

**А.С. Хахалин и Л.Л. Воронин**

Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

**Исследование механизмов синаптической пластичности в синапсах гиппокампа: совместное применение методов компонентного и нестационарного флюктуационного анализа**

**Напечатано в журнале:**

"Исследование механизмов синаптической пластичности в синапсах гиппокампа: совместное применение методов компонентного и нестационарного флюктуационного анализа"; А.С. Хахалин и Л.Л. Воронин; Нейрокомпьютеры: разработка, применение; издательство "Радиотехника" 2004, N2-3, с. 4-20.

**Резюме**

Нестационарный флюктуационный анализ (НСФА) является одним из известных статистических методов исследования ионных каналов, лежащих в основе различных типов межнейронных синаптических связей. Недавно НСФА был применен к исследованию механизмов долговременной синаптической пластичности. При анализе вызванных возбудительных постсинаптических токов (ПСТ) нейронов гиппокампа описано увеличение тока отдельного канала, связанного с постсинаптическими глутаматными рецепторами AMPA- ( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метилсаксазол-4-пропионовая кислота) типа после индукции долговременной потенциации (ДП). Увеличение оценки тока отдельного канала интерпретировалось как довод в поддержку постсинаптических механизмов ранних фаз ДП. Однако нельзя исключить других объяснений такого наблюдения. В настоящей работе на основе анализа модельных и электрофизиологических данных показано, что в случае, если ПСТ имеют сложную структуру, представляя собой суммы независимых "элементарных" ПСТ (компонент), различающихся по латентности, НСФА может приводить к завышению оценки тока отдельного ионного канала в 2-3 раза. Использование разработанного ранее метода компонентного анализа позволяет, как минимум, выявить такую ситуацию, а в случае достаточного количества "чистых" (однокомпонентных) коротколатентных ПСТ в статистических выборках, получить оценку тока отдельного канала, свободную от ошибки описанного типа.

**Введение**

Мозг млекопитающих представляет собой одну из наиболее совершенных информационных систем, существующих в природе, поэтому изучение принципов его работы становится логичным этапом на пути построения эффективных искусственных систем обработки информации. Одним из важнейших свойств информационных систем (как искусственных так и естественных) является память и способность к обучению. Одним из наиболее удобных и популярных природных объектов для изучения процессов памяти является феномен долговременной потенциации (ДП) в синапсах пирамидных нейронов гиппокампа млекопитающих [9]. Изучению механизмов, лежащих в основе этого явления, и посвящена настоящая работа.

Основной применяемой в нейросетевых разработках моделью памяти, использующей изменение синаптической эффективности, является модель формального синапса Хебба. В этой модели изменение эффективности синаптического входа определяется совпадением (корреляцией) между поступлением сигнала на этот вход и активностью постсинаптического нейрона. Однако такая простейшая картина не в состоянии описать всего разнообразия эффектов синаптической пластичности, наблюдающихся в нейронах головного мозга. Богатство и сложность этих эффектов не оставляет сомнений в том, что сети с более сложными правилами и закономерностями синаптического обучения потенциально более эффективны и по многим неясным пока причинам более предпочтительны, чем сети с простыми правилами обучения [19, 23, 32]. Именно поэтому проблема идентификации и изучения механизмов синаптической пластичности на протяжении последних лет остаётся одной из наиболее фундаментальных и важных проблем нейробиологии.

Обратимся к предельно упрощенной схеме химического синапса (рис. 1). Синапс состоит из двух основных частей: пресинаптической и постсинаптической, являющихся частями различных нейронов; между собой эти части разделены синаптической щелью. В пресинапсе, вблизи мембраны, происходит накопление везикул (пузырьков), наполненных нейромедиатором. По приходу потенциала действия (ПД) эти пузырьки сливаются с мембраной и их содержимое выбрасывается в синаптическую щель (время от времени выброс нейромедиатора может происходить и спонтанно). Напротив мест выброса (т.н. активных зон) на постсинаптической мембране расположены рецепторы – сложные белковые молекулы. В ответ на поступление нейромедиатора они или открывают связанные с ними ионные каналы (ионотропные рецепторы) или запускают внутриклеточные каскады биохимической реакции (метаботропные рецепторы),

что, в свою очередь, может приводить к фосфорилированию/дефосфорилированию клеточных белков и длительным изменениям в функционировании постсинаптической части синапса. При этом постсинапс может посредством выделения ряда специализированных веществ (ретроградных мессенджеров) в синаптическую щель оказывать влияние на пресинапс, вызывая в нем пластические перестройки.

В случае синапсов пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа в роли нейротрансмиттера выступает глутамат (самый распространенный в центральной нервной системе передатчик), а в роли наиболее значимых рецепторов – семейства ионотропных AMPA и NMDA рецепторов (названия связаны с номенклатурными названиями специфических агонистов). Рецепторы AMPA-типа ответственны за передачу сигнала, их открытие в ответ на выброс глутамата в синаптическую щель происходит при любых потенциалах постсинаптической мембраны; в открытом состоянии они проницаемы для всех ионов  $K^+$  и  $Na^+$ , поэтому открытие достаточного числа AMPA-рецепторов приводит к деполяризации постсинаптической мембраны и развитию потенциала действия в постсинаптическом нейроне. NMDA каналы являются селективными  $Ca^{2+}$ -каналами; их открытие происходит только при деполяризации постсинаптической мембраны относительно потенциала покоя; при потенциалах, близких к потенциалу покоя, в физиологических условиях NMDA-каналы заблокированы ионами  $Mg^{2+}$  из внеклеточной среды [11]. Поступление  $Ca^{2+}$  внутрь постсинаптического окончания приводит к запуску каскадов фосфорилирования, которые, в конечном итоге, могут приводить к сильнейшим перестройкам синаптического аппарата. В силу сильно нелинейной вольтамперной характеристики NMDA-каналов,  $Ca^{2+}$  поступает в клетку только если сигнал приходит на пресинапс в момент, когда постсинаптический нейрон уже достаточно деполяризован (т.е. находится в "возбужденном состоянии"); таким образом, в первом приближении работа синапса пирамид поля CA1 гиппокампа соответствует формальному правилу Хеббовского типа [12, 16].

Перечислим здесь величины, которыми мы, в нашем приближении, можем описать работу синапса. Работу пресинаптической части синапса можно охарактеризовать: количеством нейромедиатора в одной везикуле; вероятностью выброса везикулы в отдельной активной зоне –  $P$ ; количеством активных зон –  $N_{zone}$ ; количеством потенциально готовых к выбросу везикул (в расчёте на одну зону) –  $N_{ves}$ . Постсинаптическую мембрану можно характеризовать следующим набором величин: количество ионных каналов, открывающихся в ответ на выброс одной везикулы –  $n$ ; ток отдельного канала –  $i$ .

Вопрос о том, какие именно изменения синаптического аппарата играют основную роль при ДП, до сих пор не имеет общепризнанного ответа. Предполагается, что в поздней фазе ДП участвуют практически все возможные механизмы. На этой фазе (более 2-4 часов с момента тетанизации) происходят морфологические изменения синапса, подрастание новых синапсов на том же волокне, смена субъединичного состава ионных каналов на постсинаптической мембране, сопровождающаяся изменениями их характеристик, – и, видимо, множество других, более тонких процессов [33]. Относительно механизмов ранних фаз ДП (до 2-4 часов с момента тетанизации) нет единого мнения. Наиболее грубо, все гипотезы, относящиеся к механизмам ранних фаз ДП, можно разделить на две группы: пресинаптические и постсинаптические. Если на заре изучения феномена ДП наиболее признанными были гипотезы пресинаптической локализации механизмов пластичности на временных масштабах от минут до десятков минут, то сейчас ситуация сменилась на обратную. Во многих случаях исследователи отдают предпочтение постсинаптическим гипотезам, как более простым и исследованным [6, 7, 13, 20, 21, 22], хотя пресинаптические гипотезы пластичности зачастую более адекватно объясняют наблюдаемые в эксперименте данные [5, 6, 15, 18, 27, 31]. Вопрос о выборе группы пре- или постсинаптических гипотез, таким образом, является гораздо более сложным и требующим более пристального изучения, чем это может представляться.

К величинам, изменение которых в ходе ДП согласуется с постсинаптическими гипотезами пластичности, относится в первую очередь величина среднего тока отдельного канала  $i$  [6], которая может изменяться как вследствие модификации уже имеющихся на мембране рецепторов (например, путем их фосфорилирования), так и путем индуцированного синтеза и высадки на мембрану новых рецепторов (обладающих, возможно, другим субъединичным составом) [27, 28]. С постсинаптической гипотезой может также согласовываться изменение величины среднего количества каналов  $N$ , открываемых в ответ на выброс одного кванта нейромедиатора, хотя то же изменение может, в принципе, объясняться изменением величины кванта. Основным параметром, изменение которого можно объяснить только с точки зрения пресинаптических гипотез пластичности, является вероятность выброса кванта медиатора в активной зоне  $P_r$  [8, 26, 27, 29].

В недавних работах [6] описано увеличение тока отдельного канала  $i$ , связанного с постсинаптическими глутаматными рецепторами AMPA-типа при ДП в гиппокампе и при ко-экспрессии одного из белков биохимических клеточных каскадов  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-киназы II и субъединицы AMPA-рецепторов GluR1 в клетках линии Нек-293 [14]. Полученные результаты интерпретировались как довод в поддержку весомого участия постсинаптических механизмов в поддержании ранних фаз ДП. В этих работах был использован метод нестационарного флюктуационного анализа (НСФА) [24], основанный на построении диаграммы "вариация-среднее" и использующийся для определения величины тока отдельного канала на основе выборки записей вызванных постсинаптических токов (ПСТ). Однако как и любой метод НСФА обладает рядом особенностей, пренебрежение которыми может существенно исказить оценку тока канала.

