

На правах рукописи

Запара Татьяна Александровна

**Пластические реакции нейронов *in vitro*.  
Структурно-функциональные взаимодействия молекулярных  
комплексов в процессе формирования адаптивных реакций**

03.00.13-физиология

**А в т о р е ф е р а т**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Томск 2005

Работа выполнена в ГУ “Конструкторско-технологическом институте вычислительной техники” СО РАН

Научный консультант:

Академик РАН, доктор биологических наук,  
профессор **Маркс Борисович Штарк**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

**Гриднева Вера Ивановна**

доктор биологических наук, профессор

**Петрова Ирина Викторовна**

доктор биологических наук, профессор

**Гайнутдинов Халил Латыпович**

Ведущая организация – **Новосибирский государственный университет.**

Защита состоится "....".....2005г. в.... часов

на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном  
медицинском университете

по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Сибирского государственного  
медицинского университета (г. Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан "....".....2005 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Г.А. Суханова

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность проблемы.** Одной из актуальных проблем современной нейробиологии являются исследования структурно-функциональной организации пластичности нейрональных реакций на молекулярно-клеточном уровне. Сложные функции нервной системы обеспечиваются способностью нейронов к пластическим изменениям реактивности. Эта способность проявляется под действием последовательных раздражений и выражается в изменении реакции на воздействия. Выявлены общие закономерности организации базисных механизмов приспособительных реакций нервных клеток мозга, вызванных адекватными и экстремальными воздействиями [Самойлов, 1999]. В работах, направленных на исследование молекулярных механизмов пластических реакций основное внимание, как правило, уделяется обнаружению конкретных молекул, которые осуществляют метаболическое обеспечение этих реакций [Гринкевич и др., 1996; Максимова, Балабан, 1983; Никитин, Козырев, 2002; Никитин, Козырев, Шевелкин, 2002; Степанов и др., 1987; Balaban, Korshunova, Bravarenko, 2004; Zakharov et al. 1998]. Хотя в некоторых случаях идентифицированы участники метаболического обеспечения передачи сигнала, остаются недостаточно исследованными процессы, обеспечивающие доставку необходимых молекул от мест синтеза к компартментам использования, физическое взаимодействие между ними и образование надмолекулярных комплексов, которые позволяют клетке быстро, оптимально и адекватно реагировать на внешние воздействия.

В первоначальной концепции передачи сигналов [Orly, Schramm, 1976] предполагалось, что все главные компоненты рецепции воздействий и генерации ионных токов и/или метаболического ответа нейронов – рецепторы, G протеины, протеинкиназы, протеазы, ионные каналы – могут быть свободно распределены в клетке. Процессы передачи информации в клетке происходят во время случайных столкновений и взаимодействий отдельных партнеров процесса. Однако, очень большое количество рецепторов различных медиаторов, гормонов и сенсорных стимулов взаимодействуют с системами вторичных посредников – кальциевой, фосфоинозитидной, циклических нуклеотидов. Тем не менее, несмотря на явную диспропорцию типов рецепторов плазматической мембраны и систем вторичных посредников, нейроны способны отличить один стимул от другого в пределах миллисекунд. Благодаря исследованиям последних лет, в основном синаптической пластичности, происходит формирование новой концепции передачи сигналов. Она заключается в том, что специфика восприятия внешних воздействий и пластических изменений ответов клетки определена структурой организации и механизмами реорганизации взаимодействий между молекулами участниками этих процессов, цитоскелетом и моторными протеинами. Обнаружены белки, благодаря которым происходит сборка функциональных комплексов. Аминокислотная последовательность и третичная структура этих протеинов и домены белок-белкового распознавания (последовательности аминокислот) рецепторных,

сигнальных, цитоскелетных и эффекторных протеинов позволяют осуществлять физическое взаимодействие и позиционирование молекул партнеров определенного процесса в надмолекулярные комплексы, получившие название микродомены [Tsunoda et al., 1997]. В некоторых случаях образование связей между протеинами-партнерами могут происходить на ранних стадиях биосинтеза еще в эндоплазматической сети и cis-Golgi сети [Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1996; Passafaro et al., 2001]. Микродомены подвергаются транспортировке с помощью специфических моторных протеинов, которые используют тубулиновый цитоскелет как направляющие для перемещения микродоменов от компартментов синтеза к местам их встраивания в плазматическую мембрану. По актиновым филаментам моторные протеины могут экспрессировать синаптические везикулы и рецепторные микродомены в плазматическую мембрану, а также осуществлять рециркуляцию микродоменов (регулируемую активностью нейронов) между этой мембраной и внутриклеточными компартментами клетки. Благодаря исследованиям последних лет становятся доминирующими представления, что пластичность нейрональных реакций на клеточно-молекулярном уровне наряду с другими событиями обеспечивается процессами экспрессии и субклеточного динамического позиционирования функциональных микродоменов. Эти процессы инициируются внешними воздействиями и активностью нейронов (генерацией ионных токов, метаболическими реакциями), а контролируются и осуществляются структурой взаимодействий (прямых или опосредованных) с цитоскелетом. Структурные изменения, обеспечивающие пластические реакции, могут затрагивать количество молекул, которые не всегда обнаруживаются методами конфокальной микроскопии [Kim, Lisman, 1999]. Однако лиганды, модулирующие динамические перестройки цитоскелета, могут оказывать влияние на формирование пластических реакций, что позволяет исследовать механизмы организации микроструктурных перестроек в процессе формирования и сохранения нейрональной пластичности электрофизиологическими методами.

Исследования условий и механизмов формирования приспособительных реакций и роли цитоскелета в организации нейрональной пластичности могут привести к более глубокому пониманию процессов обработки информации на клеточном и субклеточном уровнях. Конкретные сведения о структурно-функциональных связях микродоменов несинаптической мембраны с цитоскелетом и временной и микроструктурной организации нейрональной пластичности ограничены. Этому направлению исследований и посвящена представленная работа.

***Цель и основные задачи исследования.*** Цель настоящего исследования состояла в изучении закономерностей формирования пластических реакций нейронов и роль цитоскелета в организации локальных пластических изменений плазматической мембраны клетки.

***Основные задачи исследования:***

1. Найти приемы и создать экспериментальные условия, которые позволяют формировать кратковременные и долговременные пластические изменения ответов изолированной сомы нейронов.

2. Экспериментально проверить предположения, что соматическая мембрана нейрона может реагировать на воздействия как функционально гетерогенная структура.
3. Экспериментально проверить предположение, что на клеточном уровне новые приспособительные реакции развиваются в ответ на экстремальные воздействия на фоне мобилизации эволюционно сформированных клеточных механизмов адаптации.
4. Исследовать влияние экспериментальной модификации реорганизации актинового и тубулинового цитоскелета на динамику формирования и сохранения пластических нейрональных реакций.

#### ***Научная новизна***

1. Впервые описаны условия, позволяющие с помощью адекватных воздействий формировать локальную перестройку возбудимости на участке мембраны меньшем, чем 1/300 часть площади соматической мембраны клетки.
2. Процесс формирования пластических реакций на этапе появления нового типа ответов сопровождается максимальным изменением ионных токов на участке клетки, однако когда пластические изменения реакции нейронов уже сформированы, параметры ионных токов возвращаются к исходному уровню
3. Впервые получены данные о том, что сочетанное применение экстремальных воздействий направленных на активацию защитных механизмов клетки и низких концентраций исследуемых веществ индуцируют формирование долговременных адаптивных реакций, которые проявляются в снижении ответов нейронов на физиологические концентрации этих веществ.
4. Впервые показано, что экспериментально вызванная модификация процессов реорганизации структуры актинового или тубулинового цитоскелета сомы нейронов оказывает влияние на развитие и сохранение нейрональной пластичности.

#### ***Теоретическая и практическая значимость результатов.***

Обнаружение локальных пластических изменений возбудимости соматической мембраны нейронов имеет теоретическое значение для оценки информационной емкости нервной системы.

Полученные результаты о влиянии экспериментальной модификации реорганизации цитоскелета на динамику формирования и сохранения изменений нейрональных реакций позволяют составить более полное представление о функциональной гетерогенности соматической мембраны и о роли цитоскелета в структурной организации процессов нейрональной пластичности. Представления и концепции о структурной организации рецепции и передачи сигналов на клеточно-молекулярном уровне сформировались, в основном, в исследованиях синаптической пластичности возбуждающих синапсов млекопитающих. Данные, полученные на эволюционно более древнем объекте, чем млекопитающие, на соматическом компартменте нейронов моллюсков, имеют самостоятельную научную ценность. Эти данные передают универсальность представлениям о структурной организации передачи сигналов и роли

цитоскелета в интеграции и организации физического взаимодействия молекул участников процессов, которые формируют пластические изменения ответов нейронов.

Экспериментальный прием сочетанного применения экстремальных стимулов и низких концентраций веществ позволил обнаружить, что экстремальные стимулы могут индуцировать клеточные процессы, направленные на усиление биологической значимости слабых воздействий (низких концентраций веществ) и снижать реакции нейронов на физиологические концентрации этих веществ. Этот экспериментальный прием может найти клиническое применение и служить основой для исследований молекулярных механизмов действия низких концентраций веществ в норме и при различных патологических состояниях.

***Основные положения, выносимые на защиту:***

1. Сoma нейрона может реагировать на локальные воздействия как функционально гетерогенная структура.
2. Воздействия на небольшие участки соматической мембраны по алгоритмам ассоциативной и не ассоциативной стимуляции могут вызывать кратковременные изменения ответов нейронов, которые имеют ряд типичных характеристик, обнаруженных на более высоком организменном уровне: дифференцировка воздействий (пространственная и по интенсивности), сокращение при повторных сессиях количества воздействий, необходимых для выработки пластических реакций.
3. Экстремальные воздействия могут индуцировать клеточные процессы, направленные на формирование новых приспособительных реакций и усиление биологической значимости слабых воздействий.
4. Изменения ионной проницаемости мембраны инициируют пластические перестройки ответов нейронов. Для поддержания процессов формирования и сохранения пластических изменений ответов нейронов необходима активация структурных перестроек молекулярной морфологии с участием актинового и тубулинового цитоскелета нейронов
5. Структурная реорганизация цитоскелета нейронов является одним из механизмов пластических изменений реакций нейронов.

***Апробация работы:*** Результаты работы докладывались на всесоюзных и международных симпозиумах, конференциях, съездах. В том числе на: VIIth international Neurobiological Symposium, Magdeburg, 1985; VI Пражский междунар. симп. Соц. стран, ЧССР, Прага. 1988; Second Intern. Conf. "Molecular electronics and biocomputers", Moscow. 1989; Всес. симп. "Одиночные ионные каналы в биологических мембранах", Пушкино. 1989; III Всесоюз. конф. по нейронаукам. Киев, 1990; Всесоюз. симп. "Ионные каналы в биологических мембранах", Кара-даг, 1990; Второе совещ. "Физические основы построения устройств обработки информации на молекулярном уровне", Москва, 1990; Fourth conference on the neurobiology of learning and memory. Irvine, California, 1990; International workshop "Gangliosides: the pharmacology of neuronal plasticity", Italy, 1991; Всесоюз. школа-семинар по биомолекулярному компьютерингу. Москва, 1991; Конф.

"Простые нервные системы", Минск, 1991; Symposium Russian Neural Networks Society and the Institute of Electrical and Electronics Engineers, "Neuroinformatics and Neurocomputers", Rostov-on-Don, 1992; Междунар. конф. Проблемы нейрокибернетики. Ростов-на-Дону, 1992; International Symposium Simple nervous systems. ISIN Pushchino, 1994; International Symposium Physiological and biochemical basis of brain activity. St.Petersburg, 1994; Всероссийский семинар "Нейроинформатика и ее приложения", Красноярск, 1995; II XXXIII International Congress of Physiological Sciences IUPS, St. Peterburg, Russia, 1997; 5th East European Conference of the international society for invertebrate neurobiology. Moscow, 1997; II International symposia Modern problems of laser physics (MPLP-97), Novosibirsk, 1997; III Съезд физиологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 1997; XVII съезда физиологов России, Ростов-на-Дону 1998; Международная конференция "Рецепция и внутриклеточная сигнализация", Пушкино, 1998; II Съезд Биофизиков России, Москва, 1999; Int. Symp. dedicated to academician I. Pavlov's 150-anniversary, St.-Petersburg, 1999; International conference "Conceptual advances in the studies of associative learning and memory" Moscow, 1999; III Международный симпозиум "Механизмы действия сверхмалых доз". Москва, 2002; VII East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology "Simpler Nervous Systems" Kaliningrad, 2003; III Съезд Биофизиков, России, Воронеж, 2004; XIX Съезд Физиологического Общества им. И.П. Павлова, Екатеринбург, Россия, 2004.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 47 научных работ в отечественной и зарубежной печати.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 197 страницах, содержит 28 рисунков. Список литературы включает 404 источника, из них 34 отечественных.

