

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Ф И З И Ч Е С К И Й Ф А К У Л Ь Т Е Т

кафедра биофизики

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

студента 6 курса

Хахалина Арсения Сергеевича

**Количественные методы
анализа синаптических связей
между нейронами головного мозга**

Научный руководитель:

доктор биологических наук Л.Л.Воронин

Допущен к защите

" " декабря 2003 г.

Заведующий кафедрой биофизики

профессор В.А.Твердислов

Москва, 2003 г.

Содержание

Содержание	1
Введение	3
Список сокращений	4
Литературный обзор	5
Долговременная потенция.....	5
Гиппокамп: специфика и строение	5
Строение типичного возбуждающего синапса центральной нервной системы млекопитающих	7
Существующие модели синаптической пластичности	10
Методы	13
Методика точечного отведения	13
Минимальные ответы	15
Приготовление препарата	15
Варианты экспериментальных протоколов.....	17
Математические методы	19
<i>Компонентный анализ</i>	19
<i>Оценка величины ПО</i>	23
<i>Нестационарный флюктуационный анализ</i>	25
<i>Квантовый анализ и анализ "выпадений"</i>	27
<i>Применявшееся программное обеспечение</i>	29
Результаты и обсуждение	30
Применение методов компонентного и квантового анализа к эффекту потенциации, вызванному сочетанием афферентной стимуляции с деполяризацией постсинаптической мембраны	30
Сравнение различных вариантов метода НСФА. Влияние шумов. Влияние разброса параметров.....	34
<i>Варианты НСФА с нормировкой среднего и нормировкой ответов</i>	34
<i>Метод "трёх точек"</i>	35
Использование НСФА для определения кривой зависимости проводимости NMDA-каналов от потенциала на постсинаптической мембране	36
Совместное использование метода НСФА и компонентного анализа. Результаты стимуляций	41
Применение компонентного анализа и метода НСФА к ответам, опосредованным AMPA-каналами, для изучения долговременной потенциации	46
Выводы	48
Список литературы	49

Введение

Нервная система животных образована нервными клетками – *нейронами*. Передача информации от одной клетке к другой происходит при помощи специальных образований, называемых *синапсами*. Одним из важнейших свойств синапса, необходимых для реализации процесса мышления и, особенно, формирования памяти, является *пластичность*. Пластичностью синапса называется его способность изменять свою эффективность под воздействием различных внутренних и внешних факторов.

Под "*эффективностью синапса*" в разных случаях могут иметься в виду немного разные вещи, но обычно эта величина определяется как средняя амплитуда вызванных постсинаптических потенциалов (или токов). В свою очередь эта амплитуда зависит от большого количества внутренних параметров самого синапса и постсинаптического нейрона.

Перед исследователями в этой связи стоят следующие основные вопросы:

1. Какие параметры синапса изменяются при пластических процессах в нём? Как можно измерить эти изменения?
2. Какие существуют виды синаптической пластичности? Каковы условия вызова изменений параметров синапса?
3. Как именно эффекты синаптической пластичности участвуют в системной деятельности организма, – в поведении, мышлении, работе памяти?

Настоящая работа посвящена преимущественно изучению первого вопроса. В работе приведены, охарактеризованы и по возможности проанализированы некоторые математические методы, которые могут помочь разрешить противоречия и дать ответы на вопросы о конкретных механизмах синаптической пластичности, а также в ней будет представлен ряд новых результатов, полученных с помощью этих методов.

Список сокращений

- AMPA – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксалепропионат
- ДП – долговременная потенция
- NMDA – *N*-метил-*D*-аспартат
- НСФА – нестационарный флюктуационный анализ
- ПД – парная депрессия
- ПО – парное облегчение

Литературный обзор

Долговременная потенция

Широко используемой экспериментальной моделью для изучения синаптической пластичности, имеющей отношение к памяти [26], является т.н. *долговременная потенция* (ДП) – феномен, открытый в 70х годах прошлого века в нейронах гиппокампа. Суть явления состоит в резком "облегчении" синаптической передачи (увеличении эффективности соответствующих синапсов) после достаточно сильного воздействия на вход пресинаптических нейронов. Роль такого "сильного воздействия" обычно играет *тетанизация* – серия сильных и частых стимулов, подаваемых на стимулирующий электрод [29]. Эффект ДП вызывается просто, эффект очень устойчив, наблюдается в течение многих часов, дней и даже недель после стимуляции (что было показано в хронических экспериментах [28]). Была продемонстрирована и физиологическая значимость этого явления, – в ряде опытов удалось достичь эффектов, сходных с ДП, не путём электрофизиологического, а путём "поведенческого" воздействия на животное, т.е. путём формирования условных рефлексов.

Гиппокамп: специфика и строение

Гиппокамп, как объект для исследований механизмов памяти, оказался исключительно удобным и ещё по нескольким причинам. Во-первых, показана активная вовлечённость этого отдела мозга в процессы восприятия информации, её распознавания, анализа и запоминания. Во-вторых, гиппокамп имеет очень упорядоченную внутреннюю структуру (корковое строение) и в некотором смысле "изолирован" от других систем мозга (имеет, весьма ограниченное число информационных входов и выходов при наличии по крайней мере трёх внутренних последовательных синаптических переключений), – это позволяет изучать его не только *in vivo*, но и *in vitro* (на изолированных препаратах). Расположение нервных клеток и их отростков позволяет получать *срезы* гиппокампа, которые, будучи погружёнными в специальный питательный раствор, максимально приближенный по составу к спинномозговой жидкости, живут в течение нескольких часов (а при соблюдении некоторых дополнительных мер – даже суток). При таком способе приготовления препарата, значительная часть локальной нейронной сети остаётся сохранной, поэтому в течение всего времени нейроны в срезах продолжают демонстрировать характерные эффекты, такие как ДП, долговременная депрессия и т.д.

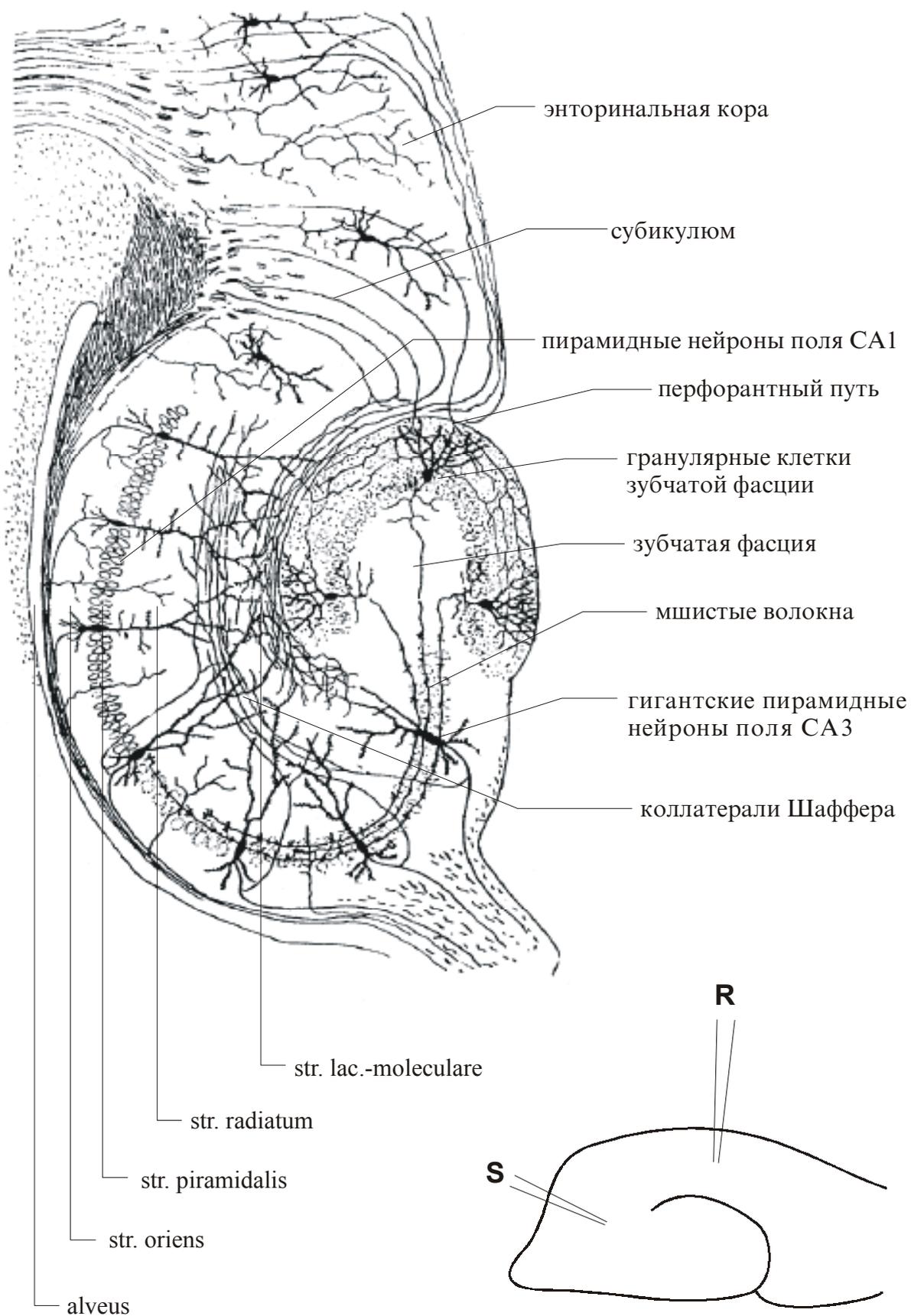


Рис. 1. Строение гиппокампа и расположение электродов на срезе
R - регистрирующий электрод, **S** - стимулирующий электрод.

Обратимся к строению гиппокампа [16] (Рис. 1). Эта часть мозга имеет корковое строение (относится к старой коре). В гиппокампе выделяется несколько основных областей, различающихся морфологически и функционально, – это *зубчатая фасция*, *поля CA1* и *CA3*. Основными клеточными элементами гиппокампа являются большие *пирамидные клетки* областей CA1 и CA3 и мелкие *гранулярные клетки* зубчатой фасции. В области CA1 различают несколько слоёв: *alveus* (наружный слой, примыкающий к эпендиме бокового желудочка и состоящий из миелинизированных афферентных и эфферентных волокон гиппокампа); *stratum oriens*, содержащий базальные ("выходные") дендриты пирамидных нейронов; *str. piramidalis* – пирамидный слой, содержащий тела нейронов; *str. radiatum*, образованный начальными сегментами апикальных ("входных") дендритов и внутригиппокампальными волокнами; и пограничный *лакунозно-молекулярный слой*, содержащий терминальные ветви дендритов пирамидных нейронов и небольшое количество полиморфных нейронов. На границах слоёв находятся скопления немногочисленных и разнообразных интернейронов.

Архитектура соединений гиппокампа такова: афференты от *энторинальной коры* входят в гиппокамп в составе *перфорантного пути*. Большая часть волокон оканчиваются на гранулярных клетках зубчатой фасции, которые, в свою очередь, посылают свои аксоны – *миштые волокна* – к пирамидным нейронам области CA3. Сигналы от нейронов поля CA3 уходят из гиппокампа по волокнам в составе *фимбрии* и *свода*, но одновременно, по коллатералям, называемым *коллатеральми Шаффера* они направляются на вход пирамидных нейронов поля CA1 (проходят в радиальном слое). Аксоны пирамид области CA1 разветвляются в альвеусе и уходят по направлению к *субикулуму*, а также через фимбрию к *септуму*.