Целью настоящей работы стала проверка факта увеличения тока отдельного канала в экспериментах, аналогичных экспериментам [6], и оправданность использования этого факта в качестве подтверждения гипотезы постсинаптических механизмов поддержания ранних фаз ДП. Для этого в работе решались следующие задачи:

- 1) Выявить физиологически допустимые ситуации, в которых метод НСФА стабильно давал бы завышенную оценку тока отдельного канала  $i$ . В этом качестве была избрана схема, в которой каждый регистрируемый (или моделируемый) ПСТ представлял собой сумму двух независимых ПСТ различной латентности. На практике это может соответствовать записи суммарных ПСТ от двух синапсов одного и того же нейрона.
- 2) С помощью модели проверить, достаточно ли эффективны методы, использовавшиеся в работах [6] при отборе ПСТ для дальнейшего анализа, в смысле борьбы с завышением оценки тока  $i$ . В частности, проверить таким образом эффективность метода сортировки ПСТ по их латентностям.
- 3) С помощью модели проверить, возможно ли использование ранее разработанного в нашей лаборатории метода компонентного анализа (КА) [4] для борьбы с завышением оценки тока отдельного канала  $i$ .
- 4) В случае удачи совместного применения методов КА и НСФА к результатам модельных экспериментов, проверить факт увеличения тока отдельного канала  $i$  в реальных экспериментах.

## Методы

В настоящей работе использованы результаты компьютерных модельных экспериментов и результаты электрофизиологических экспериментов на переживающих срезах гиппокампа крысы.

### Модельные эксперименты

Модельные эксперименты были поставлены с целью выяснить: 1) насколько усложнение структуры ПСТ (наличие двух независимых разнолатентных слагаемых, соответствующих ответам от двух разных синапсов) влияет на оценку тока отдельного канала, определяемую по методу НСФА; 2) установить зависимость ошибки оценки тока канала от латентной задержки между слагаемыми суммарного ПСТ; 3) проверить возможность выделения "чистых" (однолатентных, односинаптических) выборок с помощью метода анализа латентностей и 4) с помощью метода КА.

В рамках стохастической модели генерировалась выборка сигналов, аналогичных ПСТ, регистрировавшихся в физиологических экспериментах. Каждый модельный ПСТ представлял собой сумму элементарных "токов"  $i$  многих независимых "ионных каналов":

$$I(t) = \sum_{k=1}^N i_k(t) + \xi_I(t) \quad (1)$$

Здесь  $N$  – количество каналов, участвующих в ответе,  $\xi$  – аддитивный гауссов шум. "Открытия" и "закрытия" каналов происходили случайно в дискретные моменты времени, с заданной для каждого момента времени вероятностью ( $p(t)$  и  $p'(t)$  соответственно). Величины токов отдельных каналов принимались нормально распределенными со средним  $i$  и дисперсией  $\sigma_i$ .

Общее количество  $N$  каналов, участвовавших в отдельном модельном ПСТ, являлось случайной величиной и соответствовало квантовой модели выброса нейромедиатора, составляя от 10 до 800 для разных ПСТ из разных экспериментальных серий:

$$N = (n_0 + [\xi_n]) B(N_{zone}, P_R) \quad (2)$$

Здесь  $n_0$  – среднее количество каналов, открывающихся в ответ на выброс одного кванта нейромедиатора (на максимуме ответа);  $\xi_n$  – нормально распределенная случайная величина с дисперсией  $\sigma_n^2$ ;  $[\ ]$  – взятие целой части;  $B$  – случайная биномиально распределенная величина;  $N_{zone}$  – число активных зон синапса;  $P_R$  – вероятность выброса кванта нейромедиатора в одной активной зоне.

Модель позволяла работать с одним или двумя синапсами, независимо варьировать для них параметры выброса (количество активных зон в синапсе, вероятность выброса в каждой активной зоне), изменять латентную задержку между ответами от двух синапсов. Вероятность закрытия отдельного канала  $p_-(t)$  принималась постоянной; ее величина и временной ход вероятности открытия канала  $p_+(t)$  подбирались так, чтобы форма модельного ПСТ была близка к форме ПСТ, полученных в физиологических экспериментах. В частности, для  $p_+(t)$  использовалась аппроксимация разностью двух экспонент:

$$p_+(t) = \exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t). \quad (3)$$

Это позволило избежать рассмотрения кинетической модели работы отдельного канала, и, тем самым, упростить модель. Чтобы отразить в модели дендритную фильтрацию, неизбежную при записи реальных ПСТ, модельные ПСТ были отфильтрованы фильтром низких частот, что в первом приближении имитировало влияние электрических свойств дендритов и регистрирующей цепи.

Использовались следующие параметры модели: количество активных зон в каждом синапсе  $N_{zone} = 10$ ; вероятность выброса в каждой активной зоне:  $P_R = 0.1-0.4$ ; количество каналов, открывающихся в ответ на одну выброшенную везикулу:  $n_0 = 40 \pm 10$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение); уровень фонового белого шума (до фильтрации):  $\sigma_I = 0.4$  пА.; применялся цифровой фильтр Butterworth: 9 полюсов, частота среза 0.4 частоты дискретизации; время нарастания среднего модельного ПСТ (20%–80%) 1.2 мс; время спада (80%–20%) 6.6 мс; разброс латентностей при моделировании суммарных ответов от двух синапсов: 1–3 мс; количество модельных ПСТ в статистической группе: 50; средний ток отдельного канала:  $i = -0.1$  пА.; вариация тока отдельного канала:  $\sigma_i = 0.01$  пА. Значение тока бралось отрицательным, чтобы облегчить сравнение результатов моделирования с результатами физиологических экспериментов, в которых отрицательным считается ток, входящий в регистрирующий электрод (при использовании методики точечного отведения в режиме фиксации потенциала клетки). Критерии отбраковки модельных ПСТ были взяты из работы [6]: 1) из статистической группы исключались модельные ПСТ с латентностью более 3 мс; 2) рассматривались только модельные ПСТ с достаточно крутым и ровным передним фронтом. Сформулированные условия описаны в работе [6] как достаточно сильные критерии моносинаптической природы регистрируемых ПСТ (напомним, что одной из целей настоящей работы являлась проверка данного предположения). Ещё один указанный в работе [6] критерий отбраковки (отсутствие выбросов спонтанной синаптической активности) не имеет смысла для модельных ПСТ (лишённых спонтанной активности), и потому использовался только при анализе результатов электрофизиологических экспериментов (см. далее).

В серии модельных экспериментов с варьированием латентной задержки между компонентами (рис. 3В) модель была несколько упрощена. Уровень фонового шума до фильтрации составлял  $\sigma_I = 0.1$  пА.; вариация тока отдельного канала отсутствовала. Изменение вклада длиннлатентной компоненты было реализовано как изменение вероятности выброса нейротрансмиттера в активных зонах соответствующего модельного синапса от  $P_R = 0$  до 0.4 при фиксированной вероятности выброса в активных зонах "коротколатентного синапса", равной 0.4, и дополнительным условиям отбора модельных ПСТ с близкими амплитудами. Отбор проводился до достижения требуемого размера выборки  $n_S = 50$ , в которую включались только модельные ПСТ пиковой амплитуды в диапазоне 4–60 пА.

Модельные эксперименты выполнялись в среде Matlab версии 6.0.0.88.

### **Электрофизиологические эксперименты**

Электрофизиологические эксперименты производились по методам, описанным ранее подробно [3, 6]. Крысы линии Вистар (4–6 недель) декапитировались, мозг извлекался и помещался на 1–2 мин в холодную (0°) искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ). Выделялся гиппокамп. С помощью вибротома, также в среде ИСМЖ, готовились поперечные срезы гиппокампа толщиной 350–400 мкм. Индивидуальные срезы помещались в экспериментальную камеру, перфузируемую обогащённой ИСМЖ.

Регистрирующий электрод подводился к проксимальным апикальным дендритам пирамидных нейронов области CA1, запись осуществлялась по методике "точечной регистрации от целой клетки" в режиме фиксации потенциала. Стимулирующие (стеклянные монополярные) электроды устанавливались в радиальном слое. Клетки удерживались при потенциале  $-70$  мВ. "Минимальные" ПСТ вызывались стимуляцией радиального слоя с частотой 0.5 Гц и регистрировались с помощью усилителя Axoclamp-2B (Axon Instruments). В начале регистрировались 94–109 ПСТ до вызова ДП ("контроль"); ДП вызывалась путём деполяризации мембраны до 0 мВ без прекращения афферентной стимуляции. Тем самым моделировалась физиологическая ситуация временного сочетания афферентной стимуляции с активностью (деполяризацией) постсинаптического нейрона, соответствующая формальному правилу Хебба. После этого регистрировалось ещё 198–281 ПСТ ("ДП"). Для контроля сопротивления мембраны каждый стимул предварялся ступенькой напряжения в  $-1$  мВ, подававшейся на регистрирующий электрод. Данные фильтровались с частотой среза 3 кГц и записывались в компьютер с частотой дискретизации 10 кГц.