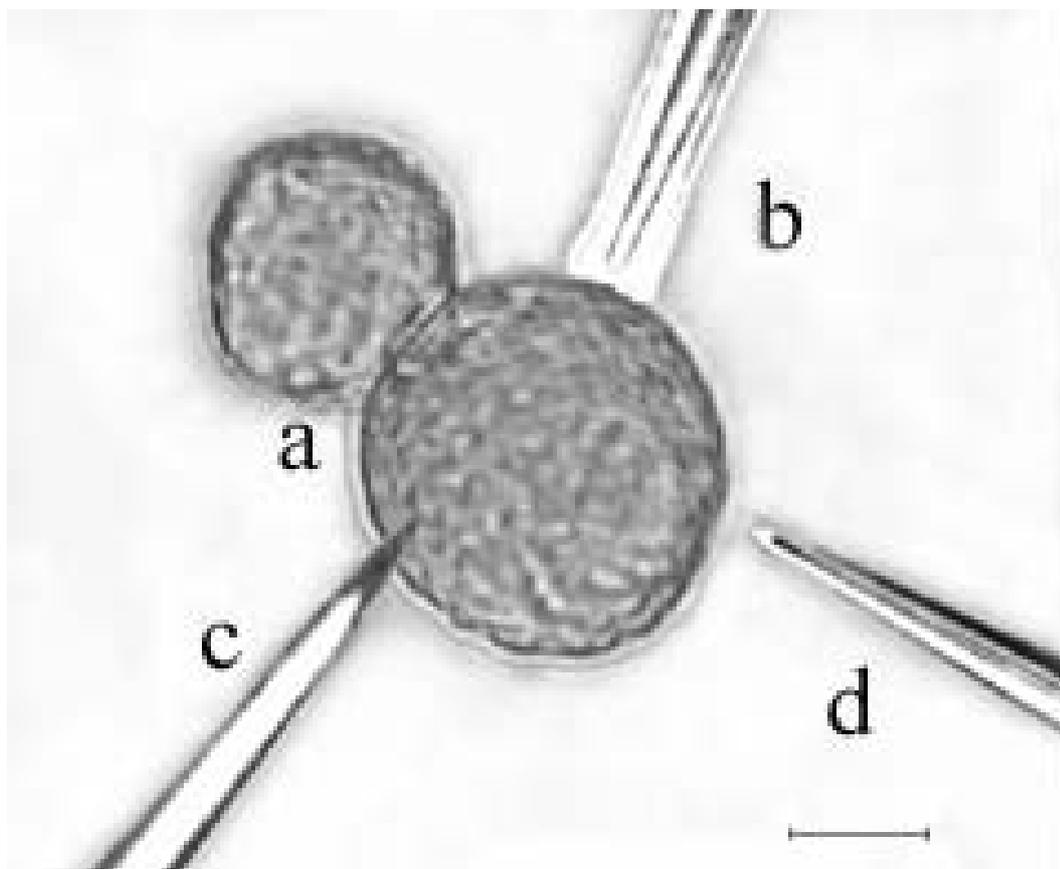
### ***МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ***

Исследования проводили на изолированных нейронах [Костенко и др., 1972] из окологлоточных ганглиев прудовика *Lymnaea stagnalis*. Процедуры, связанные с получением изолированных нейронов, проводились в стерильных условиях (в культуральном боксе) [Костенко и др., 1972]. Ферментативная обработка ганглиев осуществлялась в физиологическом растворе, содержащем 0,3-0,5% проназы (Pronase, MERK, Germany) или протеазы (Protease type XIV, Sigma, USA). Инкубация ганглиев в солевом растворе, содержащем протеолитические ферменты, проводилась в течение 20-40 минут при комнатной температуре, или 12-18 часов при температуре +4°C.

Изолированные нейроны (рис. 1) помещали на стеклянное дно камеры, предназначенной для проведения электрофизиологических исследований, и культивировали в физиологическом растворе следующего солевого состава (в мМ): NaCl - 85, KCl - 1,6, CaCl<sub>2</sub> - 4, MgCl<sub>2</sub> - 1,5, трис-HCl - 8, pH - 7,6-7,8, при температуре +6-12°C в течение 16-18 часов.

Использовалась обычная микроэлектродная техника исследований. Для регистрации интегральных токов небольших участков мембраны изолированных нейронов использовали одну из версий "патч-кламп-метода" - метод микроотведений [Zilberter et al., 1982].

Для формирования кратковременных пластических реакций изолированных нейронов использовали операционные схемы выработки привыкания и ассоциативного научения. Стимуляция небольших участков соматической мембраны и регистрация интегральных ионных токов, протекающих через эти участки, выполнялась с помощью стеклянных микропипеток с диаметром поры 10-15 мкм (рис. 1). Микроинструменты подводили к нейрону под визуальным контролем с использованием микроскопа Amplival. Плотный контакт микропипетки с нейроном возникал за счет того, что в микропипетке, соединенной через специальный держатель с



**Рис. 1** Изолированные нейроны *Lymnaea stagnalis*

a - изолированные нейроны *Lymnaea stagnalis*.

b - микропипетка для локальной стимуляции нейрона и регистрации ионных токов участка мембраны. Микропипетки, изолирующие участки мембраны, позволяют выполнять локальную стимуляцию нейрона и регистрировать ионные токи этих участков мембраны. Капилляры, расположенные внутри микропипеток, также соединены с микрошприцем, это позволяет апплицировать вещества локально в кончик микропипетки.

c - внутриклеточный микроэлектрод для регистрации мембранного потенциала нейрона.

d - микропипетка для аппликации веществ в физиологический раствор, омывающий клетку.

Масштаб - 10 мкм.

микрошприцем, создавалось небольшое отрицательное гидростатическое давление (1-10 гПа). Качество контакта оценивали по величине сопротивления утечки (100 МОм-1 ГОм). На нейроне устанавливали две такие микропипетки, что позволяло в течение эксперимента регистрировать и оценивать ионные токи двух участков соматической мембраны клетки и сравнивать ответы на стимулы, подаваемые на электрически изолированные участки мембраны. Для регистрации токов командный потенциал подавался на хлорсеребряные электроды, расположенные в микропипетке. Потенциал индифферентного электрода поддерживался на нулевом уровне с помощью преобразователя ток-напряжение. Таким образом, на исследуемом участке, при подаче импульса, устанавливался потенциал, равный разности между командным потенциалом и потенциалом покоя клетки. Импульсы калиброванной амплитуды подавались от специальных управляемых генераторов напряжения. Длительность импульсов была 90-100 мсек. Электрическая стимуляция мембраны нейрона проводилась с использованием тех же микропипеток. Для того, чтобы вызвать переход надпороговых ответов в подпороговый, проводилась стимуляция прямоугольными импульсами: величина тока 0,1-0,5 нА, длительность 50-100 мсек, интервал между стимулами 0,5-3 сек. В каждом конкретном эксперименте параметры стимуляции подбирались с учетом ответов нейрона, так, чтобы клетка на стимул отвечала генерацией 1-7 ПД.

Для того чтобы вызвать переход подпорогового ответа в спайковый, проводили локальную внеклеточную стимуляцию (через микропипетку) в сочетании с внутриклеточной стимуляцией (через внутриклеточный микроэлектрод). Параметры стимулов подбирались так, чтобы на стимул, подаваемый на микропипетку, нейрон отвечал небольшим (1-2 мВ) деполяризационным изменением мембранного потенциала, а на стимул, подаваемый на микроэлектрод, генерацией ПД. Задержка между воздействиями, наносимыми вне- и внутриклеточно, была 50-100 мсек. Временная диаграмма импульсов формировалась на электростимуляторе ЭСУ-2 и подавалась в следующем порядке: первым в паре подавался импульс на микропипетку, вторым - на внутриклеточный микроэлектрод. Для внеклеточной стимуляции применялись прямоугольные импульсы: величина тока 0,1-0,2 нА, длительность 50-100 мсек. Для внутриклеточной стимуляции использовали прямоугольные импульсы: величина тока 0,1-10 нА, длительность 50-100 мсек. Интервал между парами стимулов был 5-15 сек. В процессе подачи стимулов на один участок, на определенных этапах эксперимента, подавались тестирующие стимулы на другой участок нейрона через вторую микропипетку. Для каждой клетки параметры стимулов, которые подавали на первую или вторую микропипетку, подбирались до начала проведения многократной стимуляции так, чтобы каждый из импульсов, при подаче на соответствующий участок, вызывал либо подпороговые ответы одинаковой амплитуды, либо спайковые ответы с одинаковым количеством ПД. Другими словами, добивались того, чтобы при нанесении электрических стимулов, как на первый, так и на второй участок исходные ответы сомы нейрона были одинаковыми.

Эта серия экспериментов проводилась на нейронах с ПП -55 - -60 мВ, не проявляющих спонтанной активности.

Для формирования долговременных пластических реакций нейроны подвергались одновременному воздействию низких концентраций тестируемых веществ (кофеин или циклоспорин А) и неспецифических повреждающих факторов (во время механической изоляции нейронов из ганглия) или гипоксического стресса. Гипоксический стресс вызывали 40-минутной протокой через камеру с нейронами физиологического раствора с пониженным содержанием кислорода (гипоксический физиологический раствор). Кислород удалялся из раствора с помощью барботирования его азотом (95% N<sub>2</sub> + 5%CO<sub>2</sub>).

Использовали вещества в следующих конечных концентрациях: фаллоидин (Boehringer Mannheim) – 20-50 мкг/мл, хинин (Рехим) – 10<sup>-4</sup>-10<sup>-5</sup> М, кальциевый ионофор А-23187 (Calbiochim) – 10<sup>-8</sup>-10<sup>-9</sup> М, таксол – 20-50 мкг/мл, цитохалазин В – 5-10 мг/мл, колхицин – 5-10 мг/мл (Sigma, США). Вещества вводили непосредственно в раствор, омывающий участок мембраны, под давлением через капилляр, введенный в микропипетку.

Кофеин (ICN, USA) и циклоспорин А (Novartis, Switzerland) апплицировали непосредственно в раствор омывающий нейроны из близко расположенной к клеткам микропипетки под давлением. Концентрации веществ в микропипетке: кофеин – 5 мМ, циклоспорин А – 20 мМ. Концентрации веществ, которые вызывают реакции нейронов регистрируемые в электрофизиологических экспериментах - физиологические концентрации.

Низкие концентрации растворов кофеина и циклоспорина А готовили методом последовательного разведения 1мМ растворов этих веществ. Конечная концентрация веществ 10<sup>-15</sup>М. Растворы низкой концентрации кофеина или циклоспорина А использовали для приготовления физиологического раствора.

Обработка данных была сделана с помощью Excel 7.0. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Различия между группами нейронов были оценены по критерию знаков или критерию U (Манна-Уитни).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

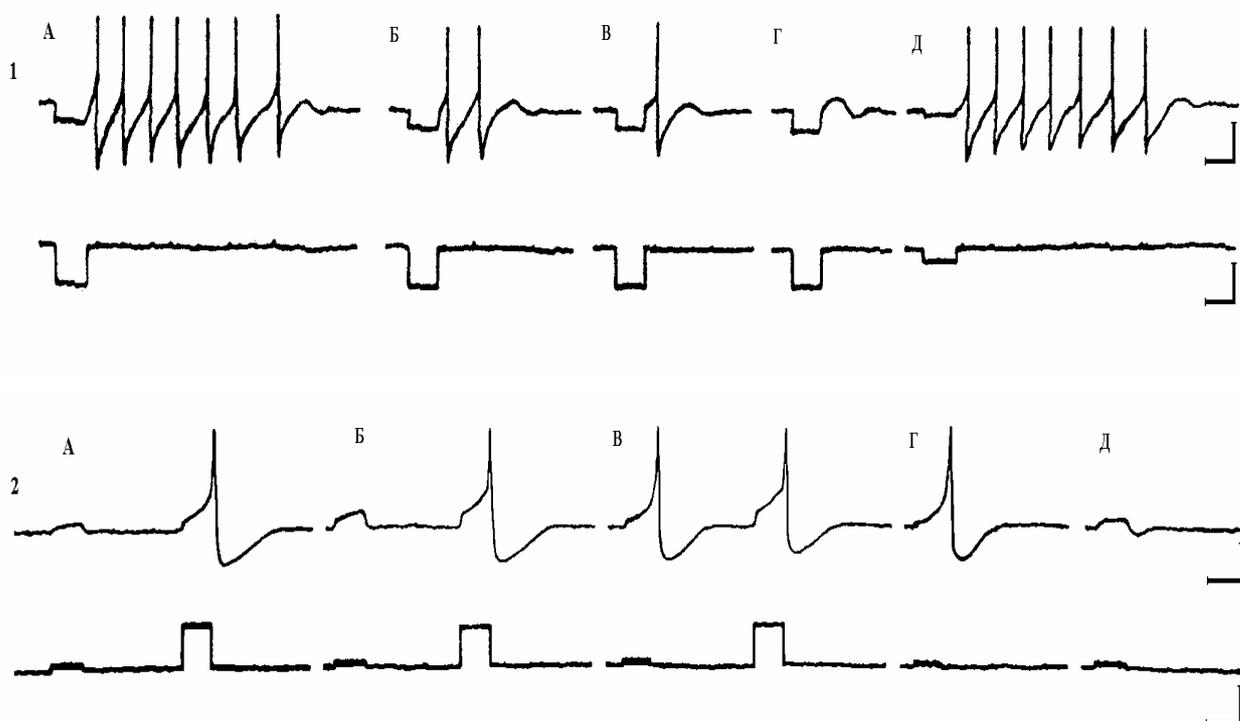
### *Кратковременные пластические реакции сомы изолированных нейронов*

Для того, чтобы вызвать изменения ответов сомы нейронов и локализовать область изменения возбудимости, на клетке размещали две микропипетки и вводили внутриклеточный электрод. Параметры стимулов подбирали так, чтобы исходно при раздражении первого или второго участка каждый из стимулов, поданный на соответствующую микропипетку, вызывал генерацию одинаковых ответов.

Исследовались пластические реакции изолированных нейронов, вызванные локальными одиночными электрическими воздействиями (клеточный аналог привыкания). Многократное применение внеклеточных локальных непериодических стимулов с интервалом между импульсами 0,5-3 секунд в ряде случаев вызывало переход спайковых ответов на стимул (фиксированных параметров) в подпороговые. Была исследована динамика перестройки ответов 111 нейронов на стимулы, первоначально вызывающие генерацию от 1 до 7 ПД. Было

обнаружено, что вероятность и динамика уменьшения эффективности вызова спайковых ответов находилась в зависимости от интенсивности стимула (первоначального ответа нейрона). Поэтому при анализе пластических изменений ответов нейронов эксперименты были разделены на две группы: группа с использованием стимулов, вызывающих "слабую реакцию" (1-2 ПД) и группа с использованием стимулов, вызывающих более "сильную реакцию" (4-7 ПД).

Если первоначально локальный внеклеточный стимул вызывал генерацию 4-7 ПД, то первоначально перестройка реакции проявлялась в постепенном сокращении числа ПД в ответе нейрона (30-50 стимулов) (Рис. 2, 1 А-В). Затем наблюдалось прекращение генерации спайковых ответов и появление нового типа ответов - подпороговых, градуальных ответов при подаче стимула на этот участок (Рис. 2, 1 Г). На этой стадии (8-10 предъявлений) подпороговые ответы



**Рис. 2** Примеры перестройки ответов соммы изолированных нейронов, вызванной локальной многократной стимуляцией

1 А-Д (верхний трек) ответ нейрона на стимулы, подаваемые на микропипетку. По фрагментам: А - ответ на первый стимул. Б - ответ на 26 стимул. В - ответ на 36 стимул. Г - ответ на 57 стимул. Д - ответ на 62 стимул (изменена амплитуда и длительность стимула).

2 А-Д (верхний трек) ответ нейрона на стимулы, подаваемые на микропипетку и внутриклеточный электрод. По фрагментам: А - ответ на первый сочетанный стимул. Б - ответ на 12 стимул. В - ответ на 26 стимул. Г - ответ на 34 стимул, который подавался только на микропипетку. Д - восстановление подпороговых ответов.

Калибровка: 50 мсек, 20 мВ.

Нижний трек - запись стимулирующих токов. Калибровка: 50 мсек, 500 пА.