На Рис. 1 показано расположение электродов при проведении типичного эксперимента на срезе гиппокампа. Буквой S обозначены возможные положения стимулирующих электродов. Эти электроды расположены в радиальном слое. Регистрирующие электроды (R на рисунке) могут осуществлять отведение как от тела пирамидного нейрона, так и от его апикальных дендритов.

Строение типичного возбуждающего синапса центральной нервной системы млекопитающих

Рассмотрим строение основного объекта данной работы – отдельного синапса (Рис. 2). Синапс (здесь и далее под этим словом мы будем иметь в виду возбуждающий химический синапс центральной нервной системы млекопитающих) представляет собой сложное образование, служащее для передачи сигнала от одного нейрона к другому.

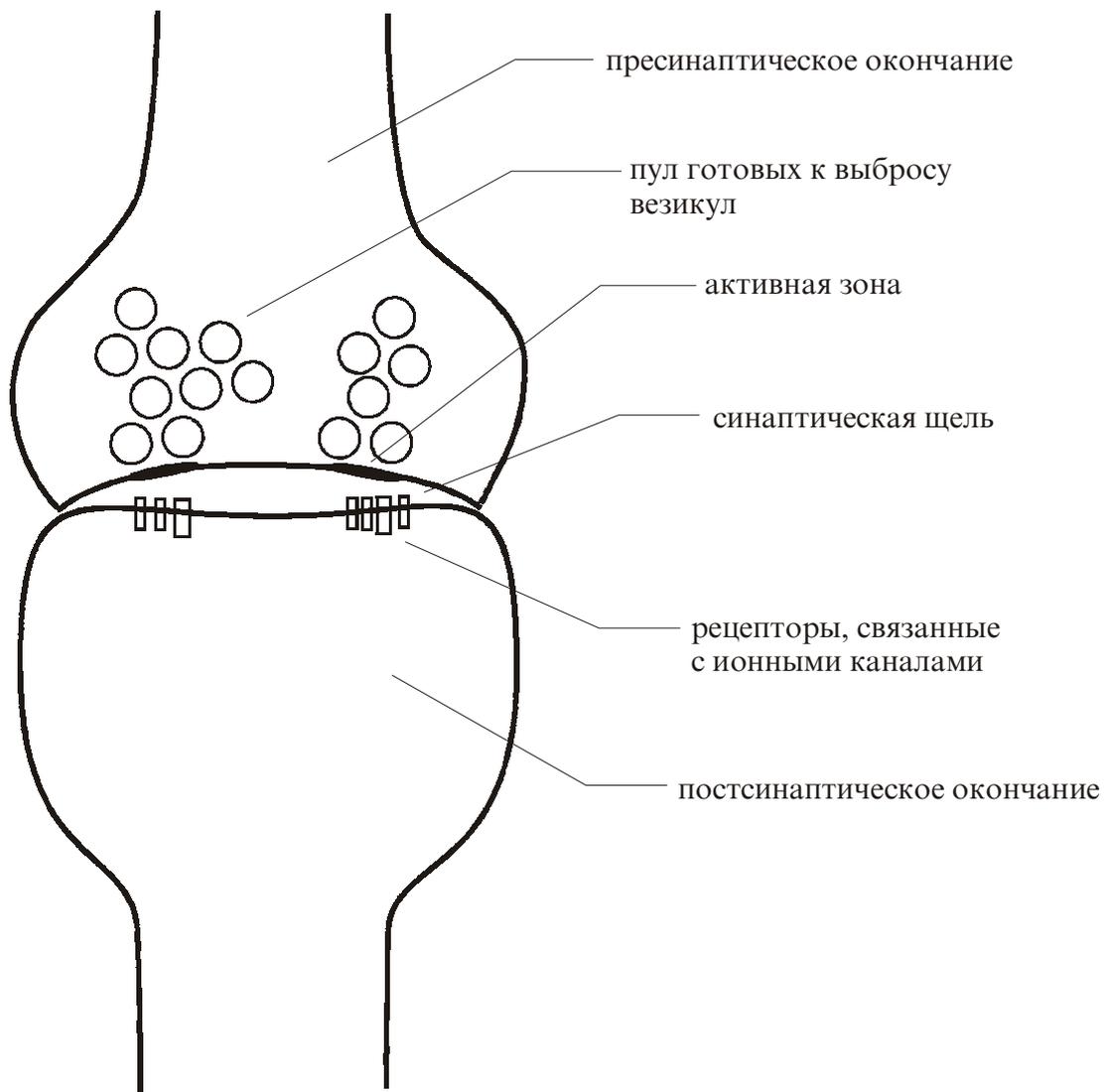


Рис. 2. Общее строение синапса

Параметры, которыми можно характеризовать работу различных частей синаптического аппарата:

- **Пул везикул:** количество потенциально готовых к выбросу везикул, среднее количество нейромедиатора в отдельной везикуле;
- **Активные зоны:** вероятность выброса везикулы, количество активных зон;
- **Рецепторы постсинаптической мембраны:** количество рецепторов (или связанных с ними ионных каналов), средний ток отдельного канала, вероятность открытия рецептора при заданной концентрации нейромедиатора, кинетика открытия каналов (с учётом или без учёта эвакуации нейромедиатора из синаптической щели).

Несмотря на то, что синапс представляет собою целостную и высокоорганизованную структуру, одна его часть, называемая *пресинаптической мембраной* является частью одного ("передающего") нейрона; в то время как *постсинаптическая мембрана* представляет собою уже часть другого, "принимающего" нейрона. Между этими мембранами находится *синаптическая щель*. В пресинапсе, вблизи мембраны, происходит накопление *везикул* (пузырьков), наполненных *нейромедиатором*. По приходе потенциала действия 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, связанные с ионными каналами и открывающие их в ответ на поступление нейромедиатора.

В нашем конкретном случае (синапсы пирамид поля CA1 гиппокампа) в роли нейромедиатора выступает глутамат, а в роли рецепторов – ионотропные рецепторы *AMPA* и *NMDA* (названия связаны с номенклатурными названиями специфических агонистов). Эти два типа рецепторов имеют разную кинетику открытия, разные последствия этого открытия, разные закономерности работы и разное физиологическое значение. Рецепторы AMPA-типа являются в некотором смысле "рабочими" рецепторами синапса, ответственными 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 (в данном случае важна проницаемость для ионов K^+ и Na^+). 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 оказываются заблокированы ионами Mg^{2+} из внеклеточной среды [10]. Интерпретация этих закономерностей напрашивается: ионы Ca^{2+} всегда являются сигналом к запуску специфических для клетки внутренних процессов. Для синапса, как части нервной клетки, это также верно. Поступление кальция внутрь постсинаптического окончания приводит к запуску каскадов фосфорилирования, которые, в конечном итоге, могут привести к сильнейшим перестройкам синаптического аппарата. Очевидно, что подобные процессы имеет смысл запускать только в ответ на некоторые "значимые" события. "Отсечка" такого рода "значимых" событий, по-видимому, и происходит за счёт нелинейной вольт-амперной характеристики NMDA-каналов. Ca поступает в клетку только если сигнал приходит на пресинапс в момент, когда

постсинаптический нейрон уже достаточно деполяризован. Это происходит, например, при тетанизации. Предложены и механизмы реализации этого условия *in vivo* [20, 27].

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 . Эта картина является, разумеется, весьма грубой. За рамками такого рассмотрения остаётся множество эффектов, таких, как электрические и химические обратные связи, кинетика открытия ионных каналов, кинетика эвакуации нейромедиатора из синаптической щели, спонтанные процессы и т. д. и т. п. На практике даже эта модель несколько огрубляется. Так, величины P , N_{zone} и $N_{ves.}$ обычно не рассматриваются по отдельности, а фигурируют в рассмотрении в виде одной производной величины – m , – среднего количества везикул, выбрасываемых в синаптическую щель. Вместо количества передатчика в одной везикуле используется величина v , которую указывают непосредственно в единицах тока или напряжения, т. е. на самом деле речь идёт о сложной величине, зависящей также и от значений n и i .

Существующие модели синаптической пластичности

На вопрос о том, какие именно изменения синаптического аппарата играют основную роль при ДП, до сих пор нет 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, – и, видимо, множество других, более тонких процессов. Относительно механизмов ранних фаз ДП (до 2-4 часов с момента тетанизации) нет единого мнения. Говоря наиболее общо, все модели ранних фаз ДП можно разделить на две группы. Ряд учёных [2, 3, 14, 17, 24] в своих работах предполагает, что основную роль в данном случае играют изменения в *пресинаптической мембране* (такие, как изменение вероятности выброса везикул, их размера, числа), сопровождающиеся изменением выброса глутамата в синаптическую щель. Их противники [6, 13, 15, 18, 19, 21] выдвигают тезисы о главенствующей роли *постсинаптических изменений* (изменение числа функциональных рецепторов и/или ионных каналов, их кинетики, среднего тока

отдельного канала), – а значит, изменений чувствительности постсинаптической мембраны к глутамату. Многие исследователи занимают в этом споре "промежуточное" положение, признавая существование как тех, так и других изменений.

Предпринимались различные попытки "опознать" в изменениях синаптической эффективности при ДП пре- или постсинаптические механизмы. Одним из возможных подходов является сравнение ответов, возникающих при активации каналов разного вида. Логично предположить, что если при ДП происходит увеличение выброса глутамата, ответы от AMPA и NMDA-рецепторов должны потенцироваться одинаково. Если же речь идёт об изменении чувствительности постсинаптической мембраны, потенциация для каналов разного вида будет различной. Однако эксперименты такого рода требуют большой аккуратности как при выборе экспериментального протокола, так и при интерпретации результатов.

Рядом исследователей в качестве гипотезы поддержания ДП в гиппокампе была предложена т.н. "Гипотеза молчащих синапсов" [6, 15, 18, 19]. Согласно этой простой на первый взгляд гипотезе, в гиппокампе животных (особенно молодых) имеется большое число *постсинаптически молчащих синапсов*. В этих синапсах происходит обычный выброс глутамата, но отсутствуют AMPA-рецепторы на постсинаптической мембране, что приводит к отсутствию постсинаптического ответа. ДП в таких синапсах осуществляется за счёт доставки и "высадки" на постсинаптическую мембрану "заготовленных" где-то во внутренних компартментах AMPA-рецепторов. Аналогичный механизм ДП предполагается и для других, не "молчащих" синапсов.

Гипотеза "молчащих синапсов" успела завоевать достаточно большую популярность несмотря на то, что основные эксперименты, её подтверждающие, были поставлены весьма неаккуратно и полученные данные можно интерпретировать по-разному. В исходных работах по "молчащим синапсам" использовались очень высокие по физиологическим меркам частоты тестовой стимуляции нейрона (1-1.6 Гц). При таких частотах стимуляции, в особенности на нейронах животных первых дней постнатального онтогенеза, оказывается ярко выраженным феномен пресинаптической депрессии. Запасы нейромедиатора в пресинапсе истощаются и выброс глутамата в ответ на проходящий по волокну стимул становится всё менее вероятным. Именно это и произошло, по-видимому, с синапсами, объявленными в указанных работах "постсинаптически молчащими". (Ряд работ этой серии проводился при комнатной температуре, что ещё более снижало вероятность выброса нейромедиатора и, тем самым, ещё более усиливало эффекты пресинаптической депрессии в изучаемых нейронах).