### **Нестационарный флюктуационный анализ**

НСФА представляет собой статистический метод, позволяющий по набору ПСТ оценить величину тока отдельного ионного канала  $i$ , а также среднее количество ионных каналов  $N$ , участвующих в генерации ПСТ. Подробное описание и анализ метода можно найти в работах [7]. Суть метода заключается в применении биномиальной вероятностной модели к процессу закрытия ионных каналов на спаде ПСТ. Пусть в каждый момент времени суммарный ток определяется состоянием  $N$  каналов, каждый из которых может находиться в открытом или закрытом состоянии (с вероятностями  $p$  и  $1-p$  соответственно). Пусть кроме того элементарные токи всех каналов одинаковы и равны  $i$ ; вероятность открытия  $p$  зависит только от времени, прошедшего с момента подачи стимула; весь присутствующий в системе шум является линейным

гауссовым шумом с математическим ожиданием, равным 0, и стандартным отклонением, равным  $\sigma_I$ . Тогда общий ток через мембрану будет представлять собой флюктуирующую случайную величину (рис. 2А), а математическое ожидание и вариация общего тока, как функции времени, будут, соответственно, выражаться формулами:

$$M(I(t)) = iNp(t), \quad (4)$$

$$D(I(t)) = i^2 Np(t)(1 - p(t)) + \sigma_I^2. \quad (5)$$

Используя для оценки математического ожидания среднее по выборке ("средний ответ" – рис. 2Б), а для оценки вариации – выборочную дисперсию (также как функцию времени – рис. 2Б), можно по совокупности значений  $(M(t), D(t))$  построить оценки для тока отдельного канала  $i$  и общего количества каналов  $N$ , используя, например, метод наименьших квадратов. Такой подход можно проиллюстрировать графически: если интерпретировать пары значений  $(M(t), D(t))$  как точки, отложенные в соответствующих координатах, оценка параметров  $i$  и  $N$  сведётся к проведению через эти точки аппроксимирующей параболы (рис. 2Г). Уравнение параболы будет в таком случае задаваться выражением

$$D = -\frac{1}{N}M^2 + iM + \sigma_I^2. \quad (6)$$

На практике оценка стандартного отклонения производилась по модифицированной формуле:

$$D(t) = \frac{\sum_{j=1}^n (I_j(t) - \beta_j M(t))^2}{n-1}, \quad (7)$$

где величина  $\beta_j$  представляла собой "нормировочный" коэффициент и определялась выражением:

$$\beta_j = \frac{\max_t (I_j(t))}{\max_t (M(t))}. \quad (8)$$

Такая модификация позволяла использовать для построения оценки тока канала выборки ПСТ с различными значениями пиковых амплитуд. Пиковые амплитуды различных ПСТ могли различаться как вследствие случайных синхронных колебаний величины проводимости каналов (связанной с флюктуациями свойств мембраны), так и вследствие биномиального характера выброса нейромедиатора, приводящего к масштабным флюктуациям числа каналов  $N$ , вовлеченных в генерацию ПСТ. Можно, однако, показать, что нормировка такого рода позволяла определять величину тока отдельного канала  $i$  достаточно точно. Оценка для  $N$  при этом приобретала характер "средневзвешенной" для данного диапазона амплитуд и теряла наглядную интерпретацию.

Чтобы сделать результаты нашей работы сравнимыми с результатами работ [6, 7], при анализе электрофизиологических и модельных экспериментах использовались следующие, описанные в этих работах, критерии отбора ПСТ: 1) достаточная крутизна фронта, быстрое нарастание ответа (не более 5 мс от края фронта до максимума ПСТ); 2) отсутствие на переднем фронте явных "перегибов"; 3) отсутствие "выбросов" и отклонений от нулевой линии на участках, предшествующем и непосредственно следующем за артефактом стимуляции (5 мс до, 1 мс после артефакта); 4) латентность ответа  $< 3$  мс.

В принципе, аппроксимация точек на диаграмме "вариация-среднее" параболой по формуле (6) позволяла одновременно определять 3 параметра: ток  $i$ , количество каналов  $N$  и уровень шума  $\sigma_I$ . Однако точность определения интересующего нас параметра  $i$  можно было увеличить, измеряя уровень фонового шума  $\sigma_I$  независимо и с большей достоверностью, чем это было бы возможно по формуле (6). Шум  $\sigma_I$  определялся по всей совокупности промежутков, непосредственно предшествующих участкам развития ПСТ (промежутки до артефакта стимуляции в случае физиологических экспериментов). Тем самым мы получали уточненную оценку положения крайней точки диаграммы "вариация-среднее": точки с нулевым средним и вариацией, равной изолированной вариации шума  $(0, \sigma_I^2)$ . Из всех аппроксимирующих парабол затем рассматривались только параболы, проходящие через эту "достоверную точку". Тем самым уменьшалось влияние близких к началу координат точек диаграммы на положение параболы, что благоприятно сказывалось на разбросе оценок метода НСФА. Уменьшение разброса результатов было связано с тем, что в реальных физиологических данных кроме интересующих нас моносинаптических ПСТ как правило присутствуют "неспецифические" ответы ("помехи"), особенно заметные на "хвостах" анализируемых ПСТ. Такие помехи могут объясняться множеством причин включая полисинаптическую активность, задержанный выброс нейромедиатора, влияние остаточного  $Ca^{2+}$  на спонтанный выброс,

диффузия медиатора от соседних активных зон, неравномерное обратное всасывание медиатора и т. д.. Такие помехи существенно завышали уровень вариации ПСТ на больших временах после стимуляции (десятки мс), однако "насильственное" проведение параболы через точку  $(0, \sigma_I^2)$  позволяло во многом избежать влияния этих помех на оценки, получаемые по методу НСФА.

Одной из проблем метода НСФА является проведение процедуры нормировки по формуле (8), связанное с проблемой определения максимума каждого отдельного ПСТ. Произвести оценку пиковой амплитуды ответа в случае зашумленного сигнала возможно только путем усреднения величины ВПСР по некоторому участку ("окну") вблизи максимума. Ширина и положение окна являются параметрами метода, выбор которых может систематически влиять на результаты. Особенно важным выбор положения и ширины окна становится в случае, если ПСТ обладают вариабельной формой, и положение максимума для разных ПСТ различается. Так, чрезмерное уменьшение ширины окна при анализе выборки, неоднородной по положению максимумов отдельных ПСТ, приводит к завышению оценки тока отдельного канала за счёт случайного занижения отдельных значений пиковой амплитуды и связанного с этим увеличения вариации. Чрезмерное увеличение величины окна также приводит к увеличению ошибки, так как по мере роста окна все более заметную роль приобретает стохастический характер открытия и закрытия отдельных ионных каналов и связанные с этим вариации формы ПСТ. Поиск оптимума параметров проводился эмпирически. Для каждой группы ответов окно устанавливалось так, чтобы его границы приходились на примерно равные значения среднего тока, составляющие около 90% от максимума среднего ПСТ. Ширина окна фиксировалась один раз для всех групп, входящих в экспериментальную серию. Таким образом, хотя для каждой группы ответов индивидуальное положение окна относительно артефакта варьировалось, его положение относительно максимума ответа оставалось постоянным.

Таким образом, метод НСФА во всех случаях применялся стандартно, в соответствии с его описанием в работах [6, 7]. Дальнейшие уточнения касались не модификации НСФА, а более тщательного составления выборки входных данных для этого метода.

### Компонентный анализ

Для анализа данных методом КА была использована программа FMS, разработанная в лаборатории и подробно описанная в работе [4]. Метод КА является модификацией метода главных компонент [17] и предназначен для анализа сигналов, представляющих собой случайные линейные комбинации нескольких базовых (главных) компонент. В нашем случае базовыми компонентами являлись независимые ПСТ от различных синапсов  $F_k(t)$ , обладающие разными латентностями и входящие в состав регистрируемого (или моделируемого) суммарного ПСТ  $I^j(t)$  ( $j$  – номер ПСТ в выборке):

$$I^j(t) = \sum_{k=1}^K c_k^j F_k(t) + b^j(t) \quad . \quad (9)$$

Здесь  $K$  – общее количество компонент;  $c_k^j$  – элементы матрицы коэффициентов;  $b^j(t)$  – случайный аддитивный шум. Коэффициент  $c_k^j$  как функция номера  $j$  представляет собой случайную величину, флуктуации которой могут быть обусловлены как биномиальной квантовой природой выброса, так и флуктуациями различных характеризующих систему величин, разбросом этих величин для разных активных зон и т. д.

Компонентный анализ предназначен для оценки входящих в формулу (9) коэффициентов  $c_k^j$ . Эти оценки мы будем называть КА-амплитудами, чтобы подчеркнуть их отличие от пиковых амплитуд. Для анализа методом КА использовались не полные ПСТ, а только их участки, примерно соответствующие возрастанию тока от нуля до максимума (переднему фронту ответа). Границы этих участков выбирались одинаковыми для всех ПСТ выборки и являлись таким образом скрытыми параметрами метода. К выбранным участкам ПСТ (будем как и раньше обозначать их  $I^j(t)$ ), хотя параметр времени  $t$  теперь представляет собой дискретную целую величину, изменяющуюся от 1 до  $T$ ) применялся метод главных компонент. Суть этого метода состоит в построении ортогонального  $K$ -мерного базиса  $\{f_k(t)\}$ , наилучшим образом представляющего сигнальные векторы  $I^j(t)$  в смысле максимальности суммы квадратов коэффициентов разложения сигнальных векторов по этому базису:

$$\sum_{k=1}^K \sum_{j=1}^N (\xi_k^j)^2 = \sum_{k=1}^K \sum_{j=1}^N (I^j, f_k)^2 \rightarrow \max \quad , \quad (10)$$

здесь  $N$  – количество сигнальных векторов  $I^j$ ;  $f_k$  – элементы нового базиса (главные компоненты);  $\xi_k^j$  – коэффициенты разложения векторов  $I^j$  по этому новому базису; круглыми скобками обозначено скалярное произведение по времени  $t$ :

$$(I^j, f_k) = \sum_{t=1}^T I^j(t) \cdot f_k(t) \quad . \quad (11)$$

Найденный базис  $\{f_k(t)\}$  и коэффициенты разложения сигнальных векторов  $I^j$  по этому базису  $\xi_k^j$  оптимальны для проведения дальнейших математических построений (базис ортонормирован, коэффициенты некоррелированы и обладают максимальной дисперсией), однако они неудобны для физиологической интерпретации. С точки зрения идентификации компонент (придания им наглядного физиологического смысла) конечной целью можно считать приведение разложения к базису (9), т. е. "восстановление" первоначальных, внутренне присущих системе компонент  $F_k$  – непосредственных слагаемых каждого "сложного" ПСТ.

Предположив равенство размерностей базисов  $\{f_k(t)\}$  и  $\{F_k(t)\}$  и пренебрегая входящим в формулу (9) шумом  $b^j(t)$ , мы можем задаться целью нахождения линейного преобразования, переводящего элементы базиса  $\{f_k(t)\}$  в элементы искомого базиса  $\{F_k(t)\}$ :

$$F_k(t) = \sum_{l=1}^K a_{kl} f_l(t) \quad , \quad (12)$$

или, записывая то же в матричном виде,

$$F = Af \quad . \quad (13)$$

В этом случае преобразование координат будет задаваться формулой

$$c_k^j = \sum_{l=1}^K a'_{lk} \xi_l^j \quad , \quad (14)$$

где  $a'_{lk}$  – элементы матрицы  $A'$ , обратной к матрице  $A$  из формулы (13).

