значение уделялось толщине и длине ножки шипика и наличию в ней цистерн ЭР и ША, что в целом сводилось к ослаблению ВПСП (напр.: Wilson, 1984). Считалось, что эффективность синапсов расположенных на шипиках соответствует эффективности стволовых синапсов или даже меньше. К середине 80-х разрабатываются также различные модели с учетом активности мембраны шипика. В этих работах было показано, что шипики могут не просто являться компартментами высокой $[Ca^{2+}]_i$, но и служить усилителями синаптического ответа (Miller et al., 1985; Perkel, Perkel, 1985; Shepherd et al., 1985). Это предполагало, что в мембране шипика присутствуют потенциалзависимые каналы; по достижении порога активации они открываются и

усиливают ВПСР. Распространение ПД между соседними шипиками в дистальных сегментах дендритов обсуждалось и в других работах (Kelso et al., 1986; Segev, Rall, 1988; Zador et al., 1990; Baer, Rinzel, 1991; Rose, Call, 1992; De Schutter, Bower, 1994a-c; Rapp et al., 1996). Как в модельных расчетах, так и расчетах на базе 3D реконструкций было показано, что тонкая ножка шипика не препятствует распространению заряда к дендриту, но ограничивает диффузию активированных молекул, Ca^{2+} , вторичных мессенжеров в соседние шипики (Wickens, 1988; Harris, Stevens, 1989; Zador et al., 1990; Koch, Zador, 1993; Svoboda et al., 1996; Sabatini et al., 2002). Разработка техники конфокальной микроскопии и потенциалзависимых индикаторов позволила проводить измерения динамики ионов Ca^{2+} в дендритах и шипиках; было получено наглядное подтверждение ранее предполагавшейся (напр.: Fifkova et al., 1983; Malenka et al., 1988) роли шипиков в компартментализации Ca^{2+} при активации синапсов (Muller, Connor, 1991; Guthrie et al., 1991). Также было показано, что ножки шипиков различных типов не являются абсолютным барьером для диффузии Ca^{2+} , но высокие концентрации Ca^{2+} ограничиваются головками шипиков (Guthrie et al., 1991). На сегодняшний день сложилось мнение, что шипики являются ключевыми единицами интегрирующими входящие сигналы (Zador et al., 1990) и основная их функция заключается в компартментализации высоких, токсичных для клетки $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Yuste, Denk, 1995). Сохраняется тенденция считать, что дистальным дендритам присущи кальциевые ПД (Stuart et al., 1999). Но интересно, что компартментализация высоких $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в стволовых синапсах интернейронов регулируется специфической организацией ЭР, но не пространственной компартментализацией как это наблюдается в шипиках (Goldberg et al., 2003a; 2003b). Следовательно, у шипиков могут быть и иные функции. По мнению Goldberg et al. шипики обеспечивает компартментализацию более медленных, NMDAR-зависимых токов Ca^{2+} , в отличие от AMPAR-зависимых токов Na^+ . Недавно с использованием потенциалзависимых индикаторов блокаторов различных проводимостей было напрямую показано, что ножки шипиков не являются барьером для ПД (Nuriya et al., 2006), при этом авторы предполагают наличие потенциал зависимых Na^+ каналов в мембране шипиков. За последнее десятилетие точка зрения на «пассивность» мембраны шипика значительно изменилась (для обз. Johnston et al., 1996; Georgiev, 2004; Tsay, Yuste, 2004; Migliore, Shepherd, 2002, 2005).

7.2. Форма и функции шипиков

В плане стабильности структуры шипиков/синапсов доминирует две точки зрения на их функции; первая безотносительна динамическим изменениям формы. С одной стороны шипики являются областью где происходят процессы связанные и колебаниями концентраций Ca^{2+} , и соответственно, областью в которой запускаются процессы синаптической пластичности, приводящие к долговременным изменениям «силы» синапсов; в плане потенциалзависимой Ca^{2+} проводимости (детектора совпадения сигналов) сопряженной с двунаправленной пластичностью (ДВП/ДД) шипики выступают в качестве высокочастотного фильтра. Обладая электрогенной мембраной, шипики являются «горячими зонами», подобно перехватам Ранвье аксонов генерируют ПД и способны работать как усилители ВПСП. Поскольку дендрит получает множество синаптических входов, то в плане дендритной интеграции синаптических сигналов шипики являются участниками низкочастотной фильтрации ВПСП (для обз. см. Tsay, Yuste, 2004). Еще в первых моделях (с пассивной мембраной шипиков) отмечалось, что форма шипиков может сильно влиять на их функциональные свойства. Поэтому вторая точка зрения основывается на том, что за счет изменения формы шипиков, изменяются и их электрические свойства (Holcman, Schuss, 2005; Hayashi, Majewska, 2005). Подвижность шипиков предполагалась и ранее (Штарк, 1970; Chang, Greenough, 1984; Woolley et al., 1990; Popov et al., 1992a; 1992b). Однако быстрое изменение формы шипиков впервые предположил Крик. Крик задался вопросом, если существует управляемое изменение формы головки и ножки шипика, то как это управление осуществляется на молекулярном уровне (Crick, 1982). Предлагалось множество моделей динамики Ca^{2+} в дендритных шипиках (напр.: Zador et al., 1990; Koch, Zador 1993; Volfovsky et al., 1999; Majewska et al., 2000a; 2000b и др.), однако с позиции Крика динамика Ca^{2+} никогда не рассматривалась до недавнего времени. Недавно в культуре гиппокампальных нейронов было показано (Korkotian, Segal, 2001), что вход Ca^{2+} в шипик приводит к быстрому (десятые доли секунды) сокращению длины шипика, которое связано с полимеризацией актина. Протоколы стимуляции, запускающие ДВП, приводят к увеличению полимеризации актина дендритных шипиков (Fukazawa et al., 2003; Okamoto et al., 2004) и к значительному увеличению внешнего диаметра их головок (Matsuzaki et al., 2004). Наоборот, при ДД наблюдается уменьшение размеров головок шипиков (Okamoto et al., 2004; Zhou et al., 2004) и даже исчезновение шипиков (Nagerl et al., 2004). Световая микроскопия не позволяет оценить реальную морфологию шипика, включая его объем, площадь поверхности, толщину и длину ножки. Однако Noguchi et al. считают, что

если размер головки отрицательно коррелирует с $[Ca^{2+}]_i$ головки и положительно с $[Ca^{2+}]_i$ дендрита, то в плане диффузии Ca^{2+} из шипика в дендрит с увеличением головки шипика будет увеличиваться и проводимость/толщина ножки (Noguchi et al., 2005). В последних работах японских коллег под руководством Kasai (Kasai et al., 2003) развивается идея того, что тонкие шипики отвечают за процессы потенциации, тогда как большие шипики могут представлять физическую основу для долговременной памяти, в потенциации не участвуя. Причем в качестве механизма предотвращающего «повторную» потенциацию синапсов на больших шипиках предлагается снижение $[Ca^{2+}]_i$ за счет более быстрой диффузии Ca^{2+} из шипика через широкую ножку (Matsuzaki et al., 2004; Noguchi et al., 2005). Такая точка зрения на механизмы регуляции Ca^{2+} в шипиках является реминисценцией «пассивного» шипика (Noguchi et al., 2005) и абсолютно противоположна результатам лаборатории Muller (и не только), в которых считается, что именно крупные синапсы/шипика являются непосредственными мишенями потенциации (Buchs, Muller, 1996; Toni et al., 1999). Существует и несколько отличный взгляд. Наблюдая непрямую флуоресценцию Ca^{2+} в шипиках после его фотолиза Korkotian et al. показали, что силу коммуникации между шипиком и дендритом ножка шипика контролирует, но не столько за счет объема ее цитоплазмы, сколько за счет длины и наличия механизмов активного удаления Ca^{2+} из этой области (Korkotian et al., 2004a; 2004b). В работах Korkotian и Segal предполагалось два механизма изоляции высокой $[Ca^{2+}]_i$ от дендрита, за счет удлинения ножки и за счет увеличения числа помп Ca^{2+} . Теоретические расчеты Holcman показали, что добавление в мембрану ножки одной/двух помп может сдвигать баланс в сторону компартментализации высокой $[Ca^{2+}]_i$. Такая точка зрения согласуется с данными Goldberg et al. на стволовых синапсах интернейронов (см. выше). Ножке шипика в этом случае отводится роль *активного* фильтра ионов Ca^{2+} диффундирующих в дендроплазму (см. также Sabatini et al., 2002; Araya et al., 2006).

Диффузия через ножку шипика может контролироваться не только формой/подвижностью (Holcman et al., 2004), но и уровнем активности синапса, мембраны шипика и дендрита. В плане диффузии активированных молекул и белков интересна работа Bloodgood и Sabatini (2005). Совмещая флуоресцентные методы и электрофизиологию, авторы показали, что для молекул GFP-белка PAGFP (28kDa) и молекул зеленого флуорофора HPTS (500Da, на основе пиранина, сходного по размерам с вторичным мессенджером цАМФ) ножка шипика является динамичным диффузионным барьером. В среднем у шипиков сопротивление ножки невелико и составляет ~4-50 МОм (Svoboda et al., 1996). Bloodgood и Sabatini обнаружили, что у некоторых шипиков

диффузионное сопряжение с дендритом практически отсутствует, но через какое-то время может обратимо изменяться. Т.о. диффузионный барьер, образуемый ножкой шипика, не статичен, но динамичен. С использованием блокады рецепторов и каналов было показано, что сопротивление ножки резко возрастает при понижении спонтанной ГАМК-эргической активности, тогда как блокада AMPAR, NMDAR и потенциалзависимых Na^+ каналов лишь слабо повышает диффузию. Эффект блокады диффузии не приписывается исключительно торможению ГАМК-эргической передачи. Спаренный, но не отдельный, протокол стимуляции (фотолиз глутамата и антидромный ПД) ограничивал диффузию как PAGFP, так и HPTS из головки шипика. Т.о. активное ограничение диффузии вторичных мессенжеров и активированных белков между головкой шипика и дендритом при достаточной активации синапса может служить особым фактором в регуляции синаптической пластичности. Перемещение белков может находиться под контролем моторных белков, но параметры диффузии маленьких молекул HPTS в этих экспериментах не отличались от таковых у белков. Авторы считают, что скорость диффузии молекул из головки в дендрит определяется ни объемом головки, ни длиной ножки, ни коэффициентом диффузии молекулы, но лишь площадью поперечного сечения ножки, которая находится под контролем активности шипика и дендрита; при активации сопротивление ножки может возрасти до 1 ГОм. В качестве механизма регуляции диффузии авторы предполагают быстрое сжатие ножки в поперечном сечении, что вполне согласуется с результатами Korkotian и Segal (2001).

8. Морфологические изменения синапсов при долговременной потенциации

Морфологические изменения синапсов, отражающие изменения эффективности синаптической передачи при ДВП, изучаются уже более 30 лет (напр.: van Harreveld, Fifkova, 1975). Однако до сих пор соответствующая роль компонентов синаптического комплекса в процессах нейрональной пластичности и особенно в обучении и памяти не выяснена (Lynch, 2004), а тема взаимоотношений между морфологическими изменениями и синаптической пластичностью остаётся предметом дискуссий. Основная идея этих исследований заключается в том, что кратковременные изменения эффективности синаптической передачи (минуты) определяются изменениями на молекулярном уровне, а долговременные связаны с изменениями морфологии

синапсов и перестройкой нейрональных связей (Bailey, Kandel, 1993; Moser, 1999; Bailey et al., 2000; Harris et al., 2003; Levi, 2004; Segal, 2005). В большинстве работ касающихся морфо-функциональных изменений синапсов при ДВП внимание уделяется постсинаптической области, а более конкретно – дендритным шипикам (Segal, 2005; Thompson et al., 2005). Морфологических работ касающихся изменений пресинаптических бутонов в процессе ДВП не много. В основном это работы связанные с измерениями динамики пулов пресинаптических везикул, объема пресинаптических бутонов, площади активной зоны и структуры пресинаптической сети. Сведения о структурно-функциональных изменениях астроглиального микродомена (Bushong et al., 2002) при ДВП отсутствуют. Этому есть объективные причины – методологическая сложность морфометрии как таковой, и в особенности морфометрии на серийных срезах и 3D реконструкции *en passant* бутонов и гигантского объема занимаемого астроцитом, а также сложность в определении критериев оценки объемных характеристик объектов, как это отмечалось и ранее (напр. Fifkova, van Harreveld, 1977, p.214, 216). В подавляющем большинстве работ основное внимание уделено изучению синапсов в ранней фазе ДВП (от первых минут до 2-х ч). Хотя по морфологическим изменениям синапсов при ДВП накоплено немало данных, многие из них противоречивы (для обз. см. Yuste, Bonhoeffer, 2001; Thompson et al., 2005), а некоторые результаты работ полученные на одиночных срезах с использованием стереологических расчетов подчас не поддаются интерпретации. Несогласованность результатов с одной стороны может быть следствием отсутствия устойчивых морфологических изменений в ранней фазе ДВП, но при этом результаты полученные на серийных срезах с использованием 3D реконструкции синапсов сходны. Другими ограничивающими интерпретацию факторами являются результаты полученные с использованием световой микроскопии и культивирования нейронов, более того нейронов с различных онтогенетических стадий. Исследованиям структуры синапсов в поздней фазе ДВП посвящены лишь единичные работы (Fifkova, van Harreveld, 1977; Chang, Greenough, 1984; Мошков, Петровская, 1983; Weeks et al., 1999; Stewart et al., 2000; Geinisman, 2000). Убедительные данные об изменениях ультраструктуры синапсов в поздней фазе ДВП отсутствуют, хотя и предполагается, что именно в этот период, связанный активацией экспрессии генов и с повышенным синтезом белка, структурные изменения наиболее вероятны (Stewart et al., 2000; Luscher et al., 2000).

8.1. Изменения количества шипиков и синапсов

Считается, что на ранней стадии ДВП (до 1–2 ч) в синапсах перфорирующего пути можно наблюдать изменения формы компонентов синапсов, нежели изменение количества синапсов (Desmond, Levy, 1986a; 1988a; Buchs, Muller, 1996). Другие данные показывают, что в течение первых 10-15 мин после генерации ДВП *in vivo* в CA1 на треть увеличивается количество стволовых синапсов (Lee et al., 1980). Результаты флуоресцентной микроскопии показывают, что для образования новых шипиков после индукции ДВП в культуре требуется не менее 20 мин (Maletic-Savatic et al., 1999; Grutzendler et al., 2002). По другим данным требуется не менее 30 мин для проявления синаптогенеза (Kirov et al., 2004). Engert и Bonhoeffer (1999) стимулировали коллатерали Шаффера в культуре срезов гиппокампа в среде с высокой $[Cd^{2+}]$. В результате локализованной суперфузии отдельных сегментов дендритного дерева пирамид CA1 раствором со стандартной экстраклеточной концентрацией ионов ДВП проявлялась только в этой локальной области нейрона. В отличие от других областей в суперфузируемом участке наблюдался рост новых шипиков, спустя 30 мин после стимуляции, и шипики сохранялись вплоть до 12 ч. Trommald et al. (1996) обнаружили увеличение числа разветвленных шипиков. Andersen и Soleng (1998) на светомикроскопическом уровне спустя 30-40 мин после запуска ДВП наблюдали увеличение числа шипиков на 30-40%. Однако от этих результатов отличаются результаты полученные с использованием 3D реконструкций синапсов. Спустя 1 ч после химического запуска ДВП *in vitro* Stewart et al. не наблюдали ни изменения числа шипиков, ни соотношений их типов (Stewart et al., 2005). Sora и Harris изучали синапсы в CA1 гиппокампальных слайсов спустя 2 ч после генерации ДВП *in vitro* и также не обнаружили достоверного увеличения числа синапсов всех категорий (Sora, Harris, 1998). Количество разветвленных шипиков при ДВП уменьшалось почти втрое, но вследствие их малочисленности не достоверно (Sora, Harris, 1998). Hosokawa et al. (1995) также не наблюдали увеличения числа шипиков спустя 3 ч после химически вызванной ДВП, но отмечали удлинение маленьких шипиков.

Спустя 8 часов после генерации ДВП *in vitro* в CA1 наблюдалось повышенное количество стволовых и пеньковых синапсов (Chang, Greenough, 1984). Спустя 24 часа после тетанизации Weeks et al. (1999) не обнаружили достоверного увеличения общего количества синапсов, однако в более ранней работе в этой же фазе ДВП эти же авторы

сообщали, что количество синапсов положительно коррелирует с уровнем потенциации (Weeks et al., 1998). Stewart et al. спустя 24 ч после запуска ДВП *in vivo* наблюдали увеличение числа синапсов почти на 50% (Stewart et al., 2000; Mezey et al., 2004). На окрашенных по Golgi нейронах Rusakov et al. (1997) наоборот наблюдали значительное уменьшение количества шипиков в этот же период. Достоверного увеличения числа аксо-дендритных синапсов в ЗФ спустя 13 дней поддержания ДВП обнаружено не было (Geinisman, 2000). Большинство этих во многом противоречивых данных получено с использованием светомикроскопических методов с ограниченным разрешением или с использованием стереологических методов анализа.

8.2. Изменения размеров шипиков

Другим привлекательным механизмом увеличения эффективности синаптической передачи полагается увеличение размеров синапсов или дендритных шипиков (Yuste, Bonhoeffer, 2001; Harris et al., 2003). Считается, что в основе увеличения размеров шипиков лежит два механизма. Первый связан с увеличением проницаемости мембраны шипика для Na^+ вследствие активации (осмотический), тогда как второй и более продолжительный связан с активацией биосинтетических процессов (Fifkova, van Harreveld, 1977). При активации синапсов гиппокампа *in vivo*, в срезах мозга и в культуре нейронов наблюдается обратимое увеличение размеров шипиков. Matsuzaki et al. наблюдая флуоресценцию отдельных шипиков (GFP экспрессируемый под промотором β -актина) в срезах гиппокампа крысят обнаружили, что изменение размеров сильно варьирует между шипиками; увеличение размеров маленьких шипиков устойчиво, тогда как крупные шипики увеличиваются сразу после стимуляции (спустя 20-60 с) но вскоре их размеры возвращаются к исходным (Matsuzaki et al., 2004). В культуре нейронов гиппокампа размеры шипиков возвращаются к исходным через 20 мин после стимуляции (Okamoto et al., 2004), тогда как в срезах гиппокампа взрослых животных увеличение размеров головок шипиков обратимо в течение 6-10 мин (Lang et al., 2004). Ранее отмечалось, что индукция ДВП в oML ЗФ мышей *in vivo* приводит к увеличению относительной средней массы всех шипиков на ~40% к 10-60 мин после стимуляции, а к исходному уровню размеры шипиков возвращались в течение суток (Fifkova, van Harreveld, 1977). [Очень интригует сравнение данных Фифковой и Ван Харревельда с результатами Sutton et al. (2006) полученными недавно (см. разд. 6.1., Количество и распределение рецепторов в

ПСУ).] Противоположно направленные изменения наблюдались в iML 3Ф, но с более быстрым восстановлением. Спустя 2 ч после химически вызванной ДВП достоверное увеличение площади поверхности наблюдалось только у грибовидных шипиков (Stewart et al., 2005). Способность шипиков менять свою форму (например, диаметр или длину ножки) является одним из основных механизмов пластичности шипиковых синапсов (см. Nimchinsky et al., 2002; Keller 2002). Первичным этапом синаптической перестройки в результате активации считается реорганизация актинового цитоскелета (Matus 2000; Matus et al., 2000). Сообщалось, что ДВП приводит к расширению ножек шипиков в СА3 гиппокампа *in vitro* крыс (Мошков с соавт. 1977, 1980; Мошков, Петровская, 1983) и в 3Ф мышей *in vivo* (Fifkova, Anderson, 1981; см. также раздел. 7.2.). Другие исследователи не обнаружили изменений диаметров ножек шипиков в СА1 гиппокампа (Chang, Greenough, 1984; Lee et al., 1980). Одновременно сообщалось об уменьшении длины ножек в oML 3Ф (Fifkova, Anderson, 1981) и недостоверное в СА1 гиппокампа (Chang, Greenough, 1984). Следует однако отметить, что для электронно-микроскопического анализа Fifkova и Anderson (1981) выбирали шипики только с длинными ножками, а большинство флуоресцентных подходов ограничено в оценке реальных размеров шипика, хотя бы по той причине, что увеличение внешнего диаметра может быть связано с инвагинацией шипика и изменением его формы от булавовидной до чашевидной, без изменения объема (см. напр.: Roelandse et al., 2003).

8.3. Изменения структуры постсинаптических уплотнений

Сила синапсов коррелирует с размером головки шипика, который в свою очередь коррелирует с размером ПСУ и, соответственно, с количеством рецепторов в постсинаптической мембране (см. разделы 5.4. и 6.1.). Поэтому вполне вероятно, что если наблюдается рост размеров шипиков, то ДВП должна бы сопровождаться увеличением размеров ПСУ. Работы в этом направлении можно разделить на стереологические, на одиночных срезах, и использующие 3D реконструкцию. Но важно отметить то, что несмотря на использование серийных срезов и 3D реконструкции площадь, занимаемая ПСУ на шипике, в работах К.М. Harris определялась как сумма длин профилей ПСУ на отдельных срезах.

Через 10-15 мин и 2 ч после стимуляции срезов гиппокампа *in vitro* Lee et al. и Chang и Greenough не обнаружили изменений длины профилей ПСУ в *stratum radiatum* СА1 области (Lee et al., 1980; Chang, Greenough, 1984). В СА3 области гиппокампа

наблюдалось даже уменьшение длины профиля ПСУ с 720 до 600 нм, хотя и не достоверное, но увеличивалась толщина ПСУ (Мошков с соавт, 1980; Мошков, Петровская, 1983). Однако позднее, Desmond и Levy (1986b) спустя 60 мин ДВП в mMML 3Ф, обнаружили увеличение площади занимаемой ПСУ на крупных вогнутых шипиках, тогда как у других шипиков этот параметр не менялся. Это согласуется с результатами Buchs и Muller (1996), наблюдавшими спустя 30-40 мин после запуска ДВП увеличение длины профилей ПСУ в проактивированных шипиках, 60% из которых имели перфорированные ПСУ. Спустя 24 ч после индукции ДВП Weeks et al. (1999) обнаружили увеличение количества перфорированных синапсов.

Изучения эффектов ДВП спустя 2 ч в гиппокампальных слайсах с использованием 3D реконструкции показало, что в среднем ни размер макулярных ПСУ, ни размер перфорированных ПСУ, ни занимаемые ими площади, ни соотношение форм ПСУ не меняются (Sora, Harris, 1998). На этом основании Sora и Harris предположили, что ДВП может быть связана с перераспределением размеров/силы существующих синапсов, иными словами, с изменением «синаптической конфигурации» без изменения средних количества и размеров синапсов (сравни раздел. 3.6.). Ostroff et al., показали, что спустя 2 ч после запуска ДВП ПСУ шипиков с полирибосомами были крупнее. Авторы считают, что локальный синтез белка обеспечивает закрепление ростовых изменений только в тех синапсах, которые поддерживают ДВП (Ostroff et al., 2002). Однако эффекты химически вызванной ДВП отличаются; недавно было показано, что после 2 ч ДВП в срезах гиппокампа при двукратном уменьшении числа макулярных ПСУ и отсутствия изменений объемов и площадей ПСУ увеличивалось количество сложных синапсов, перфорированных и сегментированных (Stewart et al., 2005).

В литературе неоднократно отмечалось, что повышение синаптической активности сопровождается увеличением числа перфорированных ПСУ (см. напр. Triller, Korn, 1985 и обсуждение в Edwards, 1995). Высказывались предположения, что частота появления перфораций ПСУ связана с изменением состава и/или свойств САМ и перегруппировкой актиновой сети в области ПСУ (Matus, 2000; Spacek, Harris, 2004). Группой Гейнисмана развивалась идея увеличения числа синапсов при ДВП за счет механизма обратимого «раскалывания» ПСУ и шипиков (Geinisman, 2000; см. раздел 5.4.). Другие исследователи являются противниками такой точки зрения (Trommald, Hulleberg, 1997). Harris рассуждает о том, что в случае «раскалывания» разветвленные

шипикки должны бы были контактировать с дочерними активными зонами одного мультисинаптического бутона, чего никогда не наблюдалось (Harris, Stevens, 1989; Harris et al., 2003).

8.4. Изменения кривизны синапса

В работах по изучению морфологических изменений синапсов в ранней фазе ДВП в ЗФ отмечалось изменение формы головок шипиков (Desmond, Levy, 1983; 1988a,b; Levy et al., 1990). Наиболее заметные изменения в стимулированной области проявлялись в увеличении и инвагинации шипиков. Но Chang и Greenough (1984), обнаружив уменьшение длин профилей шипиков при ДВП, посчитали это признаком округления шипиков и уменьшения вогнутости их головок. Ранее предпринимались оценки кривизны синапсов в различных областях мозга и экспериментальных моделях (напр.: Cooke et al., 1974; Dyson, Jones, 1980; Wesa et al., 1982; Nieto-Sampedro et al., 1982; Desmond, Levy, 1983; Rees et al., 1985; Keller et al., 1992; Ryugo et al., 1996). Неоднократно отмечалось увеличение кривизны синаптических контактов после ДВП и вызванной судорожной активности (напр.: Marrone, Petit, 2002; Marrone et al., 2004a; Connor et al., 2006). В ранних работах значения кривизны (положительной или отрицательной) синаптической щели определялись радиусами описанных около щели окружностей (Dyson, Jones, 1980), или величиной нормали от синаптической щели к хорде дуги ПСУ (напр.: Cooke et al., 1974; Wesa et al., 1982). Но чаще всего давалась и дается качественная оценка – профили синапсов плоские, подковообразные, омега-подобные или иррегулярные («U-shaped», «horseshoe-shaped» или «omega-shaped» и т.д.) (напр.: Cotman et al., 1973; Nieto-Sampedro et al., 1982; Marrone et al., 2004a). Недавно Marrone et al. использовали несколько иной подход. Кривизна щели определялась как величина тупого угла равносоставленного треугольника с двумя вершинами на краях ПСУ и третьей вершиной, на пересечении медианы с синаптической щелью (Marrone et al., 2004b). Во всех работах кривизна определялась на одиночных срезах, и подход Marrone et al. (2004b) реально не отличается от используемых ранее (напр.: Jones, Devon, 1978; Dyson, Jones, 1980; Wesa et al., 1982). Эти подходы представляют собой описание сложной поверхности произвольной формы планиметрическими измерениями ее одиночных произвольных сечений. Одним из показательных примеров сложности оценки кривизны синапса может служить форма синапса седловидной формы (гиперболический параболоид), сечения

которого во взаимоперпендикулярных плоскостях обладают как отрицательной, так и положительной кривизной. Сумма кривизн таких сечений будет соответствовать кривизне плоской поверхности. Поэтому результаты измерений кривизны синапсов на одиночных срезах без 3D реконструкции интерпретировать, как минимум, сложно. Как свидетельствуют и сами авторы этих работ оценить кривизну плоскости синаптической щели, вследствие сложности формы синапсов (Cotman et al., 1973) порой просто невозможно (Marrone, Petit, 2002), тем более ситуация осложняется наличием ламеллоподий, филоподий и спинул на головках шипиков.

Существует две противоположные точки зрения на зависимость кривизны синапса от его активности. С одной стороны, на основании измерений кривизны синапсов наркотизированных животных и животных в различных стадиях онтогенеза, считалось, что увеличение отрицательной кривизны (вогнутое PCSU) свидетельствует о пониженной функциональной активности (Dyson, Jones, 1980). Однако в настоящее время доминирует противоположная точка зрения (Marrone, Petit, 2002). С использованием mGFP Roelandse et al. наблюдали гомеостатическую пластичность шипиков как в культуре, так и *in situ* в секундных временных диапазонах. Подвижность филоподий и ламеллоподий, связанная с динамикой актинового цитоскелета, ограничивалась головками шипиков порой инкапсулирующих пресинаптические бутоны (Roelandse et al., 2003). Используя модификации методов фиксации ткани, авторы показали, что 50% шипиков взрослых животных имеют вогнутую форму. Таким образом, по данным Roelandse et al. и, например, Desmond и Levy величина и направленность кривизны области контакта пресинаптического бутона и дендритного шипика могла бы отражать уровень активности синапса. В этом отношении использование 3D реконструкции является первым шагом для развития достойной альтернативы оценкам кривизны синапса на одиночных срезах.

Анализ обширной литературы касающейся ультраструктурных изменений синапсов в ходе ДВП свидетельствует о том, что в подавляющем большинстве проведенных исследований наблюдаются серьезные противоречия и не только между лабораториями. Создается впечатление, что в этих исследованиях преобладает устойчивая тенденция укрепить наследие Дональда Хебба в форме растущего синапса, но с использованием любых доступных гитик (о «гитиках» см. Бащинский, 1998). В этом отношении невозможно не процитировать вопрос Бартлетта Мела, дословный

перевод которого на русский язык не просто представить в литературной форме: «Have we been Hebbing down the wrong path?» (Mel, 2002). Обсуждая работу Stepanyants et al. (2002), Mel акцентирует внимание на том, что существуют альтернативные механизмы увеличения информационной емкости мозга. Тем не менее, идея увеличения размеров синапсов сопряженная с получением и сохранением информации остается популярной. При этом необходимость изменений структуры синапса для долговременного поддержания повышенной эффективности синаптической передачи, а соответственно и для закрепления памятного следа, является в большей мере интуитивно ожидаемым, нежели доказанным фактом. Больше, не значит эффективнее. В этой связи было бы интересно сравнить результаты исследований синапсов при ДВП с результатами, полученными на таких экспериментальных моделях как естественная гибернация и искусственная гипотермия. Так, например, было показано, что при выходе из гипобриоза наблюдаются изменения сходные с теми, что наблюдаются при ДВП, но они обратимы в течение суток (Роров, Vocharova, 1992). Иллюстрацией актуальности проблемы взаимосвязи структуры и функции синапса может служить недавно предложенная модель долговременного сохранения памятного следа на группах близлежащих шипиков/синапсов, модель «кластерной пластичности» (Govindarajan et al., 2006). Но в отличие от доминирующей точки зрения эта модель вовсе не предполагает общего увеличения размеров синапсов. Смысл этой модели заключается в том, что при отсутствии изменений количества синапсов или их средних размеров перераспределяется сила синапсов в пределах кластеров синапсов на дендритных сегментах в зависимости от уровня пресинаптической активности. Иными словами, словами Abraham и Robins (2005), меняется «синаптическая конфигурация». Какие реально изменения структуры синапсов сопутствуют стабилизированному уровню эффективности синаптической передачи после индукции ДВП неизвестно. Поэтому изучение морфологии синапсов в поздней фазе ДВП, которая критически зависит от синтеза новых белков, с использованием современных методов анализа может оказаться весьма информативным для понимания взаимосвязи между продолжительным сохранением высокой функциональной активности синапсов и их структурой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Животные и экспериментальные процедуры

Подготовка животных к эксперименту

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 λ). Стекланный регистрирующий электрод, заполненный искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей краситель (Pontamine Sky Blue), вводили в ЗФ 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 ЗФ. Контролем для ДВП у шести крыс служила ЗФ правого полушария мозга. ЗФ правого полушария не стимулировали, но поскольку сам факт оперативного вмешательства и имплантации электродов может иметь воздействие на исследуемые структуры, то в ЗФ правого полушария также вводили электроды симметрично левому полушарию. Дополнительным (активным) контролем была одна крыса, зубчатую фасцию которой стимулировали, но не потенцировали.

Индукция долговременной потенциации и долговременная стимуляция

Тестирующие стимулы длительностью 60 мкс с силой постоянного тока 70-120 мкА подавали с интервалом в 30 с (120 имп/ч). 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. Левую ЗФ одного контрольного животного не тетанизировали, но суммарно она получала то же количество стимулов, что и тетанизированные полушария. То есть дополнительно подавались 150 стимулов, соответственно количеству стимулов в случае тетанического возбуждения. Суммарно 870 стимулов (120 имп/ч $\times$ 6 ч +150

имп) подавалось с эквивалентными интервалами с частотой 0,04 Гц (или один импульс в 25 с) в течение эксперимента, силу стимулов поднимали так, чтобы амплитуда ответов на них достигала значений ответов в ходе ДВП у потенцированных животных. Запись вызванных полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП), измерение времени и интенсивности стимуляции находились под машинным контролем (программное обеспечение разработано Dr R. M. Douglas, University of British Columbia). Подготовка животных к эксперименту и электрофизиологическая часть работы проведены д-ром Миком Эррингтоном в лаборатории профессора Тимоти Блисса (National Institute for Medical Research, London).

2. Подготовка ткани для микроскопии

Фиксацию ткани проводили посредством интракардиальной перфузии, при помощи перистальтического насоса с пиковым давлением около 600-700 мм водного столба. Грудную клетку вскрывали, в левый желудочек вставляли канюлю и надрезали правое предсердие. Для освобождения кровеносных сосудов от крови использовали 100 мл физиологического раствора на охлажденном фосфатном буфере. Для фиксации использовали 100 мл раствора 3% параформальдегида и 0,5% глутарового альдегида приготовленном на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH 7,2-7,4) комнатной температуры. После перфузии гиппокампы дополнительно обрабатывали отдельно для измерений объёмов на светомикроскопическом уровне, и отдельно для ультраструктурного анализа.

3. Световая микроскопия – измерение объёмов гиппокампа и зубчатой фассии

Объемы гиппокампов левого и правого полушарий измеряли у трёх животных. Фиксированный мозг аккуратно извлекали и помещали в 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,4). Извлеченный мозг резали в коронарной плоскости на серийные срезы толщиной по 0,1 мм на вибротоме (Leica). Срезы мозга последовательно монтировали на предметные стёкла, просушивали на воздухе и окрашивали 0,1%

толуидиновым синим на 0,1М фосфатном буфере в течение двух минут. От излишков красителя срезы отмывали водой, обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола, проводили через ксилол и заключали в смолу (DPX). Каждый третий последовательный срез из серии был использован для захвата изображений гиппокампа в цифровом виде при помощи светового микроскопа с камерой Nikon E600 и далее изображения обрабатывали в цифровом виде. Для калибровки увеличения использовали объект-микрометр с шагом линейки 0,01 мм. Объемы зубчатых фасций и гиппокампов просчитывали при помощи программы для количественной обработки цифровых изображений Lucia v.4.8 (Laboratory Imaging Ltd. Prague, Czechoslovakia). Последовательно в rostro-каудальном направлении на каждом срезе билатерально очерчивали границы зубчатой фасции (гранулярный и молекулярный слои) и всей гиппокампальной формации (включая CA1 – CA3, ЗФ, и хилус) (Рис. 4). Объем каждой структуры получали произведением ее суммарной площади на всех срезах и толщины среза.

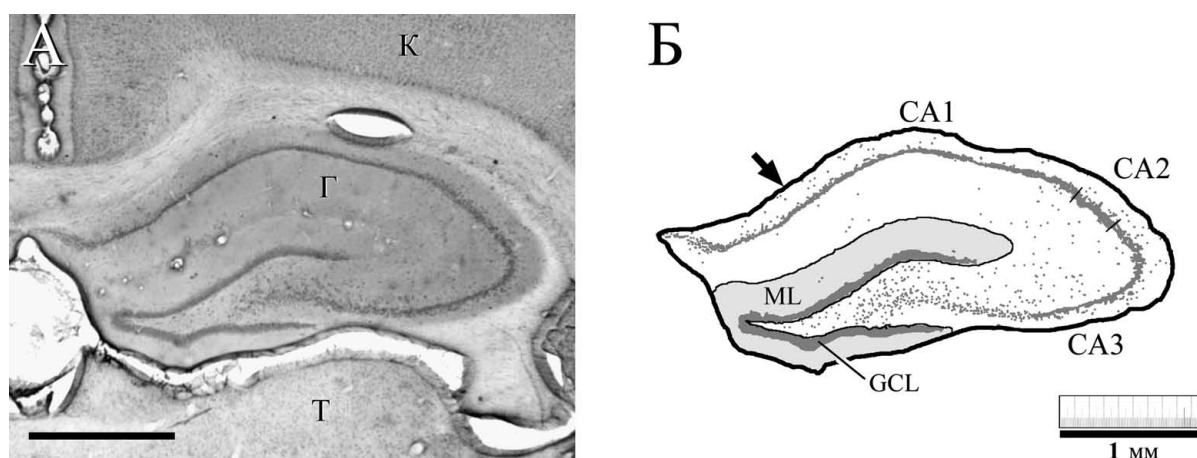


Рис. 4. Измерение объемов гиппокампальных структур.

А. Фронтальный вид толстого (100 мкм) среза дорзального отдела (~3.8 мм от *bregma*) гиппокампальной формации потенцированного левого полушария окрашенный толуидиновым синим. Г-гиппокамп, К-кора, Т-таламус. **Б.** Определение областей гиппокампальной формации. Стрелкой отмечена линия, ограничивающая периметр гиппокампальной формации представленной на рис. А; тонкая линия ограничивает периметр ЗФ от гиппокампальных зон CA1-CA3, тогда как темно-серая область представляет собой слой гранулярных клеток (GCL), а светло-серая – молекулярный слой (ML). Шкала для А и В = 1 мм.

4. Электронная микроскопия

4.1. Подготовка образцов для электронной микроскопии

После перфузии выделяли мозг и отделяли гиппокампы. Дорзальные области гиппокампов рассекались на ломтики толщиной около 500 мкм в плоскости перпендикулярной длинной оси гиппокампа. От каждого животного забиралось по 4 ломтика из каждого гиппокампа на расстоянии 1-2 мм с обеих сторон от зон окрашенных отводящими электродами. Затем образцы гиппокампа 1-2 часа дополнительно фиксировали в 2,5 % глutarовом альдегиде, приготовленном на 0,1M Na-какодилатном буфере (pH 7,2-7,4) при комнатной температуре, после чего троекратно промывали в том же буфере. Ткань дополнительно фиксировали в течение 1-1,5 часов при комнатной температуре в 1% растворе OsO₄ в 0,1M Na-какодилатном буфере, содержащем 0,01% K₂Hg₂O₇. Обезвоживание ткани проводили в водных растворах этанола (40, 50, 60, 70, 80 и 96%), в каждом по 10 мин, и в 100% ацетоне (три смены по 10 мин). Образцы в течение 30 мин при комнатной температуре пропитывались раствором, содержащим 1 объемную часть 100% ацетона и 1 объёмную часть готовой смеси эпоксидных смол. Смесь эпоксидных смол готовили в следующем соотношении: 22,5 мл Araldite-CY212, 22,5 мл Epon-812, 60 мл DDSA, и 0,6 мл фиксирующего реагента DMP-30. Каждый кусочек помещали на тефлоновую подложку и накрывали капсулой с готовой смесью эпоксидных смол, выдерживали в течение часа при 60°C и полимеризовали в течение ночи при 80°C.

4.2. Получение серийных ультратонких срезов

С поверхности образца по всей площади поперечного среза гиппокампа с помощью стеклянного ножа получали полутонкие срезы (1-2 мкм толщиной). Срезы окрашивали толуидиновым синим (Рис. 2А) и анализировали с помощью светового микроскопа. Согласно светомикроскопическому наблюдению окрашенных срезов, на заточенной плоскости блока, определяли координаты среднего молекулярного слоя (mML, Рис. 2Б) во внутреннем (*buried*) листе ЗФ. Для анализа синапсов выбирали область в диапазоне ~80-100 мкм от внешней границы гранулярного слоя и ~80-100 мкм от внешней границы ЗФ. Используя левый угол стеклянного ножа в качестве

фрезы, лишнюю ткань вокруг целевой области обрезали, получая таким образом призму высотой около 50-70 мкм. При помощи алмазного ножа Diatome на ультрамикротоме Ultracut-E (Reichert -Jung, Austria) получали серийные срезы светло-серого цвета в виде ленточек на поверхности воды в ванночке ножа. С каждого блока получали не менее 70 срезов на каждую серию. Срезы вылавливали на покрытые плёнкой из пиолоформа (Pioloform) бленды с отверстиями 1,5×3 мм и контрастировали раствором уранилацетата (насыщенный раствор в 70% этаноле) и цитратом свинца по Reynolds (1963) по 10-20 мин в каждом.

4.3. Получение и подготовка серийных изображений для анализа

Изучали срезы с использованием электронного микроскопа JEOL 1010. Сеточки помещали на вращающийся держатель для одинаковой ориентации срезов на смежных сеточках. Фотографировали срезы при увеличении 6000. Таким образом каждый микрофотоснимок захватывал область не менее 100 мкм². При фотосъемке серийных изображений в качестве реперных точек на срезах использовали поперечно срезанные милиенизированные аксоны (ма) и дендриты (Д) (см. Рис. 5А). Для тестирования увеличения микроскопа использовалась калибровочная реплика с шагом решётки 2160 линий/мм (Electron Microscopy Sciences Inc., Fort Washington, PA, USA). Полученные серии микрофотоснимков оцифровывали на сканере с разрешением 900 точек на дюйм (dpi). Предварительное выравнивание и подготовку изображений проводили при помощи графического редактора Photoshop v.8.0 (Adobe Systems Inc., <http://www.adobe.com>). Для компенсации нелинейных деформаций электронно-микроскопических изображений использовали квадратичные трансформации изображений в программе SEM Align v.1.26b в инкрементальном режиме (Fiala, Harris, 2001a; Fiala, 2002; программное обеспечение, разработанное Dr. J. C. Fiala и Dr. K.M. Harris, распространяется свободно, <http://www.synapses.bu.edu>). При выравнивании серийных срезов с использованием программы SEM Align v.1.26b в качестве реперных точек использовали поперечно срезанные митохондрии (м) (см. Рис. 5А), немиленизированные аксоны, микротрубочки и т.д. Выравнивание во всех случаях производили по всему полю

изображения. Для компенсации сдвига между крайними изображениями выровненной серии использовали встроенную в SEM Align функцию усреднения деформаций всех изображений серии.