были нерегулярными. Наблюдалось чередование генерации ПД и подпороговых ответов. Начиная с 40-60 стимула, генерация ПД полностью прекращалась. Генерацию ПД в ответе можно было вызвать, изменив его параметры (амплитуду, длительность или полярность) (рис. 2, 1 Д). Полученная модификация ответов сохранялась в течение 2-10 минут. Восстановление первоначального количества ПД происходило через 15-20 минут. Если после восстановления спайковых ответов повторить стимуляцию этого участка нейрона, то описанные стадии изменения реакции можно было вызвать применением меньшего числа стимулов.

Многочисленное электрическое раздражение в 90% случаев не вызывало изменение ПП, в остальных экспериментах если и наблюдалось изменение ПП, то оно не превышало 1-2 мВ. Такие колебания ПП нейронов наблюдались и в случае отсутствия воздействий, применяемых для изменения реакций нейрона на стимул.

Такое изменение реакции сомы нейронов на подачу стимулов фиксированных параметров развивалось в 85,9% случаев (67 экспериментов). В остальных 14,1% случаев (11 экспериментов) многократная стимуляция выбранного участка сомы нейрона не приводила к появлению подпороговых ответов. Хотя, по мере нанесения стимулов, наблюдалось уменьшение количества ПД на один-два в ответе. В этом случае после применения 250-300 стимулов, иногда вызывавших сокращение числа ПД, стимуляцию участка прекращали. Из 78 проведенных экспериментов только в 11 случаях не наблюдалось появления подпороговых ответов. По критерию знаков появление подпороговых ответов является существенным событием  $P_{кз}=0,01$ .

В случае если исходно стимул вызывал более слабую реакцию (1-2 ПД), подпороговые ответы появлялись после 8-11 стимулов. Стадия чередования двух типов ответов состояла из одного-двух спайковых ответов после появления первого подпорогового ответа. После 12-15 воздействий генерация ПД полностью прекращалась. Генерация ПД происходила при изменении параметров стимула. Перестройка ответов сохранялась 1-5 минут. Для вызова изменений ответов под действием второй сессии воздействий требовалось применение меньшего числа стимулов (9-12).

Этот способ выработки модификации реакций нейронов в 95,4% случаев вызывал появление подпороговых ответов (42 эксперимента). В остальных случаях по мере нанесения воздействий не наблюдалось изменений ответов на стимул, после нанесения 50-100 воздействий стимуляция участка прекращалась. Таким образом, из 44 проведенных экспериментов в 2 случаях не наблюдалось появления подпороговых ответов. По критерию знаков появление подпороговых ответов является существенным событием  $P_{кз}=0,01$ .

Были проведены эксперименты на соме нейронов, помещенных в раствор, который не содержал ионов натрия. Замена физиологического раствора, имеющего полный ионный состав, на безнатриевый раствор проводилась непосредственно перед проведением экспериментов. Часть нейронов в безнатриевом растворе отвечала на нанесение стимула генерацией ПД. Стимуляция была проведена на 10 нейронах, у которых исходной реакцией на стимул была генерация одного

ПД. Во всех проведенных экспериментах стимуляция участков приводила к появлению подпороговых ответов.

Исследовались пластические реакции изолированных нейронов, вызванные сочетанным применением локальных и генерализованных воздействий (клеточный аналог ассоциативного обучения). Для того, чтобы вызвать переход подпороговых ответов в надпороговые, использовали многократное применение парных стимулов. Стимуляцию участка сомы подпороговыми воздействиями проводили в сочетании с внутриклеточной стимуляцией. Внутриклеточные стимулы вызывали спайковые ответы и подавались на внутриклеточный микроэлектрод.

Если локальный электрический стимул, наносимый на участок сомы, вызывал подпороговый ответ (рис. 2, 2 А), то в результате применения первых 15-20 сочетанных стимулов происходило увеличение амплитуды подпорогового ответа (рис. 2, 2 Б). При продолжении стимуляции на исходно подпороговые стимулы нейрон начинал отвечать генерацией ПД. На этой стадии (9-11 стимулов) спайковые ответы чередовались с подпороговыми ответами. После 30-35 сочетанных стимулов генерация ПД в ответ на первый стимул становилась регулярной (рис. 2, 2 В). Модификация ответа на первоначально подпороговый стимул сохранялась в течение 2-7 минут. При повторной парной стимуляции изменение ответа (генерация ПД на первый стимул) наступало в результате применения меньшего количества сочетанных раздражений (6-10 стимулов). Как и применение одиночной стимуляции, парная стимуляция не вызывала изменений ПП сомы нейрона.

Многократное применение таких парных стимулов в 67,8% случаев (38 экспериментов) обуславливало изменение реакции нейронов. Стимул, подаваемый на микропипетку, начинал вызывать генерацию ПД (ответ на второй стимул пары при этом не изменялся). В 14,3% случаев (8 экспериментов) такая стимуляция не вызывала перестройки ответов по мере нанесения 60-90 сочетаний. Дальнейшая стимуляция в таких случаях прекращалась. В 17,8% случаев (10 экспериментов) изменялся ответ на второй стимул пары, он становился подпороговым.

Таким образом, из 56 проведенных экспериментов в 18 случаях не наблюдалось появление спайковых ответов. По критерию знаков появление спайковых ответов является существенным событием  $P_{к3}=0,01$ .

Для того, чтобы определить область распространения изменения возбудимости соматической мембраны, на нейрон подавались дифференцировочные раздражения через вторую микропипетку. Было обнаружено, что стимуляции одного участка не вызывала изменений ответов нейрона на стимул, подаваемый через вторую микропипетку.

Исследовали влияние стимуляции нескольких участков сомы одного нейрона. Для этого после подачи серии стимулов на первую микропипетку проводили подачу такой же серии стимулов на вторую микропипетку. Последовательная стимуляция двух участков сомы позволила выявить, что многократное применение воздействий может оказывать различное влияние на ответы нейрона. Были выявлены нейроны, у которых перестройка ответов происходила при

стимуляции каждого из двух произвольно выбранных участков, и нейроны, у которых перестройка происходила при стимуляции только одного из выбранных участков.

*Результаты, полученные в данном разделе работы, являются подтверждением наличия субклеточных механизмов, которые позволяют some нейронам избирательно оценивать биологическое значение нескольких воздействий. Проявлением этой способности являются пластические изменения интегральной активности и локальные изменения возбудимости, вызванные стимуляцией изолированных нейронов по алгоритмам выработки привыкания и ассоциативного обучения.*

### ***Гетерогенность пластических свойств сомы нейронов, вызванная локальной экспериментальной модификацией ионной проницаемости мембраны***

Исследовалось влияние локальных модификаций ионной проницаемости мембраны на пластические свойства сомы нейрона. Для этой цели были использованы кальциевый ионофор A23187 и хинин. Молекулы кальциевого ионофора встраиваются в мембрану и значительно повышают вхождение ионов кальция в клетку. Хинин является блокатором потенциалуправляемых кальций-зависимых калиевых каналов. Оба эти вещества изменяют пластические свойства нейронов. В случае их введения в раствор, омывающий ганглий, кальциевый ионофор ускоряет развитие привыкания, хинин, напротив блокирует развитие этой нейрональной реакции [Дьяконова, 1983; Дьяконова, 1984].

Было проведено исследование влияния локальной модификации мембраны этими веществами на пластические свойства нейронов. Для определения области действия веществ проводили локальную стимуляцию двух участков мембраны нейрона.

В начале эксперимента последовательно стимулировали два участка сомы нейрона. Если стимуляция вызывала развитие реакции привыкания - переход спайковых ответов (1-2 ПД) в подпороговые, то после восстановления исходного количества ПД в ответах нейрона в раствор, омывающий один из участков (под давлением из капилляра, расположенного внутри микропипетки) вводили одно из веществ. После этого через 5-10 минут проводили повторные сессии стимуляции, исходно вызывавшие развитие реакции привыкания.

В случае введения в одну из микропипеток кальциевого ионофора было обнаружено (в каждом из пяти проведенных экспериментов), что спайковые ответы на стимулы, подаваемые на эту микропипетку, прекращались после предъявления первых 4-5 воздействий [Ратушняк, Запара, 1989]. При проведении стимуляции другого (контрольного) участка не было обнаружено изменений динамики перестройки ответов.

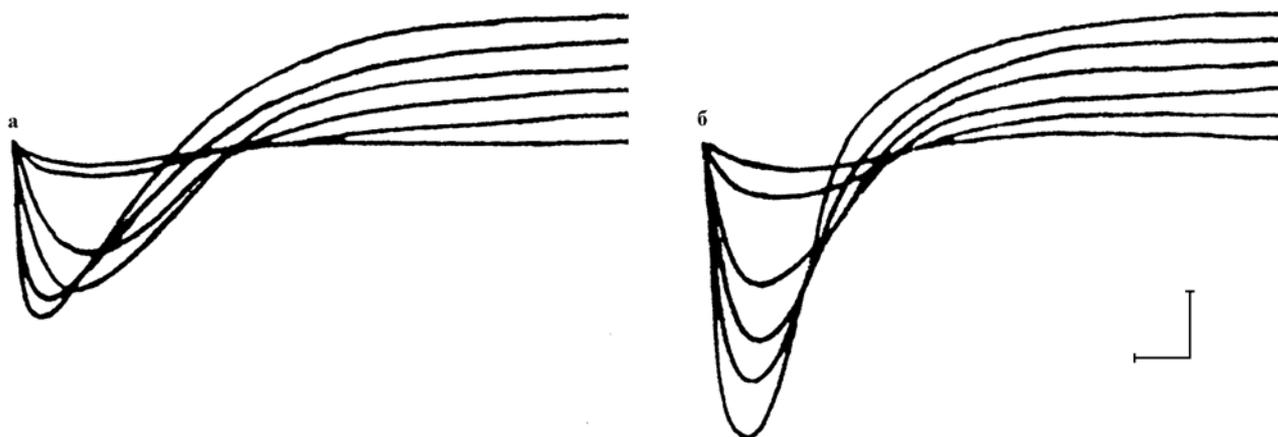
Введение в одну из микропипеток хинина позволило обнаружить (20 экспериментов), что ответы на стимулы, наносимые через эту микропипетку, не менялись после 50-100 стимулов (в течение 30-60 минут стимуляции). Обработка одного участка нейрона не оказывала влияния на пластические свойства контрольного участка [Ратушняк, Запара, 1989].

В связи с тем, что хинин изменял проводимость потенциалзависимых каналов на участках мембраны под микропипетками, проводили регистрацию ионных токов, первую после введения хинина перед стимуляцией, вторую после нанесения 20-30 воздействий. Такое число стимулов в обычных условиях (до обработки мембраны хинином) было достаточным для перестройки ответов. Обработка участка мембраны хинином приводила к уменьшению амплитуды выходящих токов. Величина изменения амплитуды этих токов на разных нейронах и на участках одной клетки сильно варьировала: от 10-20% до почти полного подавления. Последующее нанесение стимулов (в течение 30 мин) приводило к незначительному увеличению амплитуды входящих токов. На контрольных участках ионные токи и пластические свойства мембраны не менялись [Ратушняк, Запара, 1989].

*Эта серия экспериментов позволила обнаружить, что различия реакций нейронов на одинаковые воздействия могут быть обусловлены неоднородностью биофизических характеристик участков соматической мембраны нейронов.*

***Анализ интегральных ионных токов соматической мембраны в процессе формирования локальных пластических изменений возбудимости нейронов***

Регистрировали суммарные ионные токи, протекающие через участки соматической мембраны, ограниченные отверстием кончика микропипетки (5-10 мкм). Были обнаружены значительные отличия по амплитуде и соотношению входящих и выходящих токов. В пределах одного нейрона можно было обнаружить участки, на которых регистрировались либо только входящие, либо выходящие токи, а также участки, на которых регистрировались оба компонента ионных токов (рис. 3 а).



**Рис. 3** Пример изменения ионных токов в процессе формирования перестройки ответов сомы изолированных нейронов, вызванной многократной парной стимуляцией

а – ионные токи на участке нейрона до нанесения серии стимулов

б – ионные токи на участке нейрона после появления спайковых ответов (после нанесения 30 сочетанных стимулов на этот участок нейрона)

Потенциал покоя нейрона 55 мВ, шаг по напряжению 5 мВ. Калибровка 10 мсек, 100 пА.

Стимуляцию, вызывающую изменения ответов нейрона, как правило, проводили на участках, ионные токи которых были представлены входящими и выходящими компонентами. В отсутствие внешних воздействий в течение 4-6 часов параметры токов, протекающих через участок мембраны, ограниченный микропипеткой, не изменялись.

При проведении серий стимуляции поочередно регистрировали токи, протекающие через два участка соматической мембраны, ограниченные микропипетками. Регистрацию токов на участках в течение эксперимента проводили: 1) перед началом серии воздействий, 2) на стадии чередования спайковых и подпороговых ответов, 3) на стадии стабильной перестройки ответов. В случае, если перестройка ответов не происходила, регистрация токов проводилась после прекращения серии воздействий. Перестройка исходных ответов, состоящих из 1-2 ПД, имела короткую стадию чередования ответов, поэтому регистрацию токов на этой стадии не проводили, на стадии стабильной перестройки ответов не было обнаружено достоверных изменений ионных токов.

Регистрация ионных токов, протекающих через участки сомы нейрона на стадии чередования спайковых и подпороговых ответов, не выявила каких либо отличий токов, обусловленных направлением перестройки. В случае уменьшения или увеличения эффективности вызова спайковых ответов, независимо от типа проводимой стимуляции (локальная стимуляция участка или в сочетании с внутриклеточной стимуляцией) наблюдались сходные изменения ионных токов. При перестройке подпороговых и спайковых ответов (4-7 ПД) наблюдались изменения входящих и выходящих компонент (рис. 3 б).

Амплитуды входящих токов увеличивались на 50-200% (в сравнении с токами, которые регистрировали до проведения стимуляции) (рис. 3). Уменьшалось время достижения пиковых значений этих токов. Медленные выходящие токи уменьшались незначительно.

В растворе без ионов натрия на этой стадии перестройки ответов также наблюдалось увеличение амплитуды входящих токов.

На стадии стабильной перестройки ответов амплитуда входящих токов уменьшалась. Выходящие токи были сравнимы с токами, зарегистрированными до перестройки ответов. Наблюдалось уменьшение амплитуды входящих токов по сравнению с токами, зарегистрированными на стадии чередования ответа. Время достижения максимальной амплитуды входящих токов приближалось к исходному значению. Выходящие токи менялись незначительно (в большинстве случаев недостоверно) относительно зарегистрированных до перестройки ответов [Запара, Ратушняк, Штарк, 1988; Ratushnyak, Zapara, Shtark, 1989).