Позже в других работах [14] было показано, что, действительно, данные такого рода следует интерпретировать очень осторожно. При таких условиях проведения эксперимента синапсы действительно сильно депрессируются и начинают вести себя как молчащие (AMPA-ответ пропадает), однако весьма простые средства (повышение температуры, постсинаптическая деполяризация, добавление веществ, облегчающих выброс глутамата и снижающих десенситизацию постсинаптических рецепторов, использование эффекта парной фасилитации) позволяют вновь получить на них ясные AMPA-ответы [3].

В работе [6] было также показано присутствие на постсинаптической мембране "молчащих синапсов" NMDA-рецепторов. Для этого производилась деполяризация постсинаптической мембраны. NMDA-ответы действительно появлялись, это интерпретировалось как простое снятие магниевого блока. В настоящей работе показано, что деполяризация постсинаптической мембраны может приводить к кратковременной потенциации синапса, и появление ответов в работе [6] было, вероятно, связано именно со снятием пресинаптической депрессии.

Имеются и другие эксперименты, результаты которых могут быть проинтерпретированы как с позиций приверженцев "постсинаптической теории" ДП, так и с позиций их противников.

В настоящей работе мы попытаемся привести некоторые новые данные, важные для выбора одной или другой теории; продемонстрировать способы дальнейшего получения новых данных, по возможности указать некоторые достоинства и недостатки этих способов, а также предложить некоторые новые интерпретации старых результатов.

Методы

Методика точечного отведения

Основным экспериментальным методом, используемым в данной работе, является *метод точечного отведения* (patch-clamp) в модификации *целая клетка* (whole cell). Суть метода проста (рис. 3а): полый стеклянный капиллярный электрод подводится к клетке вплоть до осуществления плотного контакта с её мембраной. Затем в электрод подаётся короткий импульс отрицательного давления, который "вырывает" фрагмент мембраны внутрь электрода. После этого солевой раствор внутри стеклянного капилляра (его ионный состав стараются сделать близким к составу цитоплазмы клетки) оказывается в непосредственном контакте со внутренностью клетки. Сопротивление такого электрода относительно мало (около 4-7 МОм), что обеспечивает достаточно низкий уровень шума при записи вызванных ответов.

Запись при точечном отведении можно производить в режиме *фиксации потенциала* клетки (voltage-clamp) или *фиксации тока* (current-clamp) через её мембрану. В первом случае потенциал на регистрирующем электроде (а значит, и потенциал внутри клетки) фиксируется с помощью высокоточного операционного усилителя с отрицательной обратной связью. При этом корректирующий ток, посылаемый усилителем через электрод для стабилизации потенциала, и становится нашим электрофизиологическим сигналом. Т.к. потенциал клетки не меняется, понятно, что ток через электрод оказывается равен общему току через мембрану клетки.

В другой модификации метода происходит *фиксация тока* через электрод и происходит запись подаваемого на электрод потенциала. Запись при фиксации тока оказывается значительно менее шумной, однако обычно её бывает сложнее интерпретировать, к тому же она значительно более подвержена нелинейным искажениям при записи и предъявляет гораздо более строгие требования к стабильности изучаемого нейрона.

В данной работе всюду, где речь идёт о точечном отведении, имеется в виду точечное отведение по схеме фиксации потенциала.

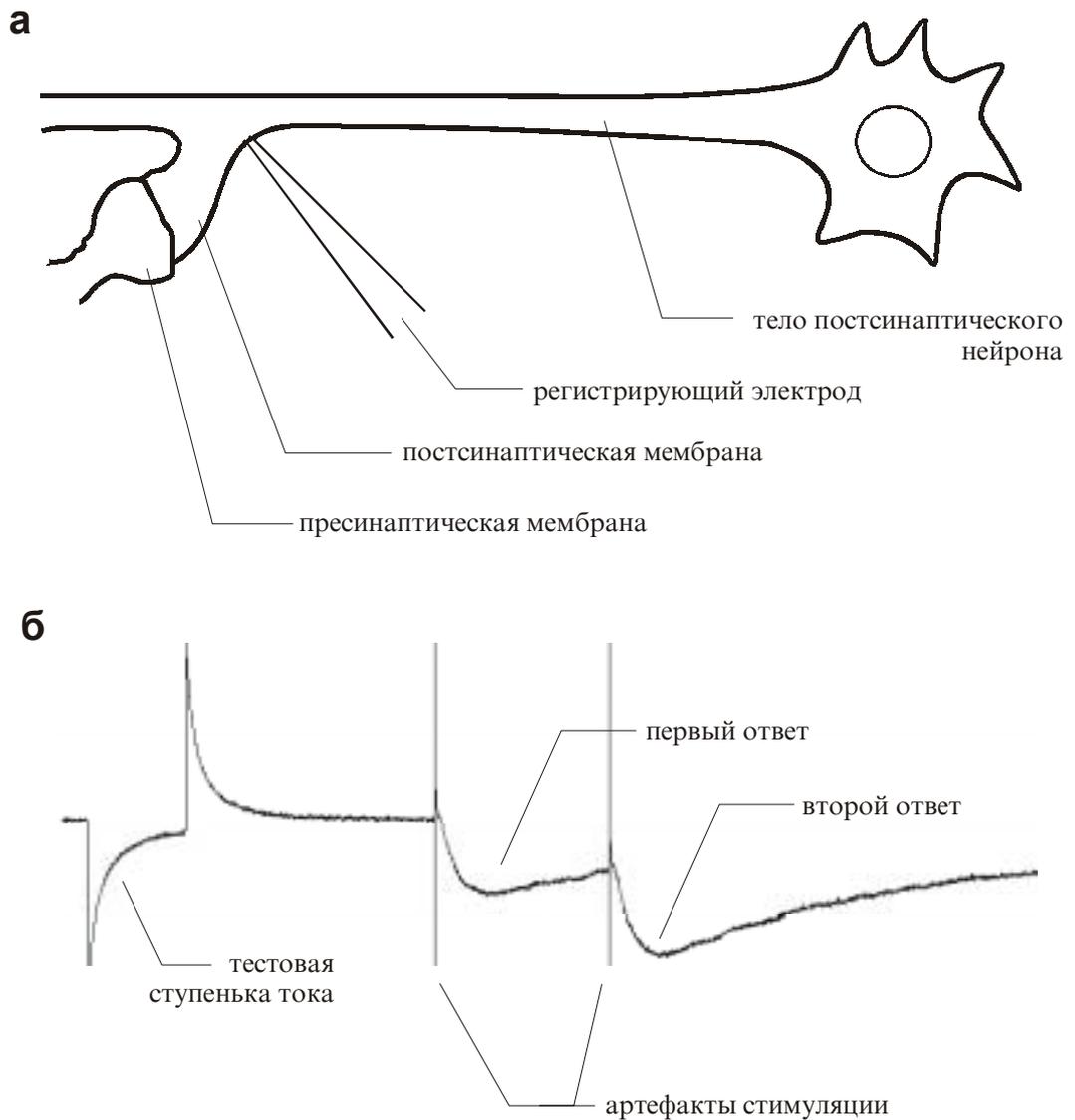


Рис. 3. Общая схема точечного отведения и общий вид экспериментальной записи

а - Схема точечного отведения. Стекланный электрод подводится к постсинаптическому нейрону (как можно ближе к записываемому синапсу), при этом раствор внутри электрода приходит в непосредственный контакт с цитоплазмой клетки.

б - Общий вид экспериментальной записи (на рисунке показано среднее по нескольким NMDA-опосредованным ответам). Видны тестовая ступенька, артефакты стимуляции, первый и второй ответы.

Минимальные ответы

Несмотря на бесспорное наличие общих закономерностей, потенциация в каждом конкретном синапсе может происходить по-разному. Кроме того, при вызове потенциации может изменяться вклад каждого из синапсов в общий ответ. Эти два соображения заставляют исследователей стремиться по возможности производить запись от отдельных синапсов или, по крайней мере, от как можно меньшего их числа.

Наиболее простой и распространённой мерой предосторожности такого характера является использование *минимальных вызванных ответов* [28]. Суть данного метода состоит в том, что после размещения стимулирующего электрода в области прохождения пресинаптических волокон, иннервирующих изучаемый нейрон, сила стимуляции плавно увеличивается от нуля вплоть до значения, при котором появляются первые вызванные ответы. При этом происходит примерно следующее: по мере увеличения силы стимуляции, импульсы тока начинают возбуждать сначала самые низкопороговые и близкие к электроду волокна, затем чуть более дальние, и т. д. В какой-то момент возбуждение затрагивает и волокна, иннервирующие наш нейрон. Если граница появления вызванных ответов была замечена достаточно хорошо, мы вправе надеяться, что стимулирующий электрод возбуждает одно волокно из всего множества волокон, имеющих синаптические контакты с нашим нейроном.

Строго говоря, даже в этом случае мы не застрахованы от получения суммарного ответа, так как одно волокно может иметь несколько синаптических контактов с одним и тем же нейроном. Однако, в любом случае, запись такого рода оказывается наиболее информативной из всех возможных. Соотношение сигнала к шуму при работе с минимальными вызванными ответами, само собой, оказывается меньше, чем в случае "обычных", суммарных ответов, однако интерпретация полученных результатов становится гораздо более строгой и определённой. Так, например, ранние работы, посвящённые гипотезе постсинаптических механизмов ранних фаз долговременной потенциации, основывались, по-видимому, как раз на неверной интерпретации результатов обработки суммарных ответов (см. [2] и ссылки в ней). Возможность ещё одной двойной интерпретации такого рода будет приведена и в настоящей работе (см. последнюю часть раздела "Результаты").

Приготовление препарата

Крысы линии Вистар (4-6 недель) декапитировались, извлекался мозг. Мозг помещался на 1-2 минуты в холодную (0°) искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ). Затем из него выделялся гиппокамп. С помощью вибротома, также в среде

ИСМЖ, готовились поперечные срезы гиппокампа толщиной 350-400 мкм. Срезы выдерживались около часа ИСМЖ с карбогеновой аэрацией (95% O₂ 5% CO₂) при комнатной температуре.

Затем индивидуальные срезы помещались в экспериментальную камеру, перфузируемую с постоянной скоростью обогащённой ИСМЖ при температуре 32°. Электроды размещались на срезе как это показано на Рис. 1. Регистрирующий электрод подводился к одному из пирамидных нейронов, запись осуществлялась в режиме точечного отведения, модификация целая клетка, методика фиксации потенциала. Стимулирующие (стеклянные монополярные) электроды устанавливались в радиальном слое. В части экспериментов проводилась стимуляция одного нейрона по двум различным синаптическим входам.

Состав базовой ИСМЖ (мМ): NaCl 124, KCl 3, KH₂PO₄ 1.25, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 2.4, NaHCO₃ 26, глюкоза 10, предварительная карбогеновая аэрация (до достижения pH 7.4).

ИСМЖ для перфузии в ходе регистрации содержала, в отличие от базовой: 2.4 мМ CaCl₂, 1.6 мМ MgCl₂, 0.3 мкМ CNQX (6-циано-7-нитрокуиноксалин-2,3-дион), 50 мкМ пикротоксина и 2 мкМ глицина.