4.4. Волюметрический анализ плотности и соотношения типов синапсов

Для получения значений плотности синапсов (числа синапсов в объеме ткани) потенцированного гиппокампа анализ проведен на 5-ти сериях срезов от трех животных, для контралатерального гиппокампа – контрольного – на 3-х сериях от трех животных, и для стимулированного, но не потенцированного гиппокампа – на 3-х сериях срезов от одного животного. Синапсы определяли по наличию ПСУ и присутствию возле него 2-3 пресинаптических везикул со стороны аксонального бутона. Анализ плотности синапсов в исследуемом объеме проводился согласно методике, предложенной и разработанной Harris K.M. (Harris, Stevens, 1989; 1992; Harris, 1994; Sora, Harris, 1998; Fiala et al., 1998; Sorra et al., 1998) с подсчетом не менее 100-150 синапсов. Согласно Harris (1994), для корректной идентификации всех типов синапсов/шипиков при толщине срезов 70 нм анализ плотности необходимо проводить не менее чем на 25 срезах. Толщина срезов (исходно светло-серого цвета) проверялась согласно Fiala, Harris (2001b) и Sorra et al. (1998) отдельно для каждой серии срезов и составляла обычно 60-70 нм. Каждому синапсу на последовательных изображениях присваивали индивидуальный номер. Каждый синапс согласно классификации Peters и Kaiserman-Abramof (1970) и Harris et al. (1992) причисляли к одному из четырех типов: к синапсам на шипиках тонких, на шипиках пеньковых, на шипиках грибовидных и к синапсам стволовым – на стволах дендритов. Дополнительным критерием принадлежности шипиков к шипикам грибовидным служило наличие шипикового аппарата или перфорированного/сегментированного ПСУ. Мультисинаптический контакт (содержащий несколько ПСУ или сегментированное ПСУ) между одним аксональным бутонем и головкой шипика учитывали как один синапс. При подсчете плотности синапсов учитывали все без исключения синапсы, как шипиковые, так и стволовые. Соотношение типов

синапсов выражали в процентах от общего количества синапсов. Плотность синапсов выражали как количество синапсов в 100 мкм^3 ткани.

4.5. Трехмерная реконструкция

Для 3D реконструкции использовали серии микрофотоснимков, на которых проводился анализ плотности синапсов. На сериях выровненных срезов при помощи программы IGL Trace 1.26b (Fiala, 2002; <http://www.synapses.bu.edu>) по контурам дендритов, шипиков, их ПСУ, которые очерчивались на цифровых изображениях вручную, строили 3D объекты и экспортировали в WRML формате. Предварительная оценка адекватности построения трёхмерных объектов проводилась при помощи программы Amadeus VRweb Viewer 1.0b4 (разработана G. Orasche и M. Pichler; Institute for Information Processing and Computer Supported New Media, Graz University of Technology, Austria; <http://www2.iicm.edu/vrweb>). Дополнительная проверка триангуляции и точности измерений, а также качественный анализ взаимодействующих компонентов нейронов проводили после окончательной компоновки трехмерных сцен из реконструированных объектов в программной оболочке 3D Studio Max (Autodesk Inc., <http://www.discreet.com>). Для анализа корреляций объема ПСУ с толщиной и площадью ПСУ, экспонированной на поверхности шипика, были использованы две серии срезов ЗФ (одна из контрольной и одна из тетанизированной ЗФ) одного животного. Согласно модели ламинарной организации, ПСУ состоит из двух слоев. Наиболее электронно-плотный компонент ПСУ располагается непосредственно под плазматической мембраной, оптическая плотность его уменьшается в направлении цитоплазмы, но затем может несколько усиливаться в области субсинаптической полосы или субсинаптических телец. Наружная граница ПСУ отделена от синаптической щели плазматической мембраной, которая, как правило, хорошо прослеживается, но внутреннюю границу ПСУ четко определить порой можно только на изображениях полученных с высоким разрешением. Поэтому для получения значений толщины и площади, занимаемой ПСУ, микрофотоснимки оцифровывали с разрешением 2400 dpi; при использовании таких разрешений одна серия изображений из 100 срезов занимает исходно не менее 6Gb дискового

пространства и ее объем увеличивается в процессе обработки, в связи с этим требуется значительная вычислительная мощность персонального компьютера. Реконструированное ПСУ обрабатывали в программе 3D Studio Max: цитоплазматическую часть триангулированной поверхности реконструированного ПСУ удаляли, получая значение площади, занимаемой ПСУ на поверхности шипика. Принимая в первом приближении форму ПСУ как форму близкую к форме цилиндра (с радиусом превышающим высоту) значение толщины ПСУ получали как отношение объема ПСУ к площади ПСУ, экспонированной на поверхности шипика. Подсчёт объёмов и площадей поверхностей реконструированных объектов в обоих программных пакетах автоматизирован.

5. Статистическая обработка

3D реконструкция на основе серийных ультратонких срезов, бесспорно, является наиболее точным подходом в морфометрии, однако и наиболее трудоемким, и требует колоссальных временных затрат. Потому реконструкции, как правило, ограничиваются единичными объектами, иллюстрируя качественную сторону организации объекта исследования. Вследствие трудоемкости количественного анализа на основе 3D реконструкций для ультраструктурного анализа синапсов было использовано лишь три крысы – число животных минимальное, но исходя из табличных критических значений и выбранного уровня значимости используемых статистических критериев достаточное для анализа. Для сравнительного анализа синапсов использованы небольшие и равные по объему (n) выборки, порядка 20-30 реконструированных объектов. Для сравнения параметров синапсов в потенцированных и контрольных полушариях мозга использовалось равное количество реконструированных синапсов от каждого животного, 33 на тонких и 33 на грибовидных шипиках из потенцированных и 33 на тонких и 33 на грибовидных шипиках из контрольных полушарий. Каждому реконструированному синапсу соответствовало четыре параметра: объем и площадь поверхности самого дендритного шипика, и объем его ПСУ и площадь поверхности реконструированного объема ПСУ. Для анализа связей и зависимостей объемов ПСУ

от их толщин и занимаемых ими площадей, использовались выборки объемом от 19 до 46. Каждому ПСУ соответствовало три параметра: занимаемый реконструированным ПСУ объем, площадь ПСУ экспонированная на поверхности дендритного шипика, и высота (толщина) ПСУ. Поскольку в данной работе для анализа использовались небольшие по объему выборки от 3 для животных до 46 для ПСУ, в ходе анализа предпочтение отдавалось наиболее мощным и наименее чувствительным к формам распределений статистическим критериям.

Анализ включал следующие процедуры. По табулированным значениям параметров синапсов строились частотно-сгруппированные распределения значений и вычислялись выборочные числовые характеристики: среднее (m), стандартные отклонение и ошибка (SD и SE), дисперсия (σ^2), медиана (M), а так же асимметрия (A) и эксцесс (E) и их стандартные ошибки. В качестве ошибок средних значений и в тексте и на диаграммах даны стандартные отклонения (σ). При использовании статистических критериев во всех случаях уровень значимости p ограничивался пятипроцентным интервалом ($p \leq 0,05$).

В первую очередь данные проверялись на соответствие нормальному закону с помощью оценок асимметрии, эксцесса и W -критерия Шапиро-Уилка (W_n). При резких отклонениях от нормального закона, выборки дополнительно проверялись на принадлежность к различным типам параметрических семейств (логнормальному, γ , β , и др.) как путем визуальной подгонки параметрических распределений к экспериментальным данным, так и при помощи одновыборочного критерия Колмогорова-Смирнова и критерия омега-квадрат (ω^2). Гистограммы объемов и площадей шипиков и их ПСУ (Рис. 13-16) для наглядности сдвига значений дополнены функциями гамма или бета (в контроле) и нормального распределения (при ДВП), полученными в результате подгонки к экспериментальным данным. При парных сравнениях данных между полушариями мозга сначала оценивалась однородность выборок при помощи двухвыборочного критерия Смирнова. Результат проверки однородности представлен в виде максимальной положительной разности между распределениями плотностей вероятностей (D_S) и уровнем значимости критерия Смирнова. Дополнительно оценивалась однородность дисперсий по

критерию Фишера (F_σ). При условии однородности дисперсий и отсутствия отличий от нормального распределения средние значения сравнивались с использованием t -критерия Стьюдента (или его расширенного варианта ANOVA, F). В случае невозможности проверки формы распределения или невыполнения условий применимости t -критерия или ANOVA, использовались критерии оценки сдвига медиан и нечувствительный к форме распределений T -критерий Крамера-Уэлча для сравнения средних значений двух независимых выборок. Критерии оценки сдвига медиан включали критерий W (Вилкоксона) и X критерий Ван дер Вардена (Ван дер Варден, 1960, с.346-357), а при равенстве объемов выборок критерии W (Вилкоксона) и критерий знаков (S) для парных данных. При этом для малых выборок вместо уровней значимости S -критерия и W -критерия указаны их табличные критические значения (S_C и W_C) (Большев, Смирнов, 1983).

Критерий Крамера-Уэлча описан в недавней монографии А.И. Орлова «Прикладная статистика» (Орлов, 2004, с. 564-567) и заключается в том, что разность средних значений двух выборок делится на оценку среднего квадратичного отклонения этой разности, при этом в качестве дисперсий используются выборочные дисперсии. Критерий Крамера-Уэлча рассчитывается по формуле:

$$T = \frac{\sqrt{n_x n_y} (m_x - m_y)}{\sqrt{n_y SD_x^2 + n_x SD_y^2}}.$$

Согласно работам Орлова при равенстве объемов выборок значение статистики T равно t -статистике Стьюдента и при больших объемах выборок распределение T -статистики сходится к стандартному нормальному распределению с математическим ожиданием $m = 0$ и дисперсией $\sigma = 1$. При этом сходимость к нормальному распределению даже на малых по объему выборках (начиная от $n_x = n_y = 6$) дает удовлетворительные результаты, поэтому для нахождения значений квантилей статистики T рекомендовано использование стандартного нормального распределения. При использовании T -статистики мы сравнивали выборки равного объема ($n=33$). В таком случае при установленном уровне значимости $p=0,05$ граничное значение доверительного интервала $\Phi_{(1-0,05/2)}=1,96$. Соответственно $\Phi_{(1-$

$\Phi_{(1-0,01/2)}=2,33$ при $p=0,02$; $\Phi_{(1-0,01/2)}=2,58$ при $p=0,01$; $\Phi_{(1-0,001/2)}=3,3$ при $p=0,001$. При превышении граничного интервала модулем статистики T на заданном уровне значимости p гипотеза о равенстве средних значений отвергается.

Для обнаружения связей рассчитаны коэффициенты линейной корреляции Пирсона (r_p) и ранговой корреляции Спирмена (r_s). Сравнение коэффициентов корреляций проводили с использованием U -критерия (Урбах, 1964, с.291-294) Для оценки форм связей проведен регрессионный анализ, включавший анализ соответствия полученных данных простым регрессионным моделям и проверку гипотезы о равенстве угловых коэффициентов линейных регрессий (Урбах, 1964, с.310-316). Результаты регрессионного анализа представлены графически с указанием моделей, коэффициентов детерминации (R^2), и коэффициентов регрессии (b) со стандартными ошибками или 95% доверительным интервалом.

Каждый из статистических программных пакетов обладает собственными преимуществами, например, наличием необходимой формы анализа, точностью расчета заявленных в документации функций, простотой организации диалогового режима, наглядностью выводов результатов анализа и т.д. Поэтому для анализа и графического представления полученных результатов использовались различные программные пакеты: Statistica 6.0 (StatSoft Inc., <http://www.statsoft.ru>), STADIA 7.0 (НПО «Информатика и компьютеры», МГУ, <http://statsoft.msu.ru>), Origin 7.0 (OriginLab Corp. <http://www.originlab.com>), SPSS 14.0 (SPSS Inc., <http://www.spss.ru>) (Боровиков, 2003, Тюрин, Макаров, 2003, Бююль, Цёфель, 2005).

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Параметры долговременной потенциации

В данной работе был использован протокол индукции ДВП в ЗФ, с повторным высокочастотным возбуждением перфорантного пути гиппокампальной формации и регистрацией полевых ответов в гранулярном слое ЗФ. Поскольку полевые ответы представляют собой интегральный одновременный ответ большого числа клеток, и реальный пик амплитуды ВПСП измерить невозможно, то обычно оценивается скорость нарастания экстраклеточного (полевого) потенциала спустя 1 мс после стимула; считается, что скорость нарастания пВПСП отражает модальное количество синхронно срабатывающих синапсов, деполяризирующих гранулярные клетки (см. Ломо, 1971, р.50). Средние значения скорости нарастания пВПСП в ходе ДВП для трех экспериментальных животных представлены на рис. 5. Значения скорости нарастания пВПСП (мВ/мс) в ходе 6 ч эксперимента нормированы по средним значениям до запуска ДВП. Сразу после индукции наблюдалось значительное,

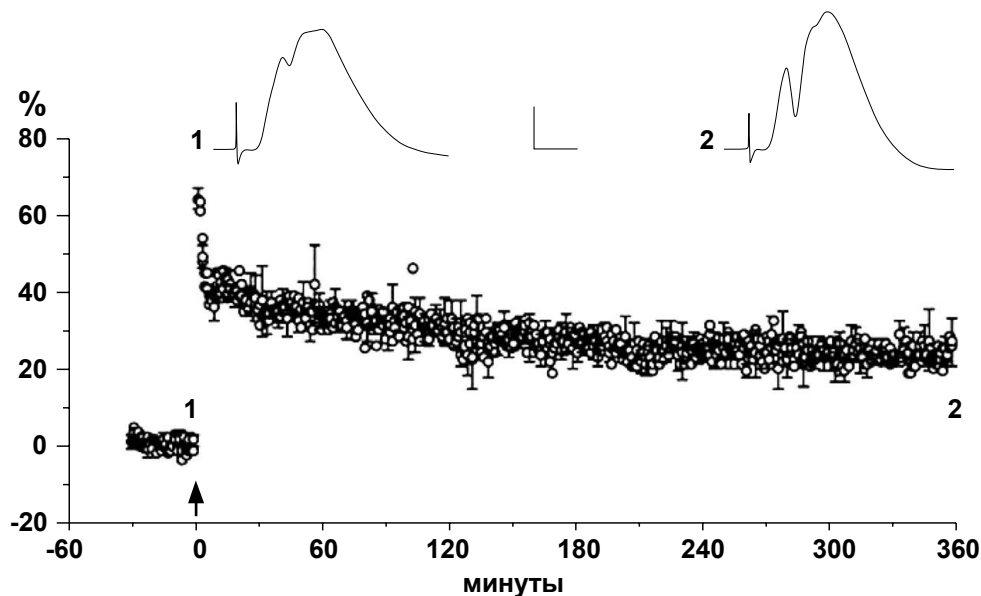


Рис. 5. Значения пВПСП в гранулярном слое ЗФ в ходе эксперимента.

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.

более чем на 60%, увеличение ответов на тестовые стимулы. В течение первых 15 мин вследствие затухания пресинаптической составляющей (посттетаническая потенция) величина ответов резко снижалась до 40%. В ходе следующих часов уровень потенциации постепенно снижался и к четверем часам эксперимента величины ответов на тестовые стимулы выходили на плато и не затухали до конца эксперимента. У всех животных спустя 6 часов после запуска ДВП величина ответов на тестовые стимулы превышала как минимум на 20% значения ответов на тестовые стимулы до запуска ДВП.

Обязательным условием длительного поддержания ДВП (свыше четырёх часов) являются запуск генной экспрессии (Adams, Dudek, 2005) и появление в синапсах дополнительных или новых белков. Следовательно, с использованием указанных протоколов стимуляции в данном эксперименте выполнено основное условие продолжительного поддержания ДВП и высока вероятность появления в синапсах дополнительных или новых структурных компонентов.

2. Плотность расположения и соотношение типов синапсов

2.1. Морфология дендритных синапсов в среднем молекулярном слое 3Ф

В работах, использующими различные подходы – световую микроскопию, включая конфокальную, электронную микроскопию, включая высоковольтную микроскопию и микроскопию серийных срезов – часто можно наблюдать несогласованность критериев принадлежности синапсов к тому или иному типу, а соответственно и несогласованность оценок количества синапсов/шипиков в объеме ткани (плотности синапсов). Следствие такой несогласованности – невозможность адекватной интерпретации результатов исследований. Оценка плотности синапсов/шипиков с использованием световой микроскопии позволяет учитывать дендритные шипики лишь на отдельных дендритных сегментах, при этом многие синапсы и шипики скрыты оптической плотностью дендрита. Сходными недостатками обладает и высоковольтная микроскопия при исследовании синапсов при такой окраске нейронов, когда дендроплазма заполняется оптически плотными осадками (окраска по Golgi или с использованием биоцитина и т.п.). Альтернативой этим подходам служит

анализ морфологии синапсов на серийных ультратонких срезах и 3D реконструкция синапсов. Подавляющее большинство исследований морфологии синапсов с использованием серийных срезов и 3D реконструкции выполнено на синапсах CA1 области гиппокампа и шипиков клеток Пуркинье мозжечка. Номенклатура дендритных шипиков в этих работах основана на критериях предложенных Peters и Kaiserman-Abramof (1970) и дополнена Harris (Harris et al., 1992). Дендритным синапсам 3Ф – классическому объекту в изучении синаптической пластичности – уделялось несправедливо меньшее внимание. В литературе неоднократно отмечалось, что дендритные шипики различных отделов корковых структур мозга отличаются своими характеристиками. В ранних ультраструктурных исследованиях дендритных шипиков молекулярного слоя 3Ф было показано, что шипики имеют очень сложные геометрические формы – на одиночных срезах они представлены чашевидными, подковообразными и омега-подобными профилями (Cotman et al., 1973; см. разд. 8.4., Гл. I). Nama et al. (Nama et al., 1989) с использованием высоковольтной электронной микроскопии нейронов 3Ф окрашенных по Golgi обнаружили существенные различия морфологии шипиков 3Ф и шипиков пирамидных нейронов коры. Авторы высказали мнение, что три категории шипиков предложенные Kaiserman-Abramof неприменимы для классификации дендритных шипиков 3Ф, поскольку в дополнение к трем основным категориям наблюдалось и много других форм шипиков: чашевидных («calyx-shaped»), сигарообразных («cigar-shaped»), булавовидных («club-shaped») и тонких нитевидных («threadlike»). Подобным образом обстоит дело с классификацией шипиков и в других областях мозга (Wilson et al., 1983; Benavides-Piccione et al., 2002). Кроме того, в литературе неоднократно отмечалось, что строгое деление шипиков/синапсов на типы невозможно, и используемая номенклатура весьма условна, поскольку шипики/синапсы представляют непрерывный континуум трех основных и переходных форм (напр.: Jones, Powell, 1969; Fiala, Harris, 1999, p.20). До недавнего времени на электронномикроскопическом уровне 3D морфометрия дендритных синапсов 3Ф ограничивалась несколькими работами норвежских исследователей (напр.: Trommald et al., 1996; Trommald, Hulleberg, 1997). Однако, хотя Trommald et al. использовали 3D реконструкцию дендритных шипиков 3Ф, для оценки параметров синапсов, во-первых,

они выбирали только синапсы на ножках (Trommald et al., 1996, p.221); во-вторых, они использовали стереологические подходы. То есть реально они измеряли не сам объект, а описанные около поверхности объекта или вписанные в его объем достаточно простые геометрические фигуры. Кроме того, Trommald et al. не использовали классификацию дендритных шипиков, предложенную Peters, Kaiserman-Abramof и Harris, предполагая, что формы дендритных шипиков представлены непрерывным континуумом. Поэтому, в плане соотнесения номенклатуры шипиков 3Ф с номенклатурой используемой для синапсов CA1, неостриатума (Carani et al., 2001) или коры больших полушарий, эти работы мало информативны. Первая работа, в которой используется номенклатура дендритных шипиков гранулярных нейронов 3Ф на базе 3D реконструкций и анализа серийных срезов – это работа Dhanrajan et al. (2004) – выполнена с нашим участием. Несмотря на отсутствие устойчивой классификации синапсов, и детальных характеристик синапсов гранулярных нейронов 3Ф мы не только придерживались классификации Peters, Kaiserman-Abramof и Harris, основанной на размерных характеристиках шипиков, но также использовали и дополнительные критерии, основанные на функциональных особенностях структуры синапсов.

2.1.1. Расположение и типы дендритных синапсов среднего молекулярного слоя зубчатой фации

В ходе работы получены 3D реконструкции как отдельных дендритных шипиков, так и сегментов дендритов. На рисунке 5А представлены четыре электронные микрофотографии (№№ 21, 24, 28, 31) из серии состоящей из 130 срезов среднего молекулярного слоя тетанизированной 3Ф и трёхмерные реконструкции дендритных сегментов полученных на этой серии (Рис. 5 Б, Г). На реконструированном сегменте дендрита (Рис. 5 Г) представлены различные типы дендритных шипиков (тонкие, пенковые, грибовидные) и стволовые синапсы. На рисунке 5 Б показан дендрит (Д) с расположенными на нем четырьмя тонкими шипиками (1–4). Красным цветом на дендритах и шипиках выделены активные зоны, которые состоят из пре- и постсинаптических электронно-микроскопически визуализируемых уплотнений на микрофотоснимках №21 и №24. Реконструированный сегмент этого дендрита

представлен под разными углами зрения. На рисунке 5 А представлены микрофотографии №28 и №31, на которых показан грибовидный шипик, выросты головки у которого (отмечены звёздочками) охватывают пресинаптический бутон (б), формируя чашевидный профиль головки шипика на нижнем снимке. От ножки до головки простираются цистерны хорошо развитого шипикового аппарата (ША). В основании удлубления головки можно видеть два постсинаптических уплотнения, разделенных спинулой, формирующей омега-подобный профиль шипика. Вторая спинула меньшего размера располагается в области перворации ПСУ1. 3D реконструкция этого грибовидного шипика и его постсинаптических уплотнений представлена рисунке 5 В. Полупрозрачная поверхность шипика позволяет оценить сложность геометрии его постсинаптических уплотнений.

2.1.2. Синапсы на грибовидных шипиках

Одним из критериев принадлежности шипика к шипикам грибовидным мы использовали объем шипика или размер головки шипика. Полученные нами данные говорят о том, что объём грибовидного шипика на дендритах mML 3Ф в среднем приблизительно в пять раз больше объёма тонкого шипика (Рис. 13-14). Другим признаком грибовидного шипика служило и наличие в нем шипикового аппарата (Попов с соавт., 2003) (Рис. 5А, Рис. 7А). Другие критерии основаны на размерах и структуре ПСУ. Полученные нами данные показывают, что объем ПСУ грибовидных шипиков не менее чем в четыре раза превышает объем ПСУ синапсов на шипиках тонких (Рис. 15-16). Дополнительным критерием принадлежности шипика к шипикам грибовидным служило наличие перфораций в ПСУ, которые являются признаком активности синапса. Реконструкции грибовидных шипиков среднего молекулярного слоя 3Ф представлены приблизительно в одном масштабе на рис. 6 (шипика развернуты головками вверх, ножками вниз). Рисунки 6-8 являются хорошей иллюстрацией объективности оценок таких характеристик шипиков 3Ф как высота шипика, длина и ширина ножки, линейные и объемные размеры головки (напр. Nana et al., 1989; Trommald, Hulleberg, 1997).

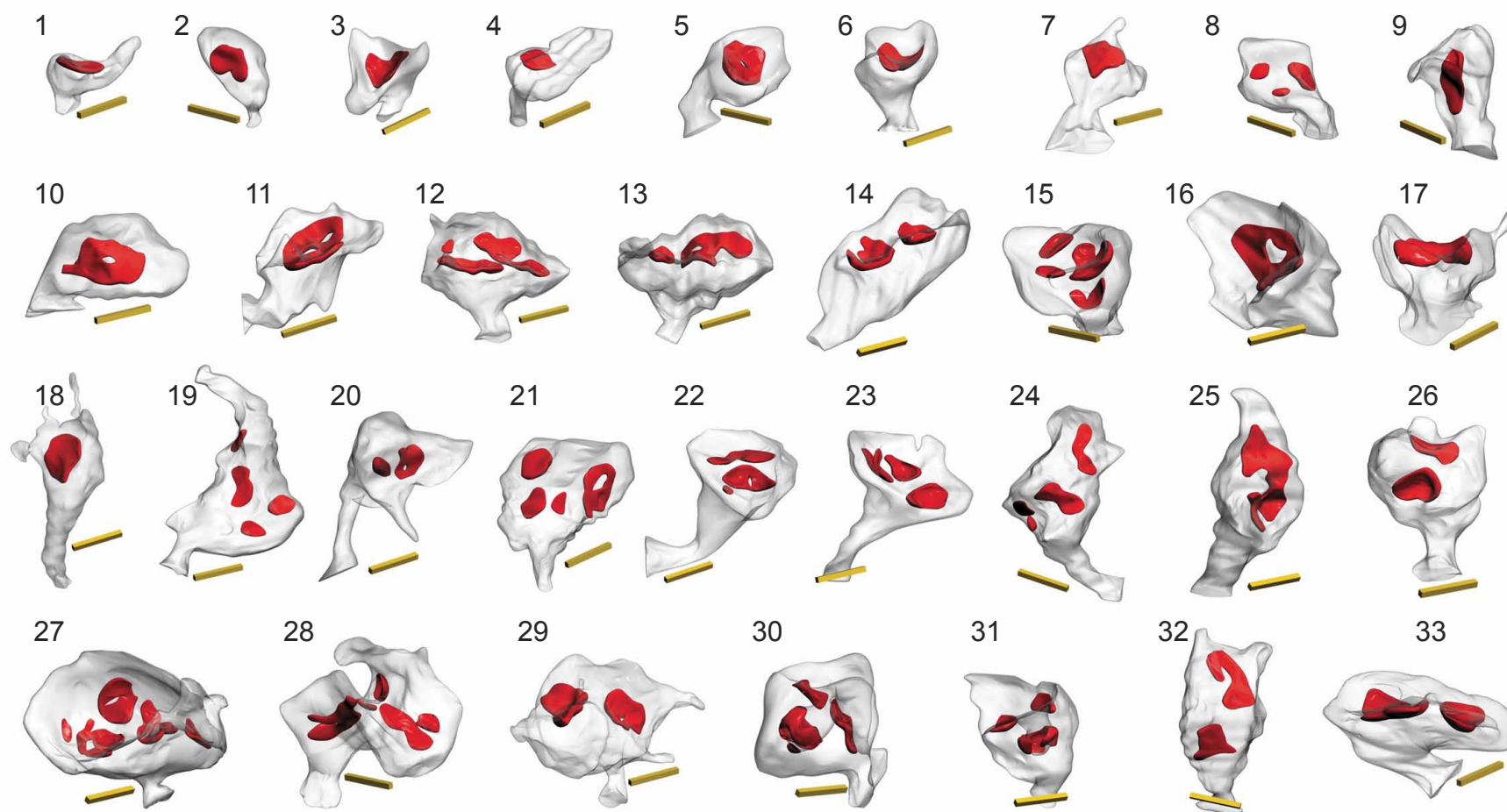


Рис. 6. 3D реконструкции грибовидных дендритных шипиков среднего молекулярного слоя зубчатой фасции.

Для проявления скрытых особенностей объемной ультраструктуры шипиков на изображении поверхность шипиков представлена полупрозрачным материалом. Постсинаптические уплотнения, лежащие под полупрозрачными поверхностями, выделены красным цветом. Шкалы выделены желтым цветом: длина 500 нм, толщина и ширина по 50 нм.

Грибовидные шипики значительно варьируют по размерам, форме и структуре ПСУ. Большинство грибовидных шипиков имеет значительные размеры (Рис. 6, №10-33), тогда как часть сравнима по размерам с крупными тонкими шипиками (Рис. 6, №1-9, Рис. 8). Грибовидные шипики как правило имеют сложную форму. На рисунке 6 шипики №№1, 3, 5, 6, 11, 13, 14-17, 22, 23, 27, 30, 31, 33 имеют вогнутые головки, а некоторые шипики практически охватывают пресинаптический бутон (Рис. 6, №27, 28). Большинство крупных грибовидных шипиков как правило имеет несколько ПСУ (Рис. 6, №6, 8, 12-15, 19-24, 26-33). На рис. 6 в головках шипиков №№15, 19, 21, 24, 30 можно видеть четыре ПСУ, а шипики №27 и №28 имеют по пять ПСУ. Ранее Kaiserman-Abramof (1969) отмечал, что в зависимости от размеров дендритных шипиков синапсы пирамидных нейронов коры больших полушарий могут иметь от одного до пяти ПСУ. Как показывают наши реконструкции шипиков, грибовидные шипики небольшого размера чаще имеют одно ПСУ (Рис. 6, № 1-7, 9), но число уплотнений не жестко связано с размерами шипика. Некоторые грибовидные шипики небольшого размера имеют 2-3 ПСУ (Рис. 6, № 6, 8). И наоборот крупные грибовидные шипики могут иметь лишь одно ПСУ (Рис. 6, № 10, 11, 16, 17, 18, 25), но, как правило, единственное ПСУ этих шипиков занимает большую площадь и имеет сложную форму. Размеры шипиков определяются двумя параметрами (занимаемым объемом и площадью поверхности), но размеры синапса могут определяться и площадью контакта пре- и постсинаптической мембраны. С какими параметрами шипиков связано число ПСУ в отдельно взятом шипике? Для решения данного вопроса необходимы адекватные методы оценки площади контакта пре- и постсинаптической мембраны. Ранее предпринимались попытки оценки площади контакта пресинаптического бутона с поверхностью шипиков (Desmond, Levy, 1988b), однако для ее оценки Desmond и Levy использовали стереологические расчеты на одиночных срезах без учета толщины срезов. Позднее Ventura и Harris (1999) на серийных срезах синапсов CA1 гиппокампа подсчитали площадь аксо-шипикового контакта. Однако авторы не описывают то, каким образом они измеряли площади контакта; вероятно, использовался описанный ранее метод (Harris, Stevens, 1988; Harris et al., 1992). Этот метод оценки включал подсчет длины профиля

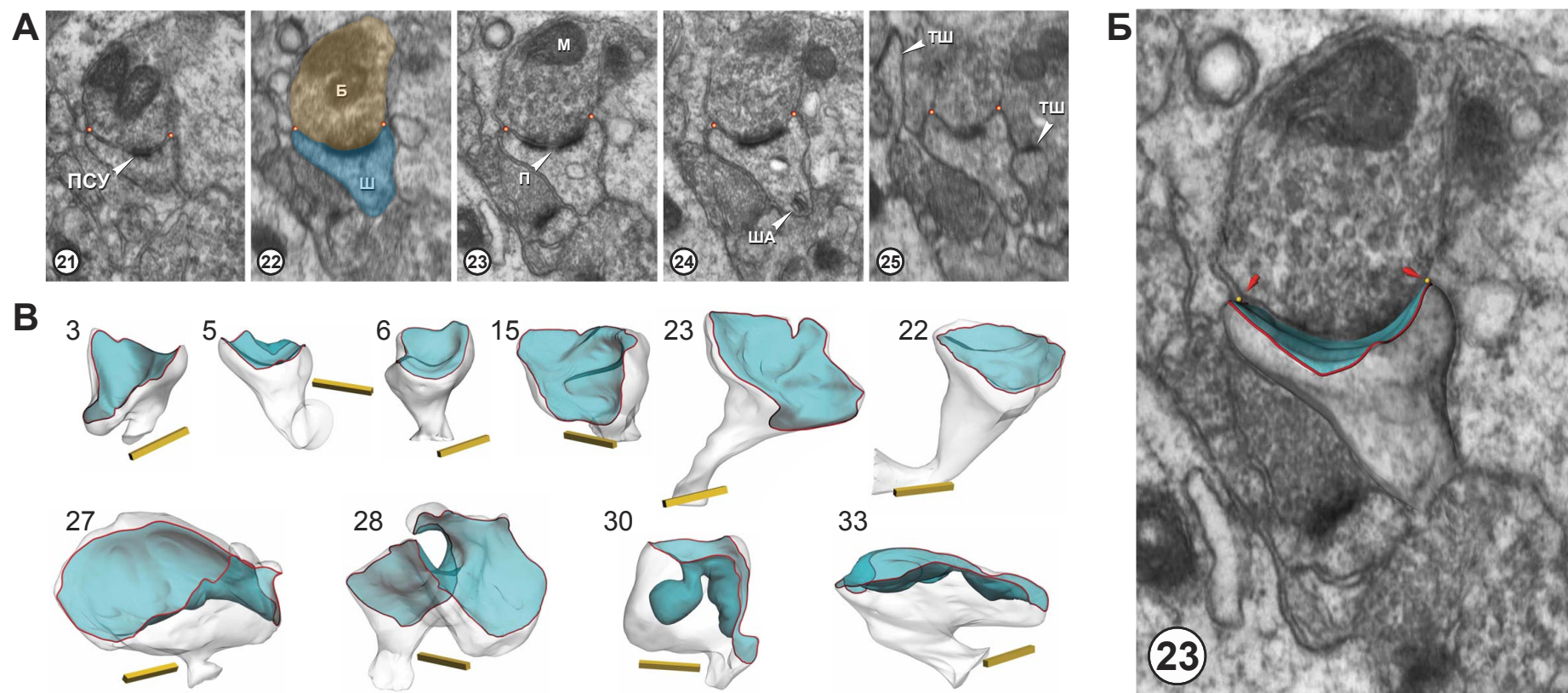


Рис. 7. Измерение площади контакта дендритного шипика с пресинаптическим бутоном на основе 3D реконструкции.

А. На пяти микрофотографиях (№21-25) молекулярного слоя зубчатой фассии (серия из 104 срезов) представлен грибовидный дендритный шипик №5 (см. рис. 6). На снимке 22 шипик (Ш) и пресинаптический бутон (Б) выделены цветом. На снимке 23 ПСУ шипика имеет перфорацию (П); на снимке 24 в основании головки шипика отмечен шипиковый аппарат (ША); ТШ - тонкий шипик, М - митохондрия. Яркими точками отмечены границы области контакта пресинаптического бутона и поверхности шипика. По этим точкам в процессе реконструкции синапсов на серийных изображениях создавались 3D объекты-метки. Согласно этим меткам в виртуальном трехмерном пространстве по поверхности шипика очерчивалась граница области контакта шипика с пресинаптическим бутоном. **Б.** Реконструированный грибовидный шипик №5 совмещен со снимком 23. Выделенная цветом площадь контакта шипика с пресинаптическим бутоном очерчена линией; стрелки указывают на объекты-метки в плоскости среза. **В.** Десять грибовидных шипиков выбранных случайным образом для определения площади контакта с пресинаптическим бутоном. Цветом выделена область контакта шипиков с пресинаптическими бутонами. Номера шипиков соответствуют номерам шипиков рисунка 6. Шкалы выделены желтым цветом: длина 500 нм, толщина и ширина по 50 нм.

мембраны шипика контактирующей, например, с пресинапстическим бутонем, умноженной на толщину среза. Поскольку, как правило, поверхность контакта изогнутая и срез проходит тангенциально к поверхности, то по своей сути такой подход дает приближенные значения. Современное программное обеспечение позволяет напрямую оценить интересующую площадь на поверхности реконструированного объекта. Мы импортировали реконструированные шипики в сцену 3D Studio Max, так же в сцену импортировали 3D объекты-метки границ интересующей области мембраны шипика (области аксо-шипикового контакта) (Рис. 7А, Б). В виртуальном 3D пространстве реконструированный шипик клонировали и согласно меткам границ интересующей области ненужную поверхность шипика-клона обрезаем, получая значения площади контакта. Используя данный подход мы получаем значения площади срезанной плоскости максимально приближенные к реальным. На рисунке 7В представлены грибовидные дендритные шипики, у которых описанным подходом получены значения площади аксо-шипикового контакта. Для данной процедуры были взяты первые 10 реконструированных на серии срезов грибовидных шипиков. Согласно рис. 6 шипики №3 и №5 имеют по одному ПСУ, шипики №6 и №33 – по два ПСУ, шипики №22 и №23 – по три ПСУ, шипики №15 и №30 – по четыре ПСУ, шипики №27 и №28 – по пять ПСУ. Наименьшая площадь контакта с аксональным бутонем составляла $0,38 \text{ мкм}^2$ (шипик №5), тогда как наибольшая площадь контакта с аксональным бутонем у шипика №27 составляла $1,8 \text{ мкм}^2$, при этом шипик №27 имеет и наибольший объем. Значения измеренных параметров десяти шипиков рисунка 7 В суммированы в таблице 2 (упорядочены по количеству ПСУ), а значения коэффициентов корреляции представлены в таблице 3. Согласно коэффициентам корреляции параметров шипиков таблицы 3 можно видеть что, несмотря на то, что все корреляции высоки и достоверны, количество ПСУ на дендритном шипике в первую очередь связано с площадью контакта шипика с аксональным бутонем.

На рис. 6 ПСУ шипиков №10-13, 15, 16, 20-22, 27, 29 имеют перфорации (перфорированные ПСУ). Перфорированные ПСУ могут встречаться и на шипиках небольшого размера (Рис. 6 и Рис. 7, шипик №5).

Таблица 2. Значения параметров грибовидных шипиков.

№	число ПСУ	площадь поверхности шипика, мкм^2 *	объем шипика, мкм^3	площадь контакта шипика, мкм^2 **	площадь ПСУ экспонированная на поверхности шипика, мкм^2 ***
3	1	1,771	0,097	0,469	0,103
5	1	1,788	0,127	0,384	0,158
6	2	2,036	0,169	0,492	0,152
33	2	4,049	0,374	1,302	0,375
22	3	3,583	0,318	0,845	0,241
23	3	3,179	0,222	0,972	0,227
15	4	3,195	0,290	1,109	0,288
30	4	4,237	0,361	1,382	0,342
27	5	5,551	0,455	1,805	0,411
28	5	4,382	0,339	1,586	0,311

* - без учета площади поверхности занимаемой основанием ножки шипика,

** - площадь контакта шипика с аксональным бутоном,

*** - подход для определения площади мембраны шипика занимаемой ПСУ аналогичен описанному подходу определения площади контакта шипика с аксональным бутоном (см. также разд. 3.2.2. Гл. II)

Таблица 3. Корреляции значений параметров грибовидных шипиков.

	число ПСУ	площадь поверхности шипика	объем шипика	площадь контакта шипика
площадь шипика	0,862 **			
объем шипика	0,714 *	0,952 ***		
площадь контакта шипика	0,886 ***	0,952 ***	0,903 ***	
экспонированная площадь ПСУ	0,714 *	0,927 ***	0,976 ***	0,903 ***

Корреляции Спирмена (r_s) достоверны при $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).

В ткани подверженной тетанической стимуляции часто можно наблюдать такую организацию шипиковых синапсов, когда часть пресинаптического бутона глубоко погружена в объем шипика. В таких случаях вырост пресинаптического бутона может быть целиком опоясан кольцом постсинаптического уплотнения (Рис. 6, шипики №30 и 31). На шипике №30 ямка образованная пресинаптическим бутоном отделена от пресинаптического бутона узким «горлышком» с диаметром не

более 200 нм (Рис. 7В). Функциональная роль инвагинаций шипика пресинаптическим бутом неизвестна, но такая форма организации синапса чаще наблюдалась в ЗФ после ДВП. Мы не проводили количественного анализа частоты встречаемости таких грибовидных шипиков, поскольку такой анализ требует большого количества реконструкций. Однако по нашим наблюдениям как минимум каждый десятый грибовидный шипик в mML потенцированной ЗФ имеет такие морфологические особенности. Ранее отмечалось, что ДВП может быть связана с увеличением отрицательной кривизны (вогнутости) головок шипиков (Desmond, Levy, 1983). Вполне возможно, что наблюдаемая «предельная» кривизна головки шипика, с инвагинацией пресинаптическим бутоном, отражает «проработанность» и стабильность таких синапсов.

Наша классификация грибовидных шипиков несколько отличается от классификации предложенной Peters и Kaiserman-Abramof, поскольку по результатам электронной микроскопии 35% тонких шипиков коры больших полушарий, на которых исходно построена классификация Peters и Kaiserman-Abramof, имеют достаточно большие размеры, содержат хорошо развитую сеть ЭР и шипиковый аппарат (см. Peters, Kaiserman-Abramof 1970, p.353; Spacek 1985b, p.239). Тонкие шипики гиппокампа и ЗФ имеют сравнительно слабо развитую сеть ЭР, порой представленную как цистернами, связанными с ЭР дендрита, так иногда и отдельными, разобщенными цистернами (Harris, Stevens, 1989 p.2987; Spacek, Harris 1997, p.192). Шипиковый аппарат, представленный стопками цистерн гладкого ЭР является непосредственным продолжением ЭР дендрита и также непосредственным участником ионного обмена при активации синапса. В этом отношении использование в качестве критерия идентификации грибовидных шипиков таких органелл как шипиковый аппарат и развитый ЭР позволяет классифицировать синапсы не только с учетом их размеров, но и с учетом их функциональной активности. Используемые нами критерии не противоречит результатам других исследователей. Так наличием перфораций отличались только крупные ПСУ (Peters, Kaiserman-Abramof, 1970), а между размерами ПСУ и размерами шипиков

наблюдается положительная корреляция (Wilson et al., 1983; Trommald, Hulleberg, 1997; Harris, Stevens, 1988; Harris, Stevens, 1989).

2.1.3. Синапсы на пеньковых шипиках

Среди всех типов шипиков пеньковые шипики заслуживают особого внимания – несогласованность критериев принадлежности шипика к пеньковым обескураживает. Используя классификацию Peters и Kaiserman-Abramof (1969), Harris К.М. к шипикам пеньковым относит шипики не имеющие перетяжки («constriction») на их шейке (напр.: Fiala, Harris, 1999, p.16; Sorra, Harris, 2000), тогда как в работах Peters и Kaiserman-Abramof (1969, 1970) пеньковые шипики – это такие шипики, шейка/ножка которых даже не просматривается. Согласно Peters и Kaiserman-Abramof (1969, 1970) пеньковые шипики это такие шипики, длина которых варьирует от 0,5 до 1,5 мкм. Но Классификация Kaiserman-Abramof базируется на световой микроскопии, и многие короткие тонкие ножки грибовидных шипиков действительно могли быть незамечены (см. рис. 6, шипики №№1-3, 8-10, 15-17, 27, 29-31, 33). При этом пространственная ориентация шипика по отношению к оптической оси микроскопа также сильно влияет на результаты анализа на уровне световой микроскопии.

Отсутствие четко определенных критериев и использование для анализа шипиков световой микроскопии или электронной микроскопии на одиночных срезах вносят неопределенность в количественные данные. Так Desmond и Levy (1985), окрашивали нейроны 3Ф по методике Golgi и подсчитали, что дендриты нейронов 3Ф имеют значительное количество пеньковых шипиков, около 32% (Desmond, Levy, 1985 p.222). Тогда как согласно Fiala и Harris (1999, p.16) – дендриты гранулярных клеток 3Ф вообще не принадлежат к дендритам, на которых присутствуют пеньковые шипики. Fiala и Harris (1999, p.16) отмечали наличие пеньковых шипиков на пирамидных клетках коры и СА1 области гиппокампа; в СА1 области гиппокампа взрослых крыс они подсчитали, что количество пеньковых шипиков составляет около 14% от всех шипиков (там же, p.22). Однако ранее этими же авторами отмечалось, что у взрослых крыс этот тип шипиков в СА1 составляет 3,5% (Harris et al., 1992, p.2694) или 1-5% (Coney et al., 2002). Сходные данные были получены Capani et al., пеньковые шипики в

CA1 и CA3 составляли 3% (Capani et al., 2001). Capani et al. использовали 3D реконструкцию и селективную окраску актина и показали, что пеньковые шипики в CA1 не имеют актиновых пучков, которые в шипиках содержащих ША ассоциированы с его цистернами. Harris (1992, p.2695; 1999, p.25,) и Peters и Kaiserman-Abramof (1970, p.330) отмечали, что пеньковые шипики коры и CA1 гиппокампа могут иметь одно или два ПСУ, 1/3 из которых перфорированные, а 1/6 пеньковых шипиков двухнедельной крысы имеет ША, что противоречит работе Capani et al. (2001) выполненной на взрослых крысах. Nama et al. (1989) с использованием высоковольтной электронной микроскопии дендритов нейронов 3Ф показали, что относительное количество пеньковых шипиков в отличие от светомикроскопических наблюдений Desmond и Levy значительно меньше, и составляет около 1-1,5%. Но высоковольтная микроскопия окрашенных по Golgi нейронов исключает визуализацию ПСУ и пресинаптических везикул, которые являются единственными достоверными маркерами дендритных синапсов, поэтому в работе Nama et al. многие пеньковые шипики могли быть недосчитаны, и оценивались лишь как неоднородности поверхности дендритного ствола.