Матрица преобразования  $A$  не вычислялась и не указывалась явно, а интерактивно строилась пользователем программы. Преобразование координат выполнялось независимо для каждой пары векторов  $\{F_k, F_l\}$ . Матрица  $A$  строилась "итерационно": каждое нажатие на одну из четырех функциональных клавиш приводило к применению к паре текущих выбранных векторов одного из четырех элементарных преобразований. Результирующая матрица  $A$  таким образом представляла собой произведение всех матриц элементарных преобразований выполненных пользователем. Матрицы элементарных преобразований имели вид:

$$\begin{aligned} H_+ &= \begin{pmatrix} 1 & a \\ 0 & 1 \end{pmatrix}; & H_- &= \begin{pmatrix} 1 & -a \\ 0 & 1 \end{pmatrix}; \\ V_+ &= \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ a & 1 \end{pmatrix}; & V_- &= \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -a & 1 \end{pmatrix}. \end{aligned} \quad (15)$$

Здесь  $a < 1$  – фиксированная величина, определяющая величину элементарного преобразования векторов. Можно показать, что путем произведения конечного числа матриц вида (15) можно сколь угодно точно приблизить любое преобразование пространства  $A$  с  $\det A = 1$ .

Осуществляя преобразования, пользователь постоянно отслеживал текущее распределение величин  $c_k^j$  и  $c_l^j$ . Для этого использовалось графическое представление значений координат (КА-амплитуд)  $c_k^j$  в виде, приведенном на рис. 4А и рис. 6А,Б. При этом величины  $c_k^j$  рассчитывались по формуле (14), после чего в соответствующих осях откладывались точки  $(c_k^j, c_l^j)$ ; каждому ПСТ таким образом соответствовала одна точка.

Преобразование производилось по следующим критериям:

- 1) Облако точек, расположенных вблизи начала координат, должно по возможности иметь форму эллипса, оси которого направлены вдоль координатных осей.

- 2) Для возбудительных ПСТ величины  $c_k^j$  должны были быть неотрицательны с погрешностью  $\pm S_k$ , где  $S_k$  – стандартное отклонение  $k$ -й координаты, рассчитанное для точек из критерия (1).
- 3) Границы облака точек должны быть по возможности близки к координатным осям. Последнее условие отражает наше предположение о том, что в выборке присутствуют все реализации формулы (9) для каждой пары координат, включая случаи  $c_k^j \approx 0$ ,  $c_l^j > 0$  и  $c_k^j > 0$ ,  $c_l^j \approx 0$ .

На практике к этим трем условиям часто добавлялось четвертое, избыточное, но в ряде случаев значительно упрощавшее процесс вращения координат:

- 4) Выделенные цветом точки, соответствующие заранее найденным в выборке "типичным ответам" (например, крайне коротколатентным или крайне длиннолатентным ПСТ) должны были "правильно" располагаться на диаграмме распределения  $(c_k^j, c_l^j)$  (так, например, точки, соответствующие ПСТ с крайними латентностями, должны были находиться на краях распределения; точки, соответствующие ПСТ, на глаз наиболее похожим на "чистые", "однокомпонентные", должны были лежать вблизи осей; точки, соответствующие ПСТ со сложной структурой, должны были находиться где-то внутри облака и т. д.).

Полученные в результате всех описанных процедур значения координат  $c_k^j$  интерпретировались затем как оценки коэффициентов из формулы (9). Чтобы узнать примерный вид компонент полученного базиса  $\{F_k(t)\}$  использовалось усреднение выборок ПСТ, для которых соответствующие точки  $(c_k^j, c_l^j)$  лежали вблизи координатных осей (см. рис. 6Б,В с подписями). Тот же принцип использовался для построения выборок "однокомпонентных" (предположительно-моносинаптических ПСТ).

В настоящей работе во всех случаях преобразование выполнялось таким образом, чтобы первая компонента соответствовала коротколатентному, а вторая – длиннолатентному слагаемым суммарных ПСТ. Компоненты с более высокими номерами после преобразования приобретали "шумовой" характер, несли информацию о тонких особенностях формы ПСТ и не поддавались интерпретации.

### Измерение латентностей ПСТ

Латентность ПСТ определялась с помощью следующей процедуры: начальный участок переднего фронта ответа (соответствующий нарастанию тока приблизительно от 20% до 50% пиковой амплитуды) аппроксимировался прямой, после чего определялась точка пересечения этой прямой с осью абсцисс. Положение этой точки рассматривалось как оценка латентности индивидуального ПСТ [2, 10].

## Результаты

### Проверка пригодности метода анализа латентностей для построения выборок "чистых" моносинаптических ПСТ

Анализ латентностей использовался в работах [6, 7] как метод отбора "простых" (моносинаптических, однокомпонентных, имеющих все кроме одного  $c_j^k$  в формуле (9) близкими к 0) ПСТ для последующего НСФА. Однако уже из общих соображений понятно, что в случае, когда отдельные ПСТ представляют собой суммы двух компонент различной латентности, отбор ПСТ по латентностям может быть малоэффективным. Действительно, ПСТ с достаточно заметным вкладом коротколатентной компоненты  $c_1$  должны демонстрировать соответствующую ей короткую латентность независимо от вклада длиннолатентной компоненты  $c_2$ .

Для проверки этого предположения, как это описано в разделе "Методы", генерировались модельные ПСТ, представлявшие собой сумму длинно- и коротколатентной компонент с фиксированной задержкой латентности между ними. Измерялись их латентные периоды и строилась диаграмма корреляции между латентностями отдельных ПСТ и относительным вкладом в них длиннолатентной компоненты. Такой вклад оценивался как отношение амплитуды  $c_2$  к общей величине ответа  $\sqrt{c_1^2 + c_2^2}$ . На рис. 3, А представлена такая диаграмма, полученная по результатам компьютерных экспериментов (группа из 100 модельных ПСТ; среднее количество квантов  $m_1 = 4$  и  $m_2 = 1.5$  для компонент с латентностью 2 и 4 мс соответственно; число активных зон для каждой из компонент  $N_z = 10$ ). Пунктирная линия соответствует указанному в работе [6] критерию отбора "коротколатентных" ответов. Видно, что выборка таких условно "коротколатентных" ответов, расположенных ниже пунктирной линии, на самом деле была неоднородна по своему компонентному составу. Большая их часть (за исключением небольшой группы в левой части графика) содержала и длиннолатентную компоненту  $c_2$ . Латентности отдельных ПСТ не коррелировали с их компонентным составом. На рис. 3Б представлены результаты аналогичной обработки данных одного из физиологических экспериментов. Объединены ПСТ, записанные в контроле и после вызова ДП, использованы ПСТ, удовлетворяющие описанным в разделе "Методы" условиям отбора, кроме условия



короткой латентности. Видно, что, как и для модельных данных, отбор по применявшимся в работах [6, 7] критериям, включая отбраковку длиннolatентных ПСТ (точки выше пунктирной линии на рис. 3Б) не позволяет избавиться от "смешанных" (двухкомпонентных) ПСТ.

### **Завышенное определение тока канала двухкомпонентных ответов: модельные эксперименты**

На рис. 4Б приведен пример модельных ПСТ, использованных для построения диаграммы, рассмотренной выше (рис. 3А), а рис. 4В иллюстрирует оценку тока канала ( $i$ ) в том же эксперименте. Видно, что такая оценка ( $-0.21$  пА) завышена более чем в два раза по сравнению с величиной, использованной при моделировании ( $-0.1$  пА). Серия из 64 аналогичных экспериментов с варьированием латентных периодов (рис. 3В) подтвердила стабильное завышение оценки тока отдельного канала  $i$  по сравнению с величиной, заложенной в модель. Ошибка в среднем возрастала по мере увеличения вклада длиннolatентной компоненты, а также по мере увеличения латентной задержки между компонентами с 1 до 3 мс; при этом оценка тока отдельного канала могла в 2–3 раза превосходить его действительное значение  $-0.1$  пА. В контрольных экспериментах, на "чистых" однокомпонентных выборках, НСФА давал значение тока отдельного канала: ( $\tilde{i} = -0.091 \pm 0.014$  пА; среднее  $\pm$  стандартное отклонение;  $n = 16$  модельных экспериментов при размере выборки  $n_s = 50$  модельных ПСТ в каждом), близкое к заложенному значению  $i = -0.1$  пА.

### **Совместное использование НСФА и КА: модельные эксперименты**

Поскольку измерения латентных периодов не давало возможности выделить однокомпонентные ответы, в следующей серии экспериментов на модели был применен разработанный ранее алгоритм КА [4]. Рис. 4А иллюстрирует стандартное для КА представление КА-амплитуд двух разнолатентных компонент, позволяющее идентифицировать однокомпонентные ПСТ, если они содержатся в выборке. В данном эксперименте, точки, попавшие в прямоугольник вдоль оси ординат, соответствовали "чистой" компоненте  $c_1$ , имевшей более короткую латентность. Модельные ПСТ, соответствовавшие этим точкам, представлены на рис. 4Бб. При анализе этой выборки однокомпонентных ответов методом НСФА была получена точная оценка величины тока отдельного канала, заложенной в модель (рис. 4Бб).

В данном эксперименте параметры модели были установлены таким образом, что чисто однокомпонентные модельные ПСТ, соответствовавшие компоненте  $c_2$ , имевшей более длительную латентность, в данной выборке не реализовались. КА позволяет выделять ответы с наибольшим вкладом компоненты  $c_2$  и наименьшим вкладом коротколатентной компоненты  $c_1$  (прямоугольник вдоль оси абсцисс на рис. 4А). На рис. 4Бв представлены соответствующие модельные ПСТ. Для них (рис. 4Бв) НСФА дал оценку тока отдельного канала, промежуточную между сильно завышенной, полученной при анализе исходных смешанных ПСТ, не разделенных на компоненты (рис. 4Ва) и корректной оценкой, полученной при анализе чистых однокомпонентных ответов (рис. 4Бб).