Электрод, использовавшийся для внутриклеточной регистрации, заполнялся раствором, содержащим (мМ): Cs метилсульфонат 130, HEPES 10, MgCl₂ 1, EGTA 0.5, NaCl 1, QX-314 5; pH 7.3-7.4.

В экспериментах с записью изолированных NMDA-ответов внеклеточный раствор обеднялся магнием (концентрация ионов Mg²⁺ доводилась до 0.1 мМ) и вносился блокатор NBQX (2 мМ).

Удерживаемый потенциал в разных опытах изменялся от -90 до +40 мВ. Использовался усилитель Axoclamp-2B фирмы Axon Instruments. Стимуляция осуществлялась с частотой 1/6 Гц. В части экспериментов после первого стимула на тот же синаптический вход подавался второй стимул (с задержкой в 70 мс). Данные фильтровались с частотой среза 3 кГц и записывались в компьютер для оффлайн-обработки с частотой дискретизации 20 кГц.

Для удобства изложения упомянем ещё об одной особенности регистрации. Стимулирующий электрод образует цепь не только с землёй, но и с регистрирующим электродом, поэтому малая часть тока, подаваемая в стимулирующий электрод во время стимула, регистрируется аппаратурой и остаётся на записи в виде т.н. *артефакта* (резких и узких выбросов большой величины). Эти артефакты ненамного (на величину латентности) предшествуют вызванным ответам. В идеале артефакты не должны исказить

форму регистрируемых сигналов, однако на практике артефакты всегда имеют экспоненциальный "хвост" с некоторой постоянной спада. Существуют алгоритмы "вычитания" артефакта из конечных записей, однако в данной работе эти алгоритмы не использовались.

Варианты экспериментальных протоколов

Как уже указывалось, метод регистрации, использующийся в данной работе, предполагает установку потенциала постсинаптической мембраны на некоторую фиксированную величину. А так как деполяризация постсинаптической мембраны, если сочетать её с выбросом глутамата в синаптическую щель, приводит к активации NMDA-рецепторов и входу Ca в клетку, напрашивается простейший протокол для изучения ранних фаз длительной потенциации. Сначала потенциал мембраны фиксируется на уровне -70 мВ, близком к нормальному потенциалу покоя нейрона, – производится запись контрольной серии ответов. Затем потенциал сдвигается в область положительных значений. В данных экспериментах использовались потенциалы в диапазоне от $+20$ до $+40$ мВ, что позволило вызывать потенциацию, продолжая записывать вызванные ответы (хотя и противоположной полярности) [4]. Затем удерживающий потенциал возвращается к исходному значению и записывается серия ответов, параметры которой впоследствии сравниваются с параметрами контрольной серии.

Важно иметь возможность хотя бы примерно отслеживать состояние исследуемого нейрона в ходе эксперимента. Для этого перед подачей стимулов в *регистрирующий электрод* регулярно подаётся *ступенька потенциала* (см. Рис 3б). Аппроксимируя переходные кривые экспонентами, можно определить *сопротивление мембраны клетки*. Величина этого сопротивления является хорошим сенсором общего состояния клетки и её пригодности для проведения дальнейших экспериментов.

Простым способом получить информацию о внутренних параметрах синапса является использование *парадигмы двойного ответа*. Суть метода заключается в том, что на стимулирующие электроды подаётся не один, а *два* стимула, разделённые некоторым промежутком времени (Рис. 3б). Эксперимент показывает, что амплитуда второго ответа практически всегда отличается от амплитуды первого. Чаще всего она оказывается *больше*, однако иногда встречаются нейроны, в которых второй ответ оказывается стабильно *меньше*, чем первый. Нейрон "первого типа" можно определёнными манипуляциями превратить в нейрон "второго типа" и наоборот.

Наиболее принятая интерпретация этих эффектов состоит в совместном рассмотрении двух различных механизмов. Обратимся вновь к Рис. 2. Выброс везикул из

пресинаптического окончания вызывается входом в него ионов Ca^{2+} (в ответ на приход потенциала действия). Затем концентрация Ca^{2+} в пресинаптическом нейроне падает, однако это не происходит мгновенно. Поэтому если второй стимул приходит через некоторое не очень большое время после первого, он ещё "застаёт" в пресинапсе некоторое количество остаточного Ca^{2+} . В итоге, концентрация Ca^{2+} для второго синапса оказывается больше, чем для первого, – и это увеличивает вероятность выброса везикулы нейромедиатора.

С другой стороны, если пул везикул слишком мал, может наблюдаться обратный эффект. Если в ответ на первый стимул из окончания выбрасываются почти все имеющиеся там везикулы, приход второго ответа даже в условиях повышенного Ca не сможет вызвать большого ответа, так как количество готовых к выбросу везикул оказывается слишком мало [11].

Если преобладающим оказывается первый механизм – говорят о *парном облегчении* (ПО) или *парной фасилитации* (PPF – paired-pulse facilitation). Если же превалирует механизм, связанный с истощением запаса готовых к выбросу везикул, имеет место *парная депрессия* (ПД, PPD – paired-pulse depression). Оба эффекта характеризуются одной численной величиной, называемой *парным отношением*, которая определяется как отношение амплитуды второго ответа к амплитуде первого.

Видно, что предложенные схемы эффектов ПО и ПД являются полностью пресинаптическими. Механизмы сенситизации и десенситизации рецепторов на постсинаптической мембране могут вносить какой-то вклад в эти эффекты, но, по-видимому, это вклад меньшего порядка, особенно при достаточно длительных интервалах между стимулами (40-70 мс). Поэтому ПО и ПД являются хорошими маркерами изменений вероятности выброса нейромедиатора [12, 17, 24]. Понятно, что если ПО близко к единице, мы имеем дело с синапсом, вероятность выброса в котором достаточно велика, чтобы эффект остаточного кальция был малозаметен, и пул везикул в котором достаточно велик, чтобы не демонстрировать истощения на данной частоте стимуляции. Если же ПО велико – следует ожидать низкой вероятности выброса глутамата в данном синапсе. Крайний случай такого рода синапсов – с отсутствием ответа на первый стимул и регулярными ответами на второй – приведён в работе [14]. Такие синапсы получили название "пресинаптически молчащих".

Приведённая модель эффектов ПО и ПД не является единственной. Так, например, были получены результаты, на первый взгляд, не согласующиеся с пресинаптической моделью эффекта ПО [5]. Для ответов, опосредованных NMDA-каналами была обнаружена зависимость величины ПО от потенциала на постсинаптической мембране. Из

этого исследователями был сделан вывод о вовлечённости постсинаптических механизмов в эффект ПО. Однако, как уже указывалось, деполяризация постсинаптической мембраны в условиях активных NMDA-каналов является физиологически значимой и может вызывать потенциацию; – учёт этого эффекта позволяет объяснить кажущуюся зависимость величины ПО от потенциала постсинаптической мембраны в рамках пресинаптической модели. Проверке данного предположения посвящена часть данной работы.

Математические методы.

Компонентный анализ

Для оценки *амплитуды* (величины) ответа используются в основном два метода: непосредственное изменение *пикового значения* ответа и *метод главных компонент*. Первый метод состоит в вычислении разницы средних по двум небольшим окнам, одно из которых выбрано на участке предшествующем артефакту ("выставление нуля"), другое – вблизи максимума (см. Рис. 4а). Положение обоих окон выбирается по графику среднего ответа.

Второй метод – *метод главных компонент* – представляет собой разработанный статистический подход к анализу сложных сигналов разного рода [1]. Интересующий нас сигнал представляется в виде вектора значений изучаемой величины в T последовательных временных точках. Полная выборка сигналов в этом случае превращается в совокупность из J штук T -мерных векторов. Суть метода состоит в нахождении базиса небольшой размерности, разложение векторов совокупности по которому представляло бы их с наибольшей точностью. Так, например, если все векторы x_i нашей совокупности были в принципе построены по формуле

$$x_i = \alpha_i \mathbf{a} + \beta_i \mathbf{b} + \mathbf{n} \quad (1)$$

(где α_i, β_i – коэффициенты; \mathbf{a}, \mathbf{b} – некие фиксированные векторы, а \mathbf{n} – вектор нормально распределённых величин, дисперсия которых не слишком велика по сравнению с нормами \mathbf{a} и \mathbf{b}) мы вправе ожидать, что для удовлетворительного описания таких векторов достаточно пространства размерности 2. При этом действительная размерность пространства сигнальных векторов может составлять несколько тысяч (т. к. именно столько временных точек регистрируется системой и записывается в память компьютера).

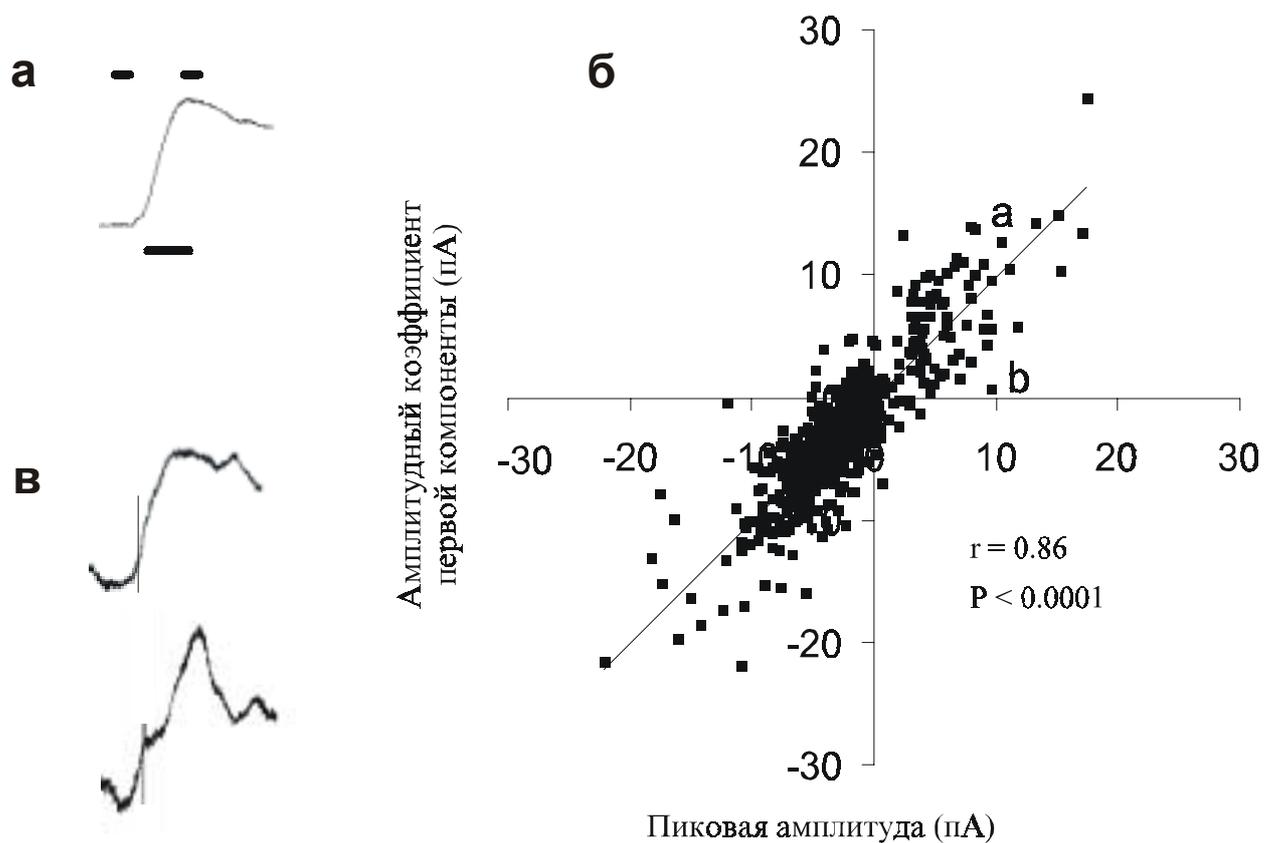


Рис. 4. Метод главных компонент как способ уменьшения соотношения сигнал/шум при оценке амплитуды ответов

а - Средний ответ и окна, по которым производятся оценки амплитуды. Над графиком две полоски указывают положение окон для усреднения. Разница между средними по этим окнам принимается за оценку пиковой амплитуды. Полоска под графиком указывает положение окна, участок сигнала в котором используется для анализа методом главных компонент.