Столь значительные разногласия в результатах определяются возможно даже не столько различиями в подходах к оценке плотности пеньковых шипиков, сколько несогласованностью используемых критериев для описания данного типа синапсов. Поэтому в качестве характеристик пеньковых шипиков, мы совместили классификации Peters, Kaiserman-Abramof и Harris, но за некоторыми исключениями. Согласно Peters и Kaiserman-Abramof (1970) пеньковым шипиком считался шипик, у которого, во-первых, невозможно было идентифицировать ножку. Согласно Harris et al. (1992), в качестве второго критерия принадлежности шипика к типу пеньковых, мы использовали соотношение высоты и ширины шипика. Пеньковым шипиком считался шипик, у которого высота приблизительно совпадает с шириной. Интересно, что грибовидные шипики №16 и №17 (Рис. 6) согласно Spacek и Harris (1997, p.191) можно было бы отнести к пеньковым шипикам, но наличие шипикового аппарата и перфорированного ПСУ отражает высокий уровень их функциональной активности и мы относим их к грибовидным шипикам. При анализе синапсов на

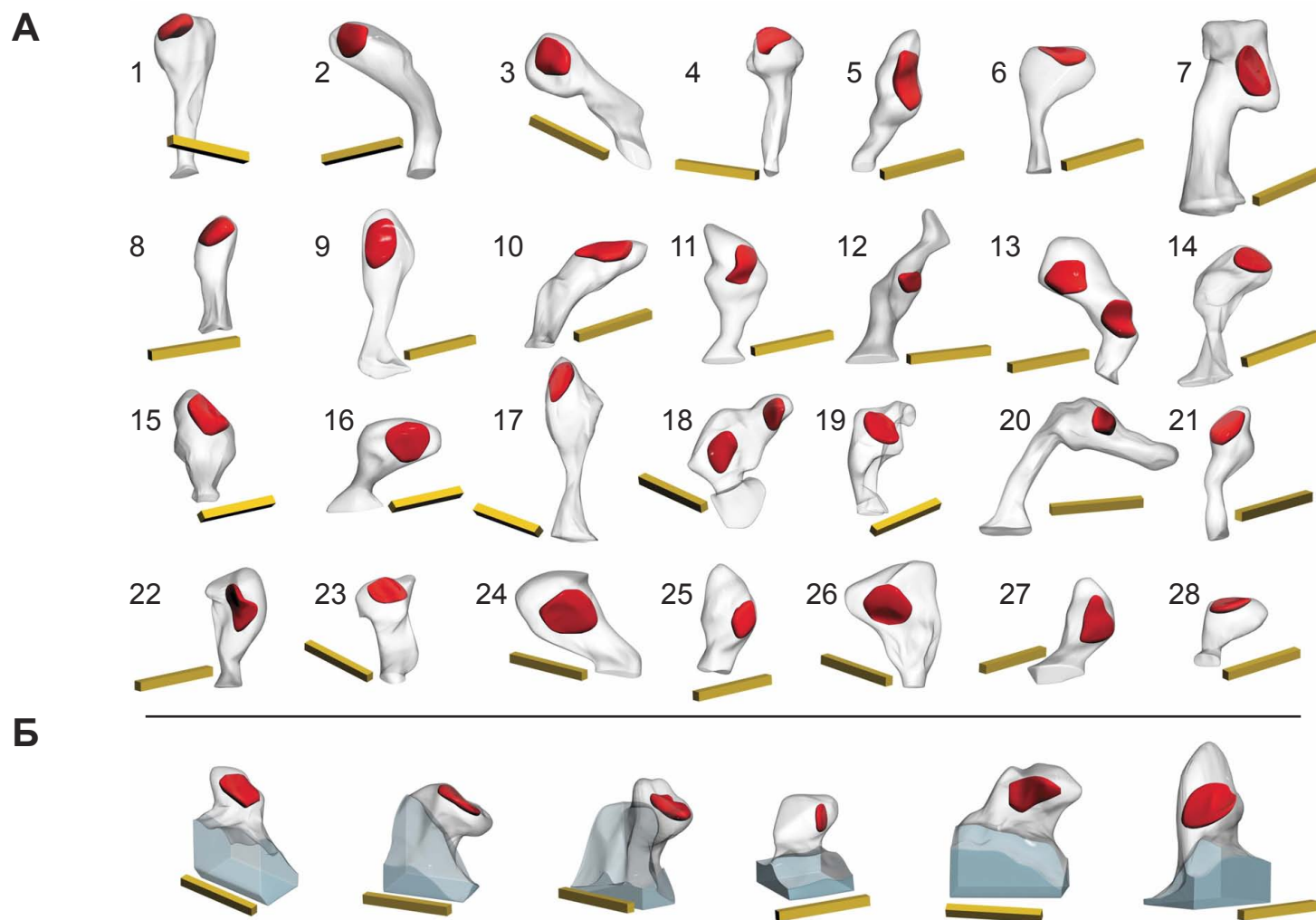


Рис. 8. 3D реконструкции тонких и пеньковых дендритных шипиков среднего молекулярного слоя зубчатой фасции.

А. Тонкие дендритные шипики. **Б.** Пеньковые дендритные шипики. Шипики реконструированы из полупрозрачного материала. ПСУ, лежащие под поверхностями шипиков, выделены красным цветом. Поскольку у пеньковых шипиков невозможно определить границу между головкой шипика и стволом дендрита, шипики реконструированы вместе с основаниями. Шкалы выделены желтым цветом: длина 500 нм, толщина и ширина по 50 нм.

серийных срезах мы не встречали в молекулярном слое 3Ф пеньковых шипиков, которые подчинялись бы двум первым критериям и в то же время имели бы перфорированные/сегментированные ПСУ или шипиковый аппарат, что согласуется с результатам 3D реконструкций и электронной цитохимии Capani et al. (2001).

Harris et al. (1992) в своей работе представили оценку объемных характеристик пеньковых шипиков. Были получены значения объема, площади поверхности, длины и ширины ножки. За исключением этой работы объемных характеристик пеньковых шипиков в литературе нет, отсутствуют и критерии определения границы между пеньковыми шипиками и дендритами. На рисунке 8 Б представлены выполненные нами 3D реконструкции пеньковых шипиков. Их форма и размеры в среднем молекулярном слое 3Ф принципиально не отличаются от таковых в CA1 области гиппокампа (см. Capani et al., 2001, p.165). Согласно стереологическим расчетам Trommald и Hulleberg (1997, Table 1, p.21) объем ножек шипиков в 3Ф в среднем составляет не более 8% от объема самого шипика. В этом случае ошибка исследователя при определении границы между дендритом и тонким или грибовидным шипиком не очень значительна. Поскольку пеньковый шипик представляет собой собственно головку шипика, то и ошибка при определении объемных параметров пеньковых шипиков значительно возрастет. О сложности определения границы между ножкой и головкой шипика, между ножкой шипика и дендритом говорилось еще в ранних работах. Например, Fifkova и Van Harreveld (1977, p.216) обсуждая вопрос оценки размеров ножек шипиков отмечали, что отсутствие четких критериев и иррегулярная форма профилей приводит к нежелательно высокому разбросу значений измеряемых параметров. По нашему мнению определение границы между поверхностью пенькового шипика и поверхностью дендрита следовало бы определять согласно нормальям к поверхности в точках с минимальным радиусом кривизны, в области перехода поверхности шипика в поверхность дендрита. В настоящее время ведется поиск математических алгоритмов описания сложных 3D объектов. В рамках этих работ разрабатываются алгоритмы сегментации поверхности объекта произвольной формы как на основе симметрий, так и на основе характера кривизны отдельных областей поверхности.

Успехи в этих направлениях достигнуты лишь для достаточно простых NURBS-поверхностей, смоделированных в 3D редакторах, тогда как для объектов с произвольной геометрией до рутинной сегментации поверхности на основе характера ее кривизны еще далеко (см. напр. Рутковский, Рутковская, 2006; Мкртчян, 2006). Вследствие сложности определения границы между пеньковым шипиком и дендритом, оценка объемных параметров пеньковых шипиков в данной работе не проводилась. Но если бы даже объемные характеристики пеньковых шипиков менялись в ходе ДВП, то согласно нашим критериям принадлежности шипика к одному из типов пеньковый шипик, изменивший свои размеры, был бы отнесен к шипикам тонким или к стволовым синапсам.

2.1.4. Синапсы на тонких шипиках и разветвленные шипики

Третий тип шипиков – шипики тонкие – соответствовал классификации Harris et al. (1992). Эти шипики не имели характерных признаков шипиков грибовидных или пеньковых. Как правило, они имели явно выраженную более или менее длинную ножку и небольшую головку и одно макулярное ПСУ (Рис. 8А). Однако как можно видеть некоторые тонкие шипики могут иметь два ПСУ (Рис. 8 шипики №13 и 18). Разветвленные дендритные шипики/синапсы в данной работе детально не исследовались, так как доля таких синапсов была около 0,5-1% от всей исследуемой популяции синапсов.

2.1.5. Разнообразие типов синапсов

в среднем молекулярном слое зубчатой фасции

Особенность ЗФ состоит в том, что четко организованная ламинарная структура молекулярного слоя ЗФ (Рис.1, 2) обеспечивает высокую специфичность связей; на дендритах среднего молекулярного слоя глутаматэргические волокна перфорантного пути образуют более 90% всех синапсов (Steward, Vinsant, 1983). В свою очередь более 90% всех этих синапсов располагается на дендритных шипиках (Harris, Kater, 1994). Следовательно, подавляющее большинство дендритных синапсов ЗФ получает одни и те же возбуждающие входы. Несмотря на это, как показывают выполненные нами 3D

реконструкции, эти синапсы морфологически очень разнообразны. Согласно исследованиям структуры синапсов в коре, СА1 области гиппокампа и неостриатуме (Peters, Kaiserman-Abramof, 1970; Harris et al., 1992; Capani et al., 2001), на дендритах среднего молекулярного слоя 3Ф на основе 3D реконструкций дендритных шипиков также можно выделить четыре основных морфологически различных типа: на грибовидных шипиках, на тонких шипиках, на пеньковых шипиках и стволовые – на стволах дендритов. В целом все наблюдаемые характеристики типов синапсов на дендритах среднего молекулярного слоя 3Ф можно свести к нескольким. Характерным признаком самых крупных грибовидных шипиков является большая головка, наличие перфорированного ПСУ и шипикового аппарата, признак пеньковых шипиков – отсутствие ножки. В таком случае к тонким будут отнесены все шипики, у которых перечисленные признаки отсутствуют. Как можно видеть на полной реконструкции дендритного сегмента (Рис. 5 Г), синапсы на тонких шипиках составляют подавляющее большинство. Используемые нами критерии идентификации типов дендритных шипиков даже на этапе работы предшествующем 3D реконструкции синапсов позволяют на серийных срезах легко дифференцировать типы синапсов и причислять их к синапсам четырех типов. Схематически типы дендритных синапсов представлены на рисунке 3. Объемные характеристики тонких и грибовидных шипиков представлены в разделе 3.3. Гл. II.

2.2. Плотность расположения синапсов

Существующие на сегодняшний день данные говорят о том, что морфологические изменения нервной ткани при ДВП могут быть связаны с изменениями числа синапсов в потенцированной области. Поэтому одной из целей данной работы была оценка изменения плотности синапсов в ходе ДВП в отличие от контрольной ткани. Предыдущие исследования плотности и структуры синапсов в поздней фазе ДВП *in vivo* базировались главным образом на стереологическом анализе с использованием парного диссектора (анализ на двух смежных срезах) или на одиночных срезах. Кроме того, в этих исследованиях при оценке плотности синапсов не учитывались возможные изменения объема ткани сопутствующие ДВП. Мы

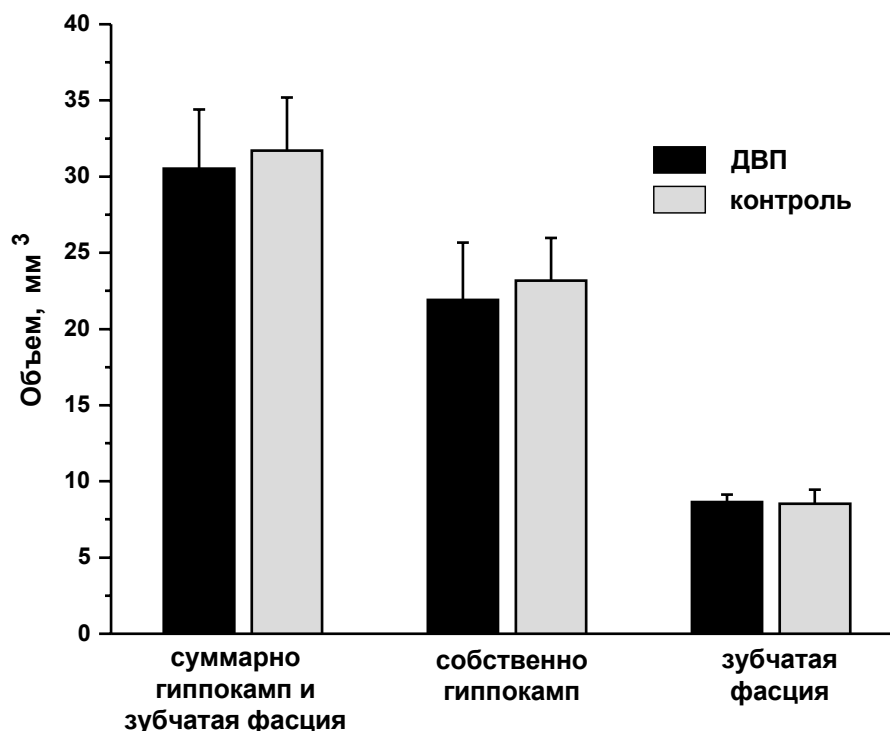


Рис.9. Объемы гиппокампов и ЗФ в контроле и при ДВП.

исследовали возможные изменения плотности синапсов в в поздней фазе ДВП *in vivo* с использованием наиболее точного морфометрического подхода – волюметрического анализа синапсов на сериях срезов.

2.2.1. Коррекция измерения плотности синапсов

Поскольку после тетанической стимуляции и в ходе ДВП возможно изменение объема потенцированной ткани, и если это изменение значительно, то оно может отразиться и на плотности синапсов в единичном объеме ткани. В таком случае, при сравнении плотности синапсов в левом полушарии с плотностью синапсов в правополушарии следовало бы ввести поправочный коэффициент, корректирующий изменение плотности синапсов к измененному объему при ДВП, если это изменение существует. На предмет возможного изменения объема потенцированной ЗФ, использовано три крысы. Согласно описанной методике (см. разд. Материалы и методы исследования) были получены значения объемов гиппокампов и ЗФ контрольных и потенцированных полушарий. На

светомикроскопическом уровне каких-либо заметных отличий цитоархитектоники между потенцированными и гиппокампами и гиппокампами из противоположных полушарий обнаружено не было. Средний суммарный объем гиппокампа и ЗФ полусферы подверженной тетанической стимуляции составлял $30,53 \pm 3,88 \text{ мм}^3$, а для самой зубчатой фации – $8,63 \pm 0,50 \text{ мм}^3$. (см. Рис. 9) Средний суммарный объем гиппокампа и ЗФ правого полушария составлял $31,7 \pm 3,50 \text{ мм}^3$, тогда как для зубчатой фации – $8,53 \pm 0,93 \text{ мм}^3$. Отношения объема ЗФ к суммарному объему гиппокампа и ЗФ в среднем составляли $28,56 \pm 3,82\%$ в левом и $26,97 \pm 1,92\%$ в правом полушариях. Проверка значений объемов гиппокампов и ЗФ правого и левого полушарий, а также их соотношений с использованием критерия Шапиро-Уилка не выявила значимых отклонений от нормального распределения (во всех случаях $W_n > 0,836$; $P > 0,205$). Сравнительный ANOVA анализ не выявил различий между средними значениями суммарных объемов гиппокампов, собственно гиппокампов и зубчатых фаций между потенцированным и контрольным полушарием (во всех случаях $F < 0,218$, $P > 0,664$). Однако отсутствие различий может быть связано с очень низкой мощностью теста ANOVA, которая при данных объемах выборок и установленном уровне значимости в отдельных случаях не превышала 6%. Поэтому для подтверждения отсутствия различий между значениями объемов из противоположных полушарий использовались непараметрические оценки однородности выборок. Критерии Крамера-Уэлча и Смирнова в данном случае не использовались, так как критерий Крамера-Уэлча дает удовлетворительные результаты при объеме выборок не менее 6 (Орлов 2004, с.566), а точные критические границы установленного уровня значимости ($p \leq 0,05$) критерия Смирнова для двух выборок с числом элементов $n=3$ отсутствуют (Большев, Смирнов, 1983, с.88, 350-352). Поэтому для сравнения однородности двух выборок использовались критерии оценки сдвига медиан как для несвязанных данных (из противоположных полушарий мозга), так и для связанных данных (полушарий одного мозга). Различий суммарных объемов гиппокампов и зубчатых фаций между левым и правым полушарием ни один из критериев не выявил ($W=12$, $W_c=6-15$; для парных данных или связанных выборок $W=6$, $W_c=-1-7$; $S=3$, $S_c=0-4$). Также

отсутствовали отличия между объемами потенцированных и контрольных зубчатых фасций ($W=9,5$, $W_c=6-15$; для парных данных $W=2$, $W_c=-1-7$; $S=1$, $S_c=0-4$). Отсутствовали различия между полушариями и в отношении объема зубчатой фасции к суммарному объему гиппокампа и зубчатой фасции ($W=11$, $W_c=6-15$; для парных данных $W=5$, $W_c=-1-7$; $S=2$, $S_c=0-4$).

Несмотря на отсутствие значимых различий между полушариями, полученные данные говорят о том, что отношение суммарного объема гиппокампа и ЗФ к объему только ЗФ были незначительно ниже в потенцированных полушариях (Рис. 9). Связаны ли несколько большие относительные объемы ЗФ в потенцированном полушарии с эффектами вызванными ДВП? Разницу объемов правого и левого гиппокампов можно было бы объяснить естественной межполушарной асимметрией (Tang, 2002; Toga, Thompson, 2003; Vallortigara, Rogers, 2005). Так, например, известно, что неокортекс правого полушария у самцов крыс несколько толще, чем левый (Diamond et al., 1975). Однако вопросы структурной межполушарной асимметрии гиппокампа, и в частности гиппокампа крыс, в настоящее время лишь начинают активно изучаться. Такие исследования включают молекулярно-генетические подходы и электрофизиологические эксперименты (Kawakami et al., 2003; Wu et al., 2005), 3D реконструкцию на светомикроскопическом уровне (Lein et al., 2005), использование высокоразрешающего ЯМР *in vivo* (напр.: Bock et al., 2006). Исторически сложилось так, что исследования асимметрии мозга сосредоточены на функциональной латерализации (гл. обр. у птиц, приматов, человека) (напр.: Hugdahl, 2005; Sun, Walsh, 2006), тогда как морфологическим исследованиям межполушарной асимметрии отдельных областей гиппокампальной формации, тем более у грызунов (обычных лабораторных животных), практически не уделяется внимания. Что касается человека, например, то объем неокортекса коррелирует с объемом гиппокампа; правый гиппокамп у детей 10-14 лет достоверно больше левого приблизительно на 11% (Utsunomiya et al., 1999), а у взрослого человека пятидесяти лет правый гиппокамп больше левого на 1,7% (Barnes et al., 2005). У приматов и человека, корреляция наблюдается не только между объемом старой и новой коры (Teffner et al., 2004a), но и на уровне отделов гиппокампальной формации.

Так, например, по данным Teffer et al., у приматов при правосторонней асимметрии корреляция суммарного объема гиппокампа и ЗФ с объемами СА областей близка к единице ($r_s = 0,918$, $p < 0,0001$), тогда как корреляции объема ЗФ с объемом гиппокампа обнаружено не было (Teffer et al., 2004b). Сравнение грызунов с приматами на первый взгляд вряд ли может показаться корректным, тем не менее, согласно многим исследованиям латерализация во многом сходна у амниот (см. напр.: Vallortigara et al., 1999; Brownell et al., 2000; Endrew, Rogers, 2002; Vallortigara, 2004; Güntürkün, 2005; Babcock, 2005). По нашим данным суммарный объем гиппокампа и ЗФ в правом полушарии в среднем также несколько превышал суммарный объем в левом полушарии (на $3,99 \pm 2,53\%$), так же и собственно гиппокамп правого полушария превышал по объему собственно гиппокамп левого полушария. Поэтому если отношения суммарного объема гиппокампа и ЗФ к объему ЗФ и были незначительно ниже в потенцированных полушариях, то скорее всего они связаны с межполушарной асимметрией собственно гиппокампов. Кроме того, как следует из наших данных, различия относительных объемов ЗФ между полушариями не были достоверны и лежали в пределах ошибки ($1,59 \pm 2,44\%$). Поэтому при подсчете плотности синапсов в потенцированной ЗФ коррекция плотности синапсов не проводилась.

2.2.2. Плотность расположения синапсов

Для решения вопроса, меняется ли количество синапсов в поздней фазе ДВП, проведен анализ плотности синапсов на сериях срезов. Волуметрический анализ проведён в верхних листах дорзального отдела ЗФ крыс из левого, потенцированного, и из правого (не подверженного стимуляции) полушарий. Результаты анализа свидетельствуют о том, что в среднем молекулярном слое ЗФ плотность синапсов составляет около 300 синапсов в 100 мкм³ (Рис. 10).

Проверка значений плотности синапсов в потенцированных и контрольных ЗФ, а также в стимулированной ЗФ с использованием критерия Шапиро-Уилка не выявила значимых отклонений от нормального распределения (во всех случаях $W_n > 0,88$; $P > 0,33$). ANOVA анализ не выявил различий между средними значениями

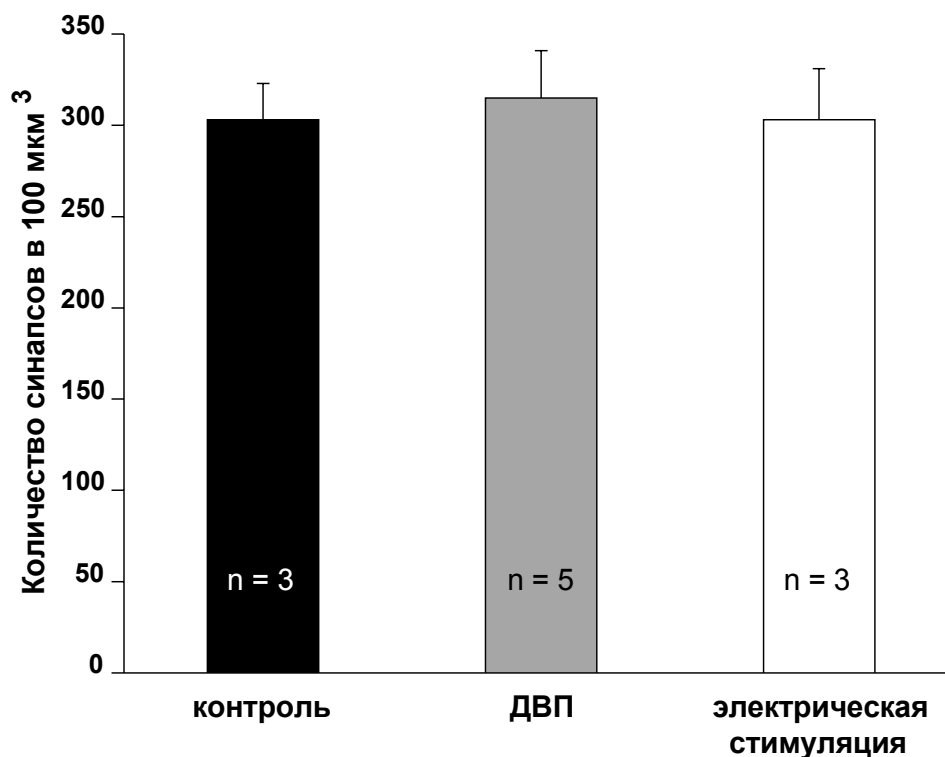


Рис. 10. Результаты анализа плотности синапсов в контроле и при ДВП.
n – число проанализированных серий срезов.

плотности синапсов между контрольными, стимулированными и потенцированными полушариями (во всех случаях $F < 0.107$ и $P > 0.754$). Как и в случае оценки объемов гиппокампов и зубчатых фассий результаты теста ANOVA были проверены непараметрическими методами. Для сравнения однородности двух выборок использовался двухвыборочный критерий Смирнова. Интегральных различий между плотностями синапсов в левом и правом полушариях не наблюдалось ($D_s = 0,4$; $P = 1,1$). Также не наблюдалось различий ни между потенцированным и стимулированным полушариями ($D_s = 0,267$; $P = 1,53$), ни между контрольными полушариями и полушарием стимулированным ($D_s = 0,333$; $P = 1,43$; при $p = 0,1$). При сравнении сдвига плотностей синапсов так же ни критерий Вилкоксона, ни Ван дер Вардена не выявили достоверных отличий ни между контрольными и потенцированными полушариями ($W = 12$, $W_c = 7-20$; $X = -0,474$, $Z = -0,429$, $P = 0,334$), ни между контрольными и стимулированными полушариями ($W = 10$, $W_c = 6-15$; $X = -0,322$, $Z = -0,34$, $P = 0,367$), ни между потенцированными и стимулированными полушариями ($W = 13$, $W_c = 7-20$; $X = 0,14$, $Z = 0,126$, $P = 0,45$). Полученные данные волнометрического

анализа плотности асимметричных синапсов на сериях срезов показывают, во-первых, что общее их количество спустя 6 ч ДВП в mML 3Ф достоверно не изменяется. Во-вторых, данные свидетельствуют о том, что ни сама по себе пролонгированная повторная ритмичная электрическая стимуляция перфорантного пути *in vivo*, ни повышенный уровень повторной ритмичной активности синапсов вследствие электрической стимуляции с заданными в нашем эксперименте параметрами не влияют на изменение общей плотности синапсов в молекулярном слое 3Ф.

Полученные данные лишь отчасти согласуются с результатами полученными при помощи конфокальной микроскопии, которые показали выраженную пластичность и подвижность дендритных шипиков после ДВП *in vitro* (Engert, Bonhoeffer, 1999; Nagerl et al., 2004). Однако, мы не нашли подтверждения того что общее количество шипиков увеличивается. Разрешение такой несогласованности возможно при анализе самих подходов к оценке количества синапсов. Так, например, Engert и Bonhoeffer (1999) наблюдали рост новых шипиков в CA1 гиппокампа *in vitro* как спустя 30-60 мин, так в поздней фазе ДВП, вплоть до 22 ч. Во-первых, Engert и Bonhoeffer (1999), используя суперфузию локальной области раствором с нормальной концентрацией Ca^{2+} на фоне общей блокады синаптической активности, наблюдали увеличение количества шипиков в суперфузируемой области вследствие ДВП, однако исключительно на тех сегментах дендритов, которые отвечали на стимуляцию коллатералей Шаффера. Даже на этих сегментах проявлялась явная тенденция к образованию новых шипиков в виде локальных групп/кластеров, причем не на всех, но лишь на отдельных небольших участках (порядка 5-50 мкм) отдельных дендритов. Более того, многие шипики появлялись как на границах, так и за пределами суперфузируемой области. Какой-либо закономерности распределения «исчезающих» шипиков при аппликации AP5 (антагониста NMDAR) не прослеживалось. Во-вторых, тут следовало бы обратить внимание на работы, в которых показано, что блокада активности вовсе не ограничивает синаптогенез, но наоборот, может приводить к значительной его активации (Steward, Vinsant, 1983; Kirov, Harris, 1999; Portera-Cailliau et al., 2003; Kirov et al., 2004; Richards et al., 2005).

Кроме того, *in vitro* всегда наблюдается более выраженная пластичность шипиков и большее их количество, нежели *in vivo* (Kirov et al., 1999; Kirov, Harris, 1999). Существует даже мнение, что именно понижение общей активности может стимулировать синаптогенез во взрослом организме за счет незрелых пеньковых шипиков (Petrak et al., 2005). Наш анализ плотности *синапсов*, в отличие от результатов конфокальной микроскопии, представляет собой интегральную оценку плотности синапсов *in vivo*, но не оценку плотности *шипиков* на локально активированных сегментах отдельных дендритов после блокады общей активности *in vitro*. Кроме того, детальный анализ работы Engert и Bonhoeffer (1999), а также других работ, основанных на световой микроскопии, показывает, что *in vitro* наблюдается не появление новых синапсов, а именно рост шипиков. Этот рост, согласно Kirov et al. (2004) и Petrak et al. (2005) мог проявляться в тех же местах, в которых шипики могли исчезать, и в том числе в местах расположения шипиков пеньковых, большинство из которых на уровне световой микроскопии дифференцировать невозможно. С другой стороны, если не брать в расчет результаты оценки плотностей синапсов полученных на одиночных срезах или с использованием парного диссектора (см. разд. 8.1.), или результаты анализа плотности шипиков на отдельных выбранных для реконструкции дендритах (см. обсуждение в Harris et al., 1992), то наши данные практически согласуются и с работой Harris и её коллег на области CA1 гиппокампа с использованием волюметрического анализа, в которых также учитывалась интегральная плотность синапсов (Kirov, Harris, 1999; Ostroff et al., 2002; Sorra, Harris, 1998). Наши данные также согласуются с результатами работ, в которых анализировалась плотность синапсов после химически вызванной ДВП, при которой активируются все синапсы, а не только синапсы на отдельных дендритных сегментах отдельных дендритов. Такие работы по химической ДВП выполнены как с использованием конфокальной микроскопии Hosokawa et al. (1995), так и с использованием волюметрического анализа плотности синапсов на серийных ультратонких срезах (Stewart et al., 2005). Полученные результаты могут говорить о том, что общее число синапсов не является критическим для долговременного поддержания высокой эффективности

синаптической передачи при ДВП. В поддержку данного предположения свидетельствуют полученные нами ранее данные о плотности синапсов в СА1 области гиппокампа с использованием моделей гибернации сусликов и искусственной гипотермии крыс. В этих работах было показано, что (несмотря на то, что у крыс плотность синапсов двукратно превосходит плотность синапсов у сусликов) вход в состояние гибернации и гипотермии, когда электрическая активность мозга снижается до минимума, а также выход из гипобии не сопровождается изменением общего числа синапсов (Попов с соавт., 2003; Медведев, 2004). По-видимому, в усилении эффективности синаптической передачи критическое значение имеют другие формы синаптической пластичности.

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. Ранее детальные исследования соотношений различных типов синапсов в ходе ДВП с использованием серийных срезов проводились лишь группе под руководством К.М. Harris. Так спустя 2 ч после высокочастотной стимуляции *in vitro*, Sora и Harris (1998) не обнаружили достоверного изменения пропорций различных категорий синапсов в СА1 гиппокампа. Такие же результаты *in vitro* были получены на синапсах СА1 гиппокампа и после химически вызванной ДВП (Stewart et al., 2005). Тем не менее, в обеих этих работах после ДВП наблюдалась сходная тенденция к увеличению синапсов на тонких дендритных шипиках, хотя достоверных отличий между ДВП и контролем не наблюдалось. Также в результатах работы Stewart et al. можно проследить тенденцию к уменьшению пеньковых и стволовых синапсов. Поэтому нельзя исключать той возможности, что в поздней фазе ДВП *in vivo* может проявляться форма пластичности синапсов связанная с изменением соотношения типов синапсов.

Для проверки этого предположения мы провели анализ соотношения отдельных типов синапсов. Для оценки соотношения типов шипиков/синапсов мы не

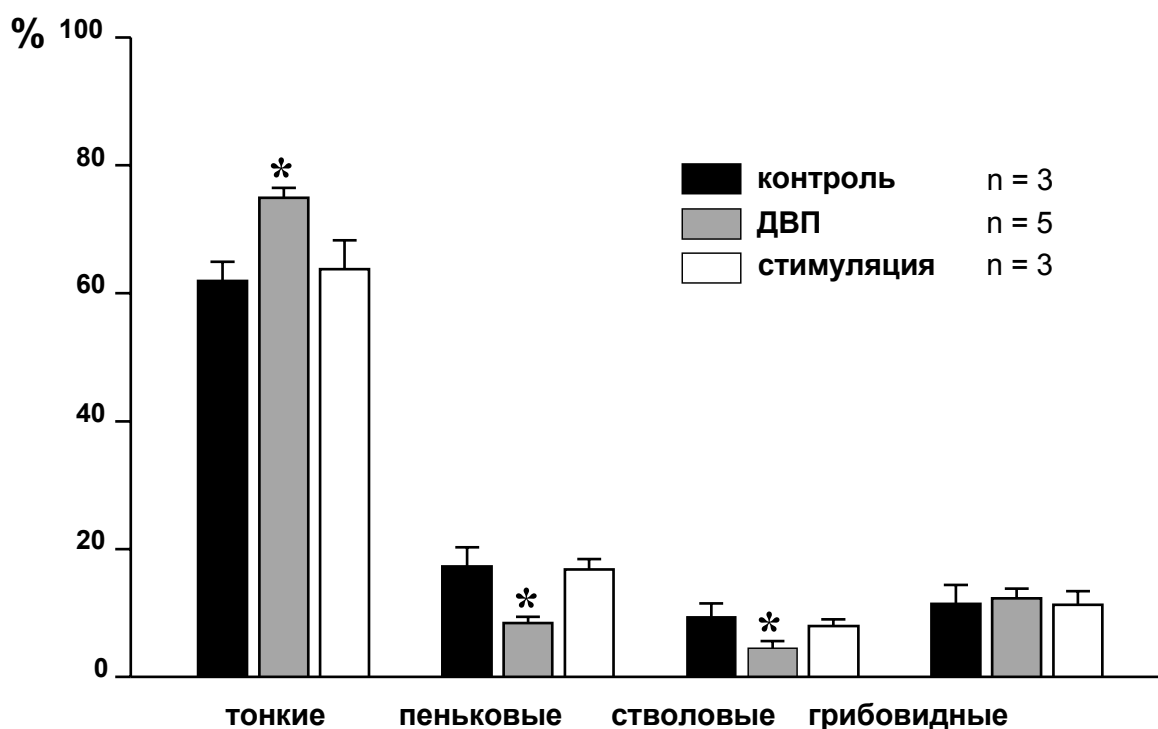


Рис. 11. Количественные соотношения морфологически различных типов синапсов. n – см. на рис. 10.

использовали подходов таких, что использовали Trommald et al. (1996), поскольку согласно Harris et al. (1992) выбор отдельных дендритных сегментов может вносить значительную погрешность в измерения. Для выяснения соотношения количества шипиков/синапсов каждой категории параллельно подсчету плотности синапсов на серийных срезах каждый шипик/синапс согласно вышеописанным критериям причислялся к одному из четырех типов: к синапсам стволовым, пеньковым, тонким или грибовидным. Средние значения процентных соотношений четырех типов синапсов к их общему количеству представлены на рисунке 11.

Оказалось, что в среднем молекулярном слое ЗФ доминирующий тип синапсов – это синапсы на тонких шипиках, в контроле их доля составляла около 62%. Доля синапсов на пеньковых шипиках составляла 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), а также у разных животных (крысы, мыши, суслики) принципиально не различается (Harris et al., 1992; Capani et al., 2001; Попов с соавт., 2003; Медведев, 2004; Stewart et al., 2005). Проверка распределений отдельных типов синапсов в потенцированных и контрольных ЗФ, а также в стимулированной ЗФ с

использованием критерия Шапиро-Уилка не выявила значимых отклонений от нормального распределения (во всех случаях $W_n > 0,781$; $P > 0,057$). Для сравнения процентных соотношений категорий синапсов использовались параметрические и непараметрические критерии как описано выше. При сравнении соотношений типов синапсов ANOVA анализ не проявил достоверных различий между контрольным (правым) и стимулированным (непотенцированным) полушарием ни по одной из категорий синапсов. Различий также не наблюдалось между ни между потенцированным и стимулированным, ни между контрольным и потенцированным (во всех случаях $F < 1,116$ и $P > 0,350$). Однако как показал анализ мощности, во всех случаях она не превышала 13%. Что касается самых крупных, грибовидных, шипиков, то дополнительная проверка отсутствия различий с использованием непараметрических критериев так же различий не проявила (для всех состояний $0,333 \leq D_s \leq 0,667$, $P > 0,378$; $W = 10-13$, $W_c = 6-20$; достигнутый уровень значимости X-критерия $P > 0,144$). Не наблюдалось различий и между контрольным и стимулированным полушариями по остальным типам синапсов (для всех сравниваемых групп $0,333 \leq D_s \leq 0,667$, $P > 0,378$; $W = 9-12,5$, $W_c = 6-15$; достигнутый уровень значимости X-критерия $P > 0,187$). Однако, что касается тонких шипиков, то процент их в среднем молекулярном слое потенцированной ЗФ был достоверно увеличен ($F > 18$, $P < 0,005$) по сравнению с ЗФ правого полушария, или стимулированного, но не потенцированного левого полушария контрольной крысы. В тоже время процент пеньковых и стволовых синапсов в подверженной тетанической стимуляции ЗФ был достоверно меньше чем в контроле и после стимуляции без потенциации ($F > 18$, $P < 0,005$). Таким образом, спустя 6 ч после индукции ДВП *in vivo* соотношение типов синапсов значительно отличалось от контроля. Количество синапсов на тонких шипиках было увеличено на 13%. При этом количество синапсов на пеньковых шипиках было уменьшено на 9%, а количество синапсов на стволах дендритов было уменьшено 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*

осуществлялось на фоне значительных изменений соотношения синапсов разных типов.

До нашей работы оценок соотношений категорий синапсов *in vivo* во всем объеме ткани с использованием серийных срезов не проводилось. 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 дендритных шипиках. Поэтому возможно, что отличия наших результатов от результатов Sora и Harris (1998) и Stewart et al. (2005), обусловлены различиями как экспериментальных условий, так и исследуемых областей. Однако, наблюдаемое нами увеличение пропорции тонких шипиков согласуется с данными экспериментов Hosokawa et al. (1995), проведенными на области CA1 гиппокампа. Авторы исследовали влияние химически вызванной ДВП на размеры и количество дендритных шипиков и предположили, что одна из основных форм структурных изменений при ДВП может заключаться в росте субпопуляции тонких шипиков. В нашем случае увеличение пропорции синапсов на тонких шипиках сопровождалось уменьшением пропорций стволовых и пеньковых синапсов, которые с одной стороны морфологически отличаются от пеньковых шипиков/синапсов пирамидных нейронов (см. разд. 2.1.2.), а с другой стороны находятся за пределами разрешения световой микроскопии. Вполне возможно, что увеличение пропорции синапсов на тонких шипиках обусловлено ростом шипиков пеньковых и образованием шипиков на месте стволовых синапсов. Идея возможного перехода стволовых синапсов в пеньковые, и перехода пеньковых синапсов в тонкие в целом не противоречит ранее полученным результатам при исследованиях синаптогенеза в CA1 гиппокампа с (Harris et al., 1992; Fiala et al., 1998; Kirov, Harris, 1999). Но 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, что согласуется с данными Harris et al. (1992). Наши данные могли бы говорить о том, что в зубчатой фасции после 6 часов ДВП *in vivo* происходит перестройка синапсов/шипикиков уже существовавших до тетанической стимуляции, нежели «расщепление» дендритных шипиков или образование синапсов *de novo*.

И мы не можем также отбрасывать предложенную Sorra и Harris (1998) возможность одновременной элиминации одних синапсов и новообразования других, в результате которых не наблюдалось бы изменения конечных значений плотности синапсов. Но такая форма синаптической пластичности, по-видимому, в меньшей степени затрагивает грибовидные шипики, большинство из которых *in vivo* стабильны в течение месяцев (Holtmaat et al., 2005), тогда как продолжительность эксперимента в данной работе – 6 часов. Поэтому вряд ли можно считать, что в ходе ДВП *in vivo* происходит массовый переход грибовидных шипиков в другие типы шипиков или элиминация одних грибовидных шипиков с новообразованием других. Прояснить образуются ли грибовидные шипики из тонких или пеньковых возможно при электронно-микроскопическом контроле прижизненных наблюдений.

Интересно то, что после стимуляции ЗФ без индукции ДВП соотношения синапсов разных типов не менялись, хотя интенсивность синаптических ответов поддерживалась на столь же высоком уровне, что и при ДВП. Однако ранее, с использованием моделей гибернации сусликов и искусственной гипотермии крыс мы показали, что *in vivo* в альтернативных функциональных состояниях соотношение различных категорий синапсов может значительно варьировать. При понижении функциональной активности нейронов количество тонких шипиков уменьшается, тогда как при восстановлении функциональной активности нейронов количество тонких шипиков увеличивается (Попов с соавт., 2003; Медведев, 2004). Возникает вопрос: что общего между гибернацией и ДВП? В обоих случаях на фоне резкого подъема электрической активности запускается экспрессия генов раннего ответа и происходит мощная активация всей 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. Принимая во внимание то, что более активному состоянию после выхода из гипобии и в поздней фазе ДВП соответствует большее число синапсов на тонких дендритных шипиках, можно было бы предполагать, что большее число тонких шипиков является критическим для поддержания высокого уровня синаптической передачи. Но в СА1 у суслика независимо от состояния тонких шипиков в 2 раза меньше, чем у крысы (130 против 260 в 1 мкм^3 ; Медведев, 2004). Поэтому нельзя однозначно утверждать, что большее число тонких шипиков определяет высокий уровень эффективности синаптической передачи.