### **Физиологические эксперименты**

Чтобы проверить влияние предварительного построения "однокомпонентных выборок" методом КА на результаты метода НСФА для реальных данных, мы использовали результаты трех электрофизиологических экспериментов, в которых ПСТ демонстрировали ДП (71–208% по сравнению с контролем). На рис. 5А приведен общий ход одного из экспериментов, представлены выборки ПСТ для участков контроля (рис. 5Ба) и ДП (рис. 5Бб), а также результаты применения НСФА к этим выборкам (рис. 5Ва,б). Для нейрона, представленного на рисунке, имело место более чем трехкратное увеличение оценки тока отдельного канала (с  $-0.31$  до  $-1.01$  пА). Для двух других нейронов ток отдельного канала также возрастал во время ДП по сравнению с контролем. (с  $-0.45$  и  $-0.40$  до  $-0.75$  и  $-0.89$  пА соответственно).

Однако КА во всех этих опытах выявил две компоненты различной латентности. На рис. 6 приведены данные другого физиологического эксперимента. Рис. 6А и Б представлены точечные диаграммы, отображающие КА-амплитуды коротколатентной ( $c_1$ ) и длиннolatентной ( $c_2$ ) компонент в контроле и после вызова ДП. Рис. 6В иллюстрирует наличие двух разнолатентных компонент путем сравнения средних по выборкам, ограниченными пунктирными прямоугольниками на рис. 6Б. Сравнение рис. 6А и Б позволяет также заметить, что максимальные значения КА-амплитуд длиннolatентной компоненты  $c_2$  не возрастали в результате ДП, в то время как значения КА-амплитуд коротколатентной компоненты проявляли более сильную потенциацию. Аналогичное различие компонент при потенциации наблюдалось во всех трех экспериментах. Таким образом, ПСТ, были представлены двумя компонентами по-разному до и после вызова ДП.

Применение метода КА позволяет получать выборки чистых (однокомпонентных) ПСТ. Для каждого из нейронов НСФА вначале применялся к исходным данным, без разделения на компоненты (рис. 6Да, Еа), а затем проводился КА (рис. 6А, Б), выделялись выборки ПСТ, соответствующие изолированной коротколатентной компоненте и к этим выборкам применялся НСФА. В примере, представленном на рис. 6, оценка тока отдельного канала, рассчитанная по всем ПСТ во время ДП (рис. 6Еа,  $i = -0.89$  пА), оказалась более чем в 2 раза завышена по сравнению с оценкой тока, полученной по выборке чистых коротколатентных ответов (рис. 6Еб,  $i = -0.44$  пА).

Соответствующие суммарные результаты по всем трем нейронам показаны на Рис. 7А и Б. На рис. 7А представлены результаты непосредственного применения НСФА к полным выборкам ПСТ до использования КА. Видно примерно двукратное возрастание оценки тока отдельного AMPA-канала после ДП в соответствии с данными [6]. Однако из рис 7Б видно, что для однокомпонентных выборок достоверного изменения оценки тока канала не происходило.

## Обсуждение

Основной результат работы показывает, что при наличии ПСТ, состоящих из более чем одной компоненты, НСФА может давать завышенное значение тока отдельного канала. Таким образом, если вклад одной из компонент в ПСТ меняется после индукции ДП существенно сильнее, чем другой (или других), то может наблюдаться мнимое изменение тока канала, определяемого с помощью НСФА. При анализе небольшой выборки дендритных записей мы подтвердили, что оценка тока отдельного AMPA-канала возрастает после индукции ДП в соответствии с данными, полученными ранее в большом числе экспериментов [6]. Однако применение КА к физиологическим данным и соответствующие модельные эксперименты позволяют считать, что по крайней мере для проанализированных нами ПСТ, такой эффект возникает в результате наличия двух компонент с разными латентными периодами и неравномерности их потенциации. При анализе однокомпонентных коротколатентных ответов ни в одном из трех проанализированных случаев не наблюдалось изменения тока отдельного канала после вызова ДП.

Наши данные позволяют предположить, что применявшаяся другими авторами визуальная отбраковка ПСТ, содержащих на переднем фронте перегиб, и потому очевидно являющихся суммой двух различных компонент [6], по крайней мере не всегда является достаточно эффективной для отбора однокомпонентных ПСТ, хотя, вероятно, и может использоваться при малой зашумленности сигнала и/или большой разнице латентных периодов [1]. Используя данные компьютерных и физиологических экспериментов, мы проанализировали также методы отбора однокомпонентных ПСТ, основанные на измерении латентностей отдельных ПСТ. Однако они также оказались недостаточно эффективными в ситуации, когда ПСТ представляют собой суммы более выраженной коротколатентной и менее выраженной длиннолатентной компонент.

Следует отметить, что в методической работе, посвященной использованию НСФА [7], в числе прочего, производилось моделирование сложных ответов с компонентами различной латентности, принципиально аналогичные нашим модельным экспериментам, однако завышение оценки тока отдельного канала не было обнаружено. Возможно, это связано с тем, что в своей работе [7] авторы разделили моделирование сложных (разнолатентных) ответов и модельные эксперименты, исследовавшие влияние шумов на точность определения параметра  $i$ . В случае низкого уровня шума, использовавшийся метод визуальной отбраковки ответов с "перегибом" на переднем фронте мог обеспечить формирование относительно "чистых" (однокомпонентных) выборок.

В нашей, в основном методической, работе было исследовано лишь небольшое количество нейронов до и после вызова ДП. Хотя ни в одном случае изменений тока AMPA-канала после вызова ДП не выявлялось, такой результат должен быть проверен в будущем на большем статистическом материале. Мы не можем исключить, что в части нейронов (хотя, вероятно, в меньшей части, чем это описано в литературе [6], а также при каких-либо других начальных условиях или процедурах вызова ДП [30] возрастание тока отдельного AMPA-канала может вносить вклад в поддержание ДП. Это представляется довольно вероятным в свете данных о возрастании проводимости AMPA-каналов под воздействием CaM-KII [14]. Основной вклад такого механизма в поддержание ДП может быть задержанным (например, на 15-40 мин) после вызова ранней фазы ДП. Наличие задержки, конкретные характеристики которой также могут зависеть от ряда условий, ожидается на основе данных о постепенном возрастании эффекта агониста AMPA рецепторов на постсинаптическую мембрану после вызова ДП [13] и данных о достаточно медленном фосфорилировании AMPA рецепторов [25].

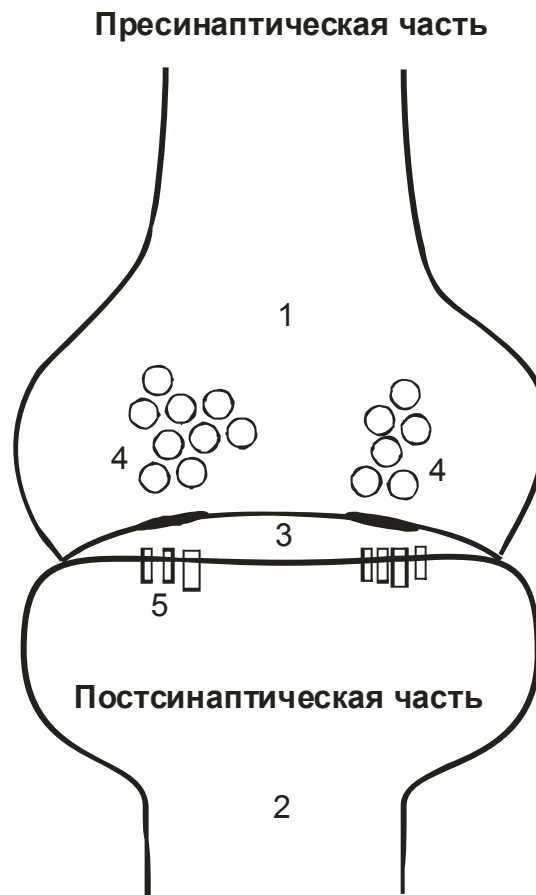
В целом, настоящая работа показывает необходимость проведения предварительного КА до использования НСФА. Применявшаяся на практике процедура отбора ПСТ с помощью измерения их латентностей при обычно встречающихся различиях латентностей и уровнях фонового шума редко приводит к образованию выборок однокомпонентных ПСТ. Предварительный КА представляется особенно необходимым, когда задачей работы является анализ изменений проводимостей лиганд-управляемых ионных каналов при пластических перестройках и фармакологических воздействиях, которые могут приводить к неоднородным изменениям разных компонент, составляющих регистрируемый ответ.

Работа выполнена при финансовой поддержке INTAS, РФФИ и Wellcome Trust.