б - Корреляционная диаграмма, построенная для двух оценок амплитуды сигнала. На графике проведена регрессионная кривая, приведены коэффициент корреляции и соответствующий уровень достоверности.

в - показаны примеры ответов, соответствующих двум выделенным на корреляционной диаграмме точкам. Видно, что точке **а**, лежащей вблизи регрессионной кривой, соответствует ответ "правильной формы", тогда как точка **б**, лежащая в стороне, соответствует ответу с явной спонтанной компонентой (ответ начинается ещё до артефакта стимуляции).

Сформулируем сказанное более строго. Пусть x_{it} – набор измеренных нами величин (индекс i соответствует номеру записанного сигнала, t – временному положению точки). Найдём набор векторов \mathbf{a}_j и коэффициентов c_{ij} таких, чтобы для представления

$$x_{it} = \sum_{j=1}^J c_{ij} a_{jt} + res_{it} \quad (2)$$

выполнялось условие

$$\sum_{ij} c_{ij}^2 \rightarrow \max . \quad (3)$$

На векторы \mathbf{a}_j накладываются, кроме того, стандартные условия ортонормированности базиса:

$$\sum_k a_{ik} a_{kj} = \delta_{ij} , \quad (4)$$

где δ_{ij} – символ Кронекера.

Процедура поиска таких векторов и коэффициентов сводится к сочетанию стандартного алгоритма ортонормирования базиса и простого оптимизационного алгоритма. На первом шаге для совокупности векторов x_{it} производится поиск вектора \mathbf{a}_1 и коэффициентов c_{i1} по условиям

$$\begin{cases} \sum_{i,t} (x_{it} - c_{i1} a_{1t})^2 \rightarrow \min \\ \sum_t a_{1t}^2 = 1 \end{cases} . \quad (5)$$

На втором шаге аналогичная процедура повторяется уже для векторов $(x_{it} - c_{i1} a_{1t})$, причём на искомый вектор \mathbf{a}_2 налагается дополнительное условие

$$\sum_t a_{1t} a_{2t} = 0. \quad (6)$$

Итерации такого рода повторяются обычно около десятка раз, хотя на практике для данных электрофизиологических экспериментов с минимальными ответами информационно значимыми оказываются лишь первые 1-3 компоненты и соответствующие им наборы коэффициентов.

Первая компонента сигнала может использоваться для оценки амплитуды ответов. При этом метод он становится эквивалентен вычислению скалярного произведения каждого индивидуального ответа с нормированным средним ответом по совокупности. Как показывает практика, оценка такого рода обычно даёт лучшее соотношение сигнала к шуму, чем стандартный метод оценки амплитуды по пиковому значению сигнала, и при этом сохраняет очень высокий уровень корреляции с этой простой для интерпретации и

более широко используемой оценкой (см. Рис. 4б). В случае же двухкомпонентного сигнала метод позволяет (при выполнении соответствующих условий для величины выборки и уровня фонового шума) разделить эти две компоненты и оценить "амплитуду" (величину вклада в общий сигнал) для каждой из них по отдельности. При этом в роли компонент могут выступать ответы разной латентности, ответы разной формы (т.е. ответы от разных синапсов или ответы, опосредованные рецепторами разного типа) и т. д.

Решающее значение для успешного использования метода главных компонент играет *выбор окна* (выбор той части сигнала, которая будет использована для аппроксимации разложением по линейному пространству меньшей размерности – см. Рис. 4а). Обычно в качестве окна выбирается промежуток от начала ответа до его максимума (или чуть дальше), однако в каждом конкретном случае, в зависимости от специфики имеющегося шума, природы компонент и т. д., этот выбор производится индивидуально.

Для анализа двухкомпонентных сигналов нами часто использовалась дополнительная модификация метода главных компонент (см. ссылки в работе [1]). После нахождения пары векторов a_1 и a_2 в дальнейшем анализе участвуют не они, а их линейные комбинации:

$$\begin{cases} a'_1 = h_1 a_1 + (1-h_1) a_2 \\ a'_2 = h_2 a_1 + (1-h_2) a_2 \end{cases} \quad (7)$$

(где $h_1, h_2 \in (0,1)$ – некоторые коэффициенты). Эти комбинации строятся так, чтобы удовлетворить требованию отсутствия корреляции между значениями коэффициентов первой и второй компоненты (c'_{i1} и c'_{i2}). При этом векторы a'_j , конечно, перестают быть взаимно ортогональными, однако информационная значимость коэффициентов первой и второй компонент при этом сильно возрастает, что позволяет производить эффективные манипуляции с выборками сигналов даже в условиях, когда интерпретация физического значения "чистой" 1й или 2й компоненты становится достаточно сложной.

На Рис. 12 и Рис. 15 представлены примеры выявления компонент при помощи данного алгоритма. В одном случае компоненты имеют разную латентность, в другом – разную форму ответа. На рисунках представлены диаграммы распределения ответов в координатах c_1 - c_2 , на этих диаграммах выделены области, примерно соответствующие "чистым" 1й и 2й компонентам и представлены средние ответы по этим двум областям.

Компонентный анализ оказывается полезным и для "чистки" статистической выборки перед применением статистических методов. Точки, лежащие резко в стороне от основной массы на корреляционных диаграммах (например, на диаграмме "пиковая амплитуда / первый амплитудный коэффициент"), часто оказываются как раз такими "неудачными"

точками, которые в некоторых случаях могут и должны быть исключены из статистической выборки (см. Рис. 4в – точка, помеченная буквой "b"). Кроме того, компонентный анализ можно использовать для нахождения отсроченных и спонтанных ответов, вычисляя корреляции различных фрагментов записи с найденными компонентами (в тех областях, где значимых корреляций быть не должно). Появление точек с большими значениями таких корреляций может быть связано с нежелательной активностью. Но, в любом случае, окончательное решение о включении или не включении проблемных ответов в статистическую выборку производится на основе визуального наблюдения отдельных записей.

Оценка величины ПО

Парное отношение также оценивалось двумя способами. В ряде экспериментов (преимущественно эксперименты с регистрацией ответов от NMDA-рецепторов) использовался "амплитудный" метод (Рис. 5а). "Хвост" первого ответа аппроксимировался экспонентой

$$\tilde{x} = k \exp(-at), \quad (8)$$

где параметры k и a определялись из соображений непрерывности функции и её производной (которые, в свою очередь, определялись применением метода наименьших квадратов к небольшому участку первого ответа до второго артефакта). Затем полученная экспонента вычиталась из общего ответа и мы получали таким образом "изолированный второй ответ". Его амплитуда находилась так же, как и для первого ответа.

Второй способ состоял в применении модификации метода компонент. После нахождения первой компоненты по совокупности всех первых ответов определялась её "корреляция" (скалярное произведение) с каждым из вторых ответов. Чтобы исключить влияние "хвоста" первого ответа на эту оценку находилось ещё одно скалярное произведение первой компоненты с фрагментом первого ответа в области, непосредственно предшествующей второму артефакту (Рис. 5в). И в случае AMPA, и в случае NMDA-ответов к моменту второго артефакта вызванные ответы на первый стимул ведут себя достаточно гладко и монотонно, поэтому величину этого скалярного произведения можно использовать для уточнения компонентного вклада во второй ответ. При этом вместо формулы $ПО = C_2 / C_1$ используется формула

$$ПО = \frac{C_2 - C_{pre}}{C_1} \quad (9)$$

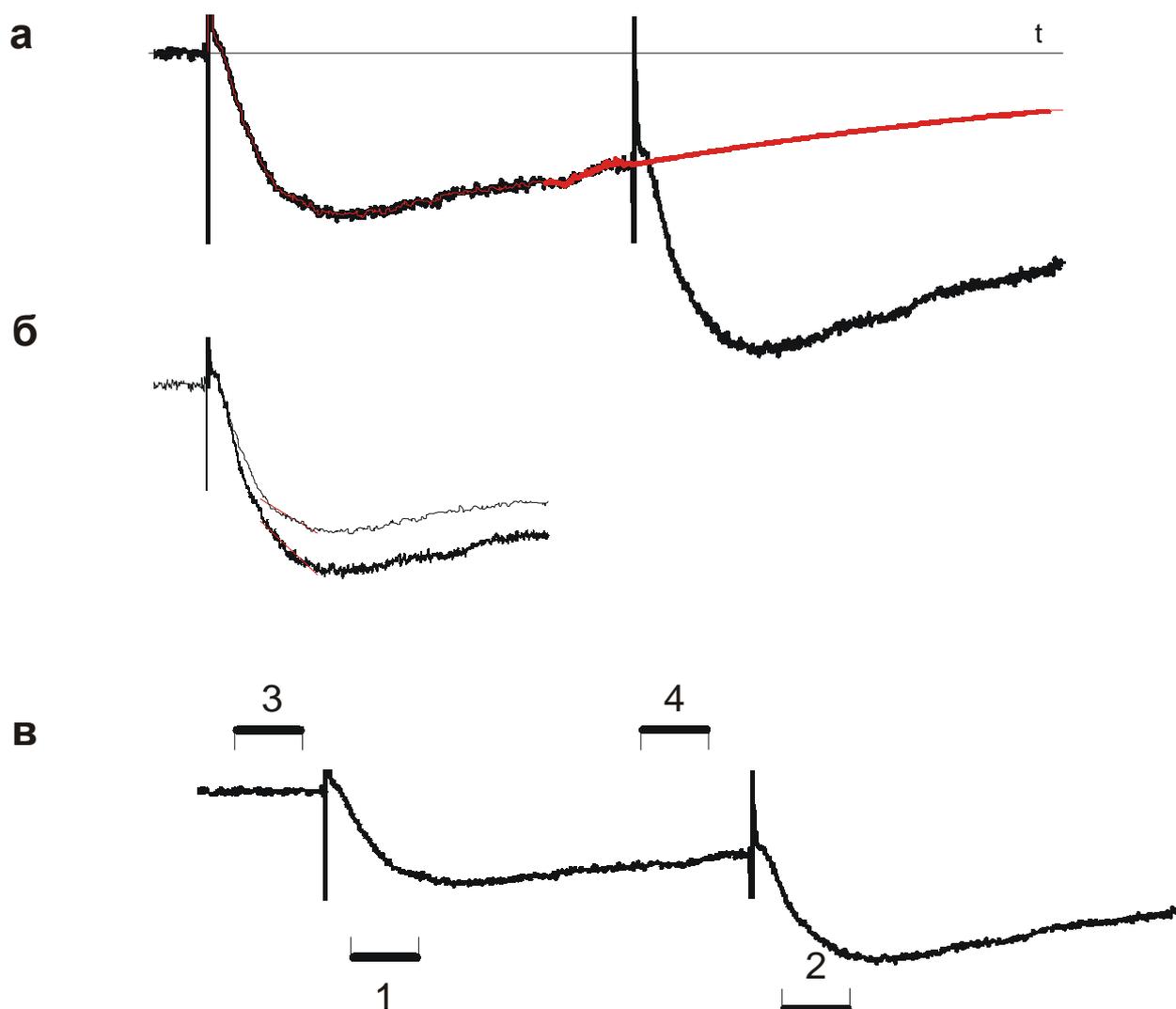


Рис. 5. Оценка величины парного облегчения

а - Вычисление величины парного облегчения экстраполяцией и вычитанием первого ответа. Тонкой линией показана экспонента, "продолжающая" первый ответ.

б - Первый ответ и "восстановленный" второй ответ.

в - Вычисление величины парного облегчения методом нахождения ковариации компонент. Окно 1 используется для нахождения главных компонент, окно 2 - для определения амплитудного (ковариационного) коэффициента второго ответа, окно 3 - для оценки уровня шума (использующейся в квантовом анализе), окно 4 - для определения вклада "хвоста" первого ответа в оценку для амплитуды второго ответа.

Нестационарный флюктуационный анализ

Одним из относительно новых методов изучения записей минимальных вызванных токов и потенциалов при отведении от синапсов и нейронов гиппокампа является метод *нестационарного флюктуационного анализа* (НСФА) [7]. Суть этого метода состоит в использовании простой биномиальной модели для изучения процесса открытия и закрытия индивидуальных каналов в ходе вызванного ответа для определения таких параметров синаптической передачи как *ток отдельного ионного канала* (i) и *общее количество каналов*, участвовавших в образовании ответов данной совокупности (n). Метод основан на изучении диаграммы "Вариация - среднее".

Простейший алгоритм и обоснование данного метода таковы. Для каждого момента времени t после подачи стимула находится *вариация* и *среднее* по всем ответам из статистической выборки:

$$M_t = \frac{\sum_{k=1}^N x_{kt}}{N}; \quad V_t = \frac{\sum_{k=1}^N (x_{kt} - M_t)^2}{N-1}, \quad (10)$$

а затем точки (M_t, V_t) наносятся на плоскость в соответствующих координатах. Покажем, что если случайная величина x подчиняется биномиальному распределению, а параметр p биномиального распределения (имеющий смысл вероятности) меняется от одной группы экспериментов к другой, эти точки лягут на параболу, причём коэффициенты параболы будут прямо связаны с параметрами данного биномиального распределения.

Пусть x – биномиально распределённая величина, пропорциональная количеству успехов в очередной серии из n испытаний, если вероятность успеха в каждом конкретном испытании равна p . Коэффициент пропорциональности обозначим за i . В этом случае:

$$M = inp, \quad V = \sigma^2 = i^2 np(1-p) = i^2 np - i^2 np^2 \quad (11)$$

Теперь предположим, что параметр p меняется при переходе от одной группы реализаций случайной величины x к другой, и для каждой группы вычисляются свои значения среднего и вариации. В этом случае значение вариации величины x по очередной группе легко выразить через значение среднего по этой группе и неизменные параметры биномиального распределения:

$$\begin{aligned} M_k = inp_k, \quad V_k = i^2 np_k - i^2 np_k^2 &\Rightarrow \\ \Rightarrow V_k = iM_k - \frac{M_k^2}{n} & \end{aligned} \quad (12)$$

Видно, что в биномиальном приближении все точки (M_i, V_i) ложатся на параболу $V = aM^2 + bM$. При этом $a = \frac{1}{n}$, $b = i$. Если величина x кроме того зашумлена, уравнение параболы будет выражаться формулой $V = aM^2 + bM + S_n$, где S_n – уровень фонового шума.

Процесс открытия и закрытия отдельных каналов во время вызванного ответа можно рассматривать как последовательность биномиальных испытаний с переменным параметром p . При этом физический смысл переменных в формуле (12) таков: p – вероятность открытия отдельного канала в данный момент времени, n – общее число каналов в активной зоне, i – ток индивидуального ионного канала. Вероятность открытия p непрерывно изменяется, что связано с динамикой выброса и последующего удаления нейромедиатора из синаптической щели, кинетикой канала (которая весьма сложна, различна для разных каналов) и т. д. В любом случае, за время вынужденного ответа величина p успевает "пробежать" все значения от 1 на пике ответа до 0 в его отсутствие (обычно считается, что практически всегда имеет место "насыщение" по нейромедиатору и в момент максимума ответа все ионные каналы оказываются открыты).

Приближение процесса открытия и закрытия каналов биномиальным процессом является, конечно, некоторым упрощением. Значения суммарного тока в каждый момент времени на каждом конкретном ответе не являются независимыми, они сильно скоррелированы по времени, что, конечно, вносит определённые искажения в распределение мгновенных токов по выборке (по сравнению с биномиальным распределением). В частности, это проявляется в том, что при малых выборках мы обычно наблюдаем не "облако" точек, приблизительно повторяющее контуры параболы (как можно было бы ожидать, если бы точки были действительно независимы), а некоторую весьма шумную "кривую" со слабой тенденцией иметь минимумы на краях и максимум где-то в центральной области. Конечно, такой характер "приближения" к параболе очень неудобен для аппроксимации, так как форма кривой легко вводит в заблуждение и исследователя и алгоритм. Кроме того, наличие временных корреляций после резкого максимума для АМРА-ответов, видимо, вносит свой вклад в отличие даже "идеальной" кривой "вариация-среднее" от параболы.

Наибольшую же проблему для метода НСФА представляют флуктуации хода воображаемой кривой "зависимости вероятности открытия канала от времени" от записи к записи. Метод явно предполагает существование некоторой "стандартной реализации" отдельного эксперимента (ответа), что проявляется в использовании связки

$p \rightarrow t \rightarrow M$ (метод опирается на изменения вероятности, но при этом единственным проявлением изменения вероятности становится средний ответ). Нарушения однозначности этих соответствий (а также их зашумлённость) и становятся причиной основных неудач метода в тех или иных конкретных случаях.

Необходимо ещё отметить, что на практике [6] метод НСФА используется в несколько модифицированном виде. Отдельные ответы всегда различаются по своей амплитуде – это может быть связано с разным числом каналов в разных активных зонах одного синапса, с флюктуациями потенциала на мембране и т. д. Поэтому на практике в метод вводится ещё одна операция – *нормирование среднего*. Вариация вычисляется не по формуле (10), а по формуле

$$V_i = \frac{\sum_{k=1}^N (x_{kt} - \beta_k M_k)}{N-1}, \quad (13)$$

где β_k – нормировочный коэффициент, определяемый соотношением

$$\beta_k = \frac{\max_t(x_{kt})}{\max_t(M_t)}. \quad (14)$$

Смысл формулы прозрачен: такая процедура аналогична нормировке каждого ответа на величину среднего и даёт примерно такие же результаты (см. раздел "Методы", параграф, посвященный сравнению разных способов нормировки).

Фильтрация входных сигналов, конечно, желательна, однако необходимо заранее оценивать допустимую глубину фильтрации, поскольку переключения отдельных каналов являются достаточно "высокочастотным" сигналом. В настоящей работе на вход метода НСФА всегда подавался сигнал, отфильтрованный медианным фильтром с шириной захвата в 7 точек.

Примеры "парабол", полученных для сигналов разного типа (симуляции, NMDA-каналы, AMPA-каналы) можно увидеть на Рис. 14.

Квантовый анализ и анализ "выпадений"

Ещё одним методом, использовавшимся в данной работе, является метод *квантового анализа* [25, 29]. Метод основан на предположении о случайном и независимом выбросе везикул нейромедиатора из пресинапса в ответ на приход потенциала действия и представляет собой статистическую оценку для t – *среднего количества квантов нейромедиатора* (среднего количества везикул), выбрасываемых в ответ на один стимул.

Эта величина называется также *средним квантовым составом* или просто *квантовым составом*.

Предположим, что выброс квантов нейромедиатора происходит с одной и той же вероятностью p независимо в n активных зонах синапса. При этом выброс одного кванта вызывает постсинаптический ответ амплитуды v (v называют обычно *величиной кванта*, она измеряется в единицах тока или напряжения в зависимости от типа используемого протокола). Налицо простейшая биномиальная модель с n независимыми экспериментами, каждый из которых может закончиться удачей или неудачей. В этом случае средний ответ и вариация по всему множеству полученных ответов должны отвечать формулам

$$\text{mean}(E) = vnp, \quad \text{var}(E) = vnp(1-p). \quad (15)$$

При малых p (в большинстве случаев такое приближение оказывается оправданным) можно записать:

$$\frac{(\text{mean } E)^2}{\text{var } E} = \frac{v^2 n^2 p^2}{v^2 np - v^2 np^2} \approx \frac{v^2 n^2 p^2}{v^2 np} = np = m \quad (16)$$

где m – среднее количество квантов, выбрасываемых в ответ на один стимул. Такой же результат можно получить и при использовании Пуассоновского приближения.

Значения амплитуд ответов E_k всегда зашумлены, поэтому на практике используется формула

$$m = \frac{(\text{mean } E)^2}{\text{var } E - S_n}, \quad (17)$$

где S_n – уровень фонового шума при определении амплитуды (который оценивается путём применения алгоритма нахождения амплитуды к "пустому" фрагменту записей – например, участку непосредственно перед артефактом).

В данной работе в качестве оценки амплитуды везде использовались коэффициенты, полученные с помощью компонентного анализа (как уже указывалось, такая оценка имеет лучшее отношение сигнала к шуму чем оценки пиковой величины сигнала). Соответственно, фоновый уровень шума вычислялся как ковариация скалярного произведения найденной "чистой компоненты" с участком перед первым артефактом.

Ещё одним способом оценки величины m является *анализ выпадений*. Для пуассоновского распределения амплитуд ответов математическое ожидание количества нулевых ответов даётся формулой

$$N_0 = N \cdot f_p(0) = Ne^{-m} \left(\frac{m^0}{0!} \right) = Ne^{-m} \quad , \quad (18)$$

где N – общее количество проведённых экспериментов (записанных ответов). А значит, величину

$$m_f = -\ln \left(\frac{N_0}{N} \right) \quad (19)$$

можно использовать как ещё одну оценку квантового состава.

N_0 можно оценить двумя способами: визуально, – непосредственно просматривая все ответы малой амплитуды и отмечая те из них, которые явно являются "выпадениями", и методом "удвоения" (при этом за оценку N_0 принимается удвоенное число ответов с отрицательной "амплитудой"). Обоснование второго метода весьма просто: распределение индивидуальных амплитуд "нулевых" ответов стремится к некоей колоколообразной кривой со средним, равным нулю. Её правое крыло перекрывается с крылом аналогичной кривой для "единичных" ответов, в то время как её левое крыло попадает в область отрицательных значений. Удвоив количество "отрицательных" ответов мы как раз и получим общее количество ответов, принадлежащих к популяции "нулевых".