3. Анализ морфологии синапсов в контроле и при ДВП на основе 3D реконструкции

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. Идея сопряженного с усилением эффективности синаптической передачи увеличения размеров синапса была давно предложена и давно подтверждена, однако детального анализа синапсов в поздней фазе ДВП *in vivo* не проводилось. 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 и оценили их объемные характеристики. Один из типов это синапсы на тонких шипиках – численно преобладающий и наиболее пластичный тип, а второй – на шипиках грибовидных, наиболее стабильных и наиболее сложно организованных. На рисунке 12 А-Г представлены примеры реконструкций тонких и грибовидных

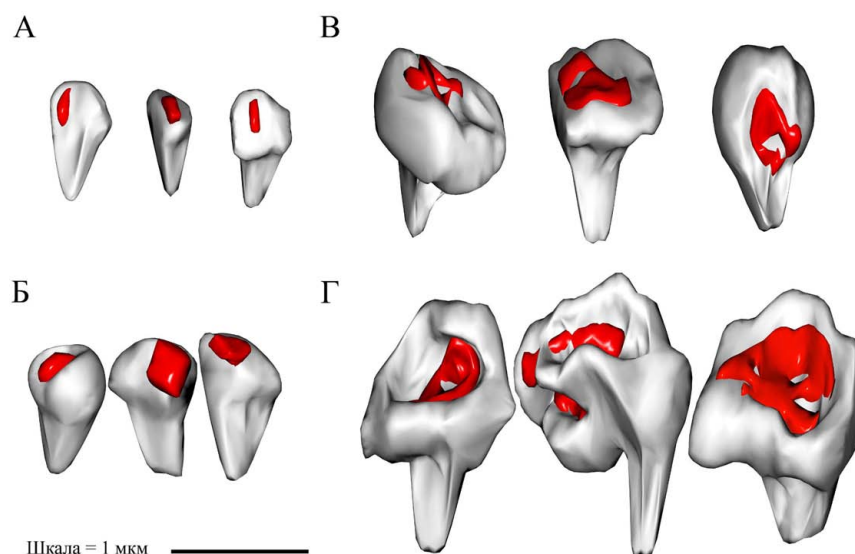


Рис. 12. Примеры реконструкций дендритных шипиков из контрольной и тетанизированной ЗФ.

А, Б – тонкие шипики; В, Г – грибовидные шипики; А, В – шипики в контроле; Б, Г – шипики при ДВП. Цветом выделены проекции ПСУ на поверхности головок шипиков, которые при ДВП более вогнуты. См. также Рис. 6 и Рис. 7; шипики №1, 3, 5, 6, 11, 15, 16, 22, 23, 27, 28, 30, 31 и 33 реконструированы на сериях из потенцированной ЗФ, остальные из контрольной. Тонкие шипики №7, 9, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 26 рисунка 8 реконструированы на сериях из потенцированной ЗФ, остальные из контрольной.

дендритных шипиков из контрольной и потенцированной ЗФ полученные нами ранее (Роров et al., 2003). Шипики из тетанизированных полушарий имеют большие размеры, а форма головок шипиков после ДВП более вогнутая, чем в контроле (см. также разд. 2.1.1., Гл. II). Параметры представленных шипиков приблизительно соответствуют средним значениям параметров рассчитанных на основе количественного анализа 3D реконструкций.

На рисунках 13-16 представлены частотно-сгруппированные распределения значений параметров синапсов на тонких и грибовидных шипиках в контроле и после ДВП. Подписи на рисунках содержат средние значения и их стандартные отклонения. Значения медиан, асимметрии и эксцесса и их стандартные ошибки (se; Рис.13) даны правее. Каждое распределение разбито на 15 интервалов. Число интервалов выбрано произвольно для удобства оценки симметрий и модальностей распределений. На

гистограммах для наглядности различий также нанесены кривые, соответствующие функциям распределений параметрических семейств. При этом принадлежность к определенному типу семейств определялась как визуально, так и согласно критерию Колмогорова-Смирнова и критерию омега-квадрат. Согласно статистикам этих критериев, почти половина распределений не отличалась от распределений логнормальных, бета и гамма распределений. Большинство распределений не является унимодальным и половина из них не подчиняется нормальному закону, о чем свидетельствуют как значения асимметрии и эксцесса, так и результаты теста Шапиро-Уилка. Значения асимметрии для всех групп параметров лежали в диапазоне приблизительно от -0,6 до 2,8 при ошибке асимметрии около 0,4. Значения эксцесса для всех групп параметров лежали в диапазоне приблизительно от -0,9 до 9,2 при ошибке эксцесса около 0,8. Причем отклонения от нормальности не проявлялись в ДВП у грибовидных шипиков и их ПСУ (для всех $0,933 < W_n \leq 0,988$ при $0,053 < P < 0,974$), в ДВП у ПСУ тонких шипиков ($0,934 < W_n < 0,952$ при $0,056 < P < 0,186$), а так же в контроле у площадей поверхностей грибовидных шипиков ($W_n > 0,939$ $P > 0,081$) и у площадей поверхностей их ПСУ ($W_n > 0,960$ $P > 0,324$). Во всех остальных случаях значения отклонялись от нормального закона, и в половине таких случаев (все параметры тонких шипиков в контроле) отклонения от нормальности были очень значительные (для всех $0,516 < W_n < 0,812$; $1,79 \cdot 10^{-5} < P < 2,10 \cdot 10^{-11}$). Распределения площадей поверхностей грибовидных шипиков в контроле и при ДВП не отвергались W_n -тестом от нормального распределения но соотношение их дисперсий все же отличалось на треть от единицы. Следовательно, в каждой паре сравниваемых значений условия применения стандартных параметрических критериев (t -тест Стьюдента или ANOVA) не выполнялись. В данной работе мы придерживались как «классических», так и «высоких статистических технологий» (Орлов, 2003, см. также <http://orlovs.pp.ru/stat.php>); для сравнения распределений использованы двухвыборочный критерий Смирнова, критерий Крамера-Уэлча, и критерий Ван дер Вардена. Под средними значениями на Рис. 13-16 представлены значения статистик и достигнутые уровни значимости. Статистика Смирнова характеризует наличие каких бы то ни было, интегральных, различий между распределениями плотностей вероятностей, статистика Крамера-Уэлча характеризует степень различия средних значений и статистика Ван дер Вардена – сдвиг медиан

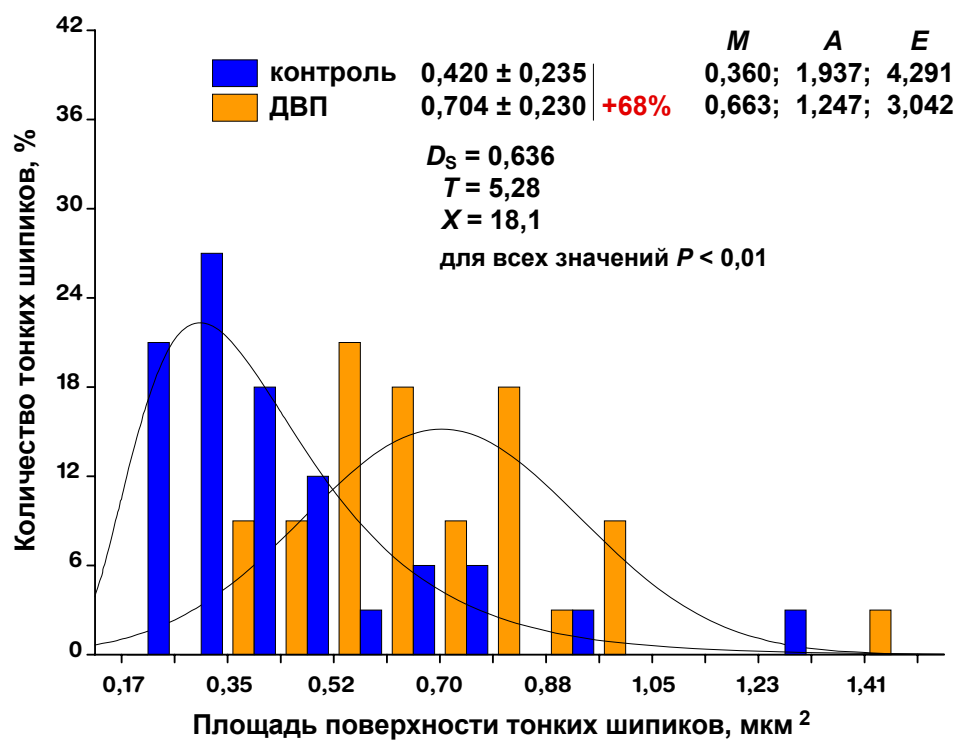
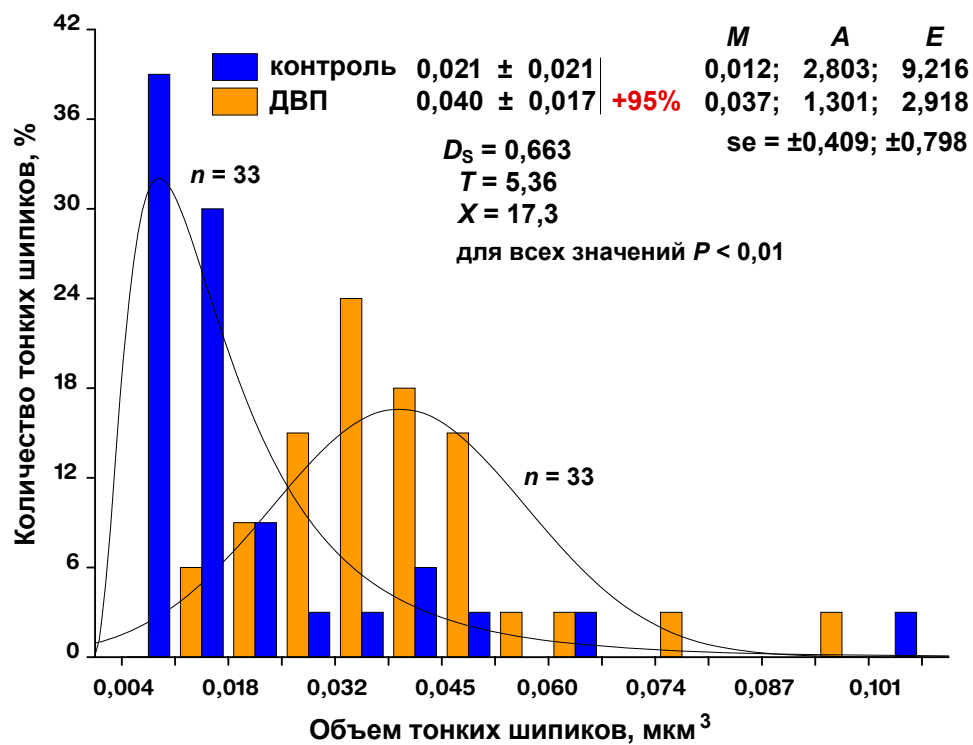


Рис. 13. Параметры тонких шипиков в контроле и при ДВП.

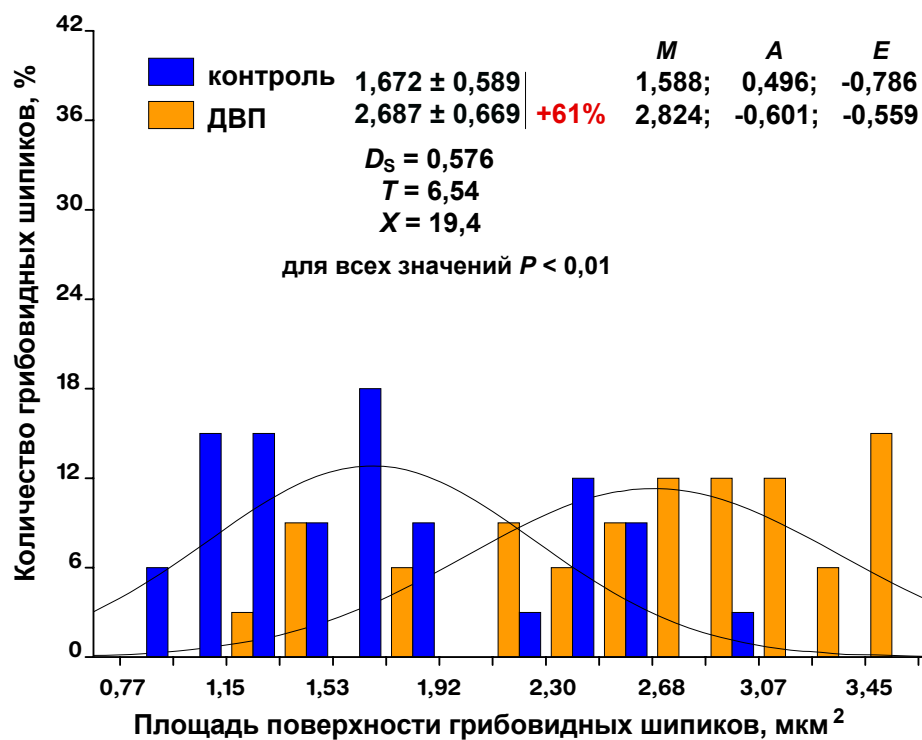
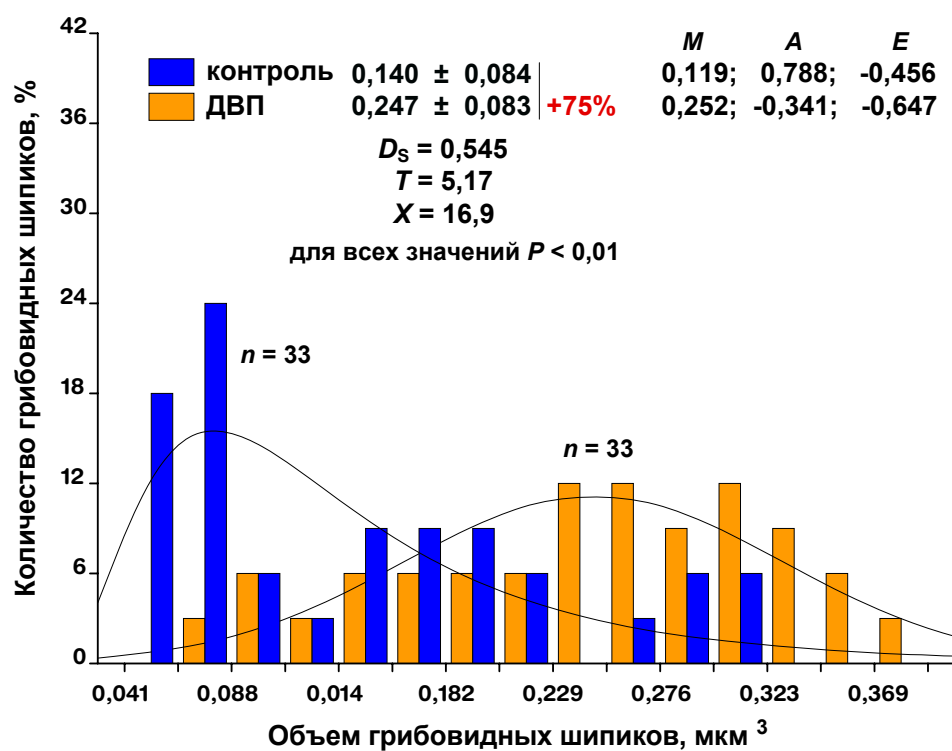


Рис. 14. Параметры грибовидных шипиков в контроле и при ДВП.

распределений. Достигнутые уровни значимости D_s и X во всех случаях $P < 0,01$, однако реальные уровни значимости в большинстве случаев гораздо ниже (в 5-7 знаке после запятой). Реальные уровни значимости T -критерия также значительно ниже, поскольку значения T во всех случаях были выше (от 4 до 6,54). Таким образом спустя 6 ч после индукции ДВП наблюдались значимые отличия параметров синапсов.

Тонкие дендритные шипики

Спустя 6 ч после индукции ДВП наблюдается смещение вправо плотностей распределения всех наблюдаемых параметров тонких шипиков. В контрольных полушариях все параметры тонких шипиков характеризовались более островершинными распределениями по сравнению грибовидными шипиками. Относительное увеличение средних значений объема тонких шипиков в тетанизированных полушариях составило 95% (Рис. 13). Несколько меньшие изменения, что естественно, наблюдаются при сравнении площадей поверхностей тонких шипиков, которые в левом полушарии в среднем на 68% превышают значения в правом, не стимулированном полушарии. Как можно видеть из кривых полученных в результате подгонки распределений к параметрическим семействам, часть параметров тонких шипиков при ДВП перекрывается с параметрами грибовидных шипиков в контроле.

Грибовидные дендритные шипики

На Рис. 14 и 16 плотности распределений параметров синапсов на грибовидных шипиках при ДВП также смещены вправо, но этот сдвиг менее выражен по сравнению с тонкими шипиками. Относительное увеличение средних значений объема составило более 75% (Рис. 14). Как отмечалось выше, между объемом грибовидного шипика и площадью его поверхности наблюдается жесткая связь (Табл. 3). Соответственно при увеличении объема шипиков после ДВП наблюдается и увеличение площади поверхности грибовидных шипиков (Рис. 14), которые в левом полушарии в среднем на 61% превышают значения в правом полушарии, в контроле. Интересно также, тогда как наибольшее изменение принадлежит увеличению объема грибовидных шипиков, согласно значению T -критерия (6,54), наиболее достоверным является увеличение площади поверхности

шипика. Наиболее достоверное увеличение площади согласуется с тем наблюдением, что головки грибовидных шипиков при ДВП, более вогнуты.

Результаты морфометрического анализа на основе 3D реконструкций свидетельствует о том, что к 6 часам ДВП значительно увеличены размеры как тонких, так и грибовидных шипиков. Следовательно, в поздней фазе ДВП высокая эффективность синаптической передачи поддерживается на фоне увеличенных размеров синапсов. Но что интересно, наибольшие изменения принадлежат тонким дендритным шипикам. Полученные результаты отчасти согласуются как с ранними работами, например, с работой Fifkova и van Harreveld (1977), так и с современными работами группы Касаи, например, Matsuzaki et al. (2004). Fifkova и van Harreveld, сообщали, что после запуска ДВП в 3Ф мышей объем шипиков в oML 3Ф увеличивается, достигает максимума в течение часа, а спустя 4-8 часов снижается и к 24 ч сохраняется на уровне 125%. Без использования 3D реконструкции Fifkova и van Harreveld не разделяли шипики на различные типы. Группой исследователей 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). Поэтому предполагается, что за общее продолжительное увеличение объемов шипиков могут отвечать именно шипики тонкие, поскольку вскоре после потенцирования размеры крупных шипиков возвращаются к исходным значениям. Наши результаты, говорят о том, что форму меняют как тонкие, так и грибовидные шипики, но при этом популяция грибовидных шипиков численно стабильна. Определяет ли это обстоятельство различия функциональной роли двух типов синапсов? Kasai et al., 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. Мы также наблюдаем долговременное изменение размеров тонких шипиков. При этом в поздней фазе ДВП *in vivo* высокая эффективность синаптической передачи также сохраняется на фоне увеличенных размеров в большей мере тонких шипиков, чем грибовидных. Но в отличие от работ группы Касаи, наши результаты, полученные *in vivo*, не подтверждают неизменности размеров грибовидных шипиков спустя 6 часов

ДВП. При сходной форме реакции в ранней и поздней фазе ДВП механизм ее различен. Как и предполагалось ранее (Fifkova, van Harreveld, 1977), по-видимому, в первые минуты объем шипиков растет за счет осмотических процессов (Matsuzaki et al., 2004; Noguchi et al., 2005) и перестроек цитоскелета (Fukazawa et al., 2003; Okamoto et al., 2004), в дальнейшем преобладают биосинтетические процессы (Ostroff et al., 2002). Поэтому некоторая несогласованность наших данных с результатами *in vitro* потенциации отдельных шипиков скорее связана с тем, что в работах Kasai наблюдалась ранняя фаза ДВП, не запускающая экспрессии генов и синтеза значительного объема «строительного материала» для длительного поддержания размеров и функций синапсов/шипиков. Поздняя фаза ДВП связана со сдвигом баланса актина дендритных шипиков в сторону образования фибриллярной формы (Fukazawa et al., 2003; Okamoto et al., 2004), тогда как одна из функций актина – поддержание стабильности структуры синапса (Halpain et al., 1998; Fischer et al., 2000; Furuyashiki et al., 2002). Известно, что в результате блокады подтипов AMPAR и NMDAR могут наблюдаться противоположно направленные эффекты. В упрощенной форме, блокада AMPAR приводит сдвигу баланса актина в сторону глобулярной формы и большей подвижности кортикального цитоскелета шипиков, такой же эффект вызывает слабая активация NMDA рецепторов. В таком случае, активация синапсов тонких, пеньковых и стволовых, т.е. маленьких, содержащих в основном NMDA рецепторы, приводила бы к дестабилизации формы шипиков, и в совокупности осмотическими факторами к набуханию/росту головок шипиков. С другой стороны, поскольку только согласованные во времени аппликации медиаторов и ПД приводят к блокаде диффузионных/транспортных процессов через ножку шипика (Bloodgood, Sabatini, 2005), то активация NMDA рецепторов маленьких «молчащих», шипиков/синапсов (Matsuzaki et al., 2001) вовсе не ограничивает транспорта «строительного материала» в шипики через их ножки. Возможно, что подобный этому механизм мог бы определять наблюдаемые нами различия в увеличении размеров тонких и грибовидных шипиков.

3.2. Анализ постсинаптических уплотнений

3.2.1. Морфометрия постсинаптических уплотнений

Однако остается открытым вопрос: определяют ли увеличенные размеры дендритных шипиков уровень эффективности синаптической передачи при ДВП?

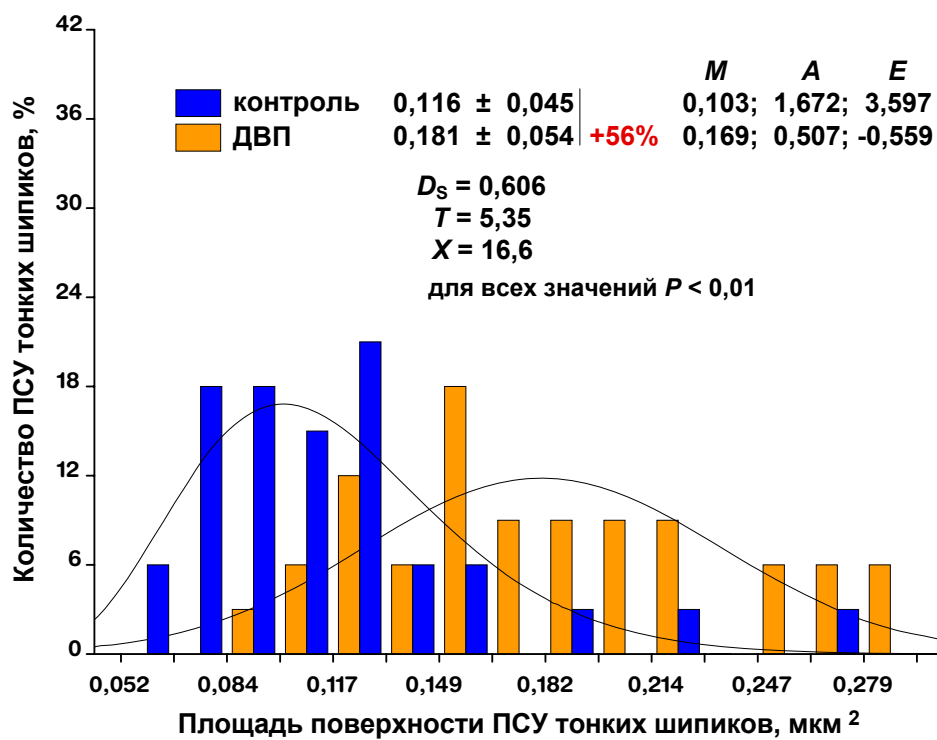
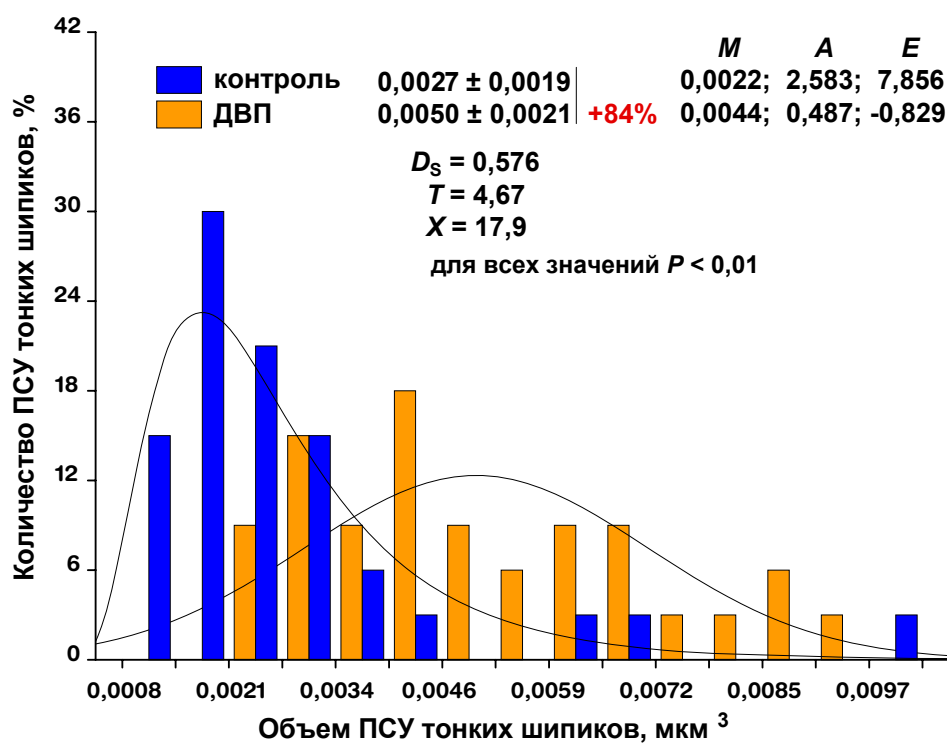


Рис. 15. Параметры ПСУ тонких шипиков в контроле и при ДВП.

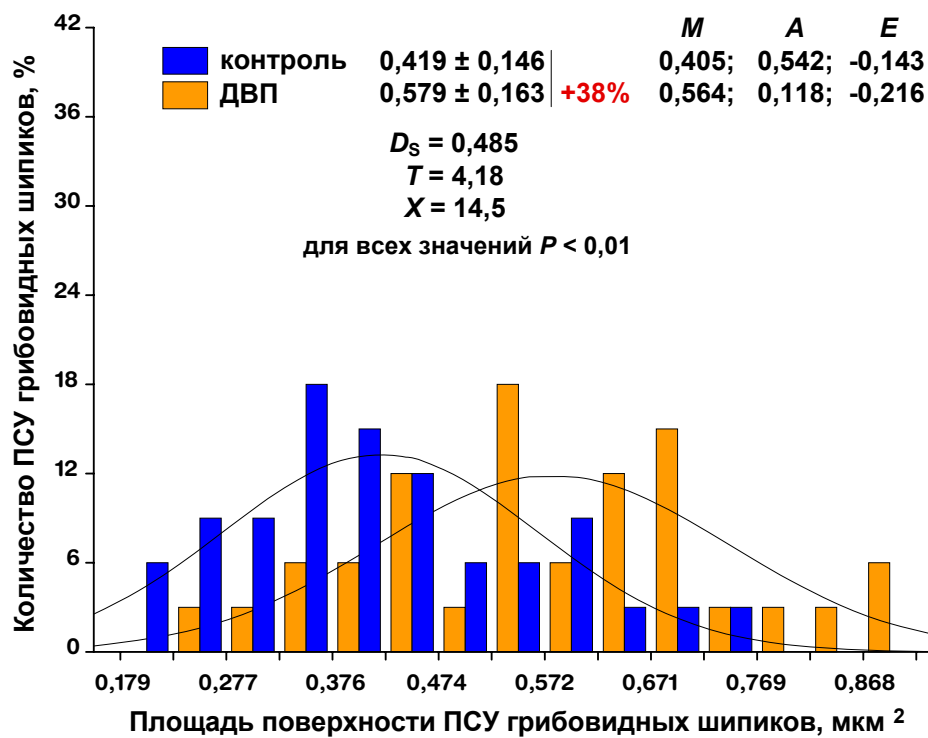
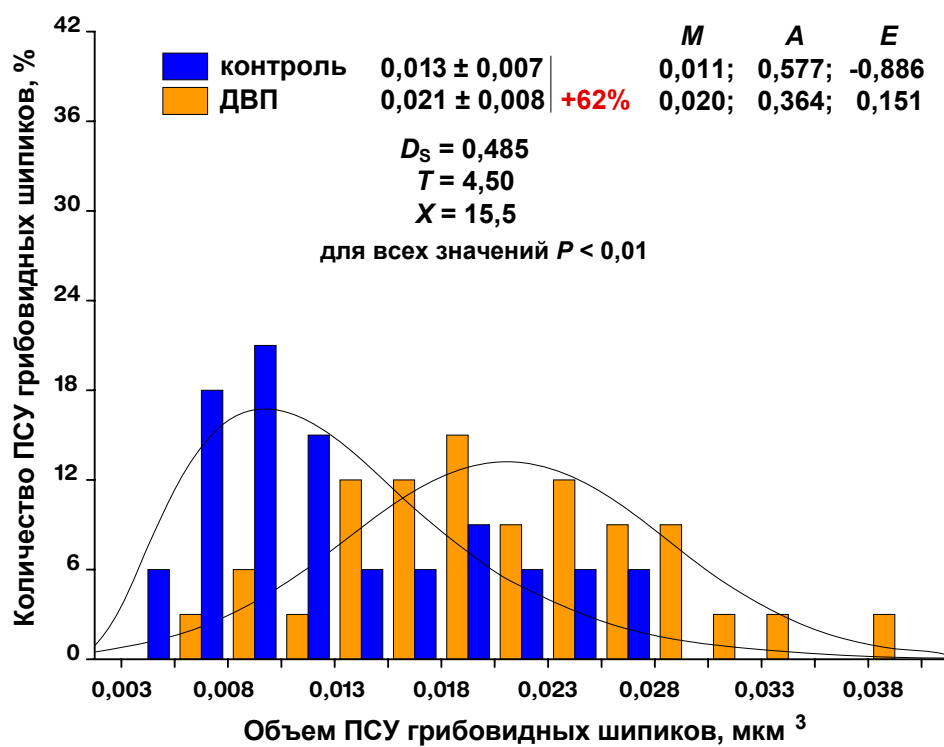


Рис. 16. Параметры ПСУ грибовидных шипиков в контроле и при ДВП.

Однозначного решения вопроса о причинно-следственных связях между размерами шипиков и эффективностью синаптической передачи, по-видимому, также не существует. Но с другой стороны, согласно нашим результатам (см. разд. 5.4. Гл. I; Табл. 3) и результатам других исследователей на синапсах пирамид коры, CA1 гиппокампа и синапсах дендритов гранулярных клеток 3Ф и клеток Пуркинье мозжечка (Wilson et al., 1983; Harris, Stevens, 1988; Harris, Stevens, 1989; Trommald, Hulleberg, 1997), с размерами шипика связан размер наиболее функционально значимого компонента синапса – постсинаптического уплотнения. Поэтому предпринята попытка поиска проявлений ДВП в структуре ПСУ. Согласно Trommald и Hulleberg корреляция между объемом головки шипика в mML 3Ф и площадью занимаемой ПСУ на шипике составляет около 0,47; однако авторы использовали стереологические расчеты значений параметров синапсов. С использованием компьютерных программ для работы с 3D объектами мы отработали подход к непосредственному получению таких параметров синапса как площадь контакта пресинаптического бутона с постсинапсом и площадь мембраны шипика под которой располагается ПСУ. Эти данные, полученные на основе 3D реконструкции показывают, что наибольшие значения коэффициента корреляции наблюдается между объемом шипика и параметрами ПСУ, и могут достигать $r_s=0,976$ (Табл. 3). Поэтому естественным было бы ожидать, что одновременно с увеличением площадей и объемов шипиков наблюдается увеличение размеров ПСУ. Полученные нами данные говорят о том, что объемы ПСУ в поздней фазе ДВП действительно значительно увеличены, причем в большей степени опять-таки у тонких шипиков. Увеличение объемов ПСУ грибовидных шипиков составило 62%, соответственно была увеличена и площадь поверхности реконструированных ПСУ на 38% (Рис. 16). У тонких шипиков достоверное увеличение объемов ПСУ составляло 62%, а увеличение площади поверхностей ПСУ – 38% (Рис. 15). Следовательно, высокая эффективность синаптической передачи в поздней фазе ДВП реализуется на фоне значительного увеличения объемов ПСУ синапсов на тонких и грибовидных шипиках.

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

ПСУ шипиков является структурой в которой сконцентрированы рецепторы нейромедиаторов (см. разд. 6.1.). NMDAR обеспечивают запуск ДВП и встраивание в ПСУ дополнительных компонентов, в частности AMPAR, отвечающих за быстрые постсинаптические токи (Lynch, 2004; Dingledine et al., 1999). Блокада встраивания AMPAR в ПСУ блокирует и ДВП (Park et al., 2004). ПСУ практически всех шипиковых синапсов несут NMDAR, но не все имеют AMPAR. ПСУ занимающие большую площадь поверхности шипика имеют пропорционально большее число AMPAR. ПСУ небольшого размера могут не иметь вовсе AMPAR и считаются синапсами «молчащими». Запуск ДВП в ЗФ также NMDAR-зависимый процесс, но исследований числа AMPAR в ПСУ синапсов ЗФ 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). Поэтому естественным было предположить, что увеличение объемов ПСУ в поздней фазе ДВП в ЗФ, может быть связано с разрастанием ПСУ в плоскости мембраны, соответственно и с увеличением синаптической области мембраны шипика. Так за счет чего происходит рост размеров ПСУ?

Ранее отмечалось, что в ранней фазе ДВП площадь, занимаемая ПСУ, в одних случаях увеличивается, а в других нет (см. разд. 8.3.); может увеличиваться и толщина ПСУ (Sorra, Harris, 1998; Мошков, Петровская, 1983; Desmond, Levy, 1986b). Следовательно, в изменения объема ПСУ могут вносить вклад два компонента: толщина и площадь ПСУ, экспонированная на поверхности шипика (но не площадь поверхности реконструированного объема ПСУ, Рис. 15, 16). Однако взаимосвязь этих параметров до сих пор никто систематически не исследовал. ПСУ обладают большой вариабельностью форм и неоднородной пространственной ориентацией, и даже на одном шипике ПСУ различны не только по форме, но и по толщине, причем толщина ПСУ и в различных его участках может различаться (см. Рис. 5В и Рис. 6). Поэтому при оценке площади занимаемой уплотнением или при определении толщины уплотнений используемые ранее стереологические измерения носили неустранимо приближенный характер.

Для выяснения за счет чего происходит рост размеров ПСУ вообще, и при ДВП в частности, мы реконструировали ПСУ на изображениях с гораздо более высоким разрешением (см. разд. 4.5., Гл. II). Подход для получения значений площади занимаемой ПСУ на поверхности шипика принципиально не отличается от подхода, описанного для оценки площади контакта шипика с пресинаптическим бутонем (см. разд. 2.1.2. и Рис. 7). Разница состоит лишь в том, что объекты-метки располагались не на границах области контакта бутона с шипиком, а на границах профилей ПСУ (включая границы перфораций ПСУ) в плоскости мембраны шипика. Площадь поверхности ПСУ, экспонированная к синаптической щели, была очерчена в виртуальном 3D пространстве согласно нормальям объектов-меток к поверхности ПСУ, и ненужная поверхность клона этого ПСУ удалена. Полученные значения площади экспонированной поверхности ПСУ и толщины представлены в виде диаграмм рассеяния на Рис. 17 и 18. Средние значения параметров ПСУ диаграмм на рисунках 17 и 18 представлены в Таблице 4. Критерий Шапиро-Уилка не выявил значимых отклонений полученных значений от нормального распределения (во всех случаях $0,93 < W_n < 0,99$ при $0,18 < P < 0,98$). Согласно F -критерию Фишера большинство дисперсий были однородны ($F_{\sigma(20;19)} < 1,77$; $F_{\sigma(27;20)} < 1,14$), за исключением дисперсий площадей и объемов ПСУ тонких шипиков ($F_{\sigma(20;27)} > 3,41$).

*Корреляции объема ПСУ и площади, занимаемой ПСУ,
на поверхности шипика*

Результаты корреляционного и регрессионного анализа свидетельствуют о том, что как между типами синапсов, так и между синапсами в различных состояниях формы и силы связей площадей с объемами ПСУ не различаются. Как в контроле, так и при ДВП, наблюдается четко выраженная связь объема ПСУ с занимаемой ими площадью на поверхности дендритных шипиков (во всех случаях r_s лежит в диапазоне от 0,87 до 0,98) (Рис. 17, 18). При этом связь занимаемой площади с объемом ПСУ адекватно описывается линейной моделью с высокими коэффициентами детерминации. Коэффициенты детерминации R^2 лежат в диапазоне от 0,76 до 0,94 (соответственно $0,87 < r_p < 0,97$). При этом сравнение угловых коэффициентов линейных регрессий показало, что достоверно они не отличаются ни

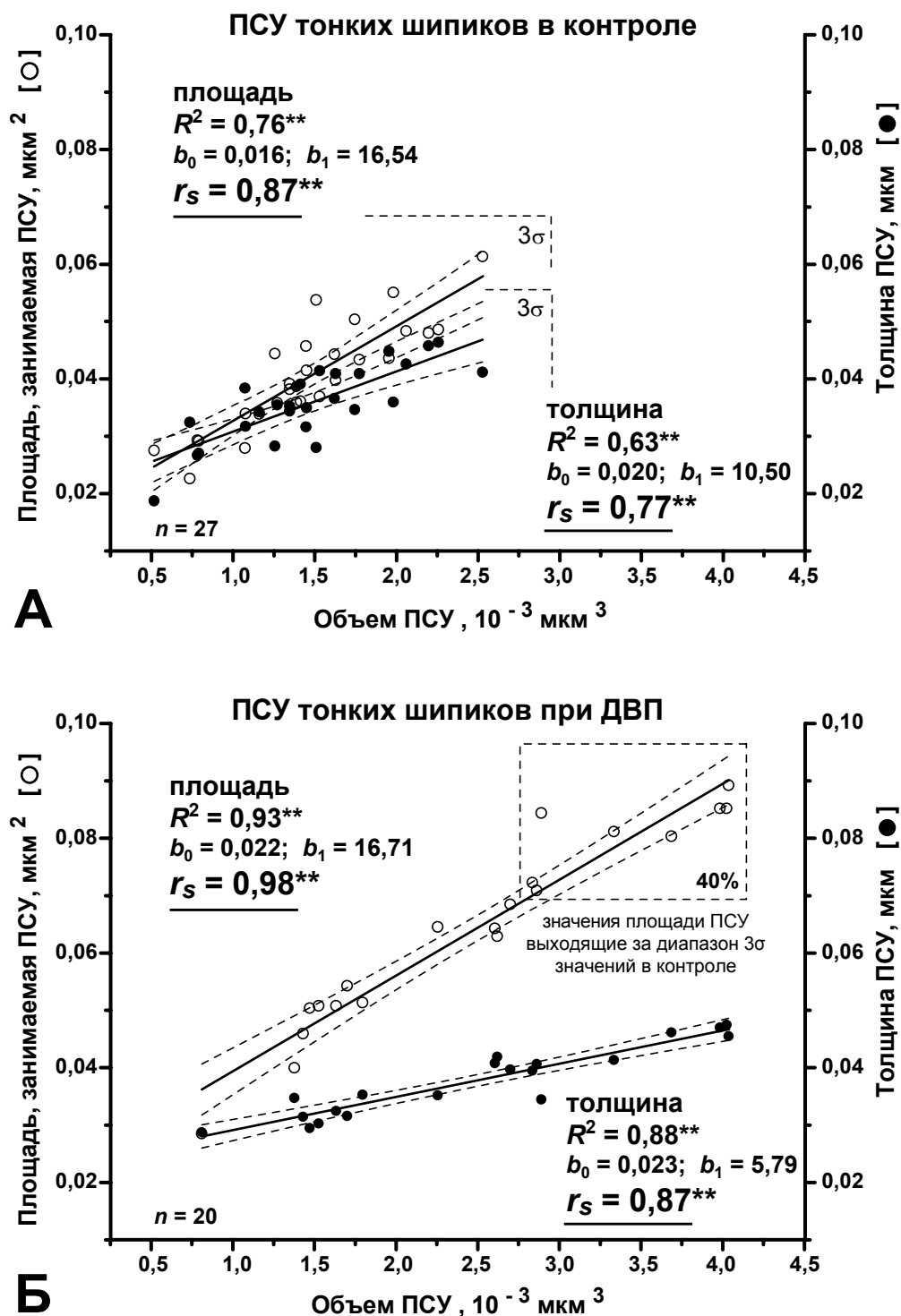
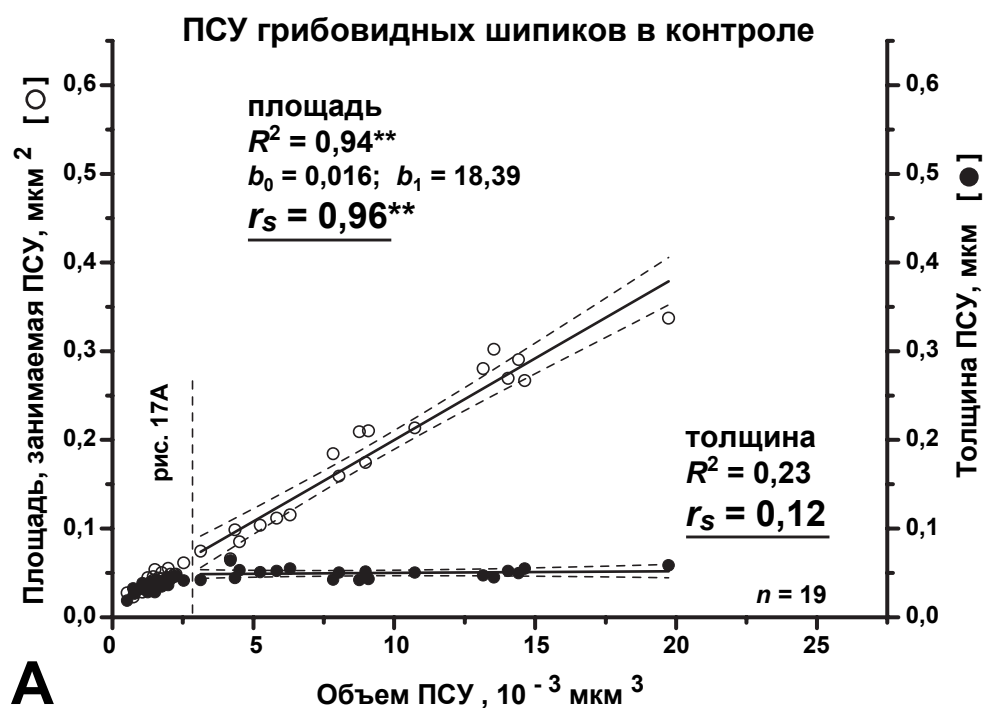
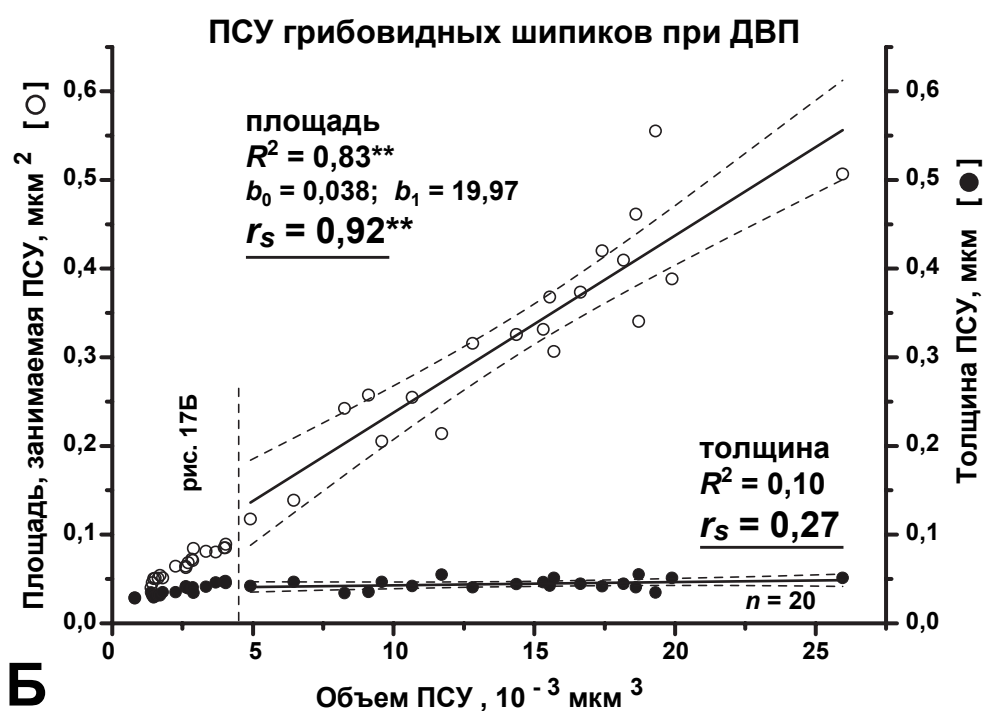


Рис. 17. Диаграммы рассеяния значений параметров ПСУ тонких дендритных шипиков. R^2 – коэффициент детерминации линии регрессии $y=b_0+xb_1$ с 95% доверительным интервалом для среднего b_1 (пунктир) и коэффициентом корреляции Спирмена (r_s) с объемом ПСУ; x – объем ПСУ, y – площадь или толщина ПСУ. Пунктирной рамкой (на Б) выделены значения площадей ПСУ тонких шипиков выходящих за диапазон 3σ в контроле (на А). n – число проанализированных синапсов.