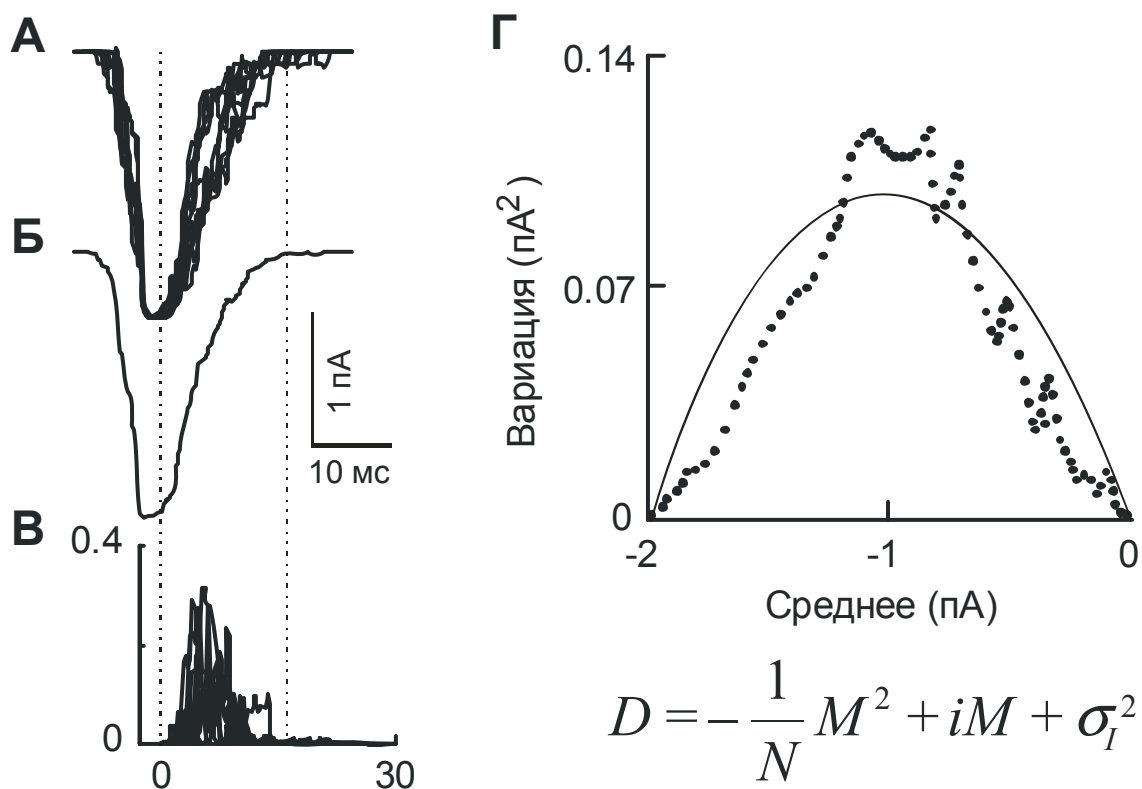
## Список литературы

1. Akaneya, Y., Altinbaev, R.Sh., Bayazitov, I.T., Kinoshita, S., Voronin, L.L. & Tsumoto, T. (2003). Low-frequency depression of synaptic responses recorded from rat visual cortex. *Neuroscience* **117**, 305-320.
2. Anderson, W.W. and Collingridge, G.L. (2001) The LTP program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *J. Neurosci. Meth.*, **108**, 71-83.
3. Altinbaev R.Sh., Bayazitov I.T. & Voronin, L.L., 2003 Potentiation of hippocampal responses at positive membrane potential indicates presynaptic nature of the low-efficacy of "silent" synapses. *Doklady Biological Sciences* (in press)
4. Astrelin, A.V., Sokolov, M.V., Behnisch, T., Reymann, K.G. and Voronin, L.L. (1998) Principal components analysis of minimal excitatory postsynaptic potentials. *J. Neurosci. Meth.*, **79**, 169-186
5. Bayazitov, I.T., Voronin, L.L., Kasyanov, A.M., Kleschevnikov, A.M., Kulchitsky, S.V. & Sametsky, E. (2002). Long-term potentiation of the AMPA and NMDA components of minimal postsynaptic currents in rat hippocampal field CA1. *Neuroscience and Behavioral Physiology* **32**, 533-540.
6. Benke, T.A., Luthi, A., Isaac, J.T.R. and Collingridge, G.L. (1998) Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*, **395**, 793-795.
7. Benke T.A., Luthi A., Palmer M.J., Wikstrom M.A., Anderson W.W., Isaac J.T., Collingridge G.L. (2001) Mathematical modelling of non-stationary fluctuation analysis for studying channel properties of synaptic AMPA receptors. *J Physiol.* **537**, 407-20.
8. Berretta, N., Rossokhin, A.V., Cherubini, E., Astrelin, A.V. & Voronin, L.L. (1999). Long-term synaptic changes induced by intracellular tetanization of CA3 pyramidal neurons in the hippocampal slices from juvenile rats. *Neuroscience* **93**, 469-477.
9. Bliss, T.V.P. & Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model for memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.
10. Burgard, E.C. & Hablitz, J.J. (1993). NMDA receptor-mediated components of miniature excitatory synaptic currents in developing rat neocortex. *Journal of Neurophysiology* **70**, 1841-1852.
11. Clark, K.A., Randall, A.D. and Collingridge, G.L. (1994) A comparison of paired-pulse facilitation of AMPA and NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic currents in the hippocampus. *Exp. Brain Res.*, **101**, 272-278.
12. Clark, K.A. & Cull-Candy, S.G. (2002). Activity-dependent recruitment of extrasynaptic NMDA receptor activation at an AMPA receptor-only synapse. *Journal of Neuroscience* **22**, 4428-4436.
13. Davies, S.N., Lester, R.A.J., Reymann, K.G. and Collingridge, G.L. (1989) Temporally distinct pre- and postsynaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature*, **338**, 500-503.
14. Derkach V., Barria A., Soderling T.R. (1999) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3269-3274.
15. Gasparini, S., Saviane, C., Voronin, L.L. & Cherubini, E. (2000). Silent synapses in the developing hippocampus: Lack of functional AMPA receptors or low probability of glutamate release? *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **97**, 9741-9746.
16. Groc, L., Gustafsson, B. & Hanse, E. (2002). Spontaneous unitary synaptic activity in CA1 pyramidal neurons during early postnatal development: constant contribution of AMPA and NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* **22**, 5552-5562.
17. Jackson, J.E. (1991) A user's guide to principal components, Wiley, New York.
18. Kleschevnikov, A.M., Kuhnt, U. & Voronin, L.L. (2002). Quantal analysis of a late phase of long-term potentiation in the guinea pig hippocampal slices. *Neuroscience Research Communications* **30**, 7-25.
19. Kullmann, D.M. (2000) Spillover and synaptic cross talk mediated by glutamate and GABA in the mammalian brain. *Prog. Brain Res.*, **125**, 339-351.
20. Luscher, C. & Frerking, M. (2001). Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neurosciences* **24**, 665-670
21. Malinow, R., & Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neurosciences* **25**, 103-126.
22. Rostas, J.A., Brent, V.A., Voss, K., Errington, M.L., Bliss, T.V. and Gurd, J.W., (1996) Enhanced tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10452-10456.

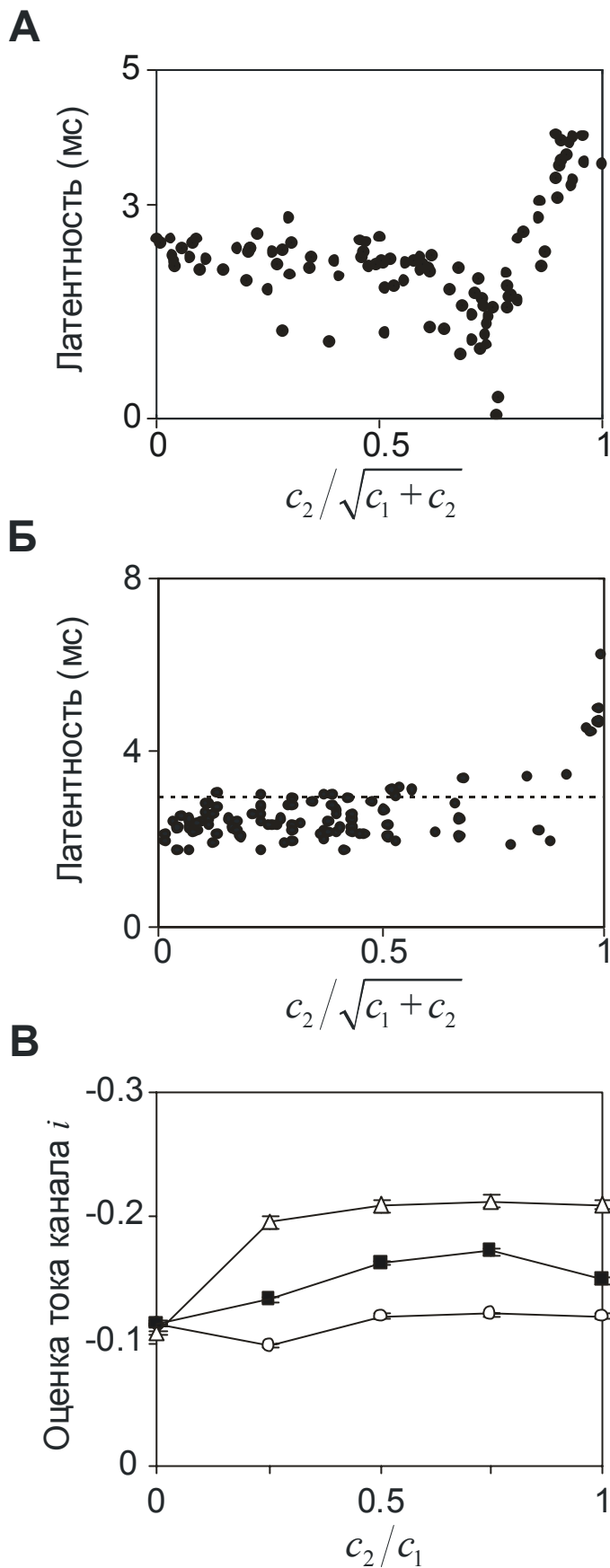
23. Saviane, C., Savtchenko, L.P., Raffaelli, G., Voronin, L.L. & Cherubini, E. (2002). Frequency-dependent shift from paired-pulse facilitation to paired-pulse depression at unitary CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *Journal of Physiology* **544**, 469-476.
24. Sigworth F.J., Neher E. (1980) Single Na<sup>+</sup> channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* **287**, 447-9.
25. Soderling, T.R. and Derkach, V.A. (2000) Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* **23**, 75-80.
26. Sokolov, M.V., Rossokhin, A.V., Behnisch, T., Reymann, K.G. & Voronin, L.L. (1998). Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation of minimal EPSPs in rat hippocampal slices: a patch clamp study. *Neuroscience* **85**, 1-13.
27. Sokolov, M.V., Rossokhin, A.V., Astrelin, A.V., Frey, J.U. & Voronin, L.L. (2002). Quantal analysis suggests a strong involvement of presynaptic mechanisms during the initial 3 h maintenance of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area in vitro. *Brain Research* **957**, 61-75.
28. Tovar, K.R. & Westbrook, G.L. (2002). Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **34**, 255-264.
29. Voronin, L.L. (1993). On the quantal analysis of hippocampal long-term potentiation and related phenomena of synaptic plasticity. *Neuroscience* **56**, 275-304.
30. Voronin, L.L., Cherubini, E. (2003). "Presynaptic silence" may be golden. *Neuropharmacology*. *Neuropharmacology* **45**, 439-49.
31. Voronin, L.L., Kuhnt, U., Davletshin, R.N. & Hess, G. (1988). Ineffective synapses in in vitro hippocampal slices. *Doklady Biological Sciences* **302**, 746-749.
32. Watt, A.J., van Rossum, M.C.W., MacLeod, K.M. & Nelson S.B. Turrigiano, G.G. (2000). Activity coregulates quantal AMPA and NMDA current at neocortical synapses. *Neuron*, **26**, 659-670.
33. Williams JM. Mason-Parker SE. Abraham WC. Tate WP. (1998) Biphasic changes in the levels of N-methyl-D-aspartate receptor-2 subunits correlate with the induction and persistence of long-term potentiation. *Molecular Brain Research* **60**, 21-27.