Если многократная стимуляция не вызывала изменения эффективности ответа, то на таких участках мембраны токи не изменялись, не изменялись также токи, протекающие через контрольные участки нейронов.

*Таким образом, было обнаружено, что изменение реакции нейронов на локальные электрические воздействия сопровождаются изменением ионных токов, и период наибольшего увеличения амплитуды входящих токов совпадает с появлением нового вида ответов на стимул. А по мере формирования стабильной перестройки ответов наблюдается возвращение пиковой*

амплитуды токов к базовому уровню, хотя полученное в результате стимуляции по алгоритмам выработки привыкания и ассоциативного обучения изменение возбудимости участка мембраны сохраняется. Эти данные подтверждают ранее сформулированные Б.И.Котляром закономерности развития процессов, обуславливающих различные формы обучения. Большинство развивающихся во время обучения изменений в разных биохимических, биофизических и ультраструктурных показателях нервных клеток спустя некоторое время полностью исчезают [Котляр, 1986]. Это свидетельствует об отражении в них промежуточных процессов, необходимых для формирования других, конечных превращений в нейронах, которые ответственны за обучение.

Результаты, полученные в данном разделе работы, свидетельствуют, что механизмы локального изменения ионной проницаемости плазматической мембраны принимают участие в формировании пластических изменений нейрональной активности, но, вероятно, являются промежуточным этапом, необходимым для активации механизмов, обеспечивающих сохранение изменений ответов.

#### ***Долговременные пластические реакции сомы изолированных нейронов***

Основополагающим условием формирования долговременных пластических реакций различного генеза является применение каких-либо достаточно сильных (экстремальных) воздействий. Проявлением таких реакций является повышение толерантности (адаптация) к экстремальным воздействиям и облегчение выработки различных видов обучения [Самойлов, 1999]. Была предпринята попытка, используя приемы выработки (алгоритмы воздействий) адаптивных и ассоциативных реакций повысить биологическое значение низких концентраций веществ.

#### **Влияние одновременного воздействия на реакции нейронов неспецифических повреждающих факторов и низких концентраций веществ**

На молекулярно-клеточном уровне одним из механизмов адаптивных реакций является изменение ионной проницаемости плазматической мембраны. Изменения ионной проницаемости плазматической мембраны для ионов водорода вызывают изменения рН клетки и активности протеинов, для ионов кальция – оказывают влияние на кальциевую сигнальную систему клетки, для ионов натрия и калия – обеспечивают изменение ионного гомеостаза и регулируют возбудимость клетки.

Известно что, мишенями кофеина являются аденозиновые рецепторы плазматической мембраны, и рианодиновые эндоплазматического ретикулума и один из типов рецепторов митохондриальной клетки (Collins, Thomas, 2001; Mironov, Usachev, 1991; Orkand, Thomas, 1995). Активация аденозиновых рецепторов подавляет нейрональную активность оказывая влияние на различные калиевые и кальциевые токи через активацию G-белков, которые взаимодействуют с ионными каналами, аденилатциклазой или фосфолипазой (Haas, Selbach, 2000). Кофеин действует

как конкурентоспособный антагонист адениновых рецепторов, вызывая интенсификацию нейрональной активности (Haas, Selbach, 2000;).

Второй мишенью кофеина являются рианодиновые рецепторы. Взаимодействуя с рианодиновыми рецепторами, кофеин способствует выбросу кальция из депо. Кофеин модулируя активность цАМФ- и  $Ca^{+2}$ -зависимых сигнальных систем, опосредованно участвует в регуляции активности ионных каналов плазматической мембраны, и энергетических систем клеток, активность которых обеспечивает поддержание ионного гомеостаза [Haas, Selbach, 2000; Mironov, Usachev, 1991].

Для того, чтобы инициировать адаптивные изменения реакций нейронов и экспериментально показать, что реакции нейронов могут регулироваться низкими концентрациями веществ, сома изолированных нейронов подвергалась последовательному воздействию кофеина два раза: проводили прекондиционирование нейронов низкими, а позже физиологическими концентрациями кофеина. Нейроны подвергались действию НК кофеина в различных условиях (сроках) культивирования: через 12-18 часов культивирования или во время экстремальных воздействий после ферментативной обработки, во время механической диссоциации клеток.

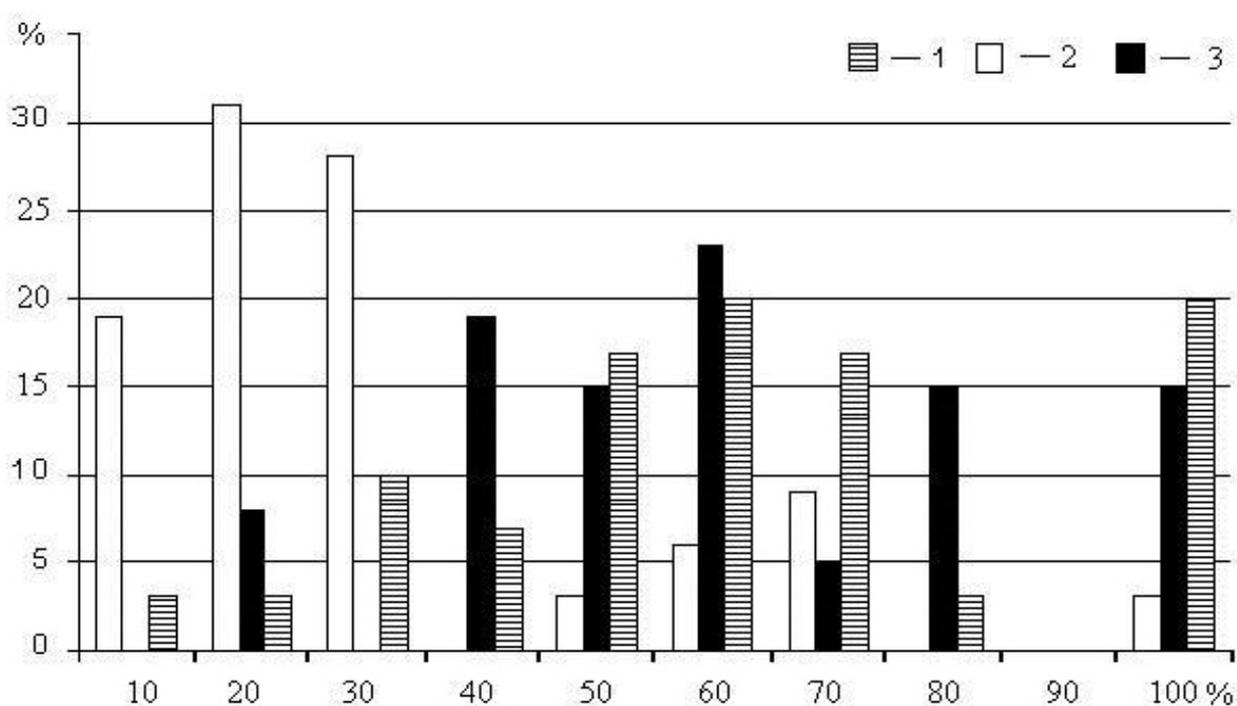
Первоначально было исследовано действие аппликации ФК кофеина на МП изолированных нейронов, которые культивировались 12-18 часов в физиологическом растворе. Для этого проводили аппликацию 50 мкл 5мМ раствора кофеина из близко расположенной к нейрону микропипетки в экспериментальную ванночку (объем 5мл). Этот способ воздействия и ФК кофеина вызвала обратимые изменения МП у всех исследованных нейронов. ФК кофеина вызвала обратимые де- и гиперполяризационные изменения МП. Изменения МП наблюдались в течение первых 10-15 минут. Постепенно амплитуда изменений уменьшалась, и мембранный потенциал возвращался к значению потенциала покоя, который был до аппликации кофеина.

Измерялось максимальное изменение МП, вызванное аппликацией кофеина. Эта пиковая амплитуда выражалась как процент от значения МП до аппликации, от ПП. В этой контрольной группе (контрольная группа №1) преобладали нейроны с пиковой амплитудой изменений МП больше чем 30% от ПП. Диаграмма распределения числа клеток, в зависимости от величины реакции на аппликацию кофеина, представлена на рисунке 4.

Низкие концентрации кофеина не вызвали каких либо изменений МП изолированных нейронов. Однако обработка нейронов растворами НК кофеина в различные периоды культивирования позволила обнаруживать эффекты НК на реакции нейрона, вызванные аппликацией ФК кофеина.

Было обнаружено, что НК лиганда оказывают существенное влияние на реакцию нейронов, вызванную аппликацией ФК, если механическая дезагрегация ганглиев и получение изолированных нейронов проводились в растворе НК кофеина. Необходимо отметить, что механическая дезагрегация ганглиев и получение изолированных нейронов выполнялось в течение 15-20 минут. Затем изолированные клетки тщательно промывались в часовых стеклах физиологическим раствором и переносились пипеткой в чашки Петри для культивирования.

Дальнейший электрофизиологический эксперимент выполняли после 12-18 часов культивирования, как и в контрольной группе. Преколондирование нейронов НК кофеина уменьшало амплитуду изменений МП, вызванных аппликацией его ФК. В контрольной группе нейронов №1 пиковая амплитуда изменений МП варьировала от 7% до 103% (в среднем  $58,4 \pm 5,1\%$ ; 30 нейронов). В группе нейронов, преколондированных НК кофеина в течение дезагрегации ганглиев, пиковая амплитуда изменений МП варьировала от 6% до 100% (в среднем  $27,6 \pm 3,8\%$ ; 32 нейрона). Средняя пиковая амплитуда изменений МП уменьшилась в этой группе на 30.8% по сравнению с контрольной группой №1. В этой группе большая часть нейронов была с небольшой амплитудой изменений МП (6-30%) (рис. 4). Эта часть клеток составляет 78% от



**Рис. 4** Диаграмма распределения числа нейронов в зависимости от максимальной амплитуды изменения мембранного потенциала в ответ на аппликацию физиологических концентраций кофеина.

Аппликация ФК кофеина и регистрация мембранного потенциала изолированных нейронов во всех группах проводилась через 12-18 часов от начала культивирования.

Нейроны 1-ой группы не подвергались инкубации в растворах НК кофеина.

Нейроны 2-ой группы инкубировались в растворах НК кофеина 15-20 минут во время механической дезагрегации ганглиев и изоляции нейронов.

Нейроны 3-ей группы инкубировались в течение 40 мин непосредственно перед регистрацией мембранного потенциала в растворах НК кофеина.

Оси: X - величина реакции (амплитуда максимального изменения мембранного потенциала нейронов в процентах от потенциала покоя до аппликации кофеина).

Y - число нейронов (% от общего числа клеток в группе).

общего количества нейронов в этой группе. ПП в контрольной и экспериментальной группе перед аппликацией ФК кофеина достоверно не отличались. Различия пиковой амплитуды изменений МП между этими группами были статистически достоверны ( $P_U < 0.001$ ).

Прекондиционирование нейронов в течение 40 минут физиологическим раствором, содержащим НК кофеина, после 12-18 часов культивирования, по существу, не влияла на нейрональные реакции, вызванные аппликацией ФК кофеина. Средняя пиковая амплитуда изменений МП, вызванная аппликацией ФК кофеина, в группе клеток, проинкубированных в течение 40 минут в физиологическом растворе, содержащем НК кофеина (непосредственно перед регистрацией МП), была  $57,2 \pm 4,7$  % (21 нейрон) ( $58,4 \pm 5,1$  % в контрольной группе №1). Диаграмма распределения числа клеток в зависимости от амплитуды изменений МП на аппликацию ФК кофеина представлена на рисунке 4.

Следующая серия экспериментов выполнялись также как та, в которых было выявлено действие низких концентраций кофеина но, вместо алкалоида кофеина был использован белок циклоспорин (CsA). Этот белок взаимодействует с рецепторами кальциевых депо, одним из типов пор митохондрий, и фосфотазами клетки. CsA оказывает блокирующее воздействие на все свои мишени [Huang, Farley, 2001; Smaili et al. 2001].

Аппликация 50 мкл 20мМ раствора CsA из близко расположенной к нейрону микропипетки в экспериментальную ванночку (объем 5мл) вызвала обратимые изменения МП у всех исследованных нейронов. В контрольной группе (контрольная группа №2) амплитуда изменений МП колебалась от 32% до 108% (в среднем на  $68,4 \pm 12,3$ %; 11 нейронов). Прекондиционирование НК CsA во время механической дезагрегации ганглиев и получения изолированных нейронов уменьшало амплитуду изменений МП, которые вызывает аппликация ФК CsA, изменения МП варьировали от 15% до 88% (в среднем на  $39,2 \pm 9,4$ %; 7 нейронов). Средняя амплитуда изменений МП в этой группе нейронов уменьшалась на 29,1% по сравнению с контрольной группой. Различия пиковой амплитуды изменений МП между группами были статистически достоверны ( $P_U < 0.001$ ).

*Важным результатом исследований условий формирования адаптивных реакций являются полученные нами данные о том, что во время экстремальных воздействий биологическое значение НК веществ повышается. Это проявляется в долговременно сохраняющемся снижении реакций нейронов на ФК веществ. Эффекты экстремальных воздействий и предобработки НК кофеина или циклоспорина А в наших экспериментах проявлялись в уменьшении амплитуды изменений МП, которые вызывали ФК каждого из двух исследованных веществ через 12-18 часов после сочетанного прекоиндиционирования [Epstein, Zapara et al., 2004]. Клетки после 12-18 часов культивирования в стабильных условиях оказались менее чувствительными к действию НК лигандов. Нейроны после ферментативной обработки во время механической дезагрегации подвергаются многочисленным и разнообразным внешним воздействиям и, вероятно, имеют другой уровень активации вторичных посредников по сравнению с клетками, которые 12-18 часов находились в стабильных условиях культивирования. Тестируемые лиганды в течение*

*прекондиционирования в выбранные нами сроки культивирования взаимодействуют с рецепторами нейронов, внутриклеточные системы которых находятся в различных состояниях активации, поэтому, вероятно, образование комплекса лиганд-рецептор может оказывать модулирующее влияние на различные наборы биохимических реакций или ультраструктурных перестроек.*

***Влияние одновременного воздействия гипоксического стресса и низких концентрацией кофеина на нейрональные реакции, вызванные аппликацией физиологических концентраций кофеина***

Прудовики, на нервных клетках которых проводились все эксперименты, являются факультативными анаэробами. В условиях гипоксии происходит переход от аэробноза к анаэробнозу благодаря специфике их метаболизма [Хочачка, 1977; Inoue et al., 2001]. Иницированная дефицитом кислорода перестройка метаболизма нейронов сопровождается изменениями МП клетки (ионного гомеостаза). В данном исследовании использовался экспериментальный прием, получивший название ишемия *in vitro*, для формирования адаптивных реакций изолированных нейронов. В экспериментах использовали животных, которые содержались при комнатной температуре, вели активный образ жизни, поднимались к поверхности воды и открывали дыхательное отверстие для забора воздуха. Такое поведение свойственно животным в состоянии аэробноза.

Для того чтобы экспериментально показать, что реакции нейронов в определенных условиях могут регулироваться НК веществ, сравнивали изменения МП нейронов, вызванные аппликацией ФК кофеина, в трех группах, в каждой из которых было по 23 нейрона. В первой группе регистрировалась реакция на аппликацию ФК кофеина у нейронов, находившихся в нормальном физиологическом растворе - в состоянии аэробноза. Во второй – у клеток, которые 40 минут инкубировались в гипоксическом физиологическом растворе. Наконец, в третьей – у нейронов, которые инкубировались 40 минут в гипоксическом физиологическом растворе с НК кофеина.

Инкубация нейронов в гипоксическом растворе вызывала обратимые изменения МП. На начальной стадии помещения нейронов в гипоксический физиологический раствор были выявлены типичные изменения МП нейронов, вызванные дефицитом кислорода: гиперполяризация, за которой следует медленная деполяризация (Zapara et al., 2004). Такие изменения МП свидетельствуют о том, что нейроны, помещенные в раствор с дефицитом кислорода, находились некоторое время в состоянии гипоксического стресса. Однако в гипоксическом растворе МП самопроизвольно возвращался к базовому уровню. В аэробных условиях (в первой группе нейронов) среднее значение МП было  $62,3 \pm 3,6$  мВ, а в состоянии анаэробноза во второй и третьей группах –  $61,9 \pm 3,6$  мВ и  $65,3 \pm 3,5$  мВ соответственно. Несмотря на некоторые различия средних значений МП, статистически достоверных различий между группами нейронов, находящихся в состоянии аэробноза и анаэробноза, по этому параметру обнаружено не было. Самопроизвольное возвращение к базовому уровню МП свидетельствует о

том, что метаболизм нейронов перешел на анаэробный тип и МП клеток, обусловленный работой АТФ-зависимых ионных насосов, смог нормализоваться.

Для формирования новых адаптивных реакций изолированных нейронов использовалось сочетанное воздействие гипоксического стресса и НК кофеина..

Во всех группах измерялась величина максимальной амплитуды деполяризации нейрональной мембраны, вызванная аппликацией кофеина. Эта пиковая амплитуда изменений МП выражалась как процент от значения ПП. В первой группе нейронов пиковая амплитуда изменений МП, вызванная аппликацией НК кофеина, в среднем была  $21,6 \pm 3,2\%$ , во второй и третьей группах –  $38,9 \pm 3,9\%$  и  $23,3 \pm 3,8\%$  соответственно.

Различия величины пиковой амплитуды изменений МП между группами нейронов, которые находились в состоянии аэробноза и анаэробноза, были статистически существенны ( $P_U < 0.005$ ). Статистически существенными ( $P_U < 0.005$ ) по этому параметру были и различия между группами нейронов, которые перешли от аэробноза к анаэробнозу в гипоксическом физиологическом растворе и гипоксическом физиологическом растворе с НК кофеина.

*В проведенной серии экспериментов было обнаружено, что, если гипоксический стресс и переход к анаэробнозу увеличивал реакцию нейронов на НК кофеина, то одновременное воздействие гипоксического стресса и НК вещества не вызывало повышения реакции нейронов на НК тестируемого вещества в условиях гипоксии. Это свидетельствует о формировании новой реакции нейронов на кофеин. Известно, что гипоксический стресс активирует сигнальные системы и протеины, которые участвуют в адаптивной перестройке метаболизма нейронов. Можно предположить, что одновременная активация микродоменов, которые обуславливают защитные физиологические реакции, и образование комплексов лиганд-рецептор тестируемых веществ создают условия для взаимодействия между молекулами и сигнальными системами, воспринимающими слабые и экстремальные воздействия. Не исключено, что эти взаимодействия могут быть структурными.*

### ***Влияние нарушений динамических перестроек цитоскелета на пластические свойства нейронов***

В предыдущих разделах было показано, что кратковременные пластические изменения ответов нейронов сопровождаются определенной динамикой ионных токов. Максимальные изменения были обнаружены на начальных стадиях перестройки ответов, а ко времени формирования стабильной перестройки амплитуда токов возвращалась к базовому уровню. Необходимо было проверить предположение о том, что зарегистрированное изменение ионных токов может инициировать ультраструктурные перестройки межмолекулярных связей с участием цитоскелета нейрона. Эти процессы с участием актинового и тубулинового цитоскелета, вероятно, обуславливают и поддерживают пластические изменения возбудимости участков мембраны сомы нейронов после возвращения амплитуды токов к базовому уровню.

Оригинальная конструкция микропипеток [Ратушняк и др., 1996] позволила модулировать состояние цитоскелета экзогенными высокоспецифическими лигандами, усиливающими или ослабляющими полимеризацию актинового или тубулинового цитоскелета в достаточно ограниченном объеме.

### ***Влияние нарушений динамических перестроек микрофиламентов цитоскелета на пластические свойства нейронов***

Воздействие на систему микрофиламентов цитоскелета нейронов осуществлялось введением в раствор микропипетки фаллоидина или цитохалазина В. Мономерная и полимеризованная формы белка актина (микрофиламенты) находятся в клетке в состоянии динамического равновесия. Фаллоидин взаимодействует с микрофиламентами, блокирует реакцию деполимеризации и, тем самым, стабилизирует полимерную форму актина в клетке [Niggli, 1987]. Цитохалазин В, взаимодействуя с мономерным актином, блокирует реакцию полимеризации и образование новых микрофиламентов.

Для выявления эффектов, которые могут быть вызваны нарушением полимеризации актина, в раствор микропипетки вводили цитохалазин. В этой серии экспериментов, чтобы выделить два участка сомы нейрона с определенными пластическими свойствами, проводили контрольную серию электрической стимуляции.

В начале эксперимента стимул, наносимый на участки нейрона под пипетками, вызывал генерацию 1-2 ПД. Подпороговые ответы появлялись после нанесения 8-11 стимулов. После нанесения 20-25 стимулов генерация ПД в 93% случаев прекращалась (28 нейронов). Цитохалазин В вводили в одну из пипеток, что не оказывало влияния на развитие пластических реакций в течение первых 30-45 минут.

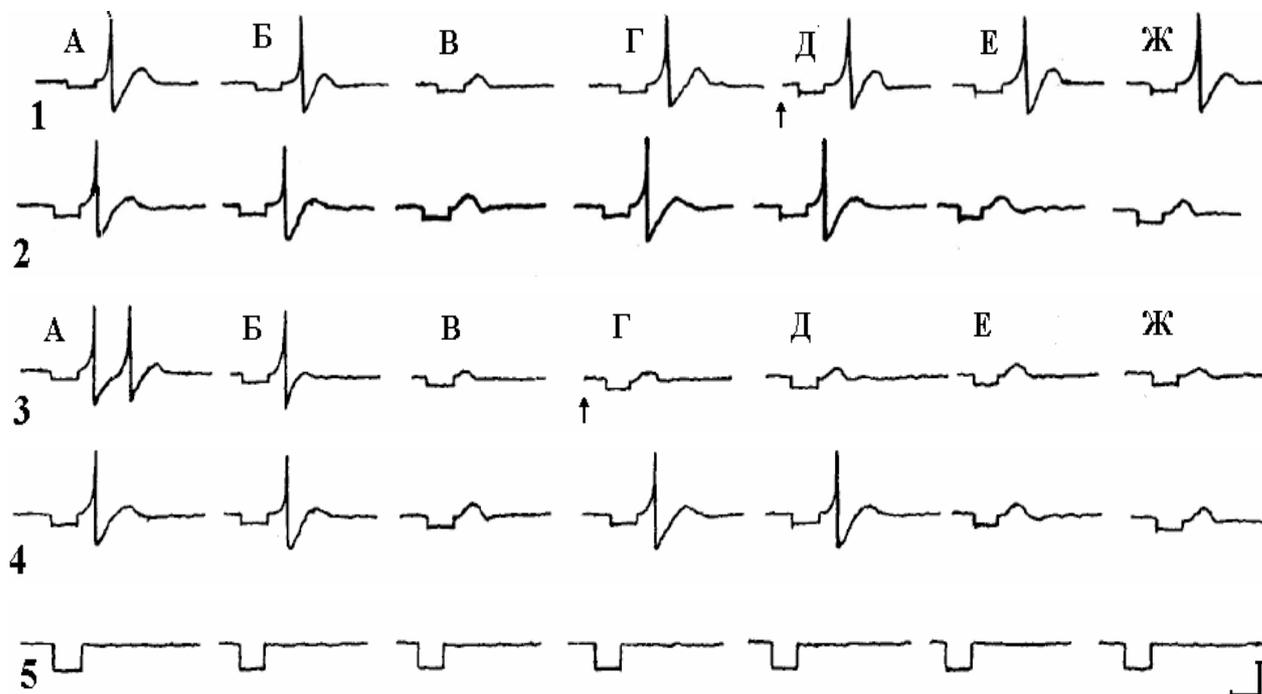
В дальнейшем одиночная стимуляция не приводила к появлению подпороговых ответов в 64,3% экспериментов. В 28,6% случаев появлялись пропуски генерации ПД. Однако эта стадия чередования двух типов реакций (ПД и подпороговых ответов) сохранялась даже после нанесения 50-100 стимулов. В 7,1% экспериментов количество ответов увеличивалось от одного ПД до 2-5.

В проведенных экспериментах в 28,6% случаев (14 нейронов) после введения в раствор микропипетки цитохалазина В и инкубации (30-45 минут) многократная одиночная стимуляция в некоторых случаях приводила к появлению подпороговых ответов, но не вызывала развития реакции привыкания.

Пластические свойства контрольного участка нейрона не изменялись - после нанесения 20-25 стимулов полностью прекращалась генерация ПД.

Парная (ассоциированная) стимуляция (22 нейрона) при воздействии цитохалазина В вызывала появление ПД только в 9% случаев (2 нейрона). Таким образом, из 22 проведенных экспериментов в 20 случаях не наблюдалось появления спайковых ответов. По критерию знаков появление спайковых ответов в этой серии экспериментов не является существенным событием. Пластические свойства контрольного участка нейрона не изменялись.

Для исследования эффектов стабилизации микрофиламентов на пластические свойства нейронов на участки клеток, у которых локальная электрическая стимуляция вызывала переход спайковых ответов в подпороговые, воздействовали фаллоидином. До воздействия проводили контрольную стимуляцию на двух участках. В случае если стимуляция каждого участка вызывала



**Рис. 5** Пример изменений пластических свойств сомы изолированных нейронов, обусловленных блокадой фаллоидином деполимеризации микрофиламентов небольшой зоны клетки.

1 - ответы нейрона на стимулы, подаваемые на участок, где проводилось введение фаллоидина в кончик микропипетки. Стрелкой обозначен момент аппликации.

2 - ответы нейрона на стимулы, подаваемые на другой участок сомы.

По фрагментам: 1-2 А-В – ответы сомы на первую серию стимулов (серия состояла из 12-16 стимулов). 1-2 Г – восстановление спайковых ответов после прекращения первой серии стимуляции. 1 Д – через 20 минут после аппликации фаллоидина. 1 Е – после нанесения 50 стимулов. 1 Ж – после нанесения 100 стимулов. 2 Д-Ж – вторая серия стимуляции (14 стимулов).

3 - ответы нейрона на стимулы, подаваемые на участок, где проводилось введение фаллоидина в кончик микропипетки. Стрелкой обозначен момент аппликации.

4 - ответы нейрона на стимулы, подаваемые на другой участок сомы.

По фрагментам: 3 А-В – ответы сомы на первые 16 стимулов. 3 Г-Д – аппликация фаллоидина и продолжение стимуляции с интервалом 0,5-3 секунды в течение 15 минут. 3 Е-Ж – стимуляция с интервалом 1-2 минуты в течение 30 минут.

4 А-В – ответы сомы на первую серию стимулов. 4 Г – восстановление спайковых ответов после прекращения стимуляции с интервалом 0,5-3 секунд в течение 15 минут. 4 Д-Ж – вторая серия стимуляции.

5 – запись стимулирующих токов. Калибровка: 50 мсек, 500 пА.

перестройку ответов, один из участков обрабатывали фаллоидином.

Было проведено несколько серий экспериментов. В первой серии экспериментов вещество в раствор микропипетки вводили после восстановления спайковых ответов, во второй серии – сразу после проведения стимуляции, вызвавшей подпороговые ответы, в третьей серии – на стадии чередования двух типов ответов.

В первой серии экспериментов исходно стимулы вызывали 1-2 ПД. Фаллоидин в раствор микропипетки начинали вводить после восстановления исходных ответов (1-2 ПД), и через 20-25 минут проводили повторную стимуляцию. В этом случае не наблюдалось перехода спайковых ответов в подпороговые после нанесения 100-150 стимулов (5 нейронов). На контрольном участке подпороговые ответы появлялись после 10-15 стимулов (рис. 5, 1-2).

Во второй серии экспериментов исходно стимулы вызывали 1-2 ПД. Фаллоидин в раствор микропипетки начинали вводить на стадии прекращения генерации спайковых ответов. Последующие 20 минут продолжали подавать стимулы с интервалом 0,5-3 секунды. Такая стимуляция поддерживала сохранение подпороговых ответов. Затем на этот участок, для определения времени сохранения перестройки реакции, подавали стимулы с интервалом 1-2 минуты. Восстановления спайковых ответов не наблюдалось в течение периода регистрации 1-1,5 часа (4 нейрона) (рис. 5, 3-4). На контрольном участке спайковые ответы (1-2 ПД) восстанавливались через 3-4 минуты после прекращения стимуляции.

В третьей серии экспериментов исходно стимулы вызывали 4-7 ПД. Фаллоидин в раствор микропипетки начинали вводить на стадии чередования подпороговых и спайковых ответов. В этом случае наблюдалось формирование стабильной перестройки реакции, но восстановления спайковых ответов не наблюдалось в течение периода регистрации 1-1,5 часа (6 нейронов). На контрольном участке время восстановления исходной реакции не изменялось (15-20 минут).

Перед введением фаллоидина и в процессе наблюдений регистрировали суммарные ионные токи на участке мембраны под пипеткой. Не было обнаружено их достоверных изменений на участках мембраны, обработанных фаллоидином. Изменения ответов, вызванные стимуляцией участка, не обработанного фаллоидином, сопровождалась перестройкой токов на этих участках мембраны.

### ***Влияние нарушений динамических перестроек тубулинового цитоскелета на пластические свойства нейронов***

Воздействие на систему микротрубочек осуществлялось введением в раствор микропипетки колхицина или таксола. Мономерная и полимеризованная форма белка тубулина (микротрубочки) находятся в клетке в состоянии динамического равновесия. Таксол взаимодействует с микротрубочками, нарушает реакцию деполимеризации и тем самым стабилизирует полимерную форму тубулина в клетке. Колхицин, взаимодействуя с мономерным тубулином, блокирует реакцию полимеризации и образование новых микротрубочек.

Для исследования влияний нарушения полимеризации тубулина на пластические свойства нейронов в раствор микропипетки вводили колхицин. В этой серии экспериментов, чтобы выбрать два участка сомы нейрона с определенными пластическими свойствами, проводили контрольную серию электрической стимуляции. Колхицин вводили в одну из пипеток после восстановления исходных ответов. Колхицин оказывал эффект на развитие пластических реакций через 10-15 минут.

Одиночная стимуляция (в случае, если исходно стимул вызывал 1-2 ПД) обработанных участков в 42,8% экспериментов (15 нейронов) не вызывала появления подпороговых ответов после нанесения 150-200 стимулов. В 57,1% экспериментов (20 нейронов) наблюдалось изменение динамики пластических реакций. Первые пропуски спайковых ответов появлялись только после нанесения 50-100 стимулов. Чередование ПД и подпороговых ответов наблюдалось после нанесения 300-500 и более стимулов. Прекращение стимуляции через 20-30 секунд приводило к восстановлению исходной реакции (в контроле через 3-4 минуты). Хотя многократная одиночная стимуляция в некоторых случаях приводила к появлению подпороговых ответов, однако она не вызывала развития реакции привыкания.

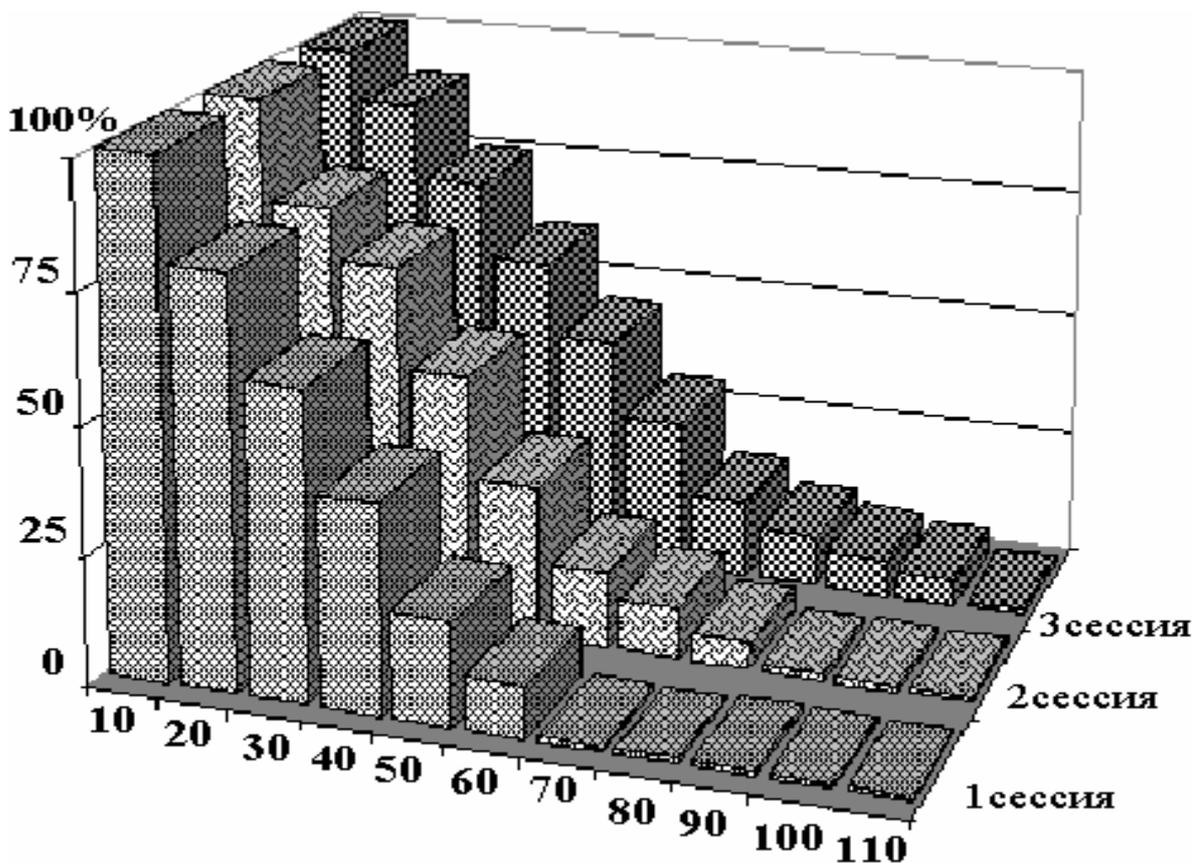
Пластические свойства контрольного участка нейрона не менялись - подпороговые ответы появлялись после нанесения 8-11 стимулов. После нанесения 12-15 стимулов генерация ПД полностью прекращалась. Восстановление исходной реакции наблюдалось через 3-4 минуты.

При парной стимуляции (14 нейронов) переход подпороговых ответов в ПД не происходил даже после нанесения 50-100 стимулов. Пластические свойства контрольного участка нейрона не менялись.

Для исследования влияния стабилизации микротрубочек на пластические свойства нейронов в раствор микропипетки вводили таксол. Эффекты таксола обнаруживались через 20-30 мин. Динамика изменения ответов была близка к контрольной, независимо от вида стимуляции. Восстановление исходных реакций происходило быстрее, чем в контрольных условиях. Повторные сессии стимуляции через пипетку с таксолом показали, что для изменения ответов необходимо подавать большее количество воздействий.

Графики изменения исходных реакций, представленных генерацией 4-6 ПД в трех последовательных сессиях демонстрирует рисунок 6 (усреднение по 23 нейронам). Восстановление ПД в ответе после первой серии стимуляции происходило на 40-60% быстрее, чем до обработки участка мембраны таксолом. Во второй сессии количество стимулов, приводящее к развитию пластической реакции, увеличивалось на 20-25% (в контроле уменьшается). Время сохранения нового вида ответов не менялось относительно первой серии. В третьей и последующих сессиях количество стимулов, необходимое для изменения реакции, продолжало увеличиваться (Рис. 6). Пластические свойства контрольного участка нейрона не изменялись. При повторной сессии стимуляции через контрольную пипетку изменения ответов происходили в результате применения меньшего количества стимулов.

*Использованный комплекс подходов, методов и локальное применение в зоне воздействия экзогенных лигандов цитоскелета (фаллоидина, цитохалазина, таксола, колхицина) позволило получить экспериментальное подтверждение участия цитоскелета в процессах изменения пластических свойств соматической мембраны. Преимущество и уникальность представленной серии исследований заключается в том, что на одном объекте - изолированной соме нейронов - для исследования механизмов нейрональной пластичности использовался весь известный набор экзогенных лигандов актинового и тубулинового цитоскелета. Это позволило экспериментально показать, что цитоскелет принимает участие, а возможно, и контролирует формирование и*



**Рис. 6** Диаграммы изменений пластических свойств сомы изолированных нейронов, обусловленных блокадой таксолем деполимеризации микротрубочек небольшой зоны клетки в трех последовательных сессиях стимуляции

1 сессия - динамика перестройки ответов изолированных нейронов, вызванная первой серией стимуляции участков сомы (начало серии стимуляции через 20 минут после аппликации таксола).

2 сессия - динамика перестройки ответов изолированных нейронов во второй серии стимуляции участков сомы.

3 сессия - динамика перестройки ответов изолированных нейронов, вызванная третьей серией стимуляции участков сомы.

Исходная реакция в группе (23 нейрона) была представлена генерацией 4-7 ПД.

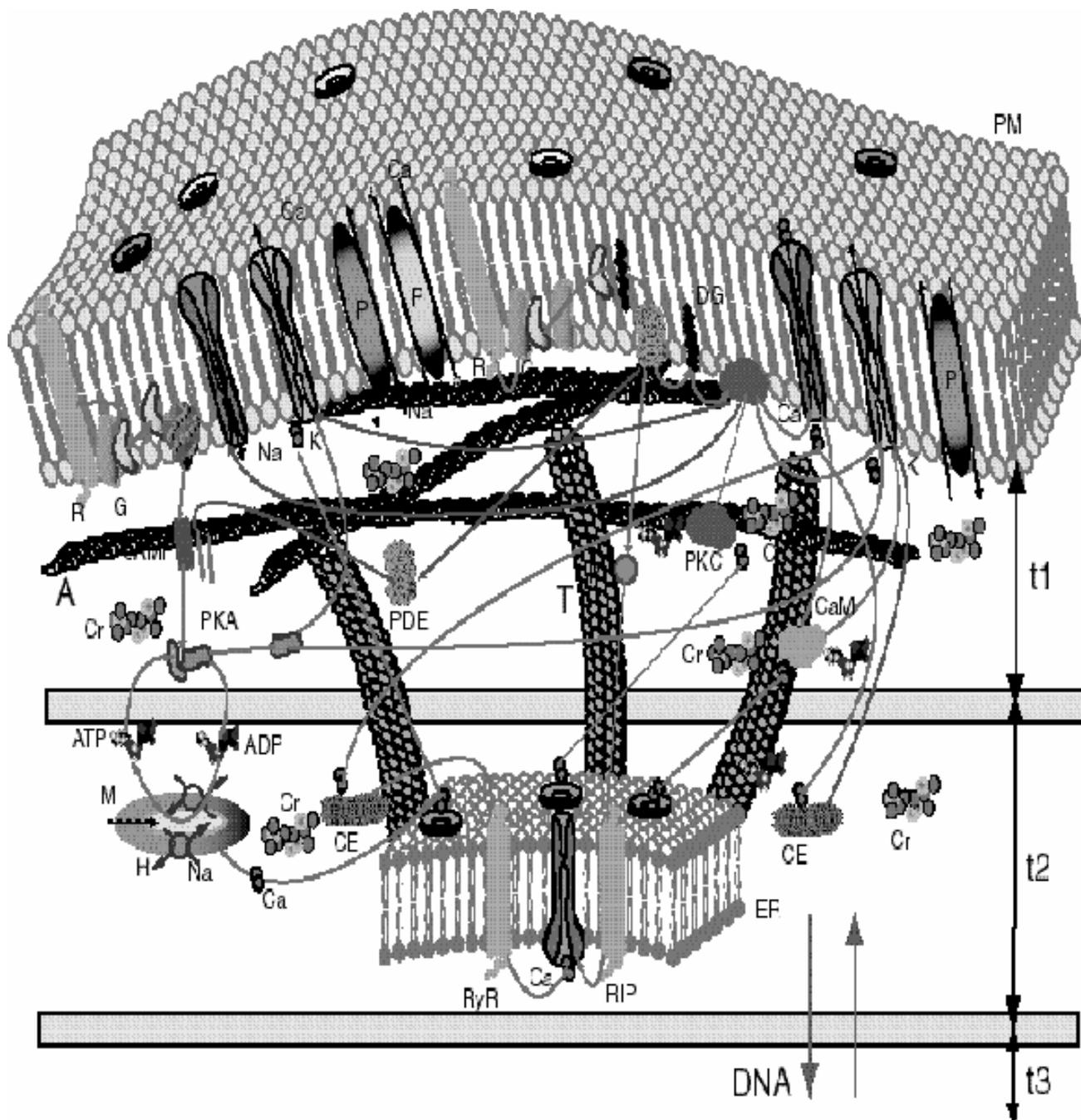
Оси: Y - 100% - исходный ответ нейрона на стимул, 0% – подпороговые ответы. X - номер стимула в серии.

*сохранение пластических реакций сомы нейронов [Запара, Ратушняк, 1991; Запара и др., 1996; Ratushnyak et al., 1998; Zapara et al., 1999].*

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Современные методы клеточной и молекулярной биологии позволили показать, что преобразования нейрональной активности, вызванные процедурами обучения, охватывают различные отрезки времени и затрагивают многие структурно-функциональные участки и пространственные области нейронов (рис.7). Однако большинство развивающихся во время обучения биохимических, биофизических и ультраструктурных изменений регистрируемых параметров нервных клеток спустя некоторое время возвращаются к базовому уровню. Это свидетельствует об отражении в них промежуточных процессов, которые важны для определенного периода и необходимы для инициирования других преобразований в нейронах, ответственных за обучение [Котляр, 1986]. Невозможно выделить какой-либо наиболее значимый процесс биофизических, биохимических или ультраструктурных преобразований, который является специфическим для феноменов обучения и адаптации. Основные данные о механизмах обучения были получены в процессе исследований синаптической пластичности. Сложилось представление, что обучение и память основаны исключительно на синаптической пластичности. Исследования роли нейрональной пластичности в организации работы мозга становятся актуальными в связи с тем, что за последнее время накопилось достаточное количество фактов, указывающих, что синаптические токи могут контролироваться пластическими изменениями биофизических свойств внесинаптической мембраны [Семьянов, 2002]. Благодаря изменениям биофизических свойств внесинаптической мембраны (проводимости, возбудимости, длительности токов) синаптические токи могут быть подавлены или усилены. Результаты проведенных нами исследований показали, что изменения биофизических свойств соматической мембраны могут быть вызваны локальными электрическими воздействиями по алгоритмам выработки привыкания и ассоциативного обучения. Изменения ответов сомы нейронов имели ряд особенностей, характерных для привыкания и ассоциативного обучения. Необходимо подчеркнуть, что пластические изменения ответов, вызванные воздействиями на небольшие участки мембраны, не сопровождались генерализованной модификацией свойств плазматической мембраны сомы нейрона. Не были выявлены изменения МП клетки и порога генерации ПД при внутриклеточном нанесении стимулов. Были обнаружены локальные изменения возбудимости сомы нейрона, которые на определенных этапах формирования реакции сопровождались изменением ионной проводимости мембраны. Фармакологическая модификация калиевой или кальциевой проводимости небольших участков мембраны изменяли пластические свойства нейрона, и изменения реакции нейрона проявлялись только при воздействиях на модифицированные участки мембраны [Ратушняк, Запара, 1989].

Полученные нами [Запара, Ратушняк, Штарк, 1988] данные являются одними из первых



**Рис. 7** Упрощенное схематическое представление взаимодействия вторичных мессенджеров, ионных каналов и цитоскелета в зонах локальной пластичности клетки

t1 - миллисекунды, секунды. Нейрон деполяризуется в результате активации метаботропных каналов (связанных с рецепторами медиаторов и взаимодействующих с G-белками). Мембранная деполяризация активирует ионотропные каналы, вызывая приток ионов в клетку, в том числе  $Ca^{2+}$ . Диацилглицерол, арахидоновая кислота и инозитолтрифосфат активируются фосфолипазами.  $Ca^{2+}$  активизирует РКС, которая после этого перемещается к плазматической мембране.  $Ca^{2+}$  также активизирует  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимые киназы (CaM), которые подвергаются аутофосфорилированию, что поддерживает активность CaM независимо от  $Ca^{2+}$ . РКС и CaM киназа могут блокировать  $Ca^{2+}$ ,  $K^{+}$  и другие каналы прямым фосфорилированием. Трансмембранные ионные сигналы в t1 период контролирует генерацию ионных токов, метаболические реакции, а также образование связей мембранных белков с цитоскелетом и

перестройки цитоскелета. Перестройки цитоскелета происходит благодаря активации различных типов актин-ассоциированных белков: кэппирующих белков типа CapZ и тропомодулин; разъединяющих протеинов типа гельзолин; мономер связывающих протеинов типа профилин.

t2 - секунды, минуты. Повышение концентрации  $Ca^{2+}$  активирует Ca-связывающие белки (например калекситин). Фосфорилирование CE PKC вызывает его транслокацию к мембране, где он блокирует K-каналы, делая мембрану более легковозбудимый к дальнейшим деполяризующим стимулам. Также CE, вызывает выход  $Ca^{2+}$  через каналы связанные с RyR на мембране ER и возможно на синаптической, что приводит к усилению  $Ca^{2+}$  сигналов. IP3 также вызывает выход  $Ca^{2+}$ , через активацию IP3 рецепторов ER. Состояние цитоскелета также регулируется  $Ca^{2+}$ -зависимыми протеинами.

PM - плазматическая мембрана; R - рецепторы; G - G-белки; AC - аденилатциклаза; cAMP - циклический аденозинмонофосфат; PKA - протеинкиназа-A; PIP2 - фосфатидилинозитол-4,5дифосфат; PDE - фосфодиэстераза; DG - диацилглицерол; IP3 - инозитол1,4,5трифосфата; PKC - протеинкиназа-C; C - кальпаин; ER - эндоплазматический ретикулум; RyR – рианодиновые рецепторы; CE -  $Ca^{2+}$ связывающий белок калекситин. T - тубулин; A - актин; MAP2 - ассоциированный с микротрубочками белок; Ad - аддисин; S - спектрин; Ca - ионы кальция; H ионы водорода; Na - натриевый канал; K - калиевый канал;  $Ca^{+}$  - кальциевый канал; K2 - кальций зависимый K канал; M митохондрии; "+" положительная связь; "-" отрицательная связь; t1-t3 временные этапы развития реакции.

экспериментальных доказательств наличия субклеточных механизмов, которые позволяют соматическому компартменту нейронов локально регулировать характеристики электрогенных структур. Локальная модификация электрогенных структур позволяет нейрону дифференцированно оценивать биологическое значение нескольких воздействий. Проявлением локальных механизмов регуляции нейрональной пластичности является изменение возбудимости и ионной проводимости отдельных участков соматической мембраны, вызванное локальной электрической стимуляцией по алгоритмам выработки привыкания и ассоциативного обучения. Локальные изменения биофизических характеристик плазматической мембраны, вероятно, позволяют нейрону избирательно регулировать синаптические токи и таким образом определять приоритеты информационных потоков нейрональной сети, в состав которой он входит.

Последовательные электрические раздражения участка сомы изолированного нейрона вызывали пластические изменения ответов, для которых был характерен ряд закономерностей, обнаруженных и описанных при использовании аналогичных алгоритмов воздействия (форм обучения) на менее редуцированных препаратах нервной системы и целом организме. Локальные пластические изменения ответов имели следующие свойства: вероятность и динамика уменьшения эффективности вызова спайковых ответов находилась в зависимости от интенсивности воздействия; обратимость реакции (при прекращении стимуляции наблюдалось самопроизвольное восстановление исходного вида ответов); повторение процедуры стимуляции вызывало

перестройку ответов после нанесения меньшего числа стимулов; дифференцировка стимулов по интенсивности и месту нанесения воздействий (при изменении параметров стимула или места нанесения раздражения регистрировался исходный вид ответа). Эти данные об особенностях локальных пластических изменений возбудимости электрогенной мембраны сомы нейрона поддерживают представления о преемственности принципов организации взаимоотношений со средой на всех выделяемых уровнях организации живых систем. Однако необходимо отдавать отчет, что известные феномены обучения – это функция всего мозга, а избирательное изменение возбудимости плазматической мембраны – только вклад нейрона в процессы обучения.

Пластические изменения ответов нейронов сопровождались локальными изменениями проницаемости участков мембраны для ионов. Было обнаружено, что разнонаправленные перестройки ответов сопровождались однотипными изменениями суммарных токов. Локальное увеличение входящих токов наблюдалось в нормальной и безнатриевой среде. Эти данные свидетельствуют об увеличении кальциевой проводимости при разнонаправленных перестройках ответов. Разное направление перестройки ответов при увеличении вхождения кальция может свидетельствовать об участии в этих процессах нескольких механизмов, определяющих направление изменения клеточного ответа. Можно предположить, что в перестройке ответов решающую роль играет не ионизированный кальций, переносимый этим током, а определенные биохимические и структурные процессы, в регуляции которых принимают участие эти ионы. Необходимо особо отметить, что период наибольшего увеличения амплитуды ионных токов совпадал с появлением нового вида ответов и чередования двух типов реакции нейронов на стимул. А по мере формирования стабильной перестройки ответов наблюдалось возвращение пиковой амплитуды токов к базовому уровню. Эти данные подтверждают закономерности развития процессов, обуславливающих различные формы обучения. Вероятно, зарегистрированное увеличение вхождения в клетку ионов кальция может инициировать ультраструктурные перестройки межмолекулярных связей и цитоскелета нейрона. Увеличение вхождения в клетку ионов кальция контролирует генерацию ионных токов, метаболические реакции, а также образование связей мембранных белков и цитоскелета и перестройки цитоскелета. Известно, что такие перестройки цитоскелета могут, не изменяя характеристик одиночных ионных каналов, приводить к уменьшению трансмембранных ионных токов соматической мембраны [Rosenmund, Westbrook, 1993]. Ионы кальция могут усиливать деполимеризацию ряда цитоскелетных белков (в частности, актина), активируя кальций-зависимые протеазы (кальпаины) [Чистякова, Парфенова, 1989; Perlmutter et al. 1990; Vanderklish et al., 1995]. Состояние цитоскелета регулируется также протеинкиназами [Aoki, Siekevitz, 1985; Bennet, Gardner, Steiner, 1988; Prekeris et al., 1996].

Перестройки цитоскелета могут происходить под влиянием внешних воздействий и оказывать влияние на формирование и сохранение пластических реакций [Hatada et al., 2000]. Высокоспецифические лиганды (фаллоидин, таксол, колхицин, цитохалазин В), которые взаимодействуют с мономерными или полимерными формами актина и тубулина, нарушают

изменения перестройки цитоскелета, которые в норме контролируются вторичными посредниками. Поэтому экспериментальные нарушения перестроек цитоскелета, вызванные экзогенными лигандами, могут вносить существенные коррекции в процессы формирования, сохранения и повторной выработки пластических реакций [Ratushnyak et al., 1997]. Известно, что цитоскелет участвует во многих клеточных процессах, поэтому обычно возникают трудности в интерпретации действий цитостатиков на клетку. В используемых нами моделях пластические изменения реакций, обусловленные действием цитостатиков, происходили на небольших участках соматической мембраны, и модификации цитоскелета тоже, вероятно, происходили локально, о чем свидетельствует динамика формирования и время сохранения пластических реакций на других участках сомы нейрона.

Было обнаружено, что нарушение процессов образования полимерных форм актина и тубулина в ряде случаев не препятствует появлению нового типа ответов, но блокирует развитие стадии стабильной перестройки ответов [Запара и др., 1996; Ratushnyak et al., 1998; Zapara et al., 1999]. Эти данные позволяют предположить, что микроструктурные перестройки, в которых участвуют актиновый и тубулиновый цитоскелет, выполняют определенную роль на этапе закрепления, сохранения "принятого нейроном решения" изменить ответ на внешнее воздействие.

Изменение состояния актинового цитоскелета - блокада деполимеризации микрофиламентов с помощью фаллоидина может – изменять пластические свойства, не оказывая прямого воздействия на электрические характеристики соматической мембраны. Обработка цитоскелета клетки перед стимуляцией, которая вызывает кратковременные пластические изменения ответов, может приводить к появлению устойчивости нейрона (исходной реакции) к такой стимуляции. Обработка цитоскелета клетки фаллоидином после изменений ответа, вызванных стимуляцией, увеличивает время сохранения сформированного ответа, и переводит кратковременные изменения ответов в долговременные [Запара, Ратушняк, 1991; Запара и др., 1996; Ratushnyak et al., 1998; Zapara et al., 1999].

Изменение состояния тубулинового цитоскелета, вызванное взаимодействием таксола с микротрубочками (блокада их деполимеризации), приводила к сокращению времени сохранения нового ответа и возникновению зависимости динамики формирования пластической реакции от серии стимуляции. Во второй и последующих сериях количество стимулов, необходимое для изменения ответов, увеличивалось [Запара и др., 1996; Ratushnyak et al., 1998; Zapara et al., 1999]. Эффекты взаимодействия таксола с микротрубочками, которые проявлялись в увеличении количества воздействий (времени), необходимых для формирования пластических нейрональных реакций, при повторных сериях, вероятно, свидетельствуют о необходимости поставки в зону пластических перестроек ответов новых молекул.

Данные, полученные на нейронах моллюсков и срезах гиппокампа, поддерживают предположения о том, что пластические изменения ответов нейронов, наряду с другими субклеточными процессами, могут быть обусловлены микроструктурными перестройками, вызванными динамическими переходами полимерная-мономерная форма белков цитоскелета. В

наших экспериментах [Ratushnyak et al., 1998; Zapara et al., 1999] показано, что структурные перестройки, необходимые для формирования пластических нейрональных изменений реакций, могут происходить в небольшом объеме клетки. В экспериментах на срезах гиппокампа показано, что структурные перестройки могут, не изменяя базовую активность нейронов обуславливать синаптическую пластичность. Структурные изменения могут затрагивать количество молекул, которые не всегда обнаруживаются методами конфокальной микроскопии [Kim, Lisman, 1999]. Поэтому для исследования роли микроструктурных перестроек, обуславливающих пластические свойства нейронов, наряду с другими методами могут быть эффективно использованы электрофизиологические методы.

Известно, что микроструктурные перестройки цитоскелета контролируются многочисленными эндогенными лигандами (минорными белками цитоскелета) [Carlier et al. 1997; Moon, Drubin, 1995; Wu, 1995]. Активность минорных белков цитоскелета регулируется сигнальными системами и зависит от внутриклеточных процессов и взаимодействия клетки с внешней средой.

Известны механизмы (кальций связывающие белки, депо) благодаря, которым ионы кальция локально управляют активностью своих мишеней. Вероятно, возможна структурная организация локальной регуляции активности одноименных молекул (рецепторов, каналов, ферментов) клетки. Системы вторичных посредников опосредованно через регуляцию активности минорных белков могут вызывать перестройку цитоскелета в небольших компартментах клетки и таким образом, локально управляя реорганизацией структуры взаимодействий между молекулами, изменять рецепцию воздействий.

Вероятно, внешние воздействия на клетку трансформируются в микроструктурные перестройки, которые позволяют сохранять некоторое время взаимодействие между молекулами, которые участвовали в генерации нового типа ответов и выполняют функцию кратковременной клеточной памяти.

Локальные экспериментальные электрические воздействия вызвали кратковременные пластические изменения ответов сомы изолированных нейронов. В естественных условиях несинаптическая мембрана нейронов мозга, наиболее вероятно, может испытывать локальные воздействия в процессе взаимодействия внесинаптических рецепторов с лигандами "объемной" передачи информации, во время патологических процессов и фармакологических воздействий на мозг. Известно, что одним из условий формирования долговременных адаптивных реакций является применение каких-либо достаточно сильных (экстремальных) воздействий. Механическая дезагрегация нейронов в растворах низких концентраций веществ моделирует такие компоненты патологических состояний, как воздействие на нейроны неспецифических повреждающих факторов и появление в межклеточном пространстве некоторых биологически активных веществ в ультранизких концентрация. Полученные данные показывают, что одновременное воздействие на сому изолированных нейронов неспецифических повреждающих факторов и низких концентраций веществ способствует формированию долговременных

приспособительных реакций нейронов и повышает биологическую значимость низких концентраций этих веществ.

Использование в качестве сильных воздействий гипоксического стресса позволило обнаружить, что одновременная мобилизация эволюционно сформированных заложенных адаптивных механизмов перехода к анаэробнозису и воздействие низких концентраций веществ способствует формированию новых приспособительных реакций нейронов и повышает биологическую значимость низких концентраций веществ, что проявляется в снижении реакции нейронов на физиологические концентрации тестируемых веществ.

Инкубация нейронов в растворах низких концентраций без экстремальных воздействий не вызывала формирования адаптивных реакций. Такие различия реакций нейронов на изолированные и сочетанные воздействия можно объяснить следующим образом. Экстремальные воздействия, которые испытывают нейроны, индуцируют базисные или специфические по отношению к воздействию внутриклеточные механизмы, направленные на возвращение основных характеристик клетки - ионного гомеостаза, pH, уровня АТФ - к норме. Экспрессируются функциональные микродомены регуляторных, эффекторных и других типов протеинов, которые участвуют в эволюционно сформированных процессах адаптации к изменениям среды. Одновременная экспрессия таких специализированных микродоменов и активация небольшого числа рецепторов тестируемых лигандов может вызвать образование между ними взаимодействий, возможно, структурных. Такая интерпретация полученных результатов соответствует современной концепции о возможности длительного физического взаимодействия между молекулами-участниками передачи сигналов и образовании функционально упорядоченных микродоменов. Возможно, после образования связей, вызванных сочетанными слабыми и экстремальными воздействиями, активация рецепторов тестируемых веществ будет инициировать активацию микродоменов, контролирующей ионный гомеостаз. Активация этих микродоменов может уменьшить величину изменения мембранного потенциала, вызванную аппликацией тестируемых веществ. Однако предположение о формировании структурных взаимодействий между микродоменами, которые участвуют в рецепции нескольких воздействий, как физической основы образования временных связей, требует дальнейшей экспериментальной проверки.