А



Б

Рис. 18. Диаграммы рассеяния значений параметров ПСУ грибовидных дендритных шипиков. Обозначения те же, что и на рис.17.

Таблица 4. Параметры ПСУ 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 ПСУ при ДВП от значений в контроле.

Таблица 5. Сравнение угловых коэффициентов регрессий площадей.

	тонкие ДВП	грибовидные контроль	грибовидные ДВП
тонкие контроль	$t=0,0788$ $P=0,935$ $df=43$	$t=0,198$ $P=0,838$ $df=43$	$t=0,271$ $P=0,784$ $df=43$
тонкие ДВП		$t=0,335$ $P=0,739$ $df=36$	$t=0,403$ $P=0,692$ $df=36$
грибовидные контроль			$t=2$ $P=0,0504$ $df=36$

Таблица 6. Сравнение угловых коэффициентов регрессий толщин.

	тонкие ДВП	грибовидные контроль	грибовидные ДВП
тонкие контроль	$t=3,98$ $P < 0,0005$ $df=43$	$t=3,34$ $P = 0,0021$ $df=43$	$t=5,08$ $P < 0,0001$ $df=43$
тонкие ДВП		$t=2,84$ $P = 0,0073$ $df=36$	$t=5,13$ $P < 0,0001$ $df=36$
грибовидные контроль			$t=1,43$ $P=0,159$ $df=36$

между двумя типами синапсов в одинаковых состояниях (контроль или ДВП), ни между состояниями одних и тех же типов синапсов (Табл. 5). При этом при анализе всей популяции синапсов (и тонких, и грибовидных) линейная корреляция объема ПСУ с занимаемой площадью в контроле составляет $r_p=0,989$ ($p=0,01$), а при ДВП $r_p=0,976$ ($p=0,01$). Таким образом, форма связи объема ПСУ с занимаемой им площадью у различных типов синапсов независимо от функционального состояния

одинакова и выражается линейной зависимостью объема ПСУ от занимаемой им площади на поверхности шипика. Следовательно, наблюдаемое увеличение объемов ПСУ в поздней фазе ДВП непосредственно линейно достоверно связано с увеличением площади, занимаемой ПСУ.

Корреляции объема и толщины ПСУ тонких шипиков

Иная картина проявляется при анализе толщины ПСУ. У тонких шипиков наблюдается также выраженная связь объема ПСУ с толщиной уплотнения. При ДВП зависимость объема ПСУ от толщины адекватно описывается линейной моделью ($R^2=0,88$, $r_p=0,94$). В контроле связь объема ПСУ и толщины ПСУ тонких шипиков можно описать как линейной ($R^2=0,63$, $r_p=0,88$), так и экспоненциальной моделью [$H=\exp(b_0+b_1/V)$]; где H -толщина, V -объем, $b_0=-2,969\pm0,0549$, $b_1=-4,890\times10^{-4}\pm6,511\times10^{-5}$; при $R^2=0,69$]. Кроме того, в отличие от контроля при ДВП угловой коэффициент линейной регрессий толщины ПСУ тонких шипиков достоверно уменьшается почти в 2 раза (Рис. 17, Табл. 6). Сравнение толщины ПСУ и площади, занимаемой ПСУ, на тонких шипиках при ДВП со значениями в контроле показывает, что значительная часть (~40%) площадей тонких шипиков, занимаемых уплотнениями, при ДВП (Рис. 17 Б) выходит за диапазон 3σ площадей ПСУ в контроле (Рис. 17 А) и смещается в диапазон значений грибовидных шипиков в контроле (Рис. 18 А). Следовательно, можно говорить о том, что в изменение объема ПСУ тонких шипиков в контроле вклад вносят оба компонента – и площадь, и толщина уплотнения. Но спустя 6 ч ДВП форма связи меняется, вклад толщины в увеличение объемов ПСУ тонких шипиков значительно уменьшается, тогда как вклад площади ПСУ в увеличение объема ПСУ не меняется. Таким образом, величение объемов ПСУ при ДВП (на 84%) опосредовано как увеличением толщины, так и увеличением площади. Увеличение размеров площади, занимаемой ПСУ, приводит к тому, что значительная часть ПСУ синапсов на тонких шипиках приобретает, характеристики свойственные функционально активным шипикам – грибовидным.

Корреляции объема и толщины ПСУ грибовидных шипиков

С увеличением объемов ПСУ связь объема с толщиной еще более уменьшается. У грибовидных шипиков при наличии жесткой линейной связи объема уплотнения с занимаемой им площадью, связь объема ПСУ с толщиной ПСУ отсутствует (в контроле $r_s=0,12$; в ДВП $r_s=0,27$) (Рис. 18). При этом, несмотря на пограничное значение уровня значимости при отсутствии различий угловых коэффициентов линейных регрессий ($P=0,05$; Табл. 6), коэффициенты корреляции Пирсона толщин ПСУ с объемом достоверно не отличаются ($U = 0,498$). Во-первых, полученные данные говорят о том, что в популяции синапсов морфологически и численно наиболее стабильных, а функционально наиболее активных, независимо от функционального состояния и независимо от размеров синапсов, толщина постсинаптического уплотнения не меняется, стабильна. Во-вторых, наблюдаемое спустя 6 ч после индукции ДВП увеличение объемов ПСУ грибовидных шипиков на 62% (что меньше чем увеличение объемов ПСУ тонких шипиков) происходит исключительно за счет увеличения площади занимаемой уплотнением, в отличие от увеличения объемов ПСУ тонких шипиков, которое зависит как от толщины ПСУ, так и от площади.

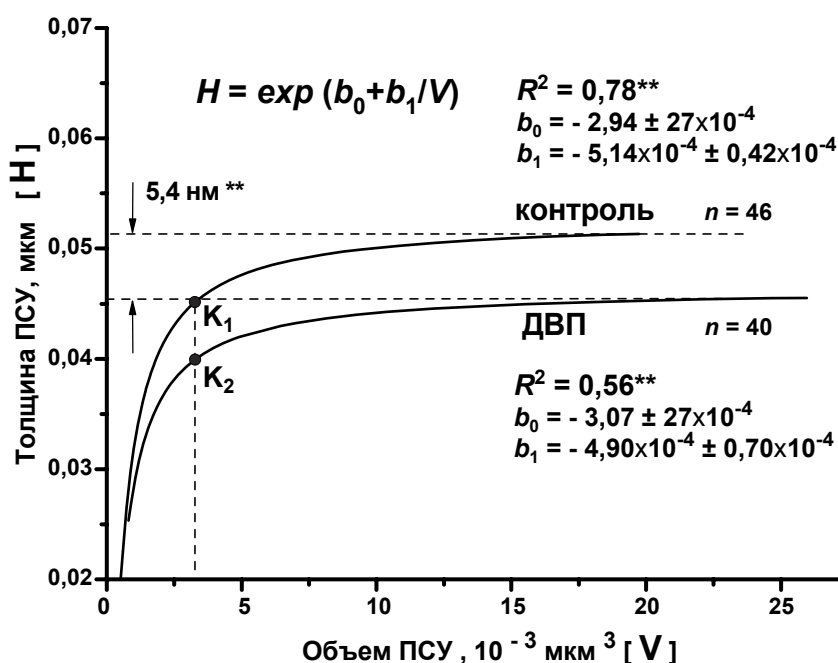


Рис. 19. Регрессионный анализ толщин ПСУ суммарно тонких и грибовидных дендритных шипиков в контроле и при ДВП. R^2 - коэффициент детерминации регрессии $H=\exp(b_0+b_1/V)$; пояснения в тексте.

*Корреляции объема ПСУ с толщиной ПСУ суммарно
у тонких и грибовидных шипиков в контроле и при ДВП*

Корреляционный анализ толщин уплотнений ПСУ всей популяции синапсов свидетельствует о том, что тогда как в целом и в контроле, и в ДВП наблюдается выраженная корреляция (в контроле $r_s=0,867$, а при ДВП $r_s=0,677$), линейная зависимость слабая (в контроле $r_p=0,668$, а при ДВП $r_p=0,583$). Связь значений толщин как в контроле, так и в ДВП можно описать экспоненциальной моделью (Рис. 19). Когда уплотнения достигают объема около $0,003 \text{ мкм}^3$ с толщиной в 40-45 нм, вблизи точек максимальной кривизны K_1 и K_2 (Рис. 19), вклад толщины в увеличение объема ПСУ значительно снижается, практически с выходом на плато. Интересно то, что в контроле точка K_1 попадает в диапазон, разделяющий морфофункционально различные типы синапсов – на тонких и на грибовидных шипиках (Рис. 18 А, вертикальный пунктир). При ДВП эта граница раздела типов синапсов смещена вправо от K_2 ($\sim 0,0045 \text{ мкм}^3$); при этом и значительная часть ПСУ тонких шипиков (в данном случае 40%) также смещена правее K_2 (см. Рис. 17, 19). Наблюдаемый тренд в увеличении толщины грибовидных шипиков справа от точек K_1 и K_2 можно объяснить спецификой используемого подхода к оценке толщины ПСУ. Во-первых, в больших по размерам синапсах (на грибовидных шипиках) ПСУ часто представлены несколькими сегментами или отдельными ПСУ, часть из которых имеет небольшие размеры, сходные с размерами ПСУ тонких шипиков. При расчете толщины ПСУ синапсов на грибовидных шипиках использовались суммарные значения объемов и суммарные значения площадей всех сегментов составляющих ПСУ. Поэтому, как и у ПСУ синапсов на тонких шипиках, с увеличением их размеров может увеличиваться и их толщина. Во-вторых, чем больше ПСУ грибовидных шипиков, тем более отрицательной кривизной они обладают (вогнуты с внешней стороны клетки). При этом при одинаковой толщине уплотнения отношение объема ПСУ к площади занимаемой на поверхности шипика (т.е. вычисляемое значение толщины) будет выше у вогнутых ПСУ, по сравнению с плоскими или выпуклыми. Вполне вероятно, что при коррекции тренда мы получили бы реальный выход на плато толщины ПСУ грибовидных шипиков. Однако решение

такого вопроса требует введения в расчеты нормальной или, по крайней мере, средней кривизны поверхности ПСУ произвольной формы, что в свою очередь требует однородной триангуляции реконструированного объекта и т.д., и т.д. Как обсуждалось в разделе 2.1.3. анализ кривизны поверхности произвольной формы непростая задача. Тем не менее, анализ ПСУ на основе 3D реконструкций проявляет значительные преимущества, по сравнению с планиметрическими оценками.

Полученные результаты, во-первых, говорят о том, что форма зависимости объема ПСУ от толщины нелинейна, и сходна в контроле и при ДВП. Во-вторых, создается впечатление, что по мере роста, достигая объема около $0,003 \text{ мкм}^3$, ПСУ тонких шипиков достигают некой конечной «эффективной» толщины ПСУ грибовидных шипиков (в 40-45 нм). Решающим фактором в дальнейшем увеличении объема ПСУ остается только увеличение занимаемой уплотнением площади мембраны шипика. Разумеется, вывод на основании измерений полученных на одном животном можно было бы считать предварительным, однако полученные соотношения толщины ПСУ и площади, занимаемой ПСУ на шипиках как в контроле, так и при ДВП, имеют ярко выраженный характер. Это позволяет сделать следующий вывод. Результаты анализа параметров ПСУ на основе 3D реконструкций подтверждают, что увеличение объемов ПСУ в поздней фазе ДВП в mML 3Ф, связано с предположенным выше разрастанием ПСУ в плоскости мембраны, соответственно и с увеличением синаптической области мембраны шипика. Наблюдаемое увеличение площади занимаемой ПСУ отличается от результатов полученных спустя 1-2 ч ДВП в CA1 области гиппокампа (Sorra, Harris, 1998; Desmond, Levy, 1986b) и спустя 2 ч в CA3 области (Мошков, Петровская, 1983). С одной стороны отличия могут быть следствием использования стандартных стереологических процедур в этих работах, по сравнению с анализом ПСУ на базе 3D реконструкции. С другой стороны компоновка и рост ПСУ скорее всего является длительным процессом, требующим и синтеза и созревания белков при длительном поддержании высокой эффективности синапса. По-видимому, устойчивое увеличение площади шипика, 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.

Но интересно то, что в ходе ДВП, по мере увеличения объемов ПСУ, толщина ПСУ шипиков достигает 44 ± 6 нм, не более. Получается, что толщина в 44 нм достаточна для долговременного поддержания синаптической передачи на уровне, значительно превышающем уровень базовый. Но сравнение параметров ПСУ в контроле и при ДВП проявляет феномен, который нарушает интуитивно понимаемую зависимость увеличения объема ПСУ от увеличения его толщины. А именно, не смотря на то, что зависимость объема ПСУ от толщины в контроле и при ДВП сходна, толщина ПСУ грибовидных шипиков при ДВП (44 ± 6 нм) в среднем на 11% или 5,4 нм достоверно меньше ($F_{(1,37)}=7,95$ при $p=0,01$), чем в контроле (50 ± 6 нм) (Рис. 19, Табл. 4). Достоверных отличий значений толщины ПСУ тонких шипиков между контрольной (36 ± 7 нм) и потенцированной (38 ± 6 нм) фасцией не наблюдается ($D_s=0,204$, $P=0,771$; $W=618$, $P=0,259$; $X=-2,98$, $P=0,175$; $T=0,93$, $P>0,05$). Тем не менее, при увеличении объемов ПСУ тонких шипиков (слева от точек K_1 и K_2 , Рис. 19) так же наблюдаются большие значения толщины ПСУ в контроле по сравнению с толщиной ПСУ при ДВП. Получается, что при высокой эффективности синаптической передачи толщина ПСУ активных синапсов уменьшается. В чем причина явного парадокса? Вполне возможно, что наблюдаемое разрастание ПСУ в плоскости мембраны может быть связано с транслокацией свободных (не участвующих в синаптической передаче при базовом уровне активности) компонентов ПСУ из субсинаптической области в перисинаптическую область. Однако такая трансформация предполагает участие в этом процессе транспортной системы синапса, а также системы рециклинга в реструктуризации синапса и требует отдельного рассмотрения.

4. Ультраструктурные признаки обновления синапсов

Очевидно, что устойчивость ДВП невозможно свести лишь к увеличению числа AMPAR или изменению «упаковки» компонентов ПСУ. Это сложный системный процесс, в котором задействованы многие сигнальные и эффекторные системы, система синтеза и процессинга белка. Каким образом при ДВП происходит увеличение размеров шипиков и ПСУ? Поскольку длительное поддержание ДВП, свыше 4 ч критически зависит от экспрессии генов и синтеза новых и дополнительных белков, естественным было бы ожидать, что вследствие индукции поздней фазы ДВП значительно возрастает экспрессия генов структурных белков ПСУ, белков цитоскелета, рецепторов, каналов. Основными в массовом отношении компонентами ПСУ являются такие белки как поддерживающие или адаптерные («scaffolding» белки), CaMKII, SynGAP (Peng et al., 2004; Cheng et al., 2006; см. также разд. 6.1. и 6.2.). Считается, что SynGAP является регулятором постсинаптического экзоцитоза (Kennedy, Ehlers, 2006). Другими функционально значимыми структурными компонентами ПСУ являются белки GKAP и Shank. GKAP является адаптерной молекулой при транспорте AMPAR и в ПСУ связан с белком Shank, структурирующим рецепторный слой, с которым также связан Homer (см. разд. 6.1. и 6.2.). Недавно Park et al. (2006a) показали, что после индукции поздней фазы ДВП наблюдается сопряженная экспрессия эволюционно консервативных кластеров генов. По данным Hong et al. (2004) после активации NMDAR наблюдается пик экспрессии гена родственного Shank, но усиления экспрессии самого Shank не обнаружено. Homer обеспечивает взаимодействие рецепторного слоя ПСУ с цистернами ЭР, его экспрессия в ЗФ возрастает после индукции ДВП вместе с генами раннего ответа (French et al., 2001). Что касается GluR2 субъединиц AMPAR, то исходно их экспрессия значительно снижается, и возвращается к исходному уровню к 8 ч, а пика достигает к 12 ч (Hong et al., 2004). То есть по результатам анализа паттерна генов, уровень экспрессии которых значительно возрастает вследствие активации NMDAR (Hong et al., 2004), вследствие индукции поздней фазы ДВП в ЗФ (Matsuo et al., 2000; Park et al., 2006a) или вследствие обучения (Guzowski et al., 2001; см также Mayer et al., 2002) невозможно утверждать, что

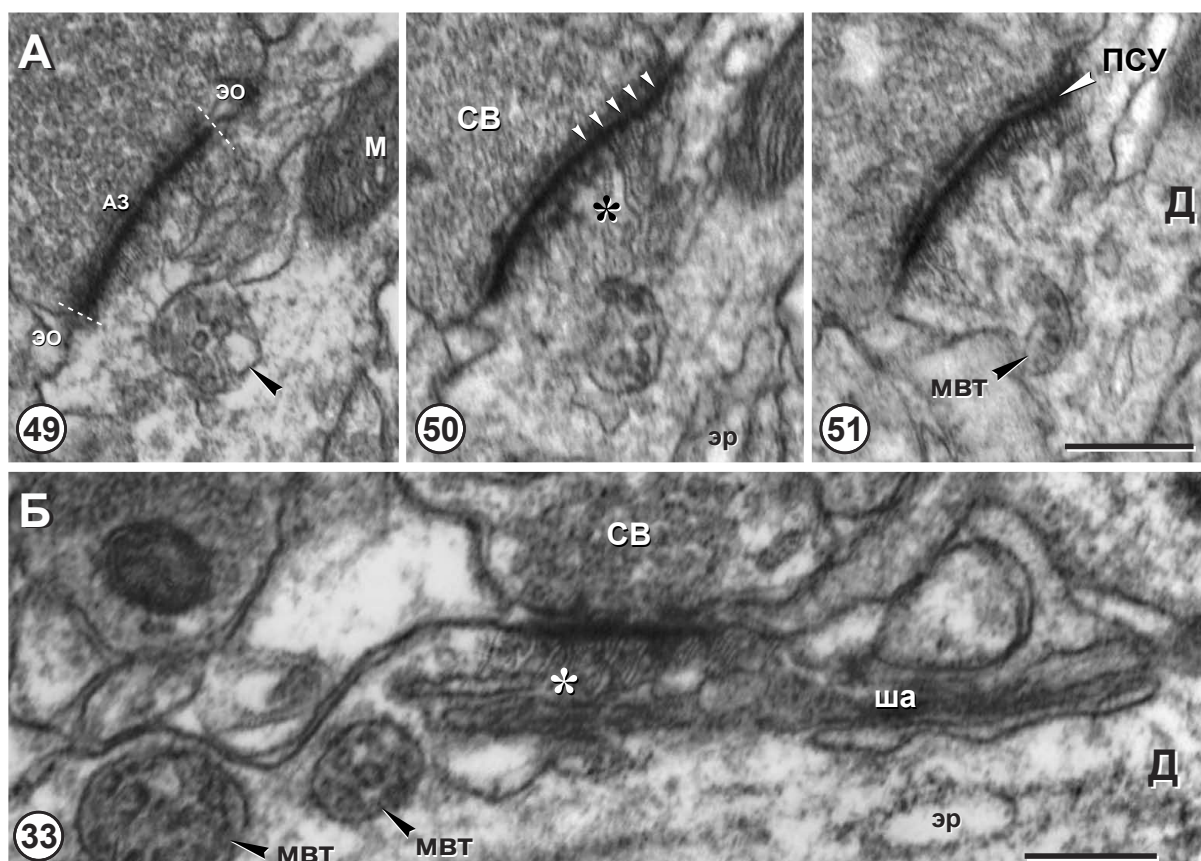


Рис. 20. Взаимодействие органелл системы рециклинга с ПСУ стволовых синапсов.

А. Связь ПСУ с мультивезикулярными тельцами (МВТ) может быть опосредована тонкими, порядка 15-20 нм цистернами ретикулума (отмечены звездочками). 49-51 и 33 – номера снимков в серии срезов стимулированной 3Ф контрольной крысы.

Б. Связь ПСУ с цистернами шипикового аппарата.

АЗ - активная или синаптическая зона; ЭО – экстрасинаптическая область;

М – митохондрия; СВ - пресинаптические везикулы; ЭР - эндоплазматический ретикулум, Д – дендроплазма. Шкалы на снимках №49-51 = 500 нм, на снимке №33 шкала = 250 нм.

продукты новоэкспрессированных генов являются генами указанных основных белков ПСУ (Peng et al., 2004; Cheng et al., 2006). Большая часть новоэкспрессированных генов связана с внутриклеточной сигнализацией, метаболизмом, выживанием, регуляцией транскрипции, синтеза и процессинга белка (Hong et al., 2004). По-видимому, синтез большинства структурных компонентов синапсов, гены которых экспрессируются конститутивно, подвержен этой регуляции.

Созревание белков завершается в транс-Гольджи сети, которая является непосредственным участником системы рециклинга синаптических белков (Kennedy,

Ehlers, 2006). Участниками системы рециклинга – эндоцитоза, сортировки и повторного встраивания мембранных белков – 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, см. разд. 6.3.). Считается, что эндоцитоз синаптических белков осуществляется в экстрасинаптической области, а доставка и встраивание синаптических белков осуществляется посредством двух механизмов, слиянием транспортных везикул/эндосом в экстрасинаптической области с последующей латеральной диффузией в плоскости мембраны, и непосредственным встраиванием мелких транспортных везикул в активной зоне в, области ПСУ.

В 3Ф в контроле и после стимуляции мы наблюдали непосредственную взаимосвязь ПСУ стволовых синапсов как с шипиковым аппаратом, так и с мультивезикулярными тельцами посредством тонких (~15-20 нм) цистерн ЭР (Рис. 20). В шипиковых синапсах, чаще в грибовидных, наблюдается сходное взаимодействие ПСУ с органеллами цитоплазмы, но оно менее выражено и встречается реже, чем в стволовых синапсах; возможно, это такое отличие определяется близостью стволовых синапсов к органеллам системы рециклинга. В этом отношении интересны ранние ультраструктурные исследования синапсов с субсинаптическими тельцами/полосками Тахі (для обз. см. Peters et al., 1991, p. 164). Функция субсинаптических телец до сих пор не выяснена, но высказывались предположения, что субсинаптические тельца могут представлять собой элементы формирующегося шипикового аппарата (Тахі, 1961, p.176) и имеют «непосредственное отношение к синаптической функции» (Косицын, 1969). Упорядоченность субсинаптических цистерн ретикулума, связующих ПСУ с МВТ и ША (стрелки на снимке №50, Рис. 20), действительно сходна с упорядоченным расположением субсинаптических телец Тахі (см. иллюстрации к работам Косицын, 1969; Агаджанова, 1973). Является ли наблюдаемая нами форма организация синапсов признаком эндо- или экзоцитоза определенно сказать пока невозможно. В литературе такая организация постсинапса не описана, но наблюдаемая форма

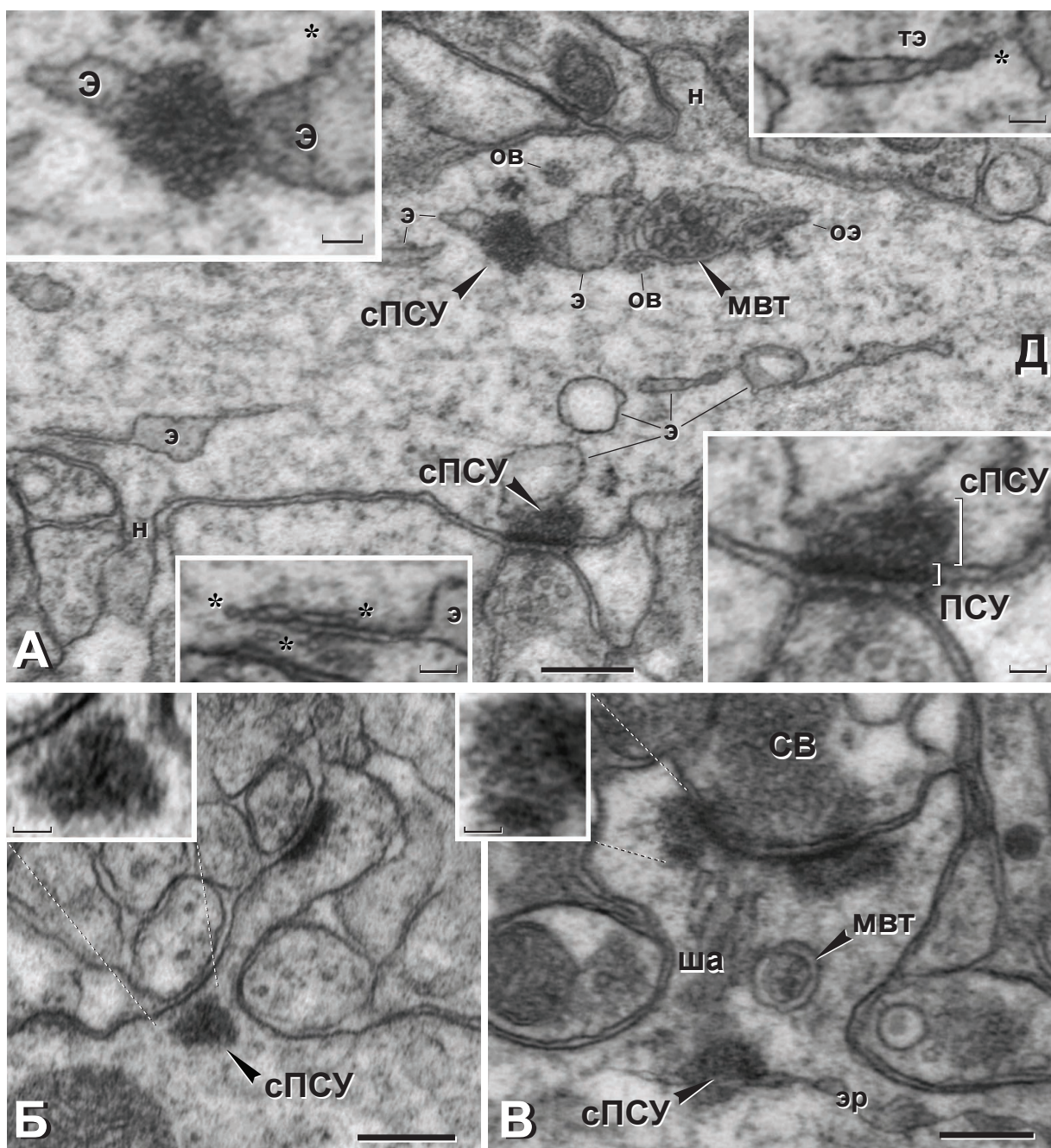


Рис. 21. Эндосомальный сортирующий комплекс и «свободные» ПСУ в контроле.

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 ретикулума (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.

взаимодействия ПСУ с компонентами системы рециклинга синаптических белков предполагает существование альтернативных механизмов обновления синапсов.

Кроме этих органелл в дендритах и шипиках контрольных и стимулированной ЗФ очень часто встречаются структуры, первоначально описанные как «свободные» ПСУ (Попов, Петухов, 1982; Petukhov, Popov, 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. 21А), что позволяет предполагать участие сПСУ в обновлении синапсов. Как правило, в дендроплазме сПСУ ассоциированы с эндосомами, с цистернами ЭР и ША в основании различных типов синапсов (Рис. 21 Б, В). Но важно то, что «свободные» ПСУ и классические ПСУ взаимосвязаны. сПСУ часто располагаются непосредственно под собственно ПСУ (Рис. 21 А, В), причем в структуре постсинаптических уплотнений можно различить гранулы/везикулы тех же размеров, что и в составе «свободных» ПСУ. Такая организация свойственна всем выявленным нами типам синапсов.

В этой связи интересны работы с использованием электронной иммуногистохимии, в которых показано расположение рецепторов в постсинаптической области. Согласно работам, например, Kharazia и Weinberg (1999) и Valtschanoff и Weinberg (2001) распределение рецепторов/каналов несимметрично относительно постсинаптической мембраны. Пик распределения AMPAR и NMDAR сдвинут в сторону цитоплазмы шипика приблизительно на 3 нм (длина карбоксильных цитоплазматических хвостов этих каналов), тогда как плотность распределения AMPAR и NMDAR убывает по направлению к цитоплазме и распространяется вглубь постсинаптической области на 30-50 нм и более. Получается, что в норме, большая часть синаптических белков, в том числе и рецепторов нейромедиаторов располагается не в синаптической мембране, но именно под синаптической мембраной в ПСУ и в субсинаптической области.

Активация рециклинга в ранней фазе ДВП недавно убедительно показана Park et al. (2006b); он проявляется в транслокации эндосом из дендритов в шипики, однако точные механизмы и область встраивания неизвестны. Ранее сообщалось, что

экзоцитоз и встраивание GluR2 рецепторов в мембрану в ходе конститутивного рециклинга наблюдается в синаптической области, тогда как встраивание GluR1-содержащих рецепторов в экстрасинаптической мембране (Passafaro et al., 2001). Одним из участников селективного направленного транспорта мембранных белков, который обеспечивает встраивание белков в плазматическую мембрану непосредственно в области ПСУ, в области активной зоны синапса, является мультипротеиновый комплекс – экзоцист (для обз. см. Kennedy, Ehlers, 2006). Недавно Gerges et al. (2006) показали что, доминантно негативная мутация белка экзоциста Eho70 нарушает встраивание AMPAR (в первую очередь GluR2/3) в синаптическую мембрану и рецепторы концентрируются в субсинаптической области. Механизм направленного везикулярного транспорта опосредованный экзоцистом на уровне ультраструктуры практически не исследован вследствие малых размеров везикул несущих экзоцист. Размеры экзоциста при различной конформации его компонентов составляют от 4-6 до 30 нм (Hsu et al., 1998; Novick et al., 2006), тогда как толщина ультратонких срезов обычно составляет 50-90 нм. Тем не менее, мы также наблюдаем скопление гранул/везикул «свободных» ПСУ в субсинаптической области различных типов синапсов, а размеры экзоциста и гранул/везикул образующих «свободные» ПСУ совпадают (Hsu et al., 1998; Novick et al., 2006). Поэтому нельзя исключать, что сПСУ являются комплексами везикул несущих экзоцист и задействованы в транспорте синаптических белков.

Долговременное поддержание высокой эффективности синаптической передачи связано с заменой GluR1 на GluR2 субъединицы AMPAR, однако экспрессия генов GluR2 субъединиц значительно снижается после индукции ДВП и возрастает лишь спустя 8 ч (Hong et al., 2004). Источников синаптических рецепторов для конститутивного рециклинга может быть два, внутриклеточные депо и синтез белка *de novo*. При этом вслед за синтезом рецепторов, требуется их созревание и мультимеризация. Но новосинтезированные мультимеры GluR2/3, участвующие в рециклинге GluR2 субъединиц, задерживаются дольше в ретикулуме по сравнению с GluR1 (для обз. см. Esteban, 2003; Sutton, Schuman, 2006), и доставка GluR2 рецепторов в синаптическую мембрану более продолжительный процесс по

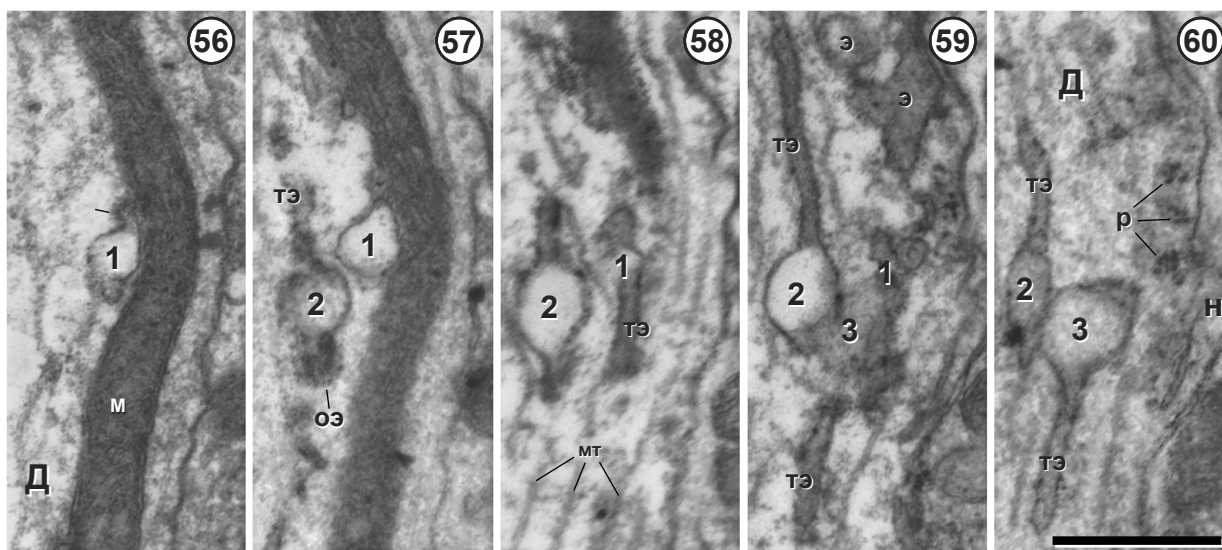


Рис. 22. Скопление трубчатых (сортирующих) эндосом спустя 6 ч ДВП.

На серии срезов (56-59 номера снимков) представлены три расположенных в непосредственной близости трубчатые эндосомы. 1-3 – расширенные участки эндосом от которых отходят более темные трубчатые компартменты (ТЭ; сравни с рис. 21А). Д – дендроплазма; М – митохондрия; МТ – микротрубочки; ОЭ – окаймленные участки эндосом; Э – аморфные эндосомы; Р – рибосомы; Н – основание ножки шипика. Шкала 500 нм.

сравнению с доставкой GluR1 рецепторов, экзоцитоз которых наблюдается в считанные минуты после индукции ДВП. Получается, что в период стабилизации ДВП может наблюдаться некоторый дефицит зрелых GluR2-содержащих мультимеров, который мог бы компенсироваться за счет внутриклеточных депо. Считается, что в процессе созревания и мультимеризации участвуют трубчатые или сортирующие эндосомы. В поздней фазе ДВП, спустя 6 ч после индукции, мы наблюдали описанное ранее увеличенное число полирибосом в основаниях шипиков (Ostroff et al., 2002; Рис. 22), 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, но в отличие от контроля в поздней фазе ДВП мы наблюдали скопления расширенных длинных трубчатых эндосом, которые в норме в длину обычно не превышают 0,8 мкм (Cooney et al., 2002). Такие признаки свидетельствуют об усиленном синтезе, созревании и сортинге мембранных белков.

Попов и Петухов наблюдали сПСУ при посттетанической потенциации и в ранней фазе ДВП (Попов, Петухов, 1982; Petukhov, Popov, 1986). Получается, что несмотря на индукцию экзоцитоза дополнительных GluR1 рецепторов, в ранней фазе ДВП «свободные» ПСУ в цитоплазме сохраняются. В норме подавляющая часть глутаматных AMPA рецепторов в мозге представлена мультимерами GluR1/2 и GluR2/3 субъединиц (см. разд. 6.1.). Недавно Kirov et al. (2004) показали, что понижение синаптической активности в CA1 области гиппокампа *in vitro* вследствие охлаждения связано с уменьшением электронной плотности ПСУ синапсов и появлением в цитоплазме дендритов «свободных» ПСУ. Если в контроле и после стимуляции мы наблюдали сПСУ в шипиках и дендритах 3Ф, то в поздней фазе ДВП «свободные» ПСУ отсутствовали. В таком случае, с учетом вышесказанного, создается впечатление, что везикулы сПСУ могли бы представлять собой депо GluR2-содержащих рецепторов, которые включаются в конститутивный рециклинг и «расходуется» в период стабилизации ДВП, когда значения ВПСП к 4 ч ДВП постепенно выходят на плато. Благодаря маленьким размерам очевидна мобильность везикул сПСУ. сПСУ могли бы нести лишь единичные мембранные белки и на этапе стабилизации ДВП обеспечивать тонкую подстройку эффективности синапсов в зависимости от уровня пресинаптической активности. Выглядит вполне закономерным то, что если к 6 ч ДВП уровень эффективности синаптической передачи стабилизирован и завершен рост синапсов, то истощен и цитозольный запас сПСУ. Разумеется, поскольку о составе и функциональной роли сПСУ пока ничего не известно, и заложенная в названии аналогия с ПСУ требует доказательств, высказанные предположения нуждаются в проверке. Тем не менее, взаимодействие сПСУ с эндосомами и с собственно 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 экстраинаптической области.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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. 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 других отделах мозга. 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 дендритных шипиках, за счет образования шипиков тонких из пеньковых, и пеньковых из синапсов стволовых (Рис.23 а-в). Мы также не исключаем и 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.23 д). Наши результаты свидетельствуют о том, что в поздней фазе ДВП *in vivo* высокая эффективность синаптической передачи сохраняется на фоне увеличенных размеров также в большей мере тонких шипиков, чем грибовидных. Результаты анализа 3D реконструкций шипиков говорят о том, что с размерами шипика связан размер наиболее функционально значимого компонента синапса – ПСУ. Морфометрия ПСУ показывает, что объемы ПСУ в поздней фазе ДВП значительно увеличены, причем в большей степени опять-таки у тонких шипиков (Рис.23 г, е). Поскольку большему диаметру ПСУ соответствует большее число AMPAR в ПСУ (Nusser, 2000), а ДВП сопровождается встраиванием дополнительных белков в ПСУ, в том числе и AMPAR, то естественным было предположить, что в поздней фазе ДВП увеличение объемов ПСУ в 3Ф, может быть

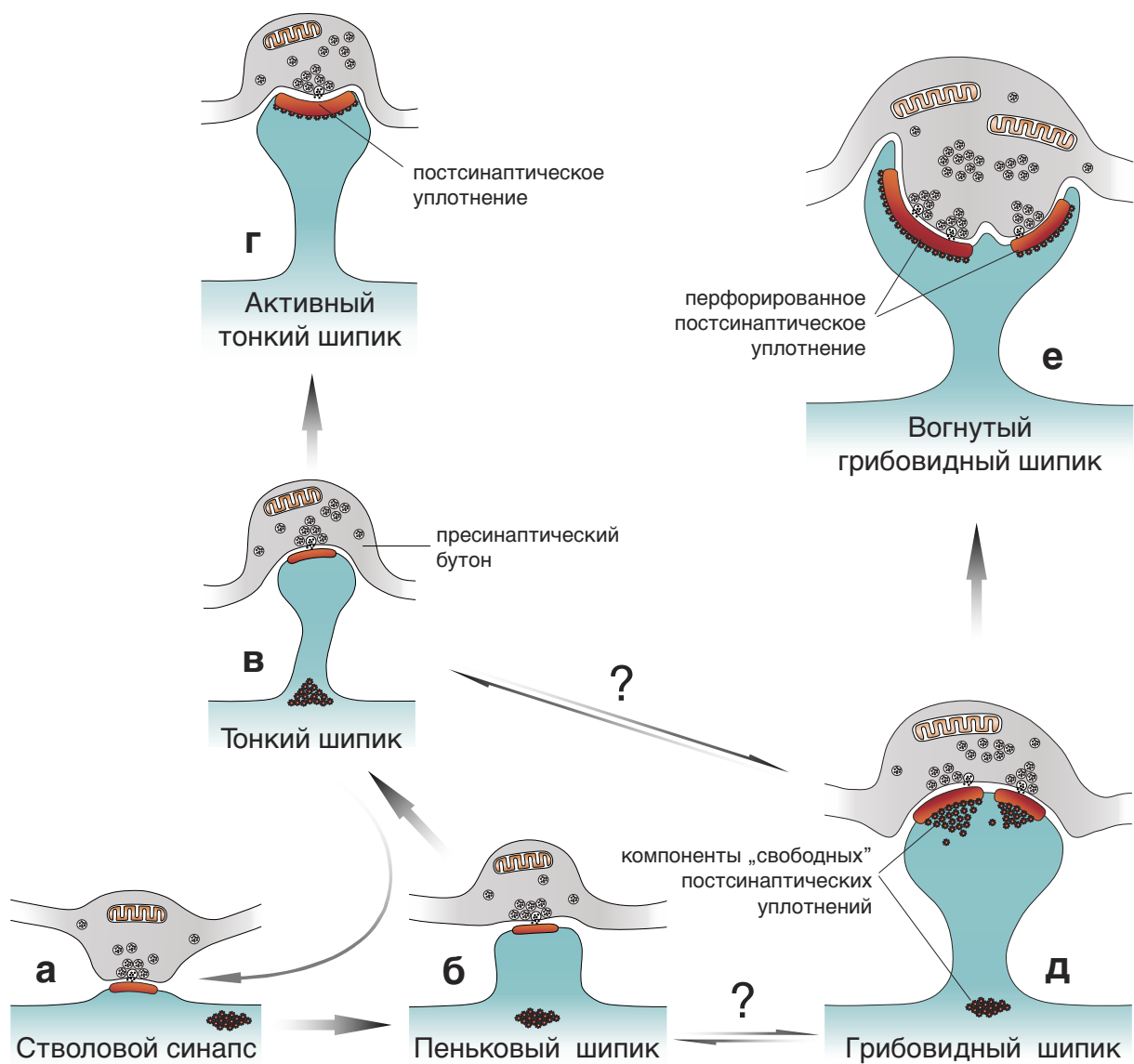


Рис. 23. Ультраструктурные изменения синапсов в поздней фазе ДВП *in vivo*.