**Рис. 1.** Упрощенная схема химического синапса. 1 – пресинаптическая часть; 2 – постсинаптическая часть; 3 – синаптическая щель; 4 – везикулы (пузырьки), заполненные нейромедиатором; 5 – рецепторы постсинаптической мембраны.

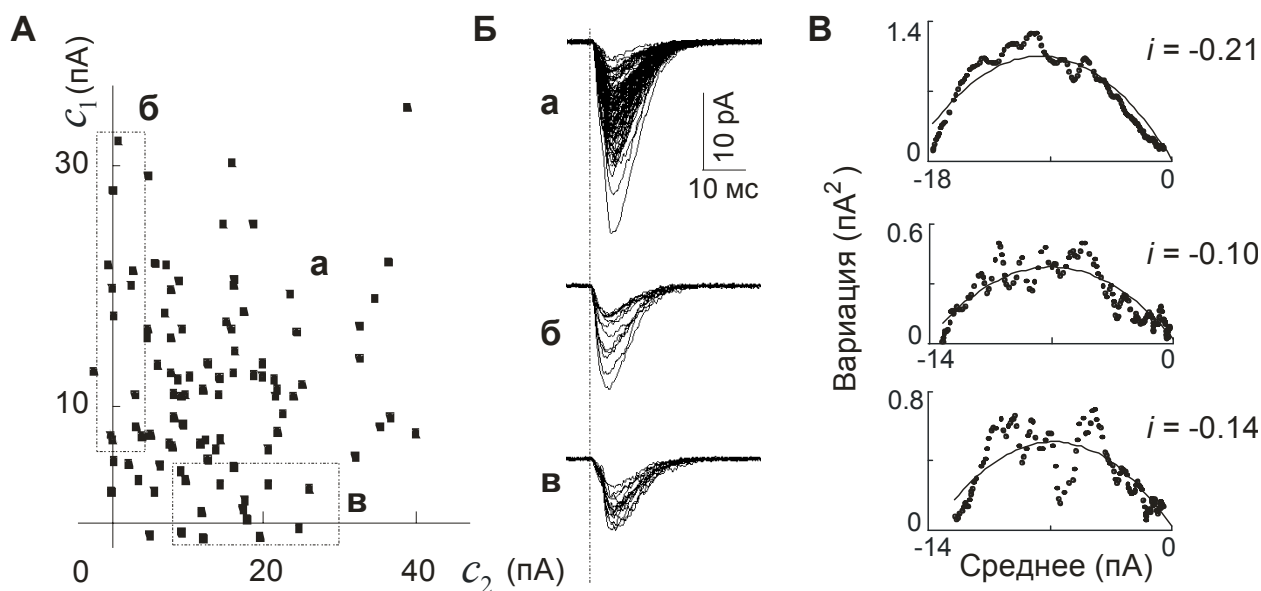


**Рис. 2.** Метод нестационарного флюктуационного анализа (НСФА). А – наложение 20 модельных вызванных постсинаптических токов (ПСТ), нормированных по амплитуде ( $i = -0.1$  пА;  $N = 20$ ; без фонового шума). Ток выбран отрицательным из соображений соответствия физиологическим данным, в которых регистрируемый ток отрицателен. Б – средний ответ, рассчитанный по 20 модельным ПСТ. В – квадраты отклонений от среднего ответа, построенные для 20 ПСТ для интервала, отмеченного пунктирными вертикальными линиями. Г – диаграмма "вариация-среднее" и ее аппроксимация параболой. Дано уравнение параболы и полученный ток одиночного канала.



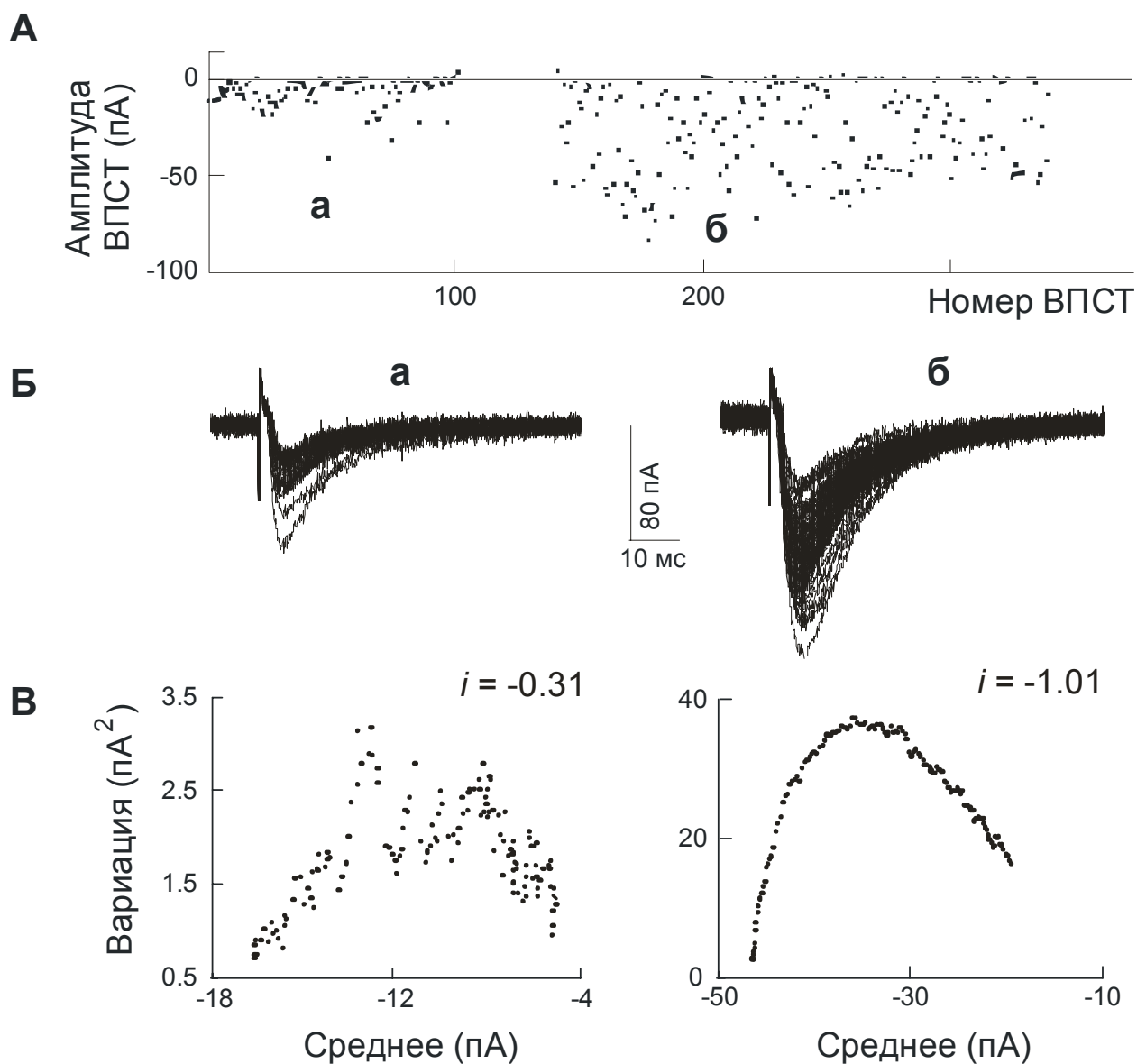
Разница латентностей компонент  $c_1$  и  $c_2$   
 —○— 1 мс; —■— 2 мс; —△— 3 мс.

**Рис. 3.** Измерение латентностей индивидуальных постсинаптических токов (А, Б) и влияние компонентного состава модельных постсинаптических токов (ПСТ) на завышение оценки тока отдельного канала (В, Г). А – зависимость латентностей индивидуальных ПСТ от относительного вклада в них длиннолатентной компоненты  $c_2$  в модельном эксперименте ( $n = 100$ ). Вклады компонент  $c_1$  и  $c_2$  представляли собой случайные величины и явно генерировались моделью для каждого ПСТ. Б – то же в физиологическом эксперименте ( $n = 114$ ). В качестве оценок вкладов компонент  $c_1$  и  $c_2$  использованы результаты КА. Представлены ПСТ, записанные в контроле и во время ДП, удовлетворяющие сформулированным условиям отбора, кроме условия на латентность. Пунктирной линией отмечена критическая линия отбраковки длиннолатентных ответов, соответствующая использованной в работах [6, 7] латентности в 3 мс. Видно, что ПСТ, избежавшие "отбраковки" остаются неоднородными по компонентному составу. В Результаты компьютерного моделирования: оценки тока отдельного канала  $i$  модельных ПСТ, полученные для выборок двухкомпонентных ответов с разным компонентным составом при различных латентных задержках между компонентами. Каждая точка получена усреднением по 4 сериям компьютерных экспериментов, по 50 модельных ПСТ в каждом. Значение тока отдельного канала, заложенное в модель,  $i = -0.1$  пА. Три кривые соответствуют трём временам задержки второй (длиннолатентной) компоненты по сравнению с первой (коротколатентной): 1, 2 и 3 мс. По оси абсцисс отложено отношение средних вкладов первой и второй компонент для каждой из выборок.