## ***ВЫВОДЫ***

1. Локальная электрическая стимуляция сомы изолированных нейронов по алгоритмам выработки привыкания и ассоциативного обучения вызывает пластические изменения ответов, которые имеют ряд особенностей, характерных для этих форм научения на уровне организма.
2. Пластические изменения ответов сомы нейронов, вызванные локальными воздействиями, не требуют генерализованной модификации структур клетки обуславливающих изменение потенциала покоя или порога генерации потенциалов действия. Пластические изменения

ответов нейронов могут сопровождаться локальными изменениями возбудимости сомы нервных клеток.

3. Реакция нейрона на внешнее воздействие может быть обусловлена состоянием ионной проницаемостью небольших участков соматической мембраны. Экспериментальная модификация состояния кальций зависимых калиевых каналов и/или проницаемости для ионов кальция небольших участков соматической мембраны может вызвать перестройку реакции нейрона на стимуляцию. Изменения пластических реакций нейрона, вызванные локальной фармакологической модификацией мембраны, проявляются только при воздействиях на модифицированный участок мембраны.
4. Процесс формирования пластических реакций может сопровождаться локальным изменением ионных токов только на том участке клетки, где происходят воздействия. Максимальное изменение ионных токов наблюдаются на этапе появления нового типа ответов, однако когда пластические изменения реакции нейронов сформированы, параметры ионных токов на участке мембраны возвращаются к исходному уровню. Формирование разнонаправленных пластических изменений нейрональных реакций сопровождается локальным однотипным изменением ионных токов плазматической мембраны.
5. Преприкондиционирование нейронов низкими концентрациями веществ одновременно с экстремальными воздействиями (неспецифическим повреждением клеток) или адекватными воздействиями, активирующими эволюционно сформированные защитные механизмы (переход от аэробноз к анаэробнозу), позволяет формировать долговременные приспособительные реакции клеток, которые проявляются в снижении нейрональных реакций на физиологические концентрации тестируемых веществ.
6. Нарушение образования новых актиновых филаментов или микротрубочек, вызванное экзогенными лигандами актина или тубулина, либо полностью блокирует формирование пластических изменений ответов, либо эффект проявляется в том, что появление нового ответа не сопровождается стабильной пластической перестройкой ответов.
7. Взаимодействие фаллоидина с микрофиламентами и нарушение их деполимеризации блокирует формирование пластических перестроек ответов. Эти данные свидетельствуют о том, что стабилизация актинового цитоскелета может быть одним из механизмов сохранения структуры взаимодействий между молекулами, обуславливающими определенный тип ответов, и выполняет функцию памяти на клеточном уровне.
8. Взаимодействие таксола с микротрубочками и нарушение их деполимеризации проявлялись в увеличении количества воздействий необходимых для формирования изменений ответов при повторении сессий выработки пластических реакций. В контрольных условиях наблюдалось сокращение числа воздействий, необходимых для повторного формирования пластических реакций.
9. Использование всего известного набора экзогенных лигандов, модулирующих динамические перестройки актинового и тубулинового цитоскелета, позволило экспериментально показать,

что цитоскелет принимает участие, а возможно, и контролирует процессы формирования и сохранения локальных пластических изменений возбудимости соматической мембраны нейронов.

***СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:***

1. Analogue of the conditioned reflex of *Helix pomatia*. // Cellular and molecular neurobiology. 1982, v.2, P.71-80. (соавт. Shtark M.B., Tretyakov V.P., Deriy B.N.).
2. The plasticity of a simple nervous system // In. "Neuronal plasticity and memory formation", (Eds. A. Marsan, H. Matties), Raven press, N-York, 1982, P. 271-283. (соавт. Shtark M.B., Grinkevich L.N., Tretyakov V.P., Deriy B.N.)
3. Закономерности миграции изолированных нейронов моллюсков при регенерации "in vitro" // Гомеостатические процессы в изолированных системах и организме. Сб. науч. трудов. - ИБФ СО АН СССР Красноярск, 1984, с. 211-216. (соавт. Ратушняк А.С.).
4. Локальные изменения ионных токов при пластических изменениях электрогенеза нейрона // Тез. Всесоюз. конф. "Простые нервные системы и их значение для теории и практики". Казань 1985 с.76-78. (соавт. Ратушняк А.С.).
5. Локальные изменения трансмембранных ионных токов при пластических перестройках электрогенеза изолированных нейронов прудовика // Журн. высш. нервн. деят. 1988, т. XXX VIII, вып. 1 с. 140-145. (соавт. Ратушняк А.С., Штарк М. Б.)
6. Моделирование на изолированных нейронах пластических перестроек функциональной активности // Мат. II Всесоюз. конф. "Простые нервные системы и их значение для теории и практики" Л., Наука, с.120-123, 1988. (соавт. Ратушняк А.С.)
7. Межклеточные взаимодействия в диссоциированной культуре нейронов при реагрегации // Мат. Всесоюз. конф. "Интегративная деятельность нейрона: молекулярные основы" М Наука, 1988,с.102-103. (соавт. Ратушняк А.С.).
8. Моделирование нескольких зон пластичности в пределах одного нейрона // В сб. Имитация систем в биологии и медицине. (Мат 6-го Пражского междунар. симп Соц. стран). ЧССР, Прага. 1988, с. 76-80. (соавт. Ратушняк А.С.)
9. Перестройка реакции нейрона при локальной модификации мембраны // Докл. АН СССР, 1989, т. 309, № 4, с. 1012-1014. (соавт. Ратушняк А.С.).
10. Experimental analysis of mechanism recording information by the molecular neuroprocessor // abs. In: Second Intern. Conf. "Molecular electronics and biocomputers." Moscow. 1989, p 108-109. (соавт. Ratushnyak A.S.)
11. Local changes of transmembrane currents at plastic reorganizations of electrogenesis of isolated neurons of the snail. // Neurosci. Behav. Physiol., 1989, v.19, № 3, p. 140-145. (соавт. Ratushnyak A.S., Shtark M.B.).

12. The molecular mechanisms of the plastic changes of the threshold for generation an action potential on the local areas of the somatic membrane // Abc. "Fourth conference on the neurobiology of learning and memory" Memory: organization and locus of change. Irvine, California, 1990, p. 66. (соавт. Ratushnyak A.S.).
13. Влияние на локальную пластичность соматической мембраны изолированных нейронов стабилизации цитоскелетных структур // Мат. II Всес. симп. "Возбудимые клетки в культуре ткани", Пущино. 1990. ОНТИ НЦБИ АН СССР, с. 152-155. (соавт. Ратушняк А.С.).
14. Influences on plastic properties of the isolated neurons by gangliosides // VIII international neurobiological symposium. Magdeburg, GDR, 1990 p. 292-296. (соавт. Ratushnyak A.S.).
15. Локальное увеличение кальциевой проводимости при пластических реакциях изолированных нейронов // В сб. III Всесоюз. конф. по нейронаукам. Киев, 1990 с. 22-23. (соавт. Ратушняк А.С.).
16. Механизмы обработки и записи информации в молекулярных нейропроцессорных системах // В сб.: Второго совещ. "Физические основы построения устройств обработки информации на молекулярном уровне". М. 1990, с. 18-19. (соавт. Ратушняк А.С.).
17. Experimental analysis of mechanisms of information fixation by means of molecular neuroprocessor // Molecular Electronics, ed. P.I. Lazarev, Kluwer Acadmic Publishers. 1991, p. 219-225. (соавт. Ratushnyak A.S.).
18. Влияние на перестройку реакции нейрона стабилизации микрофиламентов // Докл. АН СССР, 1991, т. 318, № 2, с. 492-495. (соавт. Ратушняк А.С.).
19. Экспериментальный анализ механизмов обработки и фиксации информации в молекулярных нейропроцессорах // В сб.: Всесоюз. школа-семинар по биомолекулярному компьютерингу. М1991: с.72. (соавт. Ратушняк А.С.).
20. Information processing by neuron as processor of neurocomputer system // The Institute of Electricaland Electronics Engineers Russian Neural Net works Society Simposium "Neuroinformatics and Neurocomputers", (IEEE/RNNS) p.71-81. Rostov-On-Don, 1992. (соавт. Ratushnyak A.S.).
21. Экспериментальная модуляция синаптической пластичности // В сб. Проблемы нейрокибернетики. Ростов-на-Дону, 1992, с.210-211. (соавт. Егорушкина Н.В., Ратушняк А.С.)
22. Молекулярная динамика пластичности модельного входа нейрона // В сб. Проблемы нейрокибернетики. Ростов-на-Дону, 1992, с. 216-218. (соавт. Ратушняк А.С.).
23. Experimental analysis of principles of information processing by neuron. // Optoelectronics, Instrumentation and Data Processing, no 2, p. 61-65. Allepton press, N- Y, 1993. (соавт. Ratushnyak A.S.).

24. Влияние изменения динамического равновесия в системах микротрубочек и микрофиламентов на пластические реакции нейрона. Журнал высш. нервн. деят. 1996, т.46 вып.2 с. 355- 362. (соавт. Ратушняк А.С., Жарких А.А., Ратушняк О.А.)
25. Взаимосвязь молекулярной динамики цитоскелета и нейрональной пластичности // III Съезд физиологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 1997. Изд. СО РАМН. с. 187-188. (соавт. Ратушняк А.С., Жарких А.А.).
26. Effect of change in dynamic equilibrium in systems of microtubules and microfilaments on the plastical responses of neurons. // Neurosci. behav. physiol., 1997. vol. 27, no. 4, p. 353-359. (соавт. Ratushnyak A.S., Zharkikh A.A., Ratushnyak O.A.)
27. Влияние динамических перестроек цитоскелета на формирование и сохранение нейрональных пластических реакций // Сб. тр. XVII съезда физиологов России, Ростов-на-Дону 1998 г. с. 149-150. (соавт. Ратушняк А.С., Симонова О.Г.)
28. Влияние динамического состояния цитоскелета на нейрональную пластичность. Российский физиол. журн., 1999, т. 85, № 1, с. 128-138. (соавт. Симонова О.Г., Жарких А.А., Ратушняк А.С.)
29. Structural microreorganizations as the possible mechanism of security of specificity of neuronal responses // International conference "Conceptual advances in the studies of associative learning and memory" Moscow, 1999, p. 109-114. (соавт. Simonova O.G., Ratushnyak A.S.)
30. Влияние "потенцированного" морфина на электрические параметры изолированных нейронов // Бюллетень Сибирского отделения РАМН, N-1, 1999, с. 91-93. (соавт. Симонова О.Г., Ратушняк А.С., Эпштейн О.И.)
31. Влияние морфина и биологически активного вещества (БАВ-С) на электрические параметры изолированных нейронов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины N-10, 1999, 392-398. (соавт. Симонова О.Г., Ратушняк А.С., Эпштейн О.И.)
32. The effect of the cytoskeleton dynamic condition on neuronal plasticity. Formerly I.M. Sechenov Physiol. J., 1999, v. 85, p 128-138. (соавт. Simonova O.G., Ratushnyak A.S.)
33. Influence of proteins controlling reorganization of cytoskeleton and modifiers of their activity on neuronal plasticity // VI East European Conference the International Society for Invertebrate Neurobiology ISIN, Moscow-Pushino, 2000, p 137-138. (соавт. Simonova O.G., Ratushnyak A.S.).
34. Mechanisms of behavioral effects of potentiated forms of morphine // Biull Eksp Biol Med. 2000, 128(12):619-622. (соавт. Epshtein O.I., Pavlov I.F., Simonova O.G.)
35. The effects of the dynamic state of the cytoskeleton on neuronal plasticity // Neurosci. Behav. Physiol. 2000, no. 3, p. 347-355. (соавт. Simonova O.G., Zharkikh A.A., Ratushnyak A.S.)
36. Исследование комплексного действия малых доз модуляторов системы фосфодиэстераз и алкалоидных агонистов опиатных рецепторов на реакции изолированных нейронов // В сб. материалов XVIII Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова, Казань 2001, с. 156-157. (соавт. Симонова О.Г., Эпштейн О.И. Ратушняк А.С.)

37. Роль структурно-функциональных элементов внутриклеточных сигнально-управляющих систем // В сб. материалов XVIII Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова, Казань 2001, 157-159. (соавт. Симонова О.Г., Ратушняк А.С.)
38. Reaction of neurons to alkaloid agonists of opioid receptors during modulation of phosphodiesterase // Bull. Exp. Biol. Med. 2003; Suppl. 1, p. 17-19. (соавт. Ratushnyak A.S., Simonova O.G., Epshtein O.I., Shtark M.B.).
39. Ionic mechanisms underlying depolarizing responses neurons of Lymnaea Stagnalis to hypoxia and methods of correction // В сбор. VII East European Conference of the International Society For Invertebrate Neurobiology "Simpler Nervous Systems" Kaliningrad, 2003, p. 121. (соавт. Simonova O.G, Ratushniak A.S.).
40. Структурно-функциональные механизмы пластичности нейронов in vitro // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 2004, т. 90, № 8, ч. 1, с. 207. (соавт. Симонова О.Г., Ратушняк А.С., Штарк М.Б., Эпштейн О.И.)
41. Клеточные механизмы реакций нейронов на гипоксию // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 2004, т. 90, № 8, ч. 1, с. 42-43. (соавт. Жарких А.А., Симонова О.Г., Ратушняк А.С.).
42. Внутриклеточные структурно-функциональные механизмы нейрональной пластичности // Тез. докл. III Съезд биофизиков России. 2004, том 1, с. 214-215. (соавт. Симонова О.Г., Ратушняк А.С., Штарк М.Б., Эпштейн О.И.)
43. Plasticity of neuronal responses induced by low concentrations of exogenous ligands affecting cellular calcium stores // Frontiers Biosci., 2004, v. 9, p. 809-815. (соавт. Epstein O.I., Simonova O.G., Ratushnyak A.S., Shtark M.B.)
44. Seasonal differences and protection by creatine or arginine pretreatment in ischemia of mammalian and molluscan neurons in vitro Brain Res., 2004, v.1050, p. 41-49. (соавт Simonova O.G., Zharkikh A.A., Balestrino M., Ratushnyak A.S.)

**Список используемых сокращений:** ПД - потенциал действия; ПП - потенциал покоя; МП - мембранный потенциал; ФК - физиологическая концентрация (концентрации веществ, которые вызывают реакции нейронов регистрируемые в электрофизиологических экспериментах); НК - низкая концентрация ( $10^{-15}$ М).