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.

связано с разрастанием ПСУ в плоскости мембраны. Результаты анализа корреляций параметров ПСУ на основе 3D реконструкций показали, что так оно и есть. Это позволяет считать, что устойчивое увеличение площади занимаемой ПСУ связано с повышением вероятности участия синапсов в генерации ВПСР в поздней фазе ДВП за счет увеличения числа AMPAR в ПСУ. Считается, что рост поверхности шипиков, соответственно и ПСУ, происходит за счет встраивания эндосом в экстрасинаптическую область шипика и доставка белков к ПСУ реализуется за счет латеральной диффузии в мембране. Анализ органелл системы рециклинга подтверждает то, что могут существовать альтернативные механизмы доставки синаптических белков, непосредственно активную область синапса, в ПСУ. Кандидатом на участие в такой форме транспорта синаптических белков могли бы быть «свободные» ПСУ, которые предположительно являются комплексами везикул несущих белки везикулярного экзоцитоза. Поскольку сПСУ наблюдаются в контроле и в ранней фазе ДВП (Рис. 23 а-в, д), но отсутствуют в поздней фазе ДВП (Рис.23 г, е), вполне вероятно, что сПСУ включаются в конститутивный рециклинг в период стабилизации ДВП и обеспечивают увеличение размеров ПСУ наблюдаемое спустя 6 ч после индукции потенциации.

Как в первых исследованиях морфологических коррелятов ДВП (ранняя фаза), так и в настоящей работе (поздняя фаза ДВП) основное внимание было сосредоточено на изучении постсинаптического отдела и в большей мере на шипиковых синапсах. Однако синапс, как правило, представлен как минимум еще двумя компонентами, пресинаптическим аксоном и глиальным окружением. Недавно были убедительно показаны наличие синапсов между глиальными клетками и нейронами и долговременная потенция глиальных клеток (Ge et al., 2006), и их участие в гетеросинаптической депрессии в CA1 области гиппокампа (Zhang et al., 2003). Пресинаптические механизмы потенциации исследованы также главным образом в ранней фазе ДВП. Поэтому нельзя исключать, что все три компонента синапса вносят равноценный вклад в модуляцию эффективности синаптической передачи, и это открывает широкие горизонты для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. С использованием анализа синапсов на серийных срезах и 3D реконструкции показано, что в среднем молекулярном слое зубчатой фассии 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 пеньковых 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 фассии не выявлено изменений плотности синапсов (количества синапсов в 100мкм³ 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 пеньковых 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 фассии.

БИБЛИОГРАФИЯ

Отечественные издания

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: Учебное пособие. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Агаджанова Т.А. Аксодендритические синапсы с субсинаптическими телами в гипоталамусе крысы // Доклады Академии Наук СССР. 1973. Т. 208. № 2. С. 487-489.
3. Бацинский С.Е. Статистика умеет много гитик // Международный журнал медицинской практики. 1998. № 4. с.13-15.
4. Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. 3-е изд. – М.: Наука, 1983. – 416 с.
5. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: Для профессионалов. 2-е изд. (+CD). – СПб.: Питер, 2003. – 688 с: ил.
6. Брагин А.Г., Виноградова О.С. Явление хронической потенциации в кортикальном афферентном входе пирамид поля СА3 гиппокампа // Сб. статей: Физиологические механизмы памяти. НЦБИ РАН, Пущино, 1973. с. 8–24.
7. Бьюль А., Цёфель П. SPSS: искусство обработки информации. Platinum Edition: Пер. с нем. СПб.: ООО ДиаСофтЮП, 2005. – 608 с.
8. Ван дер Варден Б.Л. Математическая статистика. Пер. с нем. Л. Н. Большева/ Под ред. Н.В. Смирнова. М.: Издат. иностранной литературы, 1960. – 240 с.
9. Кавальери Б. Геометрия, изложенная новым способом при помощи неделимых непрерывного с приложением "Опыта IV" о применении неделимых к алгебраическим степеням. т. 1: Основы учения о неделимых. Перев. с лат. М.–Л.: ГТТИ, 1940. – 413 с.
10. 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.
11. Медведев Н.И. Трехмерная организация синапсов in vivo в поле СА1 гиппокампа гибернирующих сусликов и гипотермных крыс с использованием серийных ультратонких срезов. Дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук. Пущино. 2004. – 107 с.
12. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: Методическое руководство. – СПб.: Наука, 1994. – 400 с.
13. Мкртчян А. С. Автоматизированное выделение ландшафтных единиц путем классификации рельефа с применением ГИС // Ландшафтное планирование: Общие основания. Методология, технология: Труды Международной школы-конференции «Ландшафтное планирование», М., Географический факультет МГУ. 2006. С. 203-208.
14. 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.
15. Мошков Д.А., Петровская Л.Л., Брагин А.Г. Посттетанические изменения в ультраструктуре гигантских шипиковых синапсов поля СА3 гиппокампа // Доклады Академии наук СССР. 1977. Т. 237. № 6. С.1525-1528.

16. Мошков Д.А., Петровская Л.Л., Брагин А.Г. Ультраструктурное изучение основ посттетанической потенциации в срезах гиппокампа методом замораживания-замещения // Цитология. 1980. Т. 22. № 1. С.20-26.
17. Николлс Д., Мартин Р., Валлас Б., Фукс П. От нейрона к мозгу. Пер. с англ. П. М. Балабана, А.В. Галкина, Р. А. Гиниатуллина, Р.Н. Хазипова, Л.С. Хируга. – М.: Едиториал УРСС, 2003. – 672 с.
18. Орлов А.И. Высокие статистические технологии // Заводская лаборатория. 2003. Т. 69. № 11. С. 55-60.
19. Орлов А.И. Прикладная статистика: Учебник. – М.: Изд-во «Экзамен», 2004.– 656 с.
20. Отмахов Н.А. Нейрональная сеть гиппокампа: морфологический анализ // Успехи физиологических наук. 1993. Т.24. № 4. С. 79–101.
21. Попов В.И., Медведев Н.И. с соавт. Трехмерная организация синапсов и астроглии в гиппокампе крыс и сусликов: Новые структурно-функциональные парадигмы работы синапса // Биофизика. 2003. Т. 48. № 2. С. 289-308.
22. 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.
23. Рутковский В.О., Рутковская М. А. Метод компактного описания 3D-геометрии сложных форм в виде расширенного каркасного представления // Труды КГТУ. 2006. № 1. С. 162-172.
24. Тюрин Ю.Н., Макаров А.А. Анализ данных на компьютере / Под ред. В.Э.Фигурнова. 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ИНФРА-М, 2003. – 544 с.
25. Урбах В.Ю. Биометрические методы. 2-е изд. – М.: Наука, 1964. – 416 с.
26. Хамильтон Л.У. Основы анатомии лимбической системы крысы: Пер. с англ. М.: Изд-во Моск. ун-та. 1984. – 184 с.
27. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека: В 3-х томах. Т.1. Пер. с англ. М.: Мир. 1996. – 323 с.
28. Штарк М.Б. Мозг зимнеспящих. Из-во «Наука», Сибирское отделение. Новосибирск, 1970. – 240 с.

Зарубежные издания

29. Aakalu G., Smith W.B., et al. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons // Neuron. 2001. V. 30. № 2. P. 489-502.
30. Abe K., Chisaka O., et al. Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin // Nat Neurosci. 2004. V. 7. № 4. P. 357-63.
31. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections // The Anatomical Record. 1946. V. 94. № 2. P. 239-247.
32. Abraham W.C., Christie B.R., et al. Immediate early gene expression associated with the persistence of heterosynaptic long-term depression in the hippocampus // Proc Natl Acad Sci U S A. 1994. V. 91. № 21. P. 10049-53.
33. 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.

34. Abraham W.C., Robins A. Memory retention--the synaptic stability versus plasticity dilemma // *Trends Neurosci.* 2005. V. 28. № 2. P. 73-8.
35. 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.
36. Adesnik H., Nicoll R.A., England P.M. Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking // *Neuron.* 2005. V. 48. № 6. P. 977-85.
37. Adinolfi A.M. The organization of paramembranous densities during postnatal maturation of synaptic junctions in the cerebral cortex // *Exp Neurol.* 1972. V. 34. № 3. P. 383-93.
38. Alberini C.M., Taubenfeld S.M. and Garcia-Osta A. CREB and the CREB-C/EBP-dependent Gene Expression Cascade in Long-term Memory // *Cellscience reviews.* 2005. V.2. № 2. Электронная публикация, www.cellscience.com.
39. Albrecht M.A., Colegrove S.L., Friel D.D. Differential regulation of ER Ca²⁺ uptake and release rates accounts for multiple modes of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release // *J Gen Physiol.* 2002. V. 119. № 3. P. 211-33.
40. Allison D.W., Gelfand V.I., et al. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors // *J Neurosci.* 1998. V. 18. № 7. P. 2423-36.
41. Allison D.W., Chervin A.S., et al. Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules // *J Neurosci.* 2000. V. 20. № 12. P. 4545-54.
42. Amaral D.G. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat // *J Comp Neurol.* 1978. V. 182. № 4 Pt 2. P. 851-914.
43. Amaral D.G., Witter M.P. Hippocampal Formation. In: *The rat nervous system*, 2nd ed. Edited by G. Paxinos. Academic Press. 1995. P. 443-493.
44. Andersen P., Holmqvist B., Voorhoeve P.E. Entorhinal activation of dentate granule cells // *Acta Physiol. Scand.* 1966. V. 66. № 4. P. 448-460.
45. Andersen P., Raastad M., Storm J.F. Excitatory synaptic integration in hippocampal pyramids and dentate granule cells // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1990. V. 55. №. P. 81-6.
46. Andersen B.B., Gundersen H.J. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections // *J Microsc.* 1999. V. 196. № Pt 1. P. 69-73.
47. Andrew R.J., Rogers L.J. The Nature of Lateralization in Tetrapods. In: *Comparative Vertebrate Lateralization*. Edited by L.J. Rogers, R.J. Andrew. Cambridge University Press. 2002. P. 94-113.
48. Andrews S.B., Leapman R.D., et al. Activity-dependent accumulation of calcium in Purkinje cell dendritic spines // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988. V. 85. № 5. P. 1682-5.
49. Arabadzisz D., Freund T.F. Changes in excitatory and inhibitory circuits of the rat hippocampus 12-14 months after complete forebrain ischemia // *Neuroscience.* 1999. V. 92. № 1. P. 27-45.
50. Araque A., Parpura V., et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner // *Trends Neurosci.* 1999. V. 22. № 5. P. 208-15.
51. Araya R., Eiselthal K.B., Yuste R. Dendritic spines linearize the summation of excitatory potentials // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. V. 103. № 49. P. 18799-804.
52. Artola A., Singer W. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex // *Nature.* 1987. V. 330. № 6149. P. 649-52.

53. Ashby M.C., De La Rue S.A., et al. Removal of AMPA receptors (AMPA) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs // *J Neurosci*. 2004. V. 24. № 22. P. 5172-6.
54. Augustine G.J., Santamaria F., Tanaka K. Local calcium signaling in neurons // *Neuron*. 2003. V. 40. № 2. P. 331-46.
55. Azmitia E.C., Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat // *J Comp Neurol*. 1978. V. 179. № 3. P. 641-67.
56. Babcock L.E. Asymmetry in the fossil record // *European Review*. 2005. V. 13. (Suppl.) № 2. P. 135-143.
57. Baer S.M., Rinzel J. Propagation of dendritic spikes mediated by excitable spines: a continuum theory // *J Neurophysiol*. 1991. V. 65. № 4. P. 874-90.
58. Bailey C.H., Kandel E.R. Structural changes accompanying memory storage // *Annu Rev Physiol*. 1993. V. 55. № P. 397-426.
59. Bailey C.H., Giustetto M., et al. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? // *Nat Rev Neurosci*. 2000. V. 1. № 1. P. 11-20.
60. Bailey C.H., Kandel E.R., Si K. The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth // *Neuron*. 2004. V. 44. № 1. P. 49-57.
61. Bannai H., Inoue T., et al. Kinesin dependent, rapid, bi-directional transport of ER sub-compartment in dendrites of hippocampal neurons // *J Cell Sci*. 2004. V. 117. № Pt 2. P. 163-75.
62. Bannerman D.M., Deacon R.M., et al. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia // *Behav Neurosci*. 2002. V. 116. № 5. P. 884-901.
63. Bannerman D.M., Yee B.K., et al. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions // *Behav Neurosci*. 1999. V. 113. № 6. P. 1170-88.
64. Barco A., Patterson S., et al. Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture // *Neuron*. 2005. V. 48. № 1. P. 123-37.
65. Barnes J., Scahill R.I., et al. Does Alzheimer's disease affect hippocampal asymmetry? Evidence from a cross-sectional and longitudinal volumetric MRI study // *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005. V. 19. № 5-6. P. 338-44.
66. Barria A., Muller D., et al. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation // *Science*. 1997. V. 276. № 5321. P. 2042-5.
67. Barria A., Malinow R. Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses // *Neuron*. 2002. V. 35. № 2. P. 345-53.
68. Barria A., Malinow R. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII // *Neuron*. 2005. V. 48. № 2. P. 289-301.
69. Barrionuevo G., Brown T.H. Associative long-term potentiation in hippocampal slices // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983. V. 80. № 23. P. 7347-51.
70. Barry M.F., Ziff E.B. Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses // *Curr Opin Neurobiol*. 2002. V. 12. № 3. P. 279-86.
71. Baude A., Nusser Z., et al. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is

- concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction // *Neuron*. 1993. V. 11. № 4. P. 771-87.
72. Baxter D.A., Bittner G.D., Brown T.H. Quantal mechanism of long-term synaptic potentiation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985. V. 82. № 17. P. 5978-82.
 73. Bayer K.U., De Koninck P., et al. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation // *Nature*. 2001. V. 411. № 6839. P. 801-5.
 74. Bayer K.U., Schulman H. Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII // *Biochem Biophys Res Commun*. 2001. V. 289. № 5. P. 917-23.
 75. Beaulieu C., Colonnier M. A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat-symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat // *J Comp Neurol*. 1985. V. 231. № 2. P. 180-9.
 76. Benavides-Piccione R., Ballesteros-Yanez I., et al. Cortical area and species differences in dendritic spine morphology // *J Neurocytol*. 2002. V. 31. № 3-5. P. 337-46.
 77. Benes F.M., Lange N. Two-dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective // *Trends Neurosci*. 2001. V. 24. № 1. P. 11-7.
 78. Bennett M.R. The early history of the synapse: from Plato to Sherrington // *Brain Res Bull*. 1999. V. 50. № 2. P. 95-118.
 79. Berlucchi G. The origin of the term plasticity in the neurosciences: Ernesto Lugaro and chemical synaptic transmission // *J Hist Neurosci*. 2002. V. 11. № 3. P. 305-9.
 80. Bernstein B.W., Bamberg J.R. Actin-ATP hydrolysis is a major energy drain for neurons // *J Neurosci*. 2003. V. 23. № 1. P. 1-6.
 81. Berridge M.J. Neuronal calcium signaling // *Neuron*. 1998. V. 21. № 1. P. 13-26.
 82. Bettler B., Kaupmann K., Bowery N. GABAB receptors: drugs meet clones // *Curr Opin Neurobiol*. 1998. V. 8. № 3. P. 345-50.
 83. Bezprozvanny I., Maximov A. Classification of PDZ domains // *FEBS Lett*. 2001. V. 509. № 3. P. 457-62.
 84. Bezzi P., Gundersen V., et al. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate // *Nat Neurosci*. 2004. V. 7. № 6. P. 613-20.
 85. Bi G., Poo M. Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited // *Annu Rev Neurosci*. 2001. V. 24. № . P. 139-66.
 87. Biederer T. V., Sara Y., et al. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly // *Science*. 2002. V. 297. № 5586. P. 1525-31.
 88. Bliss T.V., Gardner-Medwin A.R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path // *J Physiol*. 1973. V. 232. № 2. P. 357-74.
 86. Bliss T.V., Lømo 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.
 89. Bliss T., Schoepfer R. Neuroscience. Controlling the ups and downs of synaptic strength // *Science*. 2004. V. 304. № 5673. P. 973-4.
 90. Blomberg F., Cohen R.S., Siekevitz P. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. II. Characterization and arrangement of some of the major proteins within the structure // *J Cell Biol*. 1977. V. 74. № 1. P. 204-25.
 91. Bloodgood B.L., Sabatini B.L. Neuronal activity regulates diffusion across the neck of

- dendritic spines // *Science*. 2005. V. 310. № 5749. P. 866-9.
92. Bock J., Gruss M., et al. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows // *Cereb Cortex*. 2005. V. 15. № 6. P. 802-8.
 93. Bock N.A., Kovacevic N., et al. In vivo magnetic resonance imaging and semiautomated image analysis extend the brain phenotype for cdf/cdf mice // *J Neurosci*. 2006. V. 26. № 17. P. 4455-9.
 94. Bonhoeffer T., Yuste R. Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function // *Neuron*. 2002. V. 35. № 6. P. 1019-27.
 95. Bonifacino J.S., Traub L.M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes // *Annu Rev Biochem*. 2003. V. 72. №. P. 395-447.
 96. Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors // *Trends Pharmacol Sci*. 2000. V. 21. № 1. P. 16-9.
 97. Boss B.D., Peterson G.M., Cowan W.M. On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat // *Brain Res*. 1985. V. 338. № 1. P. 144-50.
 98. Bozon B., Kelly A., et al. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003. V. 358. № 1432. P. 805-14.
 99. Brandon E.P., Idzerda R.L., McKnight G.S. PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection // *Curr Opin Neurobiol*. 1997. V. 7. № 3. P. 397-403.
 100. Brecht M., Fee M.S., et al. Novel approaches to monitor and manipulate single neurons in vivo // *J Neurosci*. 2004. V. 24. № 42. P. 9223-7.
 101. Brecht D.S., Nicoll R.A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses // *Neuron*. 2003. V. 40. № 2. P. 361-79.
 102. Brown M.E., Bridgman P.C. *Myosin Function in Nervous and Sensory Systems* // Wiley Periodicals, Inc., 2003. P. 118-130.
 103. Brown R.E., Milner P.M. The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse // *Nat Rev Neurosci*. 2003. V. 4. № 12. P. 1013-9.
 104. Brown T.C., Tran I.C., et al. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD // *Neuron*. 2005. V. 45. № 1. P. 81-94.
 105. Brownell H., Griffin R., et al. Cerebral Lateralization and Theory of Mind. In: *Understanding other minds: perspectives from developmental cognitive neuroscience*, 2nd ed. Edited by S. Baron-Cohen, H. Tager-Flusberg and D. Cohen. Oxford: Oxford University Press. 2000. P. 306-333.
 106. Buchs P.A., Muller D. Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. V. 93. № 15. P. 8040-5.
 107. Buckmaster P.S., Schwartzkroin P.A. Interneurons and inhibition in the dentate gyrus of the rat in vivo // *J Neurosci*. 1995. V. 15. № 1 Pt 2. P. 774-89.
 108. Buckmaster P.S., Zhang G.F., Yamawaki R. Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit // *J Neurosci*. 2002. V. 22. № 15. P. 6650-8.
 109. Burke S.N., Barnes C.A. Neural plasticity in the ageing brain // *Nat Rev Neurosci*. 2006. V. 7. № 1. P. 30-40.

110. Bushong E.A., Martone M.E., et al. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains // *J Neurosci*. 2002. V. 22. № 1. P. 183-92.
111. Buss F., Spudich G., Kendrick-Jones J. Myosin VI: cellular functions and motor properties // *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004. V. 20. №. P. 649-76.
112. Caceres A., Payne M.R., et al. Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983. V. 80. № 6. P. 1738-42.
113. Calverley R.K., Jones D.G. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity // *Brain Res Brain Res Rev*. 1990. V. 15. № 3. P. 215-49.
114. Capani F., Martone M.E., et al. 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.
115. Carlin R.K., Siekevitz P. Plasticity in the central nervous system: do synapses divide? // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983. V. 80. № 11. P. 3517-21.
116. Carman C.V., Benovic J.L. G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs // *Curr Opin Neurobiol*. 1998. V. 8. № 3. P. 335-44.
117. Carter N.J., Cross R.A. Kinesin's moonwalk // *Curr Opin Cell Biol*. 2006. V. 18. № 1. P. 61-7.
118. Castro-Alamancos M.A., Donoghue J.P., Connors B.W. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex // *J Neurosci*. 1995. V. 15. № 7 Pt 2. P. 5324-33.
119. Cavallaro S., D'Agata V., et al. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. V. 99. № 25. P. 16279-84.
120. Chang F.L., Greenough W.T. Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice // *Brain Res*. 1984. V. 309. № 1. P. 35-46.
121. Chavis P., Westbrook G. Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse // *Nature*. 2001. V. 411. № 6835. P. 317-21.
122. Chen L., El-Husseini A., et al. Stargazin differentially controls the trafficking of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate and kainate receptors // *Mol Pharmacol*. 2003. V. 64. № 3. P. 703-6.
123. Cheney R.E., Rodriguez O.C. Cell biology. A switch to release the motor // *Science*. 2001. V. 293. № 5533. P. 1263-4.
124. Cheng X.T., Hayashi K., Shirao T. Non-muscle myosin IIB-like immunoreactivity is present at the drebrin-binding cytoskeleton in neurons // *Neurosci Res*. 2000. V. 36. № 2. P. 167-73.
125. Cheng D., Hoogenraad C.C., et al. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum // *Mol Cell Proteomics*. 2006. V. 5. № 6. P. 1158-70.
126. Chew T.-L., Wolf W.A., et al. A fluorescent resonant energy transfer-based biosensor reveals transient and regional myosin light chain kinase activation in lamella and cleavage furrows // *J Cell Biology*. 2002. V. 156. № 3. P. 543-553.
127. Chicurel M.E., Harris K.M. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus // *J Comp Neurol*. 1992. V. 325. № 2. P. 169-82.

128. Chih B., Engelman H., Scheiffele P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins // *Science*. 2005. V. 307. № 5713. P. 1324-8.
129. Choquet D., Triller A. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane // *Nat Rev Neurosci*. 2003. V. 4. № 4. P. 251-65.
130. Claiborne B.J., Amaral D.G., Cowan W.M. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus // *J Comp Neurol*. 1986. V. 246. № 4. P. 435-58.
131. Claiborne B.J., Amaral D.G., Cowan W.M. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus // *J Comp Neurol*. 1990. V. 302. № 2. P. 206-19.
132. Coggeshall R.E., Lekan H.A. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review // *J Comp Neurol*. 1996. V. 364. № 1. P. 6-15.
133. Cohen R.S., Blomberg F., et al. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition // *J Cell Biol*. 1977. V. 74. № 1. P. 181-203.
134. Cohen R.S., Siekevitz P. Form of the postsynaptic density. A serial section study // *J Cell Biol*. 1978. V. 78. № 1. P. 36-46.
135. Cohen-Cory S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits // *Science*. 2002. V. 298. № 5594. P. 770-6.
136. Colbran R.J. Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II // *Biochem J*. 2004. V. 378. № Pt 1. P. 1-16.
137. Colino A., Malenka R.C. Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro // *J Neurophysiol*. 1993. V. 69. № 4. P. 1150-9.
138. Collingridge G.L., Kehl S.J., McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus // *J Physiol*. 1983. V. 334. № P. 33-46.
139. Collingridge G.L. The brain slice preparation: a tribute to the pioneer Henry McIlwain // *J Neurosci Methods*. 1995. V. 59. № 1. P. 5-9.
140. Colonnier M. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study // *Brain Res*. 1968. V. 9. № 2. P. 268-87.
141. Colonnier M., Beaulieu C. An empirical assessment of stereological formulae applied to the counting of synaptic disks in the cerebral cortex // *J Comp Neurol*. 1985. V. 231. № 2. P. 175-9.
142. Colwell C.S., Altemus K.L., et al. Regulation of N-methyl-D-aspartate-induced toxicity in the neostriatum: a role for metabotropic glutamate receptors? // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. V. 93. № 3. P. 1200-4.
143. Conacci-Sorrell M., Zhurinsky J., Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer // *J Clin Invest*. 2002. V. 109. № 8. P. 987-91.
144. Conn P.J., Pin J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997. V. 37. № P. 205-37.
145. Connor S., Williams P.T., et al. Long-term potentiation is associated with changes in synaptic ultrastructure in the rat neocortex // *Synapse*. 2006. V. 59. № 6. P. 378-82.
146. Conradi S. Ultrastructure of dorsal root boutons on lumbosacral motoneurons of the adult cat, as revealed by dorsal root section // *Acta Physiol Scand Suppl*. 1969. V. 332. № P. 85-115.

147. Cooke C.T., Nolan T.M., et al. Pentobarbital-induced configurational changes at the synapse // *Brain Res.* 1974. V. 76. № 2. P. 330-5.
148. Cooney J.R., Hurlburt J.L., et al. 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.
149. Corkin S. What's new with the amnesic patient H.M.? // *Nat Rev Neurosci.* 2002. V. 3. № 2. P. 153-60.
150. Costa M.C., Mani F., et al. Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity // *J Biol Chem.* 1999. V. 274. № 22. P. 15811-9.
151. Costa-Mattioli M., Gobert D., et al. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2 // *Nature.* 2005. V. 436. № 7054. P. 1166-73.
152. Cotman C., Taylor D., Lynch G. Ultrastructural Changes in Synapses in the Dentate Gyrus of the Rat During Development // *Brain Research.* 1973. V. 63. P. 205-213.
153. Cramer L.P. Myosin VI: roles for a minus end-directed actin motor in cells // *J Cell Biol.* 2000. V. 150. № 6. P. F121-6.
154. Crick F. Do dendritic spines twitch? // *Trends Neurosci.* 1982. P. 44-46.
155. Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease // *Curr Opin Neurobiol.* 2001. V. 11. № 3. P. 327-35.
156. Dagenbach E.M., Endow S.A. A new kinesin tree // *J Cell Sci.* 2004. V. 117. № Pt 1. P. 3-7.
157. Dailey M.E., Smith S.J. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices // *J Neurosci.* 1996. V. 16. № 9. P. 2983-94.
158. Dan Y., Poo M.M. Spike timing-dependent plasticity of neural circuits // *Neuron.* 2004. V. 44. № 1. P. 23-30.
159. D'Apuzzo M., Mandolesi G., et al. Abundant GFP expression and LTP in hippocampal acute slices by in vivo injection of sindbis virus // *J Neurophysiol.* 2001. V. 86. № 2. P. 1037-42.
160. Davidson B.L., Breakefield X.O. Viral vectors for gene delivery to the nervous system // *Nat Rev Neurosci.* 2003. V. 4. № 5. P. 353-64.
161. De Robertis E.D., Bennett H.S. Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm // *J Biophys Biochem Cytol.* 1955. V. 1. № 1. P. 47-58.
162. De Schutter E., Bower J.M. An active membrane model of the cerebellar Purkinje cell. I. Simulation of current clamps in slice // *J Neurophysiol.* 1994(a). V. 71. № 1. P. 375-400.
163. De Schutter E., Bower J.M. An active membrane model of the cerebellar Purkinje cell II. Simulation of synaptic responses // *J Neurophysiol.* 1994(b). V. 71. № 1. P. 401-19.
164. De Schutter E., Bower J.M. Simulated responses of cerebellar Purkinje cells are independent of the dendritic location of granule cell synaptic inputs // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994(c). V. 91. № 11. P. 4736-40.
165. De Simoni A., Fernandes F., Edwards F.A. Spines and dendrites cannot be assumed to distribute dye evenly // *Trends Neurosci.* 2004. V. 27. № 1. P. 15-6.
166. Dean C., Dresbach T. Neuroligins and neuroligins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. № 1. P. 21-9.
167. Deller T., Nitsch R., Frotscher M. Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tracing of

- commissural fibers to the rat dentate gyrus: evidence for a previously unknown commissural projection to the outer molecular layer // *J Comp Neurol*. 1995. V. 352. № 1. P. 55-68.
168. Deller T., Martinez A., et al. A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons // *J Neurosci*. 1996. V. 16. № 10. P. 3322-33.
 169. Deller T. The anatomical organization of the rat fascia dentata: new aspects of laminar organization as revealed by anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-Luecoagglutinin (PHAL) // *Anat Embryol (Berl)*. 1998. V. 197. № 2. P. 89-103.
 170. Deller T., Korte M., et al. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. V. 100. № 18. P. 10494-9.
 171. Derkach V.A., Oh M.C., et al. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity // *Nat Rev Neurosci*. 2007. V. 8. № 2. P. 101-13.
 172. 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.
 173. Desmond N.L., Levy W.B. Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location // *Neurosci Lett*. 1985. V. 54. № 2-3. P. 219-24.
 174. Desmond N.L., Levy W.B. Changes in the numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus // *J Comp Neurol*. 1986(a). V. 253. № 4. P. 466-75.
 175. Desmond N.L., Levy W.B. Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus // *J Comp Neurol*. 1986(b). V. 253. № 4. P. 476-82.
 176. Desmond N.L., Levy W.B. Anatomy of Associative Long-Term Synaptic Modification // *Long-Term Potentiation: From Biophysics to Behavior*. Edited by Landfield P.W. and Deadwyler S.A. Alan R. Liss Inc., 1988(a). P. 265-305.
 177. Desmond N.L., Levy W.B. Synaptic interface surface area increases with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus // *Brain Res*. 1988(b). V. 453. № 1-2. P. 308-14.
 178. Dhanrajan T.M., Lynch M.A., et al. Expression of long-term potentiation in aged rats involves perforated synapses but dendritic spine branching results from high-frequency stimulation alone // *Hippocampus*. 2004. V. 14. № 2. P. 255-64.
 179. Diamond M.C., Johnson R.E., Ingham C.A. Morphological changes in the young, adult and aging rat cerebral cortex, hippocampus, and diencephalon // *Behav Biol*. 1975. V. 14. № 2. P. 163-74.
 180. DiAntonio A., Hicke L. Ubiquitin-dependent regulation of the synapse // *Annu Rev Neurosci*. 2004. V. 27. № 1. P. 223-46.
 181. Dineley K.T., Weeber E.J., et al. Leitmotifs in the biochemistry of LTP induction: amplification, integration and coordination // *J Neurochem*. 2001. V. 77. № 4. P. 961-71.
 182. Dingledine R., Borges K., et al. The glutamate receptor ion channels // *Pharmacol Rev*. 1999. V. 51. № 1. P. 7-61.
 183. Dityatev A., Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity // *Nat Rev Neurosci*. 2003. V. 4. № 6. P. 456-68.
 184. Dolmetsch R.E., Xu K., Lewis R.S. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression // *Nature*. 1998. V. 392. № 6679. P. 933-6.
 185. Douglas R.M. Long lasting synaptic potentiation in the rat dentate gyrus following brief

- high frequency stimulation // *Brain Res.* 1977. V. 126. № 2. P. 361-5.
186. Drake A., Frotscher M., Heimrich B. Blockade of neuronal activity alters spine maturation of dentate granule cells but not their dendritic arborization // *Neuroscience.* 1999. V. 94. № 3. P. 767-74.
 187. Dudek S.M., Fields R.D. Somatic action potentials are sufficient for late-phase LTP-related cell signaling // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. V. 99. № 6. P. 3962-7.
 188. Dutar P., Bassant M.H., et al. The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system // *Physiol Rev.* 1995. V. 75. № 2. P. 393-427.
 189. Dyson S.E., Jones D.G. Quantitation of terminal parameters and their inter-relationships in maturing central synapses: a perspective for experimental studies // *Brain Res.* 1980. V. 183. № 1. P. 43-59.
 190. Dyson S.E., Jones D.G. Synaptic remodelling during development and maturation: junction differentiation and splitting as a mechanism for modifying connectivity // *Brain Res.* 1984. V. 315. № 1. P. 125-37.
 191. Ebihara T., Kawabata I., et al. Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with green fluorescent protein // *J Neurosci.* 2003. V. 23. № 6. P. 2170-81.
 192. Eccles J.C., Mc I.A. The effects of disuse and of activity on mammalian spinal reflexes // *J Physiol.* 1953. V. 121. № 3. P. 492-516.
 193. Edwards F.A. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation // *Physiol Rev.* 1995. V. 75. № 4. P. 759-87.
 194. Ehrlich I., Malinow R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity // *J Neurosci.* 2004. V. 24. № 4. P. 916-27.
 195. Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory // *Nat Rev Neurosci.* 2000. V. 1. № 1. P. 41-50.
 196. Ellenberg J., Lippincott-Schwartz J., Presley J.F. Dual-colour imaging with GFP variants // *Trends Cell Biol.* 1999. V. 9. № 2. P. 52-6.
 197. Elston G.N., Benavides-Piccione R., Defelipe J. A study of pyramidal cell structure in the cingulate cortex of the macaque monkey with comparative notes on inferotemporal and primary visual cortex // *Cereb Cortex.* 2005. V. 15. № 1. P. 64-73.
 198. Engert F., Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity // *Nature.* 1999. V. 399. № 6731. P. 66-70.
 199. Eriksson P.S., Perfilieva E., et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus // *Nat Med.* 1998. V. 4. № 11. P. 1313-7.
 200. Erreger K., Chen P.E., et al. Glutamate receptor gating // *Crit Rev Neurobiol.* 2004. V. 16. № 3. P. 187-224.
 201. Erreger K., Dravid S.M., et al. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles // *J Physiol.* 2005. V. 563. № Pt 2. P. 345-58.
 202. Esteban J.A. AMPA receptor trafficking: a road map for synaptic plasticity // *Mol Interv.* 2003. V. 3. № 7. P. 375-85.
 203. Ethell I.M., Pasquale E.B. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling // *Prog Neurobiol.* 2005. V. 75. № 3. P. 161-205.
 204. Euler T., Denk W. Dendritic processing // *Curr Opin Neurobiol.* 2001. V. 11. № 4. P. 415-

- 22.
205. Fadel M.P., Szewczenko-Pawlikowski M., et al. Calreticulin affects beta-catenin-associated pathways // *J Biol Chem*. 2001. V. 276. № 29. P. 27083-9.
206. Fagni L., Chavis P., et al. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons // *Trends Neurosci*. 2000. V. 23. № 2. P. 80-8.
207. Feng G., Mellor R.H., et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP // *Neuron*. 2000. V. 28. № 1. P. 41-51.
208. Fiala J.C., Feinberg M., et al. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1 // *J Neurosci*. 1998. V. 18. № 21. P. 8900-11.
209. Fiala J.C., Harris K.M. Dendrite structure. In: *Dendrites*. Edited by G. Stuart, N. Spruston, M. Hausser. Oxford university press. 1999. P. 1-35.
210. 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.
211. Fiala J.C., Harris K.M. Cylindrical diameters method for calibrating section thickness in serial electron microscopy // *J Microsc*. 2001(b). V. 202. № Pt 3. P. 468-72.
212. Fiala J.C. Three-dimensional structure of synapses in the brain and on the web // *Proceedings of the 2002 International Joint Conference on Neural Networks*. Honolulu, Hawaii. 2002. P. 1-4.
213. Fiala J.C., Kirov S.A., et al. Timing of neuronal and glial ultrastructure disruption during brain slice preparation and recovery in vitro // *J Comp Neurol*. 2003. V. 465. № 1. P. 90-103.
214. Fields R.D., Itoh K. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity // *Trends Neurosci*. 1996. V. 19. № 11. P. 473-80.
215. Fifkova E., Van Harreveld 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.
216. Fifkova E., Anderson C.L. Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in the dentate molecular layer // *Exp Neurol*. 1981. V. 74. № 2. P. 621-7.
217. Fifkova E., Delay R.J. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity // *J Cell Biol*. 1982. V. 95. № 1. P. 345-50.
218. Fifkova E., Markham J.A., Delay R.J. Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer // *Brain Res*. 1983. V. 266. № 1. P. 163-8.
219. Fifkova E. Actin in the nervous system // *Brain Res*. 1985. V. 356. № 2. P. 187-215.
220. Fischer M., Kaech S., et al. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines // *Nat Neurosci*. 2000. V. 3. № 9. P. 887-94.
221. Floderus S. Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse // *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1944. V. 53. (Suppl.). P. 1-26.
222. Fonseca R., Nagerl U.V., et al. Competing for memory: hippocampal LTP under regimes of reduced protein synthesis // *Neuron*. 2004. V. 44. № 6. P. 1011-20.
223. Frankland P.W., Bontempi B. The organization of recent and remote memories // *Nat Rev Neurosci*. 2005. V. 6. № 2. P. 119-30.
224. French P.J., O'Connor V., et al. Subfield-specific immediate early gene expression associated with hippocampal long-term potentiation in vivo // *Eur J Neurosci*. 2001. V. 13. № 5. P. 968-76.

225. Frerking M., Nicoll R.A. Synaptic kainate receptors // *Curr Opin Neurobiol.* 2000. V. 10. № 3. P. 342-51.
226. Freund T.F., Antal M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus // *Nature.* 1988. V. 336. № 6195. P. 170-3.
227. Freund T.F., Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus // *Hippocampus.* 1996. V. 6. № 4. P. 347-470.
228. Frey U., Morris R.G. Synaptic tagging and long-term potentiation // *Nature.* 1997. V. 385. № 6616. P. 533-6.
229. Frey U., Morris R.G. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation // *Trends Neurosci.* 1998. V. 21. № 5. P. 181-8.
230. Froemke R.C., Poo M.M., Dan Y. Spike-timing-dependent synaptic plasticity depends on dendritic location // *Nature.* 2005. V. 434. № 7030. P. 221-5.
231. Fukazawa Y., Saitoh Y., et al. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo // *Neuron.* 2003. V. 38. № 3. P. 447-60.
232. Furuyashiki T., Arakawa Y., et al. Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca²⁺ channels // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. V. 99. № 22. P. 14458-63.
233. Fux C.M., Krug M., et al. NCAM180 and glutamate receptor subtypes in potentiated spine synapses: an immunogold electron microscopic study // *Mol Cell Neurosci.* 2003. V. 24. № 4. P. 939-50.
234. Ganeshina O., Berry R.W., et al. Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions // *Neuroscience.* 2004. V. 125. № 3. P. 615-23.
235. Gardiol A., Racca C., Triller A. Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery // *J Neurosci.* 1999. V. 19. № 1. P. 168-79.
236. Garner C., Nash J. Chemical synapses. // *Encyclopedia of life sciences.* 2001. Электронная публикация. P. 1-8.
237. Garner C.C., Nash J., Huganir R.L. PDZ domains in synapse assembly and signalling // *Trends Cell Biol.* 2000. V. 10. № 7. P. 274-80.
238. Gazzaley A.H., Benson D.L., et al. Differential subcellular regulation of NMDAR1 protein and mRNA in dendrites of dentate gyrus granule cells after perforant path transection // *J Neurosci.* 1997. V. 17. № 6. P. 2006-17.
239. Ge W.P., Yang X.J., et al. Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Science.* 2006. V. 312. № 5779. P. 1533-7.
240. Geinisman Y., Morrell F., de Toledo-Morrell L. Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of 'perforated' synapses visualized in random sections // *Brain Res.* 1987. V. 423. № 1-2. P. 179-88.
241. Geinisman Y., de Toledo-Morrell L., et al. Structural synaptic correlate of long-term potentiation: formation of axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones // *Hippocampus.* 1993. V. 3. № 4. P. 435-45.
242. Geinisman Y., Gundersen H.J., et al. Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region // *J Neurocytol.* 1996. V. 25. № 12. P. 805-19.
243. Geinisman Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and

- behavioral learning // *Cereb Cortex*. 2000. V. 10. № 10. P. 952-62.
244. Georgiev D.D. The nervous principle: active versus passive electric processes in neurons // *Electroneurobiologia*. 2004. V. 12. № 2. P. 169-230.
 245. Gerges N.Z., Backos D.S., et al. Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane // *Embo J*. 2006. V. 25. № 8. P. 1623-34.
 246. Gerges N.Z., Brown T.C., et al. Analysis of Rab protein function in neurotransmitter receptor trafficking at hippocampal synapses. In: *Methods in enzymology*. Vol. 403. Edited by W. E. Balch, C. J. Der, and A. Hall. Elsevier, 2005. P. 153-166.
 247. Germroth P., Schwerdtfeger W.K., Buhl E.H. Morphology of identified entorhinal neurons projecting to the hippocampus. A light microscopical study combining retrograde tracing and intracellular injection // *Neuroscience*. 1989. V. 30. № 3. P. 683-91.
 248. Geuna S. Appreciating the difference between design-based and model-based sampling strategies in quantitative morphology of the nervous system // *J Comp Neurol*. 2000. V. 427. № 3. P. 333-9.
 249. Gibb A.J. NMDA receptor subunit gating--uncovered // *Trends Neurosci*. 2004. V. 27. № 1. P. 7-10; discussion 10.
 250. Gibson W.C. Sir Charles Sherrington, O.M., P.R.S. (1857-1952). In: *Twentieth century neurology. The British contribution*. Edited by F.C. Rose. Imperial College Press. 2001. P.1-7.
 251. Giese K. P., Fedorov N. B., et al. Autophosphorylation at Thr286 of the α Calcium-Calmodulin Kinase II in LTP and Learning // *Science*, 1998. V. 279. P. 870-874.
 252. Glodowski D.R., Wright T., et al. Distinct LIN-10 domains are required for its neuronal function, its epithelial function, and its synaptic localization // *Mol Biol Cell*. 2005. V. 16. № 3. P. 1417-26.
 253. Goldberg J.H., Tamas G., et al. Calcium microdomains in aspiny dendrites // *Neuron*. 2003(a). V. 40. № 4. P. 807-21.
 254. Goldberg J.H., Yuste R., Tamas G. Ca^{2+} imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: contribution of Ca^{2+} -permeable AMPA and NMDA receptors to subthreshold Ca^{2+} -dynamics // *J Physiol*. 2003. V. 551. № Pt 1. P. 67-78.
 255. Golding N.L., Spruston N. Dendritic sodium spikes are variable triggers of axonal action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons // *Neuron*. 1998. V. 21. № 5. P. 1189-200.
 256. Goldowitz D., White W.F., et al. Anatomical evidence for a projection from the entorhinal cortex to the contralateral dentate gyrus of the rat // *Exp Neurol*. 1975. V. 47. № 3. P. 433-41.
 257. Gottlieb D.I., Cowan W.M. Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connections of the hippocampus and dentate gyrus of the rat // *J. Comp. Neurol*. 1973. V. 147. P. 393-422.
 258. Gottlieb D.I., Cowan W.M. Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connection of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. I. The commissural connections // *J Comp Neurol*. 1973. V. 149. № 4. P. 393-422.
 259. Gould E., Tanapat P., et al. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning // *Trends Cogn Sci*. 1999. V. 3. № 5. P. 186-92.
 260. 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.