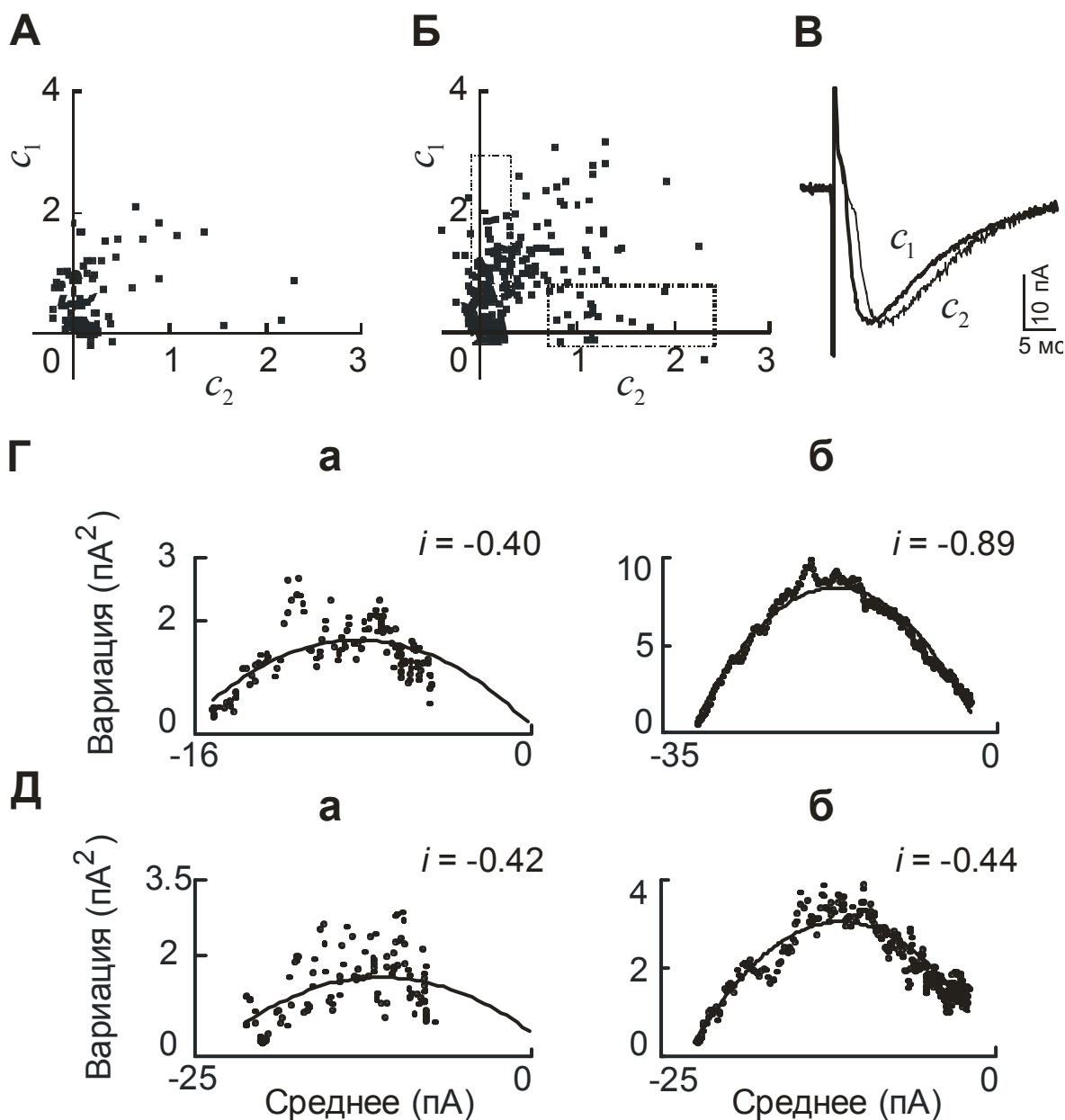


**Рис. 4.** Совместное использование методов компонентного анализа (КА) и НСФА в модельном компьютерном эксперименте. **А** – диаграмма КА-амплитуд для коротколатентной ( $c_1$  – вдоль оси ординат) и длиннолатентной ( $c_2$  – вдоль оси абсцисс) компонент ( $n = 100$ ). Пунктирными прямоугольниками отмечены "чистые" коротколатентные ответы и "преимущественно длиннолатентные" ответы с примесью низкоамплитудных коротколатентных компонент. **Б** – наложение отдельных модельных ПСТ: "смешанных" (**а**,  $n = 100$ ), "коротколатентных" (**б**,  $n = 14$ ) и "преимущественно длиннолатентных" (**в**,  $n = 14$ ), содержащих только низкоамплитудные коротколатентные компоненты (соответствующие выборки представлены на **А** пунктирными прямоугольниками). **В** – применение НСФА к каждой из выборок, представленных на **А** (а–в соответственно). Видно, что для полной выборки оценка тока отдельного канала завышена в два раза, а "чистая" выборка коротколатентных ответов дала оценку, идентичную значению тока выбранному в модели.

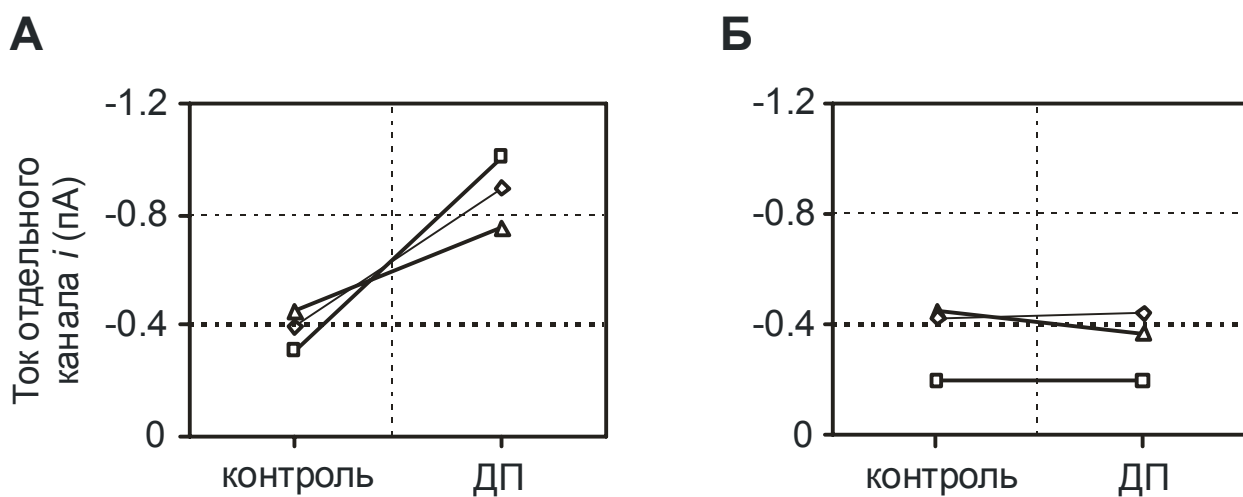




**Рис. 5.** Ход физиологического эксперимента и воспроизведение описанной в литературе процедуры определения тока канала до и после вызова ДП. **А** – Зависимость амплитуды ПСТ от порядкового номера стимула. **а** – контроль ( $n = 101$ ), **б** – ДП ( $n = 198$ ). **Б** – наложение ПСТ, полученных в ходе эксперимента. Представлены только ПСТ, удовлетворяющие критериям "отбора", описанным в разделе Методы. **а** и **б** соответствуют периодам, представленным на **А**. **В** – диаграммы "вариация-среднее" и аппроксимирующие параболы для ПСТ в контроле (**а**) и во время ДП (**б**).



**Рис. 6.** Совместное применение компонентного анализа и НСФА к физиологическим данным. **А, Б** – результаты КА, выполненного для участков контроля ( $n = 109$ ) и ДП ( $n = 281$ ) в одном из экспериментов. Видно, что в контроле компонента  $c_2$  хорошо проявляется лишь в отдельных ответах, основной вклад принадлежит компоненте  $c_1$ . Во время ДП обе компоненты становятся заметно выражены. **В** – первая и вторая компоненты: результат усреднения ПСТ по выборкам однокомпонентных ответов. Выборки ПСТ, использовавшиеся для усреднения, выделены на рис. 6Б пунктирными прямоугольниками ( $n = 53$  для  $c_1$ ,  $n = 16$  для  $c_2$ ). **Г, Д** – метод НСФА: диаграммы "вариация-среднее"; **Г** – для всех ПСТ, удовлетворяющие критериям отбора, **Д** – для "однокомпонентных" выборок, построенных с помощью метода КА; **а** – ПСТ, записанные в контроле, **б** – ПСТ во время ДП. Видно, что для полной выборки ПСТ во время ДП оценка тока отдельного канала оказалась примерно в 2 раза выше, чем для "однокомпонентной" выборки. Количество ПСТ, участвовавших в построении диаграмм "вариация-среднее", составило 41, 163, 32 и 50 для **Га, Гб, Да** и **Дб** соответственно.



**Рис. 7.** Суммарные результаты определения тока отдельного канала по данным трех электрофизиологических экспериментов. **А** – Применение метода НСФА к полным выборкам ПСТ до и после ДП; использованы ПСТ, удовлетворяющие критериям визуального отбора. Во всех трех случаях обнаруживается примерно двукратное увеличение тока отдельного канала. **Б** – Результаты НСФА однокомпонентных выборок. Видно, что значимого изменения тока отдельного канала не происходит.