

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования: Долговременная потенция (ДП), экспериментально вызванный памятный след в виде усиления эффективности функционирования синапсов вследствие повторяющихся стимуляций, тесно связана с адаптацией нервной системы к воздействию внешней среды (Wickens, 1988; Calvarley, Jones, 1990; Stevens, 1996). До последнего времени изучение ДП концентрировалось на химических синапсах, в которых передача сигнала опосредуется химическим веществом, медиатором (Bliss, Lomo, 1973; Брагин, Виноградова, 1973; Виноградова, 1975; Мошков, 1985; Pavlik, Moshkov, 1992; Gold, Bear, 1994; Stevens, Wang, 1994; Malenka, 1994; Stella et al., 1997; Enger, Bonhoffer, 1997). Кроме химической синаптической передачи в нервной системе животных широко распространена чисто электрическая и смешанная синаптическая передача (Scott et al, 1994; Sur et al., 1994), включающая химические и электрические компоненты (Zottoli, Faber, 1979; Hall et al., 1985). Зависимость проводимости таких синапсов от предшествующей стимуляции и долговременное поддержание их в активированном состоянии до недавнего времени даже не предполагались. Недавно с помощью электрофизиологических методов было показано, что смешанные синапсы Маутнеровских нейронов золотой рыбки в результате тетанической стимуляции или аппликации дофамина способны на значительный срок облегчать проведение электротонического сигнала (Yang, et al, 1990; Yang, Faber, 1991, Pereda et al, 1992, 1994; Pereda, Faber, 1995; 1996). Электронная микроскопия как метод исследования является неотъемлемым звеном в изучении таких следовых явлений, как ДП и другие формы синаптической памяти, внесшим существенный вклад в понимание механизмов, лежащих в основе ДП химических синапсов (Pierce, Lewin, 1994; Мошков, 1985; Pavlik, Moshkov, 1992). Однако структурные механизмы, которые определяют усиление электротонической связи между смешанными синапсами и постсинаптическим нейроном, остаются совершенно неизученными. Неизвестны и элементы синапсов, вовлекаемые в повышение проводимости электротонического сигнала. Комплексные морфофункциональные исследования механизмов ДП электротонической передачи являются необходимыми для понимания роли различных синаптических структур в регуляции эффективности функционирования смешанных синапсов.

Цель и основные задачи исследования. Целью работы было изучение ультраструктурных признаков, указывающих на возможные механизмы долговременной потенциации электротонической передачи в идентифицированных смешанных синапсах Маутнеровских нейронов (МН) золотых рыбок, проявляющейся после тетанизации афферентных входов в форме увеличения амплитуды экстраклеточного спайка.

Были поставлены следующие задачи. 1) Изучить возможность использования переживающих фрагментов продолговатого мозга золотых рыб, содержащих МН, в качестве объекта для проведения электрофизиологических и электронно-микроскопических экспериментов, связанных с исследованиями ДП. 2) С помощью метода замораживания-скальвания и ультратонких срезов описать и количественно оценить основные контактные структурные элементы смешанных синапсов и их мембран, возможно, вовлекаемые в усиление электротонической передачи. 3) Провести сравнительный количественный анализ ультраструктуры контактов афферентных смешанных синапсов на ультратонких срезах после возникновения ДП электротонической передачи. 4) Исследовать роль актина в электротонической трансмембранной передаче сигналов: в синаптических контактах смешанных синапсов, воздействуя на них цитохалазином D, избирательно деполимеризующим актин и в искусственных плоских бислойных фосфолипидных мембранах после включения в них молекул филаментозного актина.

Научная новизна. Впервые разработана и применена для совместного электрофизиологического и морфологического исследования МН методика долговременно (до 5 часов) переживающих фрагментов продолговатого мозга рыб *in vitro*. Показано, что в таких препаратах на протяжении всего времени эксперимента МН сохраняют вызванную электрическую активность и адекватное состояние ультраструктуры афферентных идентифицированных смешанных синапсов, вовлекаемых в процесс ДП. Впервые продемонстрирована возможность индукции *in vitro* долговременной потенциации электротонических ответов МН после тетанизации их главного афферентного источника - задних корешков 8-го нерва, окончания которых идентифицируются как булавовидные синапсы смешанного типа, так называемые *club endings* (Nakajima, 1974). Ультраструктурными исследованиями установлены количественные признаки потенцированных смешанных синапсов. Показано, что главным отличием синапсов с возросшей в разной степени электротонической проводимостью от контрольных является коррелятивное пропорциональное увеличение в синаптических контактах размеров десмосомоподобных структур, которые, как было установлено ранее, состоят преимущественно из актина. В то же время оказалось, что структура щелевых контактов, которые являются по установившемуся мнению субстратом электротонической связи между клетками, не меняется ни при переживании, ни после потенциации. В ходе экспериментов установлено, что предварительная аппликация цитохалазина D на МН в область расположения смешанных синапсов препятствует развитию в них после тетанизации афферентного входа долговременной потенциации электротонических ответов. В других экспериментах, проведенных на плоских бислойных фосфолипидных мембранах, показано, что включение в них филаментозного актина примерно на три порядка увеличивает проводимость мембраны. Установлено, что изменение электропроводности бислойных мембран обусловлено появлением в них одиночных постоянно открытых

ионных каналов проводимостью около 1000 pS. Получены абсолютно новые данные о возможности участия десмосомоподобных структур в потенцировании электротонической связи между нейронами, благодаря механизму прямого шунтирования синаптических контактов молекулами филаментозного актина.

Научно-практическая ценность работы.

Проведенное исследование имеет в основном теоретическое значение. Установленные в ходе работы изменения в специализированных контактах смешанных синапсов, имеющие место после развития ДП, а так же роль актина в увеличении электротонической передачи, дают возможность расширить наши представления об адаптивных процессах на уровне одного нейрона.

Данные результаты имеют определенную практическую значимость при разработке подходов к управлению адаптивными процессами через воздействие на состояние актина фармакологическими и физиологически-активными веществами, упорядочивают выбор таких веществ по их реакции с актином, изменению его конформационного и агрегатного состояния. Наши данные дают возможность предположить существование подобных корреляций между состоянием актинсодержащих структур в межклеточных контактах и электротонической связью между клетками в других электровозбудимых и электроневозбудимых тканях, где такие десмосомоподобные структуры описаны. Это предположение может послужить толчком в морфофункциональных исследованиях в оригинальном направлении при изучении не-нейрональных структур и межклеточных взаимодействий.

Результаты работы используются при чтении курса лекций в Пушкинском ГУ.