261. Graf E.R., Zhang X., et al. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins // *Cell*. 2004. V. 119. № 7. P. 1013-26.
262. Gray E.G. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study // *J Anat*. 1959. V. 93. №. P. 420-33.
263. Gray E.G., Guillery R.W. A Note on the Dendritic Spine Apparatus // *J Anat*. 1963. V. 97. №. P. 389-92.
264. Greenough W.T., West R.W., DeVogd T.J. Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat // *Science*. 1978. V. 202. № 4372. P. 1096-8.
265. Gross C.G. 'Psychosurgery' in renaissance art // *Trends Neurosci*. 1999. V. 22. № 10. P. 429-31.
266. Grutzendler J., Kasthuri N., Gan W.B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex // *Nature*. 2002. V. 420. № 6917. P. 812-6.
267. Guillaud L., Setou M., Hirokawa N. KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons // *J Neurosci*. 2003. V. 23. № 1. P. 131-40.
268. Gundersen H.J., Osterby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!' // *J Microsc*. 1981. V. 121. № Pt 1. P. 65-73.
269. Gundersen H.J., Bendtsen T.F., et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis // *Apmis*. 1988. V. 96. № 5. P. 379-94.
270. Gunturkun O. How asymmetry in animals starts // *European Review*. 2005. V. 13 (Suppl.) №. 2. P. 105-118.
271. Guthrie P.B., Segal M., Kater S.B. Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines // *Nature*. 1991. V. 354. № 6348. P. 76-80.
272. Guzowski J.F., Setlow B., et al. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268 // *J Neurosci*. 2001. V. 21. № 14. P. 5089-98.
273. Habets A.M., Lopes da Silva F.H., de Quartel F.W. Autoradiography of the olfactory-hippocampal pathway in the cat with special reference to the perforant path // *Exp Brain Res*. 1980. V. 38. № 3. P. 257-65.
274. Halpain S., Hipolito A., Saffer L. Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin // *J Neurosci*. 1998. V. 18. № 23. P. 9835-44.
275. Hama K., Arai T., Kosaka T. Three-dimensional morphometrical study of dendritic spines of the granule cell in the rat dentate gyrus with HVEM stereo images // *J Electron Microsc Tech*. 1989. V. 12. № 2. P. 80-7.
276. Hardingham G.E., Bading H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling // *Trends Neurosci*. 2003. V. 26. № 2. P. 81-9.
277. Harris K.M., Stevens J.K. Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics // *J Neurosci*. 1988. V. 8. № 12. P. 4455-69.
278. Harris K.M., Stevens J.K. Study of dendritic spines by serial electron microscopy and three-dimensional reconstruction. In: *Intrinsic determinants of neuronal form and function*. Edited by R.J. Lasek, M.M. Black, N.Y.: Liss, 1988. P. 179-199.
279. Harris K.M., Stevens J.K. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics // *J Neurosci*. 1989. V. 9. № 8. P. 2982-97.

280. 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.
281. Harris K.M., Kater S.B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function // *Annu Rev Neurosci*. 1994. V. 17. № P. 341-71.
282. Harris K.M. Serial Electron Microscopy as an alternative or complement to confocal microscopy for the study of synapses and dendritic spines in the central nervous system. In: *Three-dimensional confocal microscopy: Volume investigation of biological systems*. Edited by J.K. Stevens, L.R. Mills, J.E. Trogadis. Academic press. 1994. P. 506.
283. Harris K.M. Structure, development, and plasticity of dendritic spines // *Curr Opin Neurobiol*. 1999. V. 9. № 3. P. 343-8.
284. Harris K.M., Fiala J.C., Ostroff L. Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003. V. 358. № 1432. P. 745-8.
285. Hasbani M.J., Schlieff M.L., et al. Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact // *J Neurosci*. 2001. V. 21. № 7. P. 2393-403.
286. Hayashi Y., Shi S.H., et al. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction // *Science*. 2000. V. 287. № 5461. P. 2262-7.
287. Hayashi M.L., Choi S.Y., et al. Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice // *Neuron*. 2004. V. 42. № 5. P. 773-87.
288. Hayashi Y., Majewska A.K. Dendritic spine geometry: functional implication and regulation // *Neuron*. 2005. V. 46. № 4. P. 529-32.
289. Hebb D.O. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. N.Y.: Wiley, 1949.
290. Hedreen J.C. Unbiased stereology? // *Trends Neurosci*. 1999. V. 22. № 8. P. 346-7.
291. Helmchen F. Raising the speed limit--fast Ca(2+) handling in dendritic spines // *Trends Neurosci*. 2002. V. 25. № 9. P. 438-41; discussion 41.
292. Helmchen F., Denk W. Deep tissue two-photon microscopy // *Nat Methods*. 2005. V. 2. № 12. P. 932-40.
293. Henze D.A., Urban N.N., Barrionuevo G. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review // *Neuroscience*. 2000. V. 98. № 3. P. 407-27.
294. Hering H., Sheng M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation // *Nat Rev Neurosci*. 2001. V. 2. № 12. P. 880-8.
295. Hermans E., Challiss R.A. Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors // *Biochem J*. 2001. V. 359. № Pt 3. P. 465-84.
296. Heynen A.J., Bear M.F. Long-term potentiation of thalamocortical transmission in the adult visual cortex in vivo // *J Neurosci*. 2001. V. 21. № 24. P. 9801-13.
297. Hirai H., Miyazaki T., et al. Rescue of abnormal phenotypes of the delta2 glutamate receptor-null mice by mutant delta2 transgenes // *EMBO Rep*. 2005. V. 6. № 1. P. 90-5.
298. Hirokawa N., Takemura R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons // *Nat Rev Neurosci*. 2005. V. 6. № 3. P. 201-14.
299. Hjorth-Simonsen A., Jeune B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in

- the rat studied by silver impregnation // *J Comp Neurol*. 1972. V. 144. № 2. P. 215-32.
300. Hjorth-Simonsen A. Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata // *J Comp Neurol*. 1972. V. 146. № 2. P. 219-32.
 301. Holcman D., Schuss Z. Modelling Calcium Dynamics in Dendritic Spines // *SIAM J. APPL. MATH.* 2005. V. 65. № 3. P. 1006-1026.
 302. Holcman D., Schuss Z., Korkotian E. Calcium dynamics in dendritic spines and spine motility // *Biophys J*. 2004. V. 87. № 1. P. 81-91.
 303. Hollmann M., Heinemann S. Cloned glutamate receptors // *Annu Rev Neurosci*. 1994. V. 17. №. P. 31-108.
 304. Holtmaat A.J., Trachtenberg J.T., et al. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo // *Neuron*. 2005. V. 45. № 2. P. 279-91.
 305. Hong S.J., Li H., et al. Identification and analysis of plasticity-induced late-response genes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. V. 101. № 7. P. 2145-50.
 306. Hosokawa T., Rusakov D.A., et al. Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP // *J Neurosci*. 1995. V. 15. № 8. P. 5560-73.
 307. Hrabetova S., Serrano P., et al. Distinct NMDA receptor subpopulations contribute to long-term potentiation and long-term depression induction // *J Neurosci*. 2000. V. 20. № 12. P. RC81.
 308. Hsieh-Wilson L.C., Benfenati F., et al. Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments // *J Biol Chem*. 2003. V. 278. № 2. P. 1186-94.
 309. Hsu S.C., Hazuka C.D., et al. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments // *Neuron*. 1998. V. 20. № 6. P. 1111-22.
 310. Huang Y.Y., Martin K.C., Kandel E.R. Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation // *J Neurosci*. 2000. V. 20. № 17. P. 6317-25.
 311. Huang Y.S., Carson J.H., et al. Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB // *Genes Dev*. 2003. V. 17. № 5. P. 638-53.
 312. Hudmon A., Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II // *Biochem J*. 2002. V. 364. № Pt 3. P. 593-611.
 313. Hugdahl K. Symmetry and asymmetry in the human brain // *European Review*. 2005. V. 13 (Suppl.) № 2. P. 119-133.
 314. Huntley G.W. Dynamic aspects of cadherin-mediated adhesion in synapse development and plasticity // *Biol Cell*. 2002. V. 94. № 6. P. 335-44.
 315. Husi H., Ward M.A., et al. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes // *Nat Neurosci*. 2000. V. 3. № 7. P. 661-9.
 316. Hussain N.K., Sheng M. Neuroscience. Making synapses: a balancing act // *Science*. 2005. V. 307. № 5713. P. 1207-8.
 317. Impey S., McCorkle S.R., et al. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions // *Cell*. 2004. V. 119. № 7. P. 1041-54.
 318. Inagaki N., Nishizawa M., et al. Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II within post-synaptic dendritic spines of cultured hippocampal neurons // *J Biol Chem*. 2000. V. 275. № 35. P. 27165-71.
 319. Isaac J.T., Nicoll R.A., Malenka R.C. Evidence for silent synapses: implications for the

- expression of LTP // *Neuron*. 1995. V. 15. № 2. P. 427-34.
320. Jabs R., Pivneva T., et al. Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity // *J Cell Sci*. 2005. V. 118. № Pt 16. P. 3791-803.
 321. Jackson M.B., Scharfman H.E. Positive feedback from hilar mossy cells to granule cells in the dentate gyrus revealed by voltage-sensitive dye and microelectrode recording // *J Neurophysiol*. 1996. V. 76. № 1. P. 601-16.
 322. Jacobs B., Schall M., et al. Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study // *Cereb Cortex*. 2001. V. 11. № 6. P. 558-71.
 323. Jelen F., Oleksy A., et al. PDZ domains - common players in the cell signaling // *Acta Biochim Pol*. 2003. V. 50. № 4. P. 985-1017.
 324. Jiang C., Schuman E.M. Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites // *Trends Biochem Sci*. 2002. V. 27. № 10. P. 506-13.
 325. Job C., Eberwine J. Identification of sites for exponential translation in living dendrites // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001(a). V. 98. № 23. P. 13037-42.
 326. Job C., Eberwine J. Localization and translation of mRNA in dendrites and axons // *Nat Rev Neurosci*. 2001(b). V. 2. № 12. P. 889-98.
 327. Johnson O.L., Ouimet C.C. Protein synthesis is necessary for dendritic spine proliferation in adult brain slices // *Brain Res*. 2004. V. 996. № 1. P. 89-96.
 328. Johnston D., Magee J.C., et al. Active properties of neuronal dendrites // *Annu Rev Neurosci*. 1996. V. 19. № . P. 165-86.
 329. Jones E.G., Powell T.P. Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex // *J Cell Sci*. 1969. V. 5. № 2. P. 509-29.
 330. Jones E.G., Powell T.P. Synapses on the axon hillocks and initial segments of pyramidal cell axons in the cerebral cortex // *J Cell Sci*. 1969. V. 5. № 2. P. 495-507.
 331. Jones D.G., Devon R.M. An ultrastructural study into the effects of pentobarbitone on synaptic organization // *Brain Res*. 1978. V. 147. № 1. P. 47-63.
 332. Jones M.W., Errington M.L., et al. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories // *Nat Neurosci*. 2001. V. 4. № 3. P. 289-96.
 333. Josselyn S.A., Kida S., et al. CREB, plasticity and memory. In: *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol. 19: Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction. Edited by L. Kaczmarek and H.J. Robertson. Elsevier, 2002. P. 329-361.
 334. Kaech S., Fischer M., et al. Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines // *J Neurosci*. 1997. V. 17. № 24. P. 9565-72.
 335. Kaiserman-Abramof, I.R. The spines of pyramidal cell dendrites. A light and electron microscope study. // *Materials of Eighty-second annual session of American association of anatomists*. 1969. *The Anatomical Record*. V. 163. № 2. P. 208.
 336. Kanai Y., Dohmae N., Hirokawa N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule // *Neuron*. 2004. V. 43. № 4. P. 513-25.
 337. Kang H., Sun L.D., et al. An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory // *Cell*. 2001. V. 106. № 6. P. 771-83.
 338. Kapur A., Yeckel M.F., et al. L-Type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP // *J Neurophysiol*. 1998. V. 79. № 4. P. 2181-90.
 339. Karcher R.L., Roland J.T., et al. Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-

- dependent protein kinase II // *Science*. 2001. V. 293. № 5533. P. 1317-20.
340. Kasahara J., Fukunaga K., Miyamoto E. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region // *J Biol Chem*. 2001. V. 276. № 26. P. 24044-50.
 341. Kasai H., Matsuzaki M., et al. Structure-stability-function relationships of dendritic spines // *Trends Neurosci*. 2003. V. 26. № 7. P. 360-8.
 342. Kawakami R., Shinohara Y., et al. Asymmetrical allocation of NMDA receptor epsilon2 subunits in hippocampal circuitry // *Science*. 2003. V. 300. № 5621. P. 990-4.
 343. Kelleher R.J., 3rd, Govindarajan A., Tonegawa S. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity // *Neuron*. 2004. V. 44. № 1. P. 59-73.
 344. Keller A., Arissian K., Asanuma H. Synaptic proliferation in the motor cortex of adult cats after long-term thalamic stimulation // *J Neurophysiol*. 1992. V. 68. № 1. P. 295-308.
 345. Keller A. Use-dependent inhibition of dendritic spines // *Trends Neurosci*. 2002. V. 25. № 11. P. 541-3; discussion 43-4.
 346. Kelso S.R., Ganong A.H., Brown T.H. Hebbian synapses in hippocampus // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986. V. 83. № 14. P. 5326-30.
 347. Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. V. 94. № 19. P. 10409-14.
 348. Kempermann G., Gage F.H. Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis // *Brain Res Dev Brain Res*. 2002. V. 134. № 1-2. P. 1-12.
 349. Kennedy M.B. Signal-processing machines at the postsynaptic density // *Science*. 2000. V. 290. № 5492. P. 750-4.
 350. Kennedy M.B., Beale H.C., et al. Integration of biochemical signalling in spines // *Nat Rev Neurosci*. 2005. V. 6. № 6. P. 423-34.
 351. Kennedy M.J., Ehlers M.D. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity // *Annu Rev Neurosci*. 2006. V. 29. № . P. 325-62.
 352. Kharazia V.N., Weinberg R.J. Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat // *J Comp Neurol*. 1999. V. 412. № 2. P. 292-302.
 353. Kim E., Sheng M. PDZ domain proteins of synapses // *Nat Rev Neurosci*. 2004. V. 5. № 10. P. 771-81.
 354. Kim J.H., Lee H.K., et al. The role of synaptic GTPase-activating protein in neuronal development and synaptic plasticity // *J Neurosci*. 2003. V. 23. № 4. P. 1119-24.
 355. Kirov S.A., Harris K.M. Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated // *Nat Neurosci*. 1999. V. 2. № 10. P. 878-83.
 356. Kirov S.A., Sorra K.E., Harris K.M. Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats // *J Neurosci*. 1999. V. 19. № 8. P. 2876-86.
 357. Kirov S.A., Petrak L.J., et al. Dendritic spines disappear with chilling but proliferate excessively upon rewarming of mature hippocampus // *Neuroscience*. 2004. V. 127. № 1. P. 69-80.
 358. Kiss J.Z., Troncoso E., et al. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair // *Brain Res Brain Res Rev*. 2001. V. 36. № 2-3. P. 175-84.
 359. Klann E., Dever T.E. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity // *Nat Rev Neurosci*. 2004. V. 5. № 12. P. 931-42.
 360. Knafo S., Ariav G., et al. Olfactory learning-induced increase in spine density along the

- apical dendrites of CA1 hippocampal neurons // *Hippocampus*. 2004. V. 14. № 7. P. 819-25.
361. Kneussel M. Postsynaptic scaffold proteins at non-synaptic sites. The role of postsynaptic scaffold proteins in motor-protein-receptor complexes // *EMBO Rep*. 2005. V. 6. № 1. P. 22-7.
 362. Koch C., Zador A. The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization // *J Neurosci*. 1993. V. 13. № 2. P. 413-22.
 363. Koh I.Y., Lindquist W.B., et al. An image analysis algorithm for dendritic spines // *Neural Comput*. 2002. V. 14. № 6. P. 1283-310.
 364. Kohler C., Chan-Palay V., Wu J.Y. Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain // *Anat Embryol (Berl)*. 1984. V. 169. № 1. P. 41-4.
 365. Kolodziej S.J., Hudmon A., et al. Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains // *J Biol Chem*. 2000. V. 275. № 19. P. 14354-9.
 366. Kopanitsa M.V. Extrasynaptic receptors of neurotransmitters: Distribution, mechanisms of activation, and physiological role // *Neurophysiologiia/Neurophysiology*. 1997. V. 29. № 6. P. 357-365.
 367. Kopec C.D., Li B., et al. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation // *J Neurosci*. 2006. V. 26. № 7. P. 2000-9.
 368. Korkotian E., Segal M. Spike-associated fast contraction of dendritic spines in cultured hippocampal neurons // *Neuron*. 2001. V. 30. № 3. P. 751-8.
 369. Korkotian E., Oron D., et al. Confocal microscopic imaging of fast UV-laser photolysis of caged compounds // *J Neurosci Methods*. 2004(a). V. 133. № 1-2. P. 153-9.
 370. Korkotian E., Holcman D., Segal M. Dynamic regulation of spine-dendrite coupling in cultured hippocampal neurons // *Eur J Neurosci*. 2004(b). V. 20. № 10. P. 2649-63.
 371. Kornau H.C., Seeburg P.H., Kennedy M.B. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins // *Curr Opin Neurobiol*. 1997. V. 7. № 3. P. 368-73.
 372. Kreft M., Stenovec M., et al. Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes // *Glia*. 2004. V. 46. № 4. P. 437-45.
 373. Kubinova L., Janacek J., et al. Confocal stereology and image analysis: Methods for estimating geometrical characteristics of cells and tissues from three-dimensional confocal images // *Physiol. Res*. 2004. V. 53 (Suppl. 1). P. 47-55.
 374. Kubinova L., Janacek J., et al. Confocal stereology and image analysis: methods for estimating geometrical characteristics of cells and tissues from three-dimensional confocal images // *Physiol Res*. 2004. V. 53 Suppl 1. №. P. S47-55.
 375. Kuhl D., Skehel P. Dendritic localization of mRNAs // *Curr Opin Neurobiol*. 1998. V. 8. № 5. P. 600-6.
 376. Kull F.J., Vale R.D., Fletterick R.J. The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins // *J Muscle Res Cell Motil*. 1998. V. 19. № 8. P. 877-86.
 377. Kullmann D.M. Silent synapses: what are they telling us about long-term potentiation? // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003. V. 358. № 1432. P. 727-33.
 378. Kunishima N., Shimada Y., et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor // *Nature*. 2000. V. 407. № 6807. P. 971-7.

379. Kunkel D.D., Lacaille J.C., Schwartzkroin P.A. Ultrastructure of stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region // *Synapse*. 1988. V. 2. № 4. P. 382-94.
380. Kuusinen A., Abele R., et al. Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD // *J Biol Chem*. 1999. V. 274. № 41. P. 28937-43.
381. Laatsch R.H., Cowan W.M. Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization // *J Comp Neurol*. 1966. V. 128. № 3. P. 359-95.
382. Landis D.M., Reese T.S. Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines // *J Cell Biol*. 1983. V. 97. № 4. P. 1169-78.
383. Lang C., Barco A., et al. Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. V. 101. № 47. P. 16665-70.
384. Langford G.M. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport // *Traffic*. 2002. V. 3. № 12. P. 859-65.
385. Larson J., Lynch G. Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned stimulation involves two events // *Science*. 1986. V. 232. № 4753. P. 985-8.
386. Larson J., Wong D., Lynch G. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation // *Brain Res*. 1986. V. 368. № 2. P. 347-50.
387. Lashley K.S. In search of the engram // *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1950. V. 4. P. 454-482.
388. Lawrence C.J., Dawe R.K., et al. A standardized kinesin nomenclature // *J Cell Biol*. 2004. V. 167. № 1. P. 19-22.
389. Lee K.S., Schottler F., et al. Brief bursts of high-frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus // *J Neurophysiol*. 1980. V. 44. № 2. P. 247-58.
390. Lee K.J., Park C.H., Rhyu I.J. Efficient three-dimensional reconstruction of synapse with high-voltage electron microscopy // *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2005. V. 54. № 2. P. 139-41.
391. Lein E.S., Callaway E.M., et al. Redefining the boundaries of the hippocampal CA2 subfield in the mouse using gene expression and 3-dimensional reconstruction // *J Comp Neurol*. 2005. V. 485. № 1. P. 1-10.
392. Leonard A.S., Lim I.A., et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. V. 96. № 6. P. 3239-44.
393. Leonard A.S., Bayer K.U., et al. Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II docking to N-methyl-D-aspartate receptors by calcium/calmodulin and alpha-actinin // *J Biol Chem*. 2002. V. 277. № 50. P. 48441-8.
394. Lerma J. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission // *Nat Rev Neurosci*. 2003. V. 4. № 6. P. 481-95.
395. Leuschner W.D., Hoch W. Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their n-terminal domains // *J Biol Chem*. 1999. V. 274. № 24. P. 16907-16.
396. Levy D.A., Bayley P.J., Squire L.R. The anatomy of semantic knowledge: medial vs.

- lateral temporal lobe // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. V. 101. № 17. P. 6710-5.
397. Levy W.B. Contrasting rules for synaptogenesis, modification of existing synapses, and synaptic removal as a function of neuronal computation // *Neurocomputing*. 2004. V. 58-60. P. 343-350.
 398. Levy W.B., Colbert C.M., Desmond N.L. Elemental Adaptive Processes of Neurons and Synapses: A Statistical/Computational Perspective. In: *Neuroscience and Connectionist Theory*. Edited by M.Clusk and D.Rumelhart. Lawrence Erlbaum Associates. Hillsdale, New Jersey, 1990. P. 187-235.
 399. Levy W.B., Desmond N.L. The Rules of Elemental Synaptic Plasticity. In: *Synaptic modification, neuron selectivity, and nervous system organization*. Edited by W.B. Levy, J.A. Anderson and S. Lehmkuhle. Hillsdale, N.J.: Lawrence Erlbaum Assoc. 1985. P. 105-121.
 400. Levy W.B., Steward O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation // *Brain Res*. 1979. V. 175. № 2. P. 233-45.
 401. Levy W.B., Steward O. Temporal contiguity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus // *Neuroscience*. 1983. V. 8. № 4. P. 791-7.
 402. 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.
 403. Liao D., Zhang X., et al. Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons // *Nat Neurosci*. 1999. V. 2. № 1. P. 37-43.
 404. Liao D., Scannevin R.H., Huganir R. Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors // *J Neurosci*. 2001. V. 21. № 16. P. 6008-17.
 405. Lichtman J.W. Confocal Microscopy // *Scientific american*. August. 1994. P.40-45.
 406. Ligon L.A., Karki S., et al. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions // *Nat Cell Biol*. 2001. V. 3. № 10. P. 913-7.
 407. Lipp H.P., Schwegler H., et al. Strain-specific correlations between hippocampal structural traits and habituation in a spatial novelty situation // *Behav Brain Res*. 1987. V. 24. № 2. P. 111-23.
 408. Lippincott-Schwartz J., Patterson G.H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells // *Science*. 2003. V. 300. № 5616. P. 87-91.
 409. Lisman J., Schulman H., Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory // *Nat Rev Neurosci*. 2002. V. 3. № 3. P. 175-90.
 410. Liu L., Wong T.P., et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity // *Science*. 2004. V. 304. № 5673. P. 1021-4.
 411. Lloyd D.P. Post-tetanic potentiation of response in monosynaptic reflex pathways of the spinal cord // *J Gen Physiol*. 1949. V. 33. № 2. P. 147-70.
 412. Lømo T. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation // XII Scandinavian congress of physiology. Turku 1966. *Acta Physiol. Scand*. 1966. V.68 (Suppl.). P. 277.
 413. Lømo T. Potentiation of monosynaptic EPSPs in the perforant path-dentate granule cell synapse // *Exp Brain Res*. 1971. V. 12. № 1. P. 46-63.
 414. Lømo T. The discovery of long-term potentiation // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003. V. 358. № 1432. P. 617-20.

415. London M., Schreibman A., et al. The information efficacy of a synapse // *Nat Neurosci.* 2002. V. 5. № 4. P. 332-40.
416. Lonze B.E., Ginty D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system // *Neuron.* 2002. V. 35. № 4. P. 605-23.
417. Lopes da Silva F.H., Witter M.P., et al. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex // *Physiol Rev.* 1990. V. 70. № 2. P. 453-511.
418. Lorente de No R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system // *J. Psychol. Neurol.* 1934. V. 46. P. 113-177.
419. Lubke J., Frotscher M., Spruston N. Specialized electrophysiological properties of anatomically identified neurons in the hilar region of the rat fascia dentata // *J Neurophysiol.* 1998. V. 79. № 3. P. 1518-34.
420. Lujan R., Nusser Z., et al. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus // *Eur J Neurosci.* 1996. V. 8. № 7. P. 1488-500.
421. Luscher C., Nicoll R.A., et al. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane // *Nat Neurosci.* 2000. V. 3. № 6. P. 545-50.
422. Luscher B., Keller C.A. Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses // *Pharmacol Ther.* 2004. V. 102. № 3. P. 195-221.
423. Luthi A., Wikstrom M.A., et al. Bi-directional modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity // *BMC Neurosci.* 2004. V. 5. № 1. P. 44.
424. Lynch M.A. Long-term potentiation and memory // *Physiol Rev.* 2004. V. 84. № 1. P. 87-136.
425. Majewska A., Brown E., et al. Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization // *J Neurosci.* 2000(a). V. 20. № 5. P. 1722-34.
426. Majewska A., Tashiro A., Yuste R. Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility // *J Neurosci.* 2000(b). V. 20. № 22. P. 8262-8.
427. Majewska A., Sur M. Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: changes during the critical period and effects of visual deprivation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. V. 100. № 26. P. 16024-9.
428. Malenka R.C., Kauer J.A., et al. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission // *Science.* 1988. V. 242. № 4875. P. 81-4.
429. Malenka R.C., Nicoll R.A. Long-term potentiation--a decade of progress? // *Science.* 1999. V. 285. № 5435. P. 1870-4.
430. Malenka R.C., Bear M.F. LTP and LTD: an embarrassment of riches // *Neuron.* 2004. V. 44. № 1. P. 5-21.
431. Maletic-Savatic M., Malinow R., Svoboda K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity // *Science.* 1999. V. 283. № 5409. P. 1923-7.
432. Malinow R., Hayashi Y., et al. Introduction of green fluorescent protein into hippocampal neurons through viral infection. In: *Imaging living neuron.* Edited by R. Yuste, F. Lanni, A. Konnerth. N.Y.: Cold Spring Harbor Press, 1999. P. 58.1-58.9.
433. Malinow R., Malenka R.C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity // *Annu Rev Neurosci.* 2002. V. 25. №. P. 103-26.

434. Mallik R., Gross S.P. Molecular motors: strategies to get along // *Curr Biol*. 2004. V. 14. № 22. P. R971-82.
435. Marrone D.F., Petit T.L. The role of synaptic morphology in neural plasticity: structural interactions underlying synaptic power // *Brain Res Brain Res Rev*. 2002. V. 38. № 3. P. 291-308.
436. Marrone D.F., LeBoutillier J.C., Petit T.L. Complementary techniques for unbiased stereology of brain ultrastructure // *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2003. V. 52. № 4. P. 425-8.
437. Marrone D.F., LeBoutillier J.C., Petit T.L. Comparative analyses of synaptic densities during reactive synaptogenesis in the rat dentate gyrus // *Brain Res*. 2004(a). V. 996. № 1. P. 19-30.
438. Marrone D.F., LeBoutillier J.C., Petit T.L. Changes in synaptic ultrastructure during reactive synaptogenesis in the rat dentate gyrus // *Brain Res*. 2004(b). V. 1005. № 1-2. P. 124-36.
439. Marrs G.S., Green S.H., Dailey M.E. Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites // *Nat Neurosci*. 2001. V. 4. № 10. P. 1006-13.
440. Marszalek J.R., Weiner J.A., et al. Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B // *J Cell Biol*. 1999. V. 145. № 3. P. 469-79.
441. Martin K.A. Письмо Кевана Мартина Микки Лондону. The embarrassing truth about "Lord Sherrington". 2002. Электронный вариант. См. <http://lobster.ls.huji.ac.il/~mikilon/Kevan.html>
442. Martin K.C., Kosik K.S. Synaptic tagging -- who's it? // *Nat Rev Neurosci*. 2002. V. 3. № 10. P. 813-20.
443. Martone M.E., Pollock J.A., et al. Ultrastructural localization of dendritic messenger RNA in adult rat hippocampus // *J Neurosci*. 1996. V. 16. № 23. P. 7437-46.
444. Martone M.E., Zhang Y., et al. Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell dendrites // *J Neurosci*. 1993. V. 13. № 11. P. 4636-46.
445. Matsuda K., Kamiya Y., et al. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability // *Brain Res Mol Brain Res*. 2002. V. 100. № 1-2. P. 43-52.
446. Matsuda K., Fletcher M., et al. Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors // *J Neurosci*. 2003. V. 23. № 31. P. 10064-73.
447. Matsuo R., Murayama A., et al. Identification and cataloging of genes induced by long-lasting long-term potentiation in awake rats // *J Neurochem*. 2000. V. 74. № 6. P. 2239-49.
448. Matsuzaki M., Ellis-Davies G.C., et al. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons // *Nat Neurosci*. 2001. V. 4. № 11. P. 1086-92.
449. Matsuzaki M., Honkura N., et al. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines // *Nature*. 2004. V. 429. № 6993. P. 761-6.
450. Matus A. Actin-based plasticity in dendritic spines // *Science*. 2000. V. 290. № 5492. P. 754-8.
451. Matus A., Brinkhaus H., Wagner U. Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses // *Hippocampus*. 2000. V. 10. № 5. P. 555-60.

452. Matus A. Moving molecules make synapses // *Nat Neurosci.* 2001. V. 4. № 10. P. 967-8.
453. Maximov A., Tang T.S., Bezprozvanny I. Association of the type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor with 4.1N protein in neurons // *Mol Cell Neurosci.* 2003. V. 22. № 2. P. 271-83.
454. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones // *Nature.* 1984. V. 309. № 5965. P. 261-3.
455. Mayer P., Ammon S., et al. Gene expression profile after intense second messenger activation in cortical primary neurones // *J Neurochem.* 2002. V. 82. № 5. P. 1077-86.
456. Mazzarello P. The hidden structure: A scientific biography of Camillo Golgi. Trans. and edited by H. Buchtel and A. Badiani. Oxford University Press. 1999. P. 407.
457. McBain C.J., Freund T.F., Mody I. Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity // *Trends Neurosci.* 1999. V. 22. № 5. P. 228-35.
458. McNaughton B.L. Long-term potentiation, cooperativity and Hebb's cell assemblies: a personal history // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003. V. 358. № 1432. P. 629-34.
459. McNaughton B.L., Douglas R.M., Goddard G.V. Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents // *Brain Res.* 1978. V. 157. № 2. P. 277-93.
460. Mehta A.K., Ticku M.K. An update on GABAA receptors // *Brain Res Brain Res Rev.* 1999. V. 29. № 2-3. P. 196-217.
461. Mel B.W. Have we been Hebbing down the wrong path? // *Neuron.* 2002. V. 34. № 2. P. 175-177.
462. Meldolesi J. Rapidly exchanging Ca^{2+} stores in neurons: molecular, structural and functional properties // *Prog Neurobiol.* 2001. V. 65. № 3. P. 309-38.
463. Meyer T., Shen K. In and out of the postsynaptic region: signalling proteins on the move // *Trends Cell Biol.* 2000. V. 10. № 6. P. 238-44.
464. Mezey S., Doyere V., et al. Long-term synaptic morphometry changes after induction of long-term potentiation and long-term depression in the dentate gyrus of awake rats are not simply mirror phenomena // *Eur J Neurosci.* 2004. V. 19. № 8. P. 2310-8.
465. Michel R.P., Cruz-Orive L.M. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area // *J Microsc.* 1988. V. 150. № Pt 2. P. 117-36.
466. Miesenbock G., Kevrekidis I.G. Optical imaging and control of genetically designated neurons in functioning circuits // *Annu Rev Neurosci.* 2005. V. 28. №. P. 533-63.
467. Migliore M., Shepherd G.M. Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances // *Nat Rev Neurosci.* 2002. V. 3. № 5. P. 362-70.
468. Miki T., Satriotomo I., et al. Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus // *Anat Sci Int.* 2005. V. 80. № 3. P. 153-62.
469. Miller J.P., Rall W., Rinzel J. Synaptic amplification by active membrane in dendritic spines // *Brain Res.* 1985. V. 325. № 1-2. P. 325-30.
470. Miller S., Yasuda M., et al. Disruption of dendritic translation of CaMKII α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation // *Neuron.* 2002. V. 36. № 3. P. 507-19.
471. Miller P., Zhabotinsky A.M., et al. The stability of a stochastic CaMKII switch: dependence on the number of enzyme molecules and protein turnover // *PLoS Biol.* 2005.

- V. 3. № 4. P. e107.
472. Miyata M., Finch E.A., et al. Local calcium release in dendritic spines required for long-term synaptic depression // *Neuron*. 2000. V. 28. № 1. P. 233-44.
 473. Mizoguchi A., Nakanishi H., et al. Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses // *J Cell Biol*. 2002. V. 156. № 3. P. 555-65.
 474. Mok H., Shin H., et al. Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1B α with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/discs large/zona occludens-1 proteins // *J Neurosci*. 2002. V. 22. № 13. P. 5253-8.
 475. Molloy J.E., Schmitz S. Molecular motors: kinesin steps back // *Nature*. 2005. V. 435. № 7040. P. 285-7.
 476. Montana V., Ni Y., et al. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes // *J Neurosci*. 2004. V. 24. № 11. P. 2633-42.
 477. Morris R.G., Garrud P., et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions // *Nature*. 1982. V. 297. № 5868. P. 681-3.
 478. Morris E.P., Torok K. Oligomeric structure of alpha-calmodulin-dependent protein kinase II // *J Mol Biol*. 2001. V. 308. № 1. P. 1-8.
 479. Moser M.B. Making more synapses: a way to store information? // *Cell Mol Life Sci*. 1999. V. 55. № 4. P. 593-600.
 480. Muller W., Connor J.A. Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca²⁺ responses // *Nature*. 1991. V. 354. № 6348. P. 73-6.
 481. Murai K.K., Nguyen L.N., et al. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling // *Nat Neurosci*. 2003. V. 6. № 2. P. 153-60.
 482. Murase S., Mosser E., Schuman E.M. Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function // *Neuron*. 2002. V. 35. № 1. P. 91-105.
 483. Nagerl U.V., Eberhorn N., et al. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons // *Neuron*. 2004. V. 44. № 5. P. 759-67.
 484. Naisbitt S., Valtschanoff J., et al. Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein // *J Neurosci*. 2000. V. 20. № 12. P. 4524-34.
 485. Nakagawa T., Setou M., et al. A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex // *Cell*. 2000. V. 103. № 4. P. 569-81.
 486. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function // *Science*. 1992. V. 258. № 5082. P. 597-603.
 487. Nakanishi S., Nakajima Y., et al. Glutamate receptors: brain function and signal transduction // *Brain Res Brain Res Rev*. 1998. V. 26. № 2-3. P. 230-5.
 488. Nam C.I., Chen L. Postsynaptic assembly induced by neurexin-neurologin interaction and neurotransmitter // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. V. 102. № 17. P. 6137-42.
 489. Nestler E.J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction // *Nat Rev Neurosci*. 2001. V. 2. № 2. P. 119-28.
 490. Nieto-Sampedro M., Hoff S.F., Cotman C.W. Perforated postsynaptic densities: probable intermediates in synapse turnover // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982. V. 79. № 18. P. 5718-22.

491. Nimchinsky E.A., Sabatini B.L., Svoboda K. Structure and function of dendritic spines // *Annu Rev Physiol.* 2002. V. 64. №. P. 313-53.
492. Nimchinsky E.A., Yasuda R., et al. The number of glutamate receptors opened by synaptic stimulation in single hippocampal spines // *J Neurosci.* 2004. V. 24. № 8. P. 2054-64.
493. Noguchi J., Matsuzaki M., et al. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca^{2+} signaling in dendrites // *Neuron.* 2005. V. 46. № 4. P. 609-22.
494. Novick P., Medkova M., et al. Interactions between Rabs, tethers, SNAREs and their regulators in exocytosis // *Biochem Soc Trans.* 2006. V. 34. № Pt 5. P. 683-6.
495. Nowak L., Bregestovski P., et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones // *Nature.* 1984. V. 307. № 5950. P. 462-5.
496. Nuriya M., Jiang J., et al. Imaging membrane potential in dendritic spines // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. V. 103. № 3. P. 786-90.
497. Nusser Z., Lujan R., et al. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus // *Neuron.* 1998. V. 21. № 3. P. 545-59.
498. Nusser Z. AMPA and NMDA receptors: similarities and differences in their synaptic distribution // *Curr Opin Neurobiol.* 2000. V. 10. № 3. P. 337-41.
499. O'Brien R.J., Lau L.-F., Huganir R.L. Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses // *Current Opinion in Neurobiology.* 1998. V. 8. P. 364-369.
500. O'Keefe J., Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford university press, 1978. P. 570.
501. Okamoto K., Nagai T., et al. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity // *Nat Neurosci.* 2004. V. 7. № 10. P. 1104-12.
502. Omkumar R.V., Kiely M.J., et al. Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor // *J Biol Chem.* 1996. V. 271. № 49. P. 31670-8.
503. Osterweil E., Wells D.G., Mooseker M.S. A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis // *J Cell Biol.* 2005. V. 168. № 2. P. 329-38.
504. Ostroff L.E., Fiala J.C., et al. 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.
505. Otmakhov N., Tao-Cheng J.H., et al. Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation // *J Neurosci.* 2004. V. 24. № 42. P. 9324-31.
506. Ouyang Y., Kantor D., et al. Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus // *J Neurosci.* 1997. V. 17. № 14. P. 5416-27.
507. Ouyang Y., Rosenstein A., et al. Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons // *J Neurosci.* 1999. V. 19. № 18. P. 7823-33.
508. Owen D.J., Collins B.M., Evans P.R. Adaptors for clathrin coats: structure and function // *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004. V. 20. №. P. 153-91.
509. Ozer R.S., Halpain S. Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton // *Mol Biol Cell.* 2000. V. 11. № 10. P. 3573-87.

510. Palacios I.M., Johnston D.St. Getting the Message Across: The intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001. V. 17. P. 569-614.
511. Palay S.L. Synapses in the central nervous system // *J Biophys Biochem Cytol.* 1956. V. 2. № 4, Suppl. P. 193-202.
512. Papp S., Dziak E., et al. Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca²⁺-handling proteins // *J Cell Biol.* 2003. V. 160. № 4. P. 475-9.
513. Park M., Penick E.C., et al. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP // *Science.* 2004. V. 305. № 5692. P. 1972-5.
514. Park C.S., Gong R., et al. Molecular network and chromosomal clustering of genes involved in synaptic plasticity in the hippocampus // *J Biol Chem.* 2006(a). V. 281. № 40. P. 30195-211.
515. Park M., Salgado J.M., et al. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes // *Neuron.* 2006(b). V. 52. № 5. P. 817-30.
516. Parpura V., Basarsky T.A., et al. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling // *Nature.* 1994. V. 369. № 6483. P. 744-7.
517. Passafaro M., Piech V., Sheng M. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons // *Nat Neurosci.* 2001. V. 4. № 9. P. 917-26.
518. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Atlas, 4th ed. Academic Press. 1998. P. 474.
519. Pearce J.M. Sir Charles Scott Sherrington (1857-1952) and the synapse // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004. V. 75. № 4. P. 544.
520. Peccarisi C., Boeri R., Salmaggi A. Eugenio Tanzi (1856-1934) and the beginnings of European neurology // *J Hist Neurosci.* 1994. V. 3. № 3. P. 177-85.
521. Peng J., Kim M.J., et al. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry // *J Biol Chem.* 2004. V. 279. № 20. P. 21003-11.
522. Perkel D.H., Perkel D.J. Dendritic spines: role of active membrane in modulating synaptic efficacy // *Brain Res.* 1985. V. 325. № 1-2. P. 331-5.
523. Peters A., Kaiserman-Abramof I.R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines // *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1969. V. 100. № 4. P. 487-506.
524. 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.
525. Peters A., Palay S.L., Webster H.deF. The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells, 3rd ed. Oxford University Press. 1991. P. 494.
526. Peterson G.M. A quantitative analysis of the crossed septohippocampal projection in the rat brain // *Anat Embryol (Berl).* 1989. V. 180. № 5. P. 421-5.
527. Petrak L.J., Harris K.M., Kirov S.A. Synaptogenesis on mature hippocampal dendrites occurs via filopodia and immature spines during blocked synaptic transmission // *J Comp Neurol.* 2005. V. 484. № 2. P. 183-90.
528. Pettit D.L., Wang S.S., et al. Chemical two-photon uncaging: a novel approach to mapping glutamate receptors // *Neuron.* 1997. V. 19. № 3. P. 465-71.
529. 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.