Необходимо ещё отметить, что второй метод часто оказывается неприменим в случае, если артефакты имеют большие "хвосты" (это приводит к сдвигу всех амплитудных значений вниз или вверх на некую постоянную величину).

Применявшееся программное обеспечение

Компонентный анализ выполнялся с помощью программы FMS, разработанной специально для нужд лаборатории А.В. Астрелиным [1]. Все остальные вычисления и симуляции производились с помощью оригинальных программ в среде математического моделирования Matlab версии 6.0.

Результаты и обсуждение

Применение методов компонентного и квантового анализа к эффекту потенциации, вызванному сочетанием афферентной стимуляции с деполяризацией постсинаптической мембраны

Как уже указывалось, некоторые эксперименты, посвящённые изучению ПО на фармакологически изолированных AMPA- и NMDA-каналах, привели к получению результатов, на первый взгляд, не согласующихся с пресинаптической моделью эффекта ПО [5]. Величина парного отношения, измеряемого на опосредованных NMDA-рецепторами ответах, зависела от потенциала на постсинаптической мембране. Это дало авторам повод выдвинуть тезис о вовлечённости в реализацию ПО постсинаптических механизмов, таких как сенситизация рецепторов и т. д. Но возможна и другая интерпретация указанного факта. Деполяризация постсинаптической мембраны в сочетании с афферентной стимуляцией могла потенцировать данный синапс.

Для проверки этой возможности была поставлена серия экспериментов (по протоколам, описанным в разделе "Методы - Варианты экспериментальных протоколов", фармакологически изолированные NMDA-каналы). Для каждой из реализаций протокола были выделены 4 группы ответов: 1) контроль (-70 мВ), 2) положительный потенциал – начальный участок, 3) положительный потенциал – весь период, 4) период после потенциации (-70 мВ). Было обработано и проанализировано 12 записей протокола такого типа (8 нейронов). В обработку входила оценка амплитуд с помощью компонентного анализа, подсчёт "выпадений", оценка квантового состава, вычисление ПО с помощью обоих методов. Результаты представлены на Рис 6.

Видно, что наблюдаемое статистически значимое уменьшение величины парного отношения сопровождалось статистически значимым увеличением среднего квантового состава и одновременным уменьшением количества "выпадений", что в полной мере согласуется именно с гипотезой о *пресинаптическом* механизме уменьшения ПО в данном случае. Такой синхронный ход трёх указанных параметров синаптической передачи характерен и типичен для эффекта потенциации. Почти во всех случаях амплитуды была заметна большая или меньшая задержка увеличения амплитуды после смены мембранного потенциала (Рис. 6б), что также хорошо укладывается в представление о наблюдающемся увеличении амплитуды ответов как о вызове потенциации.

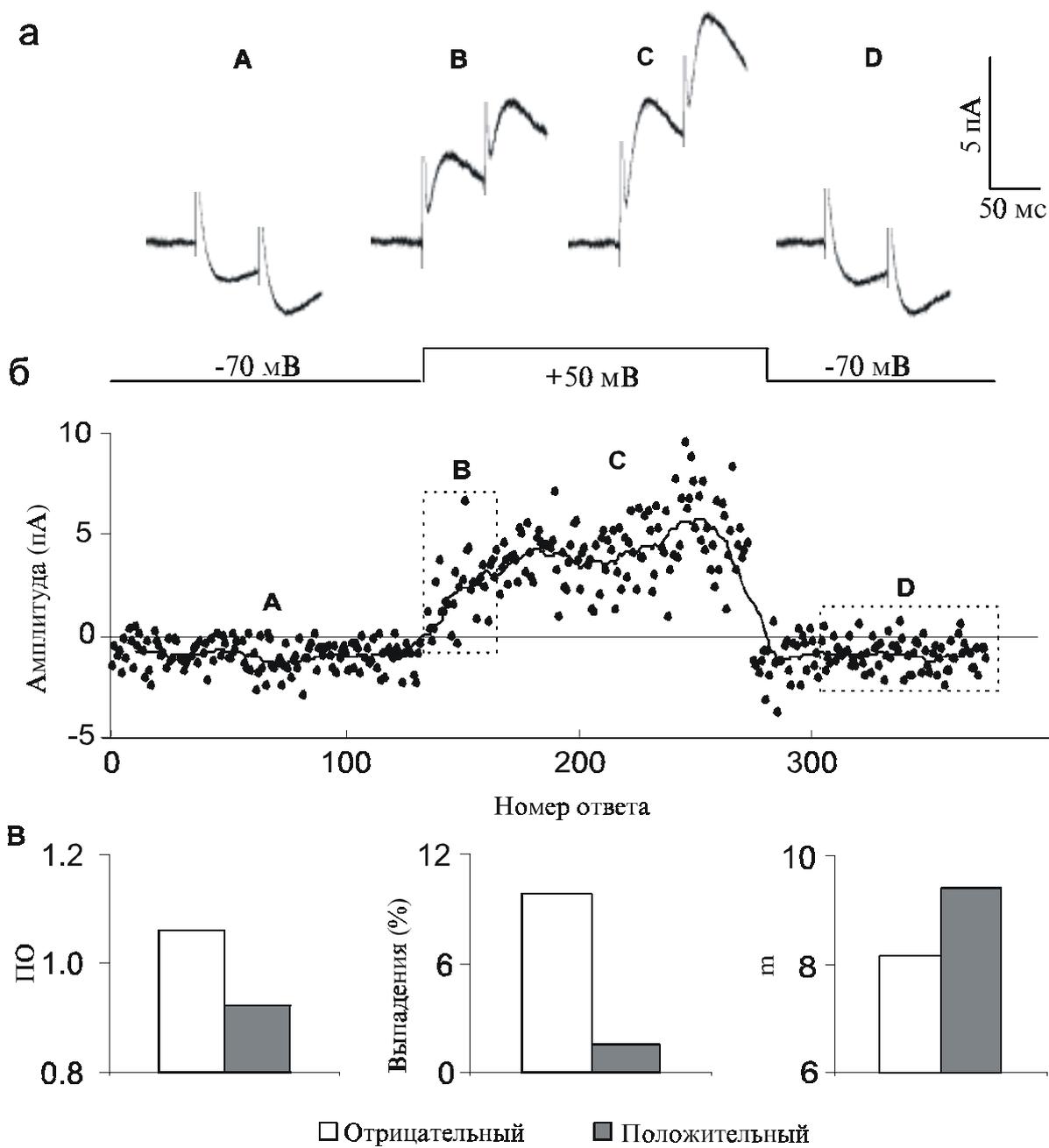


Рис. 6. Результаты анализа

а - Средние ответы, рассчитанные по трём статистическим группам: контроль (**а**), начало промежутка деполяризации (**б**) и весь промежуток деполяризации (**с**).

б - Ход одного из экспериментов. По оси ординат отложены первые амплитудные коэффициенты для первого ответа. Видно, что после деполяризации мембраны увеличение ответа происходит не мгновенно, а с некоторой задержкой.

в - Изменения величин ПО, количества выпадений и оценки среднего квантового состава после деполяризации постсинаптической мембраны.

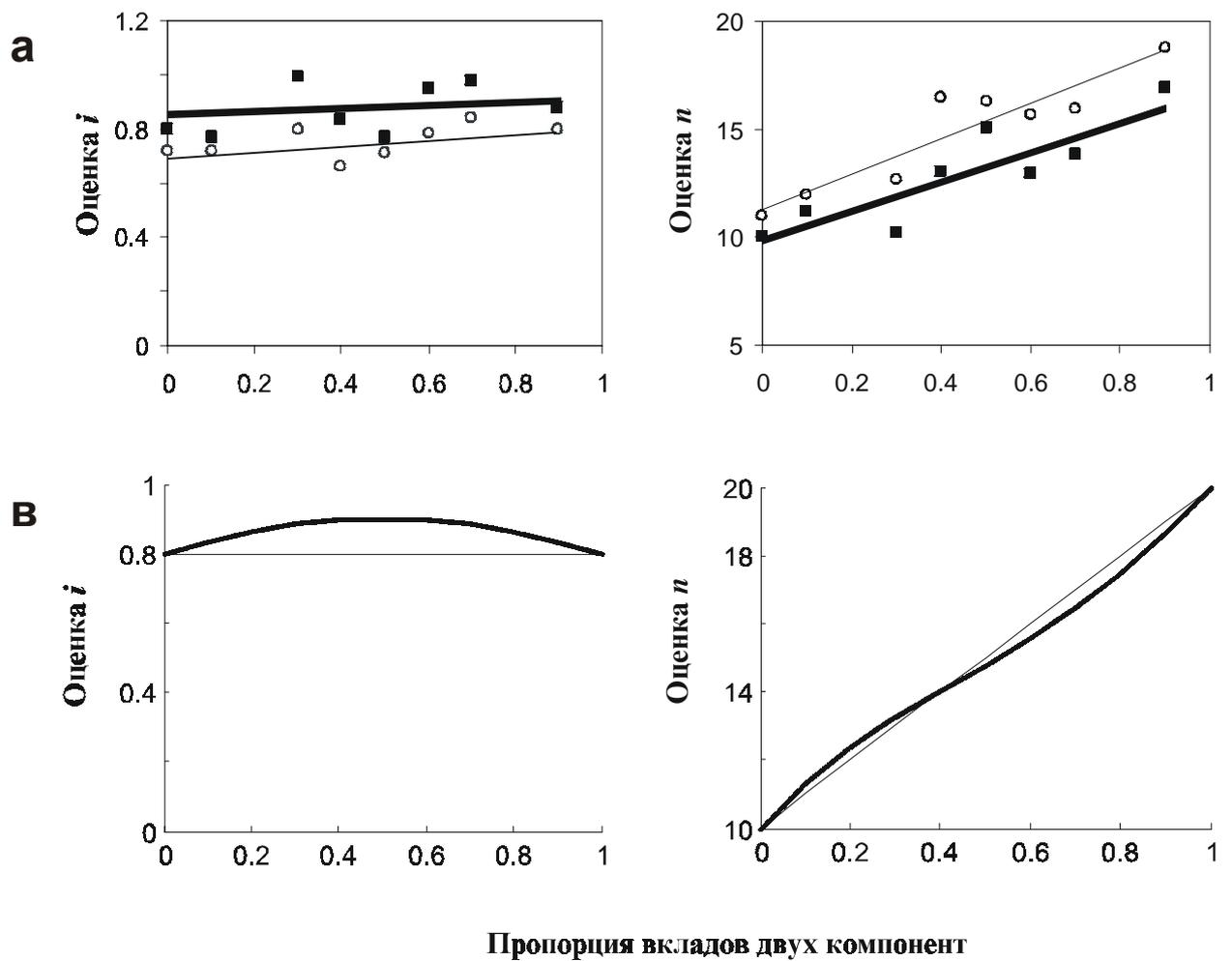


Рис. 7. Сравнение модификаций метода НСФА с нормировкой ответов (жирная линия) и нормировкой среднего (тонкая линия)

а - Оценка тока отдельного канала (симуляционные данные)

б - Оценка общего количества каналов (симуляционные данные)

в - Оценка тока отдельного канала (численный расчёт для биномиального распределения)

г - Оценка количества каналов (для биномиального распределения)

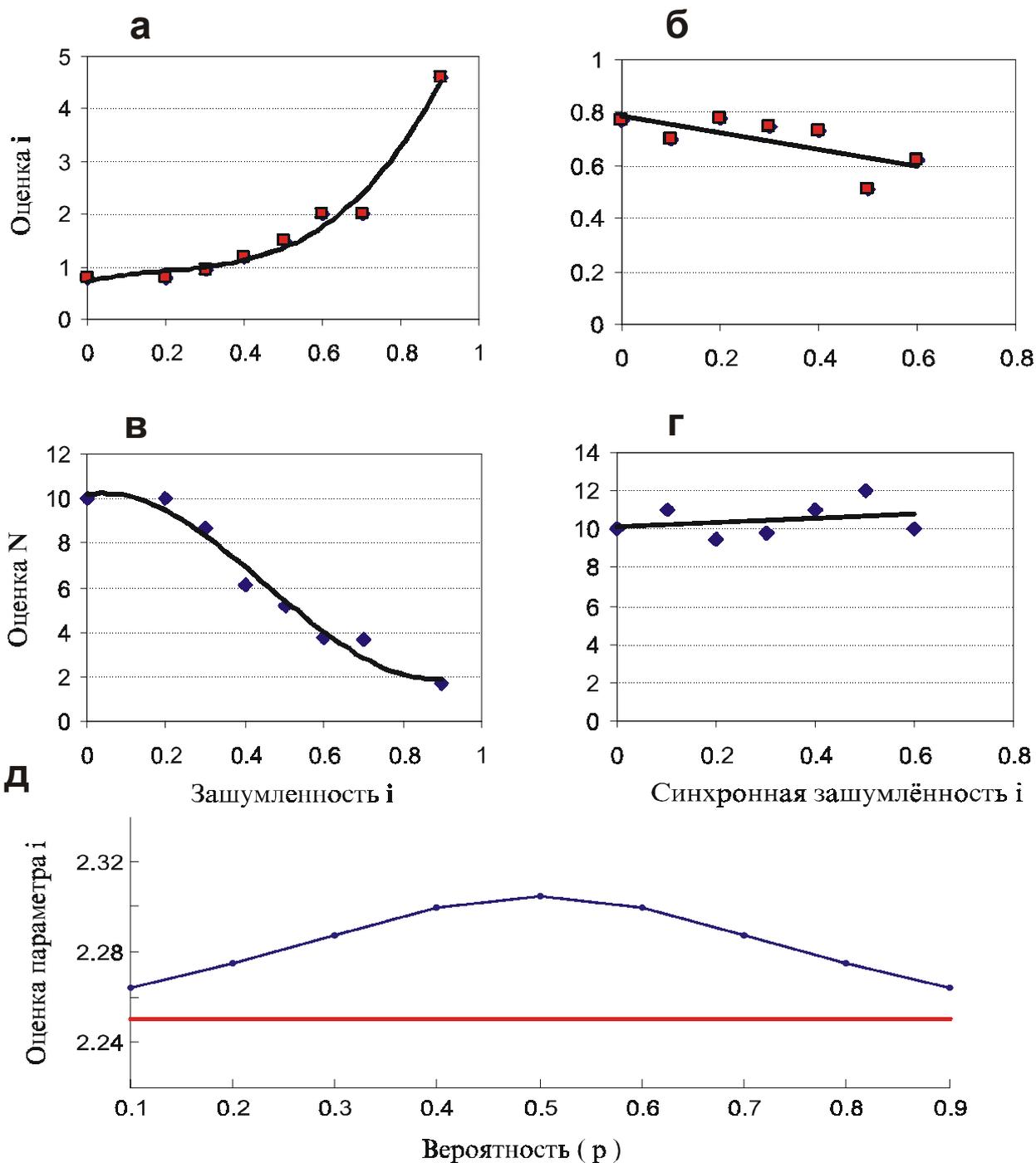


Рис. 8. Влияние шума на оценки для i и n

а - Зашумлены отдельные каналы. Среднее $i = 0.8$ пА, уровень шума изменяется от 0 до 1 пА (абсолютные значения). Оценка количества каналов n .

б - Синхронный шум (i меняется от эксперимента к эксперименту). Средний ток одного канала тот же. Уровень шума меняется от 0 до 0.6 (относительные значения). Оценка количества каналов n .

в - Зашумлены отдельные каналы (параметры те же, что и для **а**). Оценка для величины тока отдельного канала i .

г - Синхронный шум (параметры те же, что и для **б**). Оценка для величины тока отдельного канала.

д - Численный (не стохастический) расчёт отличия оценки величины тока отдельного канала i для "метода трёх точек" от реального значения параметра i (прямая линия). По оси абсцисс отложена вероятность открытия отдельного канала p .

Сравнение различных вариантов метода НСФА. Влияние шумов. Влияние разброса параметров

Варианты НСФА с нормировкой среднего и нормировкой ответов

Как уже указывалось, процедуру "нормировки", призванную нивелировать разброс амплитуд, вызванную зашумлением входных параметров, можно производить как минимум двумя способами: можно в согласии с формулами (13-14) вычислять вариацию по некой "адаптированной" формуле, таким образом, производя нормировку средних; можно же нормировать каждый отдельный ответ в соответствии с формулой

$$\tilde{x}_{it} = \frac{\max_t(M_t)}{\max_t(x_{it})} x_{it} \quad . \quad (20)$$

Возникает вопрос – какой из двух вариантов предпочтительнее? Понятно, что в условиях незначительной зашумлённости параметров оба метода будут давать примерно одинаковые оценки, однако их поведение на более сложных, "разбросанных" данных может отличаться.

Для выяснения этого вопроса был проведён ряд симуляций. В качестве входных данных использовались ответы, полученные с помощью оригинальной программы симуляции активности каналов. Ситуация, предлагавшаяся обоим алгоритмам для разрешения, была осложнена многоквантовостью ответов. Для части ответов количество каналов составляло $n_1 = 10$, для оставшихся этот параметр был равен $n_2 = 20$. В разных экспериментах пропорции каналов одного и другого типа варьировались.

Результаты моделирования представлены на Рис. 7а,б. Видно, что один из методов (нормировка ответов) в среднем даёт завышенные значения амплитуды отдельных каналов i , занижая при этом оценку количества каналов n . Для второго метода ситуация противоположна. На Рис. 7в,г показаны теоретические кривые для зависимости оценок i и n , даваемых обоими методами в аналогичном простейшем "поликвантовом" случае, рассчитанные в биномиальном приближении.

Кроме того, был произведён анализ влияния "синхронной" и "несинхронной" зашумлённости величин тока отдельного канала на оценки, даваемые методом нормировки ответов. "Синхронный шум" означает изменение параметра i от ответа к ответу, что может соответствовать, например, спонтанным локальным флюктуациям уровня потенциала постсинаптической мембраны. Под "асинхронным шумом" понимаются случайные флюктуации тока каждого отдельного канала. Результаты этих симуляций представлены на Рис. 8а-г. Видно, что метод хорошо справляется с "синхронным шумом", но довольно быстро переходит к смещённым оценкам в случае

"асинхронного шума". При этом значения тока отдельного канала оказываются сильно завышены по сравнению с действительным средним значением входного параметра модели.

Метод "трёх точек"

Не так давно одним из сотрудничающих с нами исследователей (Л.В. Савченко) был предложен метод статистического анализа данных, сходный с НСФА, но отличающийся от него о одним существенным признаком. Для стандартного НСФА существует как минимум три параметра, играющих роль "величины статистики" и прямо определяющих разброс и смещение даваемых методом оценок. Такими параметрами являются: 1) количество входящих в выборку ответов, 2) количество точек для анализа в одном ответе (а также степень их скоррелированности), и 3) количество каналов (элементарных биномиальных "экспериментов"), образующих один суммарный ответ. Для получения достоверных данных все эти три параметра желательно делать как можно большими.

Л.В. Савченко был предложен метод, по всем формулам аналогичный методу НСФА без нормировки, однако параметр 2 (количество точек для одновременного анализа) в нём насильственно установлен в *минимальное* возможное значение, для которого ещё можно посчитать "средний квадрат отклонения" – $N = 3$. На первый взгляд кажется, что результаты такого "метода" не должны представлять собой никакой ценности, поскольку, очевидно, как среднее, так и средний квадрат отклонения, рассчитанные по 3м точкам, имеют мало общего с математическими ожиданиями этих величин, используемыми при обосновании метода НСФА. Однако симуляции показали, что в биномиальном случае этот "модифицированный" метод даёт почти правильные результаты с небольшим ($< 20\%$) систематическим отклонением. На Рис. 8д показана кривая – отклонение оценки параметра i от его действительного значения в зависимости от вероятности открытия отдельного канала p (здесь, в отличие от НСФА, эта величина не обязательно должна пробегать все значения; она может быть фиксирована. В этом смысле предложенный метод занимает промежуточное положение между методами нестационарного и стационарного флюктуационного анализом). Кривая рассчитана численно, без использования стохастических алгоритмов. Однако удачных примеров использования этого метода к анализу экспериментальных данных пока показано не было.

Использование НСФА для определения кривой зависимости проводимости NMDA-каналов от потенциала на постсинаптической мембране

К тем же записям, которые были использованы для изучения эффекта потенциации, был применён метод НСФА. По достаточно очевидным причинам все данные для построения кривой проводимости каналов должны быть получены с одного нейрона (точечное отведение всегда выполняется на некотором удалении от изучаемого синапса, поэтому величины всех регистрируемых токов оказываются ослаблены, причём величину этого ослабления практически невозможно измерить или предугадать). К счастью, в одном из экспериментальных протоколов удалось зарегистрировать достаточное количество ответов, постсинаптический потенциал принимал последовательно 6 разных значений, причём неоднократное его приведение к потенциалу покоя дало возможность контроля.

Запись была поделена на участки, соответствующие постоянному потенциалу на постсинаптической мембране. К каждому из участков был применён метод НСФА. Пример рабочей НСФА-параболы можно увидеть на Рис. 14б. Основной результат анализа представлен на Рис. 9а. На полученные экспериментальные точки наложена кривая проводимости, полученная ранее методами *inside-out patch* для того же уровня внеклеточного Mg^{2+} [9]. Данные, полученные для разных участков -70 мВ, можно использовать в качестве оценки разброса экспериментальных значений. Видно, что с весьма удовлетворительной точностью кривая, полученная с интактных синапсов методом НСФА совпадает с кривой, полученной непосредственным измерением токов отдельных экстрасинаптических каналов на малом участке выделенной мембраны.

Резкое выпадение точки -90 мВ с контрольной кривой связано, вероятно, со спецификой магниевого блока в NMDA-каналах. Нелинейная зависимость тока канала от потенциала на мембране связана магниевым блоком, при этом *inside-out patch*-исследования показывают, что на самом деле при блоке имеет место не уменьшение тока канала, а его переход в состояние *субпроводимости* – режим очень быстрых переключений из закрытого состояния в открытое и обратно [9]. В результате перестаёт выполняться предположение об открытии всех каналов в момент максимума ответа, поэтому процедура нормировки (13-14) может давать неверные результаты, смещение которых тем больше, чем сильнее магниевый блок.