530. Pierce J.P., Mayer T., McCarthy J.B. Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines // *Curr Biol*. 2001. V. 11. № 5. P. 351-5.
531. Pierce J.P., van Leyen K., McCarthy J.B. Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines // *Nat Neurosci*. 2000. V. 3. № 4. P. 311-3.
532. Pologruto T.A., Yasuda R., Svoboda K. Monitoring neural activity and [Ca²⁺] with genetically encoded Ca²⁺ indicators // *J Neurosci*. 2004. V. 24. № 43. P. 9572-9.
533. Popov V.I., Bocharova L.S. Hibernation-induced structural changes in synaptic contacts between mossy fibres and hippocampal pyramidal neurons // *Neuroscience*. 1992. V. 48. № 1. P. 53-62.
534. Popov V.I., Bocharova L.S., Bragin A.G. Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation // *Neuroscience*. 1992. V. 48. № 1. P. 45-51.
535. Popov V.I., Davies H.A., et al. Serial ultrathinning 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.
536. Portera-Cailliau C., Pan D.T., Yuste R. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia // *J Neurosci*. 2003. V. 23. № 18. P. 7129-42.
537. Pozzo-Miller L.D., Pivovarova N.B., et al. Activity-dependent calcium sequestration in dendrites of hippocampal neurons in brain slices // *J Neurosci*. 1997. V. 17. № 22. P. 8729-38.
538. Pozzo-Miller L.D., Connor J.A., Andrews S.B. Microheterogeneity of calcium signalling in dendrites // *J Physiol*. 2000. V. 525 Pt 1. №. P. 53-61.
539. Price J.L. An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex // *J Comp Neurol*. 1973. V. 150. № 1. P. 87-108.
540. Prybylowski K., Wenthold R.J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse // *J Biol Chem*. 2004. V. 279. № 11. P. 9673-6.
541. Qiu J. Motoring activity // *Nature Reviews Neuroscience*. 2005. V. 6. № 3. P. 175.
542. Racca C., Stephenson F.A., et al. NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area // *J Neurosci*. 2000. V. 20. № 7. P. 2512-22.
543. Racz B., Blanpied T.A., et al. Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines // *Nat Neurosci*. 2004. V. 7. № 9. P. 917-8.
544. Ramon y Cajal S. (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés* (trans. from the spanish by L. Azoulay), Paris: Maloine. English translations: *Histology of the nervous system of man and vertebrates* (trans. N. Swanson and L.W. Swanson). New York: Oxford University Press. 1995. P. 1672.
545. Rao A., Craig A.M. Signaling between the actin cytoskeleton and the postsynaptic density of dendritic spines // *Hippocampus*. 2000. V. 10. № 5. P. 527-41.
546. Rapp M., Yarom Y., Segev I. Modeling back propagating action potential in weakly excitable dendrites of neocortical pyramidal cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. V. 93. № 21. P. 11985-90.
547. Rauschecker J.P., Singer W. The effects of early visual experience on the cat's visual cortex and their possible explanation by Hebb synapses // *J Physiol*. 1981. V. 310. №. P. 215-39.

548. Raymond C.R., Thompson V.L., et al. Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation // *J Neurosci.* 2000. V. 20. № 3. P. 969-76.
549. Rees S., Guldner F.H., Aitkin L. Activity dependent plasticity of postsynaptic density structure in the ventral cochlear nucleus of the rat // *Brain Res.* 1985. V. 325. № 1-2. P. 370-4.
550. Reid C.A., Bliss T.V. Learning about kainate receptors // *Trends Pharmacol Sci.* 2000. V. 21. № 5. P. 159-60.
551. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J Cell Biol.* 1963. V. 17. №. P. 208-12.
552. Ribak C.E., Seress L., Amaral D.G. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus // *J Neurocytol.* 1985. V. 14. № 5. P. 835-57.
553. Richards D.A., De Paola V., et al. AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus // *J Physiol.* 2004. V. 558. № Pt 2. P. 503-12.
554. Richards D.A., Mateos J.M., et al. Glutamate induces the rapid formation of spine head protrusions in hippocampal slice cultures // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. V. 102. № 17. P. 6166-71.
555. Robertson J.D. The ultrastructure of a reptilian myoneural junction // *J Biophys Biochem Cytol.* 1956. V. 2. № 4. P. 381-94.
556. Rodriguez O.C., Schaefer A.W., et al. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis // *Nat Cell Biol.* 2003. V. 5. № 7. P. 599-609.
557. Roelandse M., Welman A., et al. Focal motility determines the geometry of dendritic spines // *Neuroscience.* 2003. V. 121. № 1. P. 39-49.
558. Rogan M.T., Staubli U.V., LeDoux J.E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala // *Nature.* 1997. V. 390. № 6660. P. 604-7.
559. Rongo C. Disparate cell types use a shared complex of PDZ proteins for polarized protein localization // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001. V. 12. № 4. P. 349-59.
560. Rose G., Diamond D., Lynch G.S. Dentate granule cells in the rat hippocampal formation have the behavioral characteristics of theta neurons // *Brain Res.* 1983. V. 266. № 1. P. 29-37.
561. Rose G.J., Call S.J. Evidence for the role of dendritic spines in the temporal filtering properties of neurons: the decoding problem and beyond // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992. V. 89. № 20. P. 9662-5.
562. Rose O., Grund C., et al. Contactus adherens, a special type of plaque-bearing adhering junction containing M-cadherin, in the granule cell layer of the cerebellar glomerulus // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. V. 92. № 13. P. 6022-6.
563. Rosenbluth J., Wissig S.L. The Distribution of Exogenous Ferritin in Toad Spinal Ganglia and the Mechanism of Its Uptake by Neurons // *J Cell Biol.* 1964. V. 23. №. P. 307-25.
564. Roussignol G., Ango F., et al. Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons // *J Neurosci.* 2005. V. 25. № 14. P. 3560-70.
565. Rubio M.E., Wenthold R.J. Differential distribution of intracellular glutamate receptors in dendrites // *J Neurosci.* 1999. V. 19. № 13. P. 5549-62.
566. Rumpel S., LeDoux J., et al. Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of

- associative learning // *Science*. 2005. V. 308. № 5718. P. 83-8.
567. Rusakov D.A., Richter-Levin G., et al. Reduction in spine density associated with long-term potentiation in the dentate gyrus suggests a spine fusion-and-branching model of potentiation // *Hippocampus*. 1997. V. 7. № 5. P. 489-500.
 568. Ryugo D.K., Wu M.M., Pongstaporn T. Activity-related features of synapse morphology: a study of endbulbs of held // *J Comp Neurol*. 1996. V. 365. № 1. P. 141-58.
 569. Sabatini B.L., Oertner T.G., Svoboda K. The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines // *Neuron*. 2002. V. 33. № 3. P. 439-52.
 570. Salter M.W., Kalia L.V. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation // *Nat Rev Neurosci*. 2004. V. 5. № 4. P. 317-28.
 571. Sanchez C., Diaz-Nido J., Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function // *Prog Neurobiol*. 2000. V. 61. № 2. P. 133-68.
 572. Sanchez Martin C., Ledesma D., et al. Microtubule-associated protein-2 located in growth regions of rat hippocampal neurons is highly phosphorylated at its proline-rich region // *Neuroscience*. 2000. V. 101. № 4. P. 885-93.
 573. Saper C.B. Any way you cut it: a new journal policy for the use of unbiased counting methods // *J Comp Neurol*. 1996. V. 364. № 1. P. 5.
 574. Scharfman H.E., Sollas A.L., et al. Structural and functional asymmetry in the normal and epileptic rat dentate gyrus // *J Comp Neurol*. 2002. V. 454. № 4. P. 424-39.
 575. Scheiffele P. Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS // *Annu Rev Neurosci*. 2003. V. 26. №. P. 485-508.
 576. Schell M.J. The N-methyl D-aspartate receptor glycine site and D-serine metabolism: an evolutionary perspective // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004. V. 359. № 1446. P. 943-64.
 577. Schikorski T., Stevens C.F. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. V. 96. № 7. P. 4107-12.
 578. Schiller J., Schiller Y., Clapham D.E. NMDA receptors amplify calcium influx into dendritic spines during associative pre- and postsynaptic activation // *Nat Neurosci*. 1998. V. 1. № 2. P. 114-8.
 579. Schmitz C., Korr H., Heinsen H. Design-based counting techniques: the real problems // *Trends Neurosci*. 1999. V. 22. № 8. P. 345-6.
 580. Schmitz C., Hof P.R. Design-based stereology in neuroscience // *Neuroscience*. 2005. V. 130. № 4. P. 813-31.
 581. Schnapp B.J. Trafficking of signaling modules by kinesin motors // *J Cell Sci*. 2003. V. 116. № Pt 11. P. 2125-35.
 582. Schnell D.J., Hebert D.N. Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes // *Cell*. 2003. V. 112. № 4. P. 491-505.
 583. Schnell E., Sizemore M., et al. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. V. 99. № 21. P. 13902-7.
 584. Schoepp D.D. Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system // *J Pharmacol Exp Ther*. 2001. V. 299. № 1. P. 12-20.
 585. Schratt G.M., Tuebing F., et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development // *Nature*. 2006. V. 439. № 7074. P. 283-9.

586. Schulz T.W., Nakagawa T., et al. Actin/alpha-actinin-dependent transport of AMPA receptors in dendritic spines: role of the PDZ-LIM protein RIL // *J Neurosci*. 2004. V. 24. № 39. P. 8584-94.
587. Schuman E.M. mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse // *Neuron*. 1999. V. 23. № 4. P. 645-8.
588. Scoville W.B., Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1957. V. 20. № 1. P. 11-21. См. Также репринт *J Neuropsychiatry Clin. Neurosci*. 2000. V. 12. № 1. P. 103-13.
589. Seeburg P.H., Higuchi M., Sprengel R. RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology // *Brain Res Brain Res Rev*. 1998. V. 26. № 2-3. P. 217-29.
590. Segal M. Rapid plasticity of dendritic spine: hints to possible functions? // *Prog Neurobiol*. 2001. V. 63. № 1. P. 61-70.
591. Segal M. Dendritic spines and long-term plasticity // *Nat Rev Neurosci*. 2005. V. 6. № 4. P. 277-84.
592. Segal M., Landis S. Afferents to the hippocampus of the rat studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase // *Brain Res*. 1974. V. 78. № 1. P. 1-15.
593. Segev I., Rall W. Computational study of an excitable dendritic spine // *J Neurophysiol*. 1988. V. 60. № 2. P. 499-523.
594. Sejnowski T.J., Tesauro G. The Hebb rule for synaptic plasticity: Algorithms and implementations. In: *Neural models of plasticity*. Edited by J.H. Byrne, W.O. Berry. N.Y.: Academic Press, 1989. P. 94-103.
595. Setou M., Nakagawa T., et al. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport // *Science*. 2000. V. 288. № 5472. P. 1796-802.
596. Setou M., Seog D.H., et al. Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites // *Nature*. 2002. V. 417. № 6884. P. 83-7.
597. Shapiro L., Colman D.R. Structural biology of cadherins in the nervous system // *Curr Opin Neurobiol*. 1998. V. 8. № 5. P. 593-9.
598. Shen K., Teruel M.N., et al. CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines // *Neuron*. 1998. V. 21. № 3. P. 593-606.
599. Shen K., Teruel M.N., et al. Molecular memory by reversible translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II // *Nat Neurosci*. 2000. V. 3. № 9. P. 881-6.
600. Sheng M. Molecular organization of the postsynaptic specialization // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. V. 98. № 13. P. 7058-61.
601. Sheng M., Kim E. The Shank family of scaffold proteins // *J Cell Sci*. 2000. V. 113 (Pt 11). №. P. 1851-6.
602. Sheng M., Kim M.J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms // *Science*. 2002. V. 298. № 5594. P. 776-80.
603. Sheng M., Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes // *Annu Rev Neurosci*. 2001. V. 24. №. P. 1-29.
604. Shepherd G.M., Brayton R.K., et al. Signal enhancement in distal cortical dendrites by means of interactions between active dendritic spines // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985. V. 82. № 7. P. 2192-5.

605. Sherrington C.S. The central nervous system. In: A Text-Book of Physiology, 7th ed. V.3 Edited by F. M. Macmillan. London. 1897.
606. Shi S.H., Hayashi Y., et al. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation // *Science*. 1999. V. 284. № 5421. P. 1811-6.
607. Shi S., Hayashi Y., et al. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons // *Cell*. 2001. V. 105. № 3. P. 331-43.
608. Shirao T., Sekino Y. Clustering and anchoring mechanisms of molecular constituents of postsynaptic scaffolds in dendritic spines // *Neurosci Res*. 2001. V. 40. № 1. P. 1-7.
609. Shoop R.D., Esquenazi E., et al. Ultrastructure of a somatic spine mat for nicotinic signaling in neurons // *J Neurosci*. 2002. V. 22. № 3. P. 748-56.
610. Shouval H.Z. Clusters of interacting receptors can stabilize synaptic efficacies // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. V. 102. № 40. P. 14440-5.
611. Sierralta J., Mendoza C. PDZ-containing proteins: alternative splicing as a source of functional diversity // *Brain Res Brain Res Rev*. 2004. V. 47. № 1-3. P. 105-15.
612. Skutella T., Nitsch R. New molecules for hippocampal development // *Trends Neurosci*. 2001. V. 24. № 2. P. 107-13.
613. Smart F.M., Edelman G.M., Vanderklish P.W. BDNF induces translocation of initiation factor 4E to mRNA granules: evidence for a role of synaptic microfilaments and integrins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. V. 100. № 24. P. 14403-8.
614. Smith W.B., Aakalu G., Schuman E.M. Local protein synthesis in neurons // *Curr Biol*. 2001. V. 11. № 22. P. R901-3.
615. Sobczyk A., Scheuss V., Svoboda K. NMDA receptor subunit-dependent $[Ca^{2+}]$ signaling in individual hippocampal dendritic spines // *J Neurosci*. 2005. V. 25. № 26. P. 6037-46.
616. Soderling T.R. CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity // *Curr Opin Neurobiol*. 2000. V. 10. № 3. P. 375-80.
617. Soderling T.R., Chang B., Brickey D. Cellular signaling through multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II // *J Biol Chem*. 2001. V. 276. № 6. P. 3719-22.
618. Somogyi P., Tamas G., et al. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex // *Brain Res Brain Res Rev*. 1998(a). V. 26. № 2-3. P. 113-35.
619. Somogyi P. Precision and variability in the placement of pre- and postsynaptic receptors in relation to transmitter release sites. In: Central synapses: Quantal mechanisms and plasticity. Edited by D.S. Faber, H. Korn, S.J. Redman, S.M. Thompson and J.S. Altman. Human Frontier Science Program, Strasbourg, 1998(b). P. 82-95.
620. Sorra K.E., Harris K.M. Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1 // *J Neurosci*. 1993. V. 13. № 9. P. 3736-48.
621. 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.
622. Sorra K.E., Fiala J.C., Harris K.M. Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation // *J Comp Neurol*. 1998. V. 398. № 2. P. 225-40.
623. Sorra K.E., Harris K.M. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines // *Hippocampus*. 2000. V. 10. № 5. P. 501-11.

624. Sotelo C. Viewing the brain through the master hand of Ramon y Cajal // *Nat Rev Neurosci.* 2003. V. 4. № 1. P. 71-7.
625. Spacek J. Relationships between synaptic junctions, puncta adhaerentia and the spine apparatus at neocortical axo-spinous synapses. A serial section study // *Anat Embryol (Berl).* 1985(a). V. 173. № 1. P. 129-35.
626. Spacek J. Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components // *Anat Embryol (Berl).* 1985(b). V. 171. № 2. P. 235-43.
627. Spacek J. Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheath // *Anat Embryol (Berl).* 1985(c). V. 171. № 2. P. 245-52.
628. Spacek J., Harris K.M. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat // *J Neurosci.* 1997. V. 17. № 1. P. 190-203.
629. Spacek J., Harris K.M. Three-dimensional organization of cell adhesion junctions at synapses and dendritic spines in area CA1 of the rat hippocampus // *J Comp Neurol.* 1998. V. 393. № 1. P. 58-68.
630. Spacek J., Harris K.M. Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus // *J Neurosci.* 2004. V. 24. № 17. P. 4233-41.
631. Spacek J., Hartmann M. Three-dimensional analysis of dendritic spines. I. Quantitative observations related to dendritic spine and synaptic morphology in cerebral and cerebellar cortices // *Anat Embryol (Berl).* 1983. V. 167. № 2. P. 289-310.
632. Spacek J., Lieberman A.R. Relationships between mitochondrial outer membranes and agranular reticulum in nervous tissue: ultrastructural observations and a new interpretation // *J Cell Sci.* 1980. V. 46. № 1. P. 129-47.
633. Squire L.R., Knowlton B., Musen G. The structure and organization of memory // *Annu Rev Psychol.* 1993. V. 44. № 1. P. 453-95.
634. Squire L.R., Stark C.E., Clark R.E. The medial temporal lobe // *Annu Rev Neurosci.* 2004. V. 27. № 1. P. 279-306.
635. Star E.N., Kwiatkowski D.J., Murthy V.N. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity // *Nat Neurosci.* 2002. V. 5. № 3. P. 239-46.
636. Staubli U., Lynch G. Stable hippocampal long-term potentiation elicited by 'theta' pattern stimulation // *Brain Res.* 1987. V. 435. № 1-2. P. 227-34.
637. Stensaas L.J. The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. I. Fifteen millimeter stage, spongioblast morphology // *J. Comp Neurol.* 1967(a). V. 129. № 1. P. 59-70.
638. Stensaas L.J. The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. II. Twenty millimeter stage, neuroblast morphology // *J. Comp Neurol.* 1967(b). V. 129. № 1. P. 71-84.
639. Stensaas L.J. The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. III. Twenty-nine millimeter stage, marginal lamina // *J Comp Neurol.* 1967(c). V. 130. № 2. P. 149-62.
640. Stensaas L.J. The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. IV. Forty-one millimeter stage, intermediate lamina // *J Comp Neurol.* 1967(d). V. 131. № 4. P. 409-22.
641. Stensaas L.J. The development of hippocampal and dorsolateral pallial region of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. V. Sixty millimeter stage, glial cell morphology // *J*

- Comp Neurol. 1967(e). V. 131. № 4. P. 423-36.
642. Stensaas L.J. The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. VI. Ninety millimeter stage, cortical differentiation // J. Comp Neurol. 1968. V. 132. № 1. P. 93-108.
643. Stepanyants A., Hof P.R., Chklovskii D.B. Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity. Neuron. 2002. V. 34. № 2. P. 275-88.
644. Sterio D.C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector // J Microsc. 1984. V. 134. № Pt 2. P. 127-36.
645. Steward O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat // J Comp Neurol. 1976. V. 167. № 3. P. 285-314.
646. Steward O. Alterations in polyribosomes associated with dendritic spines during the reinnervation of the dentate gyrus of the adult rat // J Neurosci. 1983. V. 3. № 1. P. 177-88.
647. Steward O. mRNA at synapses, synaptic plasticity, and memory consolidation // Neuron. 2002. V. 36. № 3. P. 338-40.
648. Steward O., Falk P.M. Protein-synthetic machinery at postsynaptic sites during synaptogenesis: a quantitative study of the association between polyribosomes and developing synapses // J Neurosci. 1986. V. 6. № 2. P. 412-23.
649. Steward O., Falk P.M., Torre E.R. Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes // J Neurocytol. 1996. V. 25. № 12. P. 717-34.
650. Steward O., Levy W.B. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus // J Neurosci. 1982. V. 2. № 3. P. 284-91.
651. Steward O., Reeves T.M. Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site // J Neurosci. 1988. V. 8. № 1. P. 176-84.
652. Steward O., Schuman E.M. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites // Annu Rev Neurosci. 2001. V. 24. № P. 299-325.
653. Steward O., Schuman E.M. Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons // Neuron. 2003. V. 40. № 2. P. 347-59.
654. Steward O., Scoville S.A. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat // J Comp Neurol. 1976. V. 169. № 3. P. 347-70.
655. 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.
656. Steward O., Wallace C.S., et al. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites // Neuron. 1998. V. 21. № 4. P. 741-51.
657. Steward O., Worley P.F. A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites // Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. V. 98. № 13. P. 7062-8.
658. Stewart M.G., Davies H.A., et al. 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. P. 43-54.
659. Stewart M.G., Harrison E., et al. Re-structuring of synapses 24 hours after induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus in vivo // Neuroscience.

2000. V. 100. № 2. P. 221-7.
660. Stewart M.G., Medvedev N.I., et al. Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices // *Eur J Neurosci*. 2005. V. 21. № 12. P. 3368-78.
661. Strack S., Colbran R.J. Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor // *J Biol Chem*. 1998. V. 273. № 33. P. 20689-92.
662. Stuart G., Spruston N., et al. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS // *Trends Neurosci*. 1997. V. 20. № 3. P. 125-31.
663. Sun T., Walsh C.A. Molecular approaches to brain asymmetry and handedness // *Nat Rev Neurosci*. 2006. V. 7. № 8. P. 655-62.
664. 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.
665. Sutton M.A., Wall N.R., et al. Regulation of dendritic protein synthesis by miniature synaptic events // *Science*. 2004. V. 304. № 5679. P. 1979-83.
666. Sutton M.A., Ito H.T., et al. Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis // *Cell*. 2006. V. 125. № 4. P. 785-99.
667. Sutton M.A., Schuman E.M. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory // *Cell*. 2006. V. 127. № 1. P. 49-58.
668. Svoboda K. Do spines and dendrites distribute dye evenly? // *Trends Neurosci*. 2004. V. 27. № 8. P. 445-6.
669. Svoboda K., Tank D.W., Denk W. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts // *Science*. 1996. V. 272. № 5262. P. 716-9.
670. Sytnyk V., Leshchyn'ska I., et al. Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts // *J Cell Biol*. 2002. V. 159. № 4. P. 649-61.
671. Takai Y., Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions // *J Cell Sci*. 2003. V. 116. № Pt 1. P. 17-27.
672. Takumi Y., Ramirez-Leon V., et al. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses // *Nat Neurosci*. 1999. V. 2. № 7. P. 618-24.
673. Tamamaki N., Nakamura K., et al. Neurons in Golgi-stain-like images revealed by GFP-adenovirus infection in vivo // *Neurosci Res*. 2000. V. 38. № 3. P. 231-6.
674. Tanaka C., Nishizuka Y. The protein kinase C family for neuronal signaling // *Annu Rev Neurosci*. 1994. V. 17. № . P. 551-67.
675. Tanaka J., Matsuzaki M., et al. Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum // *J Neurosci*. 2005. V. 25. № 4. P. 799-807.
676. Tandrup T., Gundersen H.J., Jensen E.B. The optical rotator // *J Microsc*. 1997. V. 186. № Pt 2. P. 108-20.
677. Tang A.C. A Hippocampal Theory of Cerebral Lateralization. In: *The Asymmetrical Brain*. Edited By K. Hugdahl and R.J. Davidson. A Bradford Book. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts. London, England. 2002. P. 38-68.
678. Tarrant S.B., Routtenberg A. The synaptic spinule in the dendritic spine: electron microscopic study of the hippocampal dentate gyrus // *Tissue Cell*. 1977. V. 9. № 3. P.

- 461-73.
679. 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.
 680. Teffer K., Schenker N., Semendeferi K.(a) A comparative volumetric analysis of the human and ape hippocampus. Society for Neuroscience Abstracts. 30. October 23-27. 2004. San Diego, CA, USA.
 681. Teffer K., Schenker N., Semendeferi K.(b) A comparative volumetric analysis of the cornu ammonis, dentate gyrus, and subiculum of the hippocampus in the hominoids. Society for Neuroscience Abstracts. 30. October 23-27. 2004. San Diego, CA, USA.
 682. Thomas G.M., Huganir R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity // Nat Rev Neurosci. 2004. V. 5. № 3. P. 173-83.
 683. Thompson S.M., Mattison H.A., Nestor M.W. Morphological correlates of long-term potentiation and depression // Cellscience Reviews. 2005. V. 2. № 2. Электронная публикация, www.cellscience.com.
 684. Tiedge H., Brosius J. Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture // J Neurosci. 1996. V. 16. № 22. P. 7171-81.
 685. Tiruchinapalli D.M., Oleynikov Y., et al. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons // J Neurosci. 2003. V. 23. № 8. P. 3251-61.
 686. Toga A.W., Thompson P.M. Mapping brain asymmetry // Nat Rev Neurosci. 2003. V. 4. № 1. P. 37-48.
 687. Tomita S., Adesnik H., et al. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains // Nature. 2005. V. 435. № 7045. P. 1052-8.
 688. Tomita S., Brecht D.S., Nicoll R.A. CaMKII substrates in synaptic plasticity // Cellscience reviews. 2005. V.2. №1. Электронн. публикация, www.cellscience.com
 689. Tomita S., Chen L., et al. Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins // J Cell Biol. 2003. V. 161. № 4. P. 805-16.
 690. Tomita S., Nicoll R.A., Brecht D.S. PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity // J Cell Biol. 2001. V. 153. № 5. P. F19-24.
 691. Toni N., Buchs P.A., et al. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite // Nature. 1999. V. 402. № 6760. P. 421-5.
 692. Toni N., Buchs P.A., et al. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation // J Neurosci. 2001. V. 21. № 16. P. 6245-51.
 693. Torre E.R., Steward O. Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies // J Neurosci. 1992. V. 12. № 3. P. 762-72.
 694. Torre E.R., Steward O. Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture // J Neurosci. 1996. V. 16. № 19. P. 5967-78.
 695. Trachtenberg J.T., Chen B.E., et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex // Nature. 2002. V. 420. № 6917. P. 788-94.
 696. Triller A., Choquet D. Synaptic structure and diffusion dynamics of synaptic receptors // Biol Cell. 2003. V. 95. № 7. P. 465-76.
 697. Triller A., Choquet D. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic

- membranes: and yet they do move! // *Trends Neurosci.* 2005. V. 28. № 3. P. 133-9.
698. Triller A., Korn H. Activity-dependent deformations of presynaptic grids at central synapses // *J Neurocytol.* 1985. V. 14. № 2. P. 177-92.
 699. 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.
 700. Trommald M., Hulleberg G. Dimensions and density of dendritic spines from rat dentate granule cells based on reconstructions from serial electron micrographs // *J Comp Neurol.* 1997. V. 377. № 1. P. 15-28.
 701. Tsay D., Yuste R. On the electrical function of dendritic spines // *Trends Neurosci.* 2004. V. 27. № 2. P. 77-83.
 702. Tsokas P., Grace E.A., et al. Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation // *J Neurosci.* 2005. V. 25. № 24. P. 5833-43.
 703. Tu J.C., Xiao B., et al. Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors // *Neuron.* 1998. V. 21. № 4. P. 717-26.
 704. Turner D.A., Buhl E.H., et al. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection // *Prog Neurobiol.* 1998. V. 55. № 6. P. 537-62.
 705. Turrigiano G. A competitive game of synaptic tag // *Neuron.* 2004. V. 44. № 6. P. 903-4.
 706. Ungar F., Piscopo I., Holtzman E. Calcium accumulation in intracellular compartments of frog retinal rod photoreceptors // *Brain Res.* 1981. V. 205. № 1. P. 200-6.
 707. Utsunomiya H., Takano K., et al. Development of the temporal lobe in infants and children: analysis by MR-based volumetry // *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999. V. 20. № 4. P. 717-23.
 708. Vale R.D. The molecular motor toolbox for intracellular transport // *Cell.* 2003. V. 112. № 4. P. 467-80.
 709. Vallortigara G. Visual Cognition and Representation in Birds and Primates. In: *Comparative Vertebrate Cognition*. Edited by L.J. Rogers and G. Kaplan. Kluwer Academic, Plenum Publishers. 2004. P. 57-94.
 710. Vallortigara G., Rogers L.J., Bisazza A. Possible evolutionary origins of cognitive brain lateralization // *Brain Res Brain Res Rev.* 1999. V. 30. № 2. P. 164-75.
 711. Vallortigara G., Rogers L.J. Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization // *Behav Brain Sci.* 2005. V. 28. № 4. P. 575-89; discussion 89-633.
 712. Valtschanoff J.G., Weinberg R.J. Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density // *J Neurosci.* 2001. V. 21. № 4. P. 1211-7.
 713. Van Groen T., Wyss J.M. Species differences in hippocampal commissural connections: studies in rat, guinea pig, rabbit, and cat // *J Comp Neurol.* 1988. V. 267. № 3. P. 322-34.
 714. Van Harrevelde A., Fifkova E. Swelling of dendritic spines in the fascia dentata after stimulation of the perforant fibers as a mechanism of post-tetanic potentiation // *Exp Neurol.* 1975. V. 49. № 3. P. 736-49.
 715. Van Hoesen G.W., Pandya D.N. Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. III. Efferent connections // *Brain Res.* 1975. V. 95. № 1. P. 39-59.

716. van Zundert B., Yoshii A., Constantine-Paton M. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal // *Trends Neurosci.* 2004. V. 27. № 7. P. 428-37.
717. Vandenberghe W., Nicoll R.A., Brecht D.S. Stargazin is an AMPA receptor auxiliary subunit // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. V. 102. № 2. P. 485-90.
718. Ventura R., Harris K.M. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes // *J Neurosci.* 1999. V. 19. № 16. P. 6897-906.
719. Vercelli A., Repici M., et al. Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals // *Brain Res Bull.* 2000. V. 51. № 1. P. 11-28.
720. Verhey K.J., Meyer D., et al. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules // *J Cell Biol.* 2001. V. 152. № 5. P. 959-70.
721. Verkhratsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons // *Physiol Rev.* 2005. V. 85. № 1. P. 201-79.
722. Villa A., Podini P., et al. Intracellular Ca²⁺ stores in chicken Purkinje neurons: differential distribution of the low affinity-high capacity Ca²⁺ binding protein, calsequestrin, of Ca²⁺-ATPase and of the ER luminal protein, Bip // *J Cell Biol.* 1991. V. 113. № 4. P. 779-91.
723. Vinogradova O.S. Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information // *Hippocampus.* 2001. V. 11. № 5. P. 578-98.
724. Volfovsky N., Parnas H., et al. Geometry of dendritic spines affects calcium dynamics in hippocampal neurons: theory and experiments // *J Neurophysiol.* 1999. V. 82. № 1. P. 450-62.
725. Volpicelli L.A., Lah J.J., et al. Rab11a and myosin Vb regulate recycling of the M4 muscarinic acetylcholine receptor // *J Neurosci.* 2002. V. 22. № 22. P. 9776-84.
726. Volterra A., Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues // *Nat Rev Neurosci.* 2005. V. 6. № 8. P. 626-40.
727. von Bartheld C.S. Comparison of 2-D and 3-D counting: the need for calibration and common sense // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. № 9. P. 504-6.
728. Voronin L.L., Cherubini E. 'Deaf, mute and whispering' silent synapses: their role in synaptic plasticity // *J Physiol.* 2004. V. 557. № Pt 1. P. 3-12.
729. Wagner W., Hammer J.A., 3rd. Myosin V and the endoplasmic reticulum: the connection grows // *J Cell Biol.* 2003. V. 163. № 6. P. 1193-6.
730. Waites C.L., Craig A.M., Garner C.C. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis // *Annu Rev Neurosci.* 2005. V. 28. №. P. 251-74.
731. Walikonis R.S., Jensen O.N., et al. Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry // *J Neurosci.* 2000. V. 20. № 11. P. 4069-80.
732. Walikonis R.S., Oguni A., et al. Densin-180 forms a ternary complex with the (alpha)-subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and (alpha)-actinin // *J Neurosci.* 2001. V. 21. № 2. P. 423-33.
733. Wallace C.S., Lyford G.L., et al. Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence // *J Neurosci.* 1998. V. 18. № 1. P. 26-35.
734. Wallenstein G.V., Eichenbaum H., Hasselmo M.E. The hippocampus as an associator of discontinuous events // *Trends Neurosci.* 1998. V. 21. № 8. P. 317-23.
735. Walton P.D., Airey J.A., et al. Ryanodine and inositol trisphosphate receptors coexist in

- avian cerebellar Purkinje neurons // *J Cell Biol.* 1991. V. 113. № 5. P. 1145-57.
736. Wang S.S., Denk W., Hausser M. Coincidence detection in single dendritic spines mediated by calcium release // *Nat Neurosci.* 2000(a). V. 3. № 12. P. 1266-73.
 737. Wang S.S., Khiroug L., Augustine G.J. Quantification of spread of cerebellar long-term depression with chemical two-photon uncaging of glutamate // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000(b). V. 97. № 15. P. 8635-40.
 738. Wang Z., Song D., Berger T.W. Contribution of NMDA receptor channels to the expression of LTP in the hippocampal dentate gyrus // *Hippocampus.* 2002. V. 12. № 5. P. 680-8.
 739. Wang H., Storm D.R. Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system // *Mol Pharmacol.* 2003. V. 63. № 3. P. 463-8.
 740. Washbourne P., Liu X.B., et al. Cycling of NMDA receptors during trafficking in neurons before synapse formation // *J Neurosci.* 2004. V. 24. № 38. P. 8253-64.
 741. Weeks A.C., Ivanko T.L., et al. The degree of potentiation is associated with synaptic number during the maintenance of long-term potentiation in the rat dentate gyrus // *Brain Res.* 1998. V. 798. № 1-2. P. 211-6.
 742. Weeks A.C., Ivanko T.L., et al. Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: I. The intermediate maintenance phase // *Synapse.* 1999. V. 31. № 2. P. 97-107.
 743. Weisskopf M.G., Bauer E.P., LeDoux J.E. L-type voltage-gated calcium channels mediate NMDA-independent associative long-term potentiation at thalamic input synapses to the amygdala // *J Neurosci.* 1999. V. 19. № 23. P. 10512-9.
 744. Wells D.G., Richter J.D., Fallon J.R. Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in the synapto-dendritic compartment // *Curr Opin Neurobiol.* 2000. V. 10. № 1. P. 132-7.
 745. Wells D.G., Dong X., et al. A role for the cytoplasmic polyadenylation element in NMDA receptor-regulated mRNA translation in neurons // *J Neurosci.* 2001. V. 21. № 24. P. 9541-8.
 746. Wenthold R.J., Petralia R.S., et al. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons // *J Neurosci.* 1996. V. 16. № 6. P. 1982-9.
 747. Wesa J.M., Chang F.L., et al. Synaptic contact curvature: effects of differential rearing on rat occipital cortex // *Brain Res.* 1982. V. 256. № 2. P. 253-7.
 748. West M.J. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias // *Trends Neurosci.* 1999. V. 22. № 2. P. 51-61.
 749. West M.J., Coleman P.D., Flood D.G. Estimating the number of granule cells in the dentate gyrus with the disector // *Brain Res.* 1988. V. 448. № 1. P. 167-72.
 750. Westrum L.E., Blackstad T.W. An electron microscopic study of the stratum radiatum of the rat hippocampus (regio superior, CA 1) with particular emphasis on synaptology // *J Comp Neurol.* 1962. V. 119. №. P. 281-309.
 751. Westrum L.E., Jones D.H., et al. Microtubules, dendritic spines and spine apparatuses // *Cell Tissue Res.* 1980. V. 208. № 2. P. 171-81.
 752. Wickens J. Electrically coupled but chemically isolated synapses: dendritic spines and calcium in a rule for synaptic modification // *Prog Neurobiol.* 1988. V. 31. № 6. P. 507-28.
 753. Williams R.W., Rakic P. Three-dimensional counting: An accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material // *J Comp Neurol.* 1988. V. 278. P. 344-

- 352.
754. Wilson C.J. Passive cable properties of dendritic spines and spiny neurons // *J Neurosci.* 1984. V. 4. № 1. P. 281-97.
 755. Wilson C.J., Groves P.M., et al. Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum // *J Neurosci.* 1983. V. 3. № 2. P. 383-8.
 756. Witter M.P., Groenewegen H.J. Laminar origin and septotemporal distribution of entorhinal and perirhinal projections to the hippocampus in the cat // *J Comp Neurol.* 1984. V. 224. № 3. P. 371-85.
 757. Witter M.P., Groenewegen H.J., et al. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region // *Prog Neurobiol.* 1989. V. 33. № 3. P. 161-253.
 758. Wong W., Scott J.D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004. V. 5. № 12. P. 959-70.
 759. Woolley C.S., Gould E., et al. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons // *J Neurosci.* 1990. V. 10. № 12. P. 4035-9.
 760. Woolley C.S., Weiland N.G., et al. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density // *J Neurosci.* 1997. V. 17. № 5. P. 1848-59.
 761. Wu Y., Kawakami R., et al. Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in schaffer collateral synapses in epsilon1/NR2A knock-out mice // *J Neurosci.* 2005. V. 25. № 40. P. 9213-26.
 762. Wyss J.M. An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat // *J Comp Neurol.* 1981. V. 199. № 4. P. 495-512.
 763. Wyss J.M., Swanson L.W., Cowan W.M. A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat // *Neuroscience.* 1979. V. 4. № 4. P. 463-76.
 764. Xia Z., Storm D.R. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity // *Nat Rev Neurosci.* 2005. V. 6. № 4. P. 267-76.
 765. Xiao B., Tu J.C., Worley P.F. Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function // *Curr Opin Neurobiol.* 2000. V. 10. № 3. P. 370-4.
 766. Yamagata M., Weiner J.A., Sanes J.R. Sidekicks: synaptic adhesion molecules that promote lamina-specific connectivity in the retina // *Cell.* 2002. V. 110. № 5. P. 649-60.
 767. Yamaguchi Y., Pasquale E.B. Eph receptors in the adult brain // *Curr Opin Neurobiol.* 2004. V. 14. № 3. P. 288-96.
 768. Yamamoto C., McIlwain H. Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro // *J Neurochem.* 1966. V. 13. № 12. P. 1333-43.
 769. You T., Niwa O., et al. An amperometric detector formed of highly dispersed Ni nanoparticles embedded in a graphite-like carbon film electrode for sugar determination // *Anal Chem.* 2003. V. 75. № 19. P. 5191-6.
 770. Yuen E.Y., Jiang Q., et al. Microtubule regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in neurons // *J Biol Chem.* 2005. V. 280. № 33. P. 29420-7.
 771. Yuste R., Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity // *Annu Rev Neurosci.* 2001. V. 24. №. P. 1071-89.
 772. Yuste R., Bonhoeffer T. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies // *Nat Rev Neurosci.* 2004. V. 5. № 1. P. 24-34.
 773. Yuste R., Denk W. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration //

- Nature. 1995. V. 375. № 6533. P. 682-4.
774. Yuste R., Majewska A., Holthoff K. From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines // *Nat Neurosci*. 2000. V. 3. № 7. P. 653-9.
 775. Yuzaki M. New insights into the structure and function of glutamate receptors: the orphan receptor delta2 reveals its family's secrets // *Keio J Med*. 2003(a). V. 52. № 2. P. 92-9.
 776. Yuzaki M. The delta2 glutamate receptor: 10 years later // *Neurosci Res*. 2003(b). V. 46. № 1. P. 11-22.
 777. Zador A., Koch C., Brown T.H. Biophysical model of a Hebbian synapse // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. V. 87. № 17. P. 6718-22.
 778. Zamponi G.W., Snutch T.P. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins // *Curr Opin Neurobiol*. 1998. V. 8. № 3. P. 351-6.
 779. Zhang W., Benson D.L. Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses // *Hippocampus*. 2000. V. 10. № 5. P. 512-26.
 780. Zhang J., Campbell R.E., et al. Creating new fluorescent probes for cell biology // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. V. 3. № 12. P. 906-18.
 781. Zhang M., Wang W. Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins // *Acc Chem Res*. 2003. V. 36. № 7. P. 530-8.
 782. Zhang J.M., Wang H.K., et al. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*. 2003. V. 40. № 5. P. 971-82.
 783. Zhang Q., Pangrsic T., et al. Fusion-related release of glutamate from astrocytes // *J Biol Chem*. 2004. V. 279. № 13. P. 12724-33.
 784. Zhou Q., Homma K.J., Poo M.M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses // *Neuron*. 2004. V. 44. № 5. P. 749-57.
 785. Ziff E.B. Enlightening the postsynaptic density // *Neuron*. 1997. V. 19. № 6. P. 1163-74.
 786. Zito K., Knott G., et al. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton // *Neuron*. 2004. V. 44. № 2. P. 321-34.
 787. Ziv N.E., Garner C.C. Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees // *Curr Opin Neurobiol*. 2001. V. 11. № 5. P. 536-43.
 788. Ziv N.E., Garner C.C. Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly // *Nat Rev Neurosci*. 2004. V. 5. № 5. P. 385-99.
 789. Ziv N.E., Smith S.J. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation // *Neuron*. 1996. V. 17. № 1. P. 91-102.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я выражаю благодарность своему руководителю Виктору Ивановичу Попову за определение приоритетов в моей научной деятельности, за многолетнее руководство и совместную плодотворную научную работу.

Я выражаю благодарность моим оппонентам, профессорам Зинченко Валерию Петровичу и Годухину Олегу Викторовичу за пристальное внимание к деталям моей работы и конструктивную критику.

Я выражаю благодарность сотрудникам лаборатории механизмов рецепции нашего института и сотрудникам кабинета электронной микроскопии за обеспечение базы для проведения научно-исследовательской работы, и в частности руководителю кабинета электронной микроскопии Хуцяну Сергею Суреновичу, а также коллегам биологического отдела Открытого университета Великобритании профессору Майклу Стьюарту и Хезе Девис.

Я благодарю Дмитрия Александровича Игнатьева за ценные советы по работе с животными при исследованиях гибернации и искусственной гипотермии, а так же за ценные рекомендации по стилистике изложения материала.

Я благодарю Риту Яковлевну Гордон за превращение огромного объема наработанного экспериментального материала в публикации.

Все результаты диссертации получены при помощи компьютера, поэтому я очень признателен Катаеву Анатолию Ахсарбековичу за первую науку о том, как заставить компьютер работать на нас.

Я также благодарю Орлова Александра Ивановича за прекрасно организованный интернет портал «Высокие статистические технологии» и редактора интернет журнала «Биометрика» Леонова Василия Петровича за ценные советы о том, как следует обрабатывать данные, чтобы работа не попала в «кунсткамеру» журнала. Я также признателен Роберту Валентиновичу Полозову за оказанное внимание к моей работе, за поддержку в обсуждении применимости математических методов.

Я также признателен множеству преподавателей зарубежных университетов за безвозмездное обеспечение меня литературой, как первоисточниками, так и последними публикациями по самым актуальным вопросам нейробиологии.

Я выражаю глубочайшую признательность Бочаровой Ларисе Сергеевне за совместное плодотворное обсуждение этой обширной литературы, но в большей степени за искреннее участие и бесценные методические указания и наставления.

И конечно я благодарю моих близких, без которых эта работа бы не состоялась, моих родителей, прививших мне трудолюбие, чувство ответственности и необходимость иметь глубокие знания, а за величайшие любовь и терпение – мою прекрасную Надежду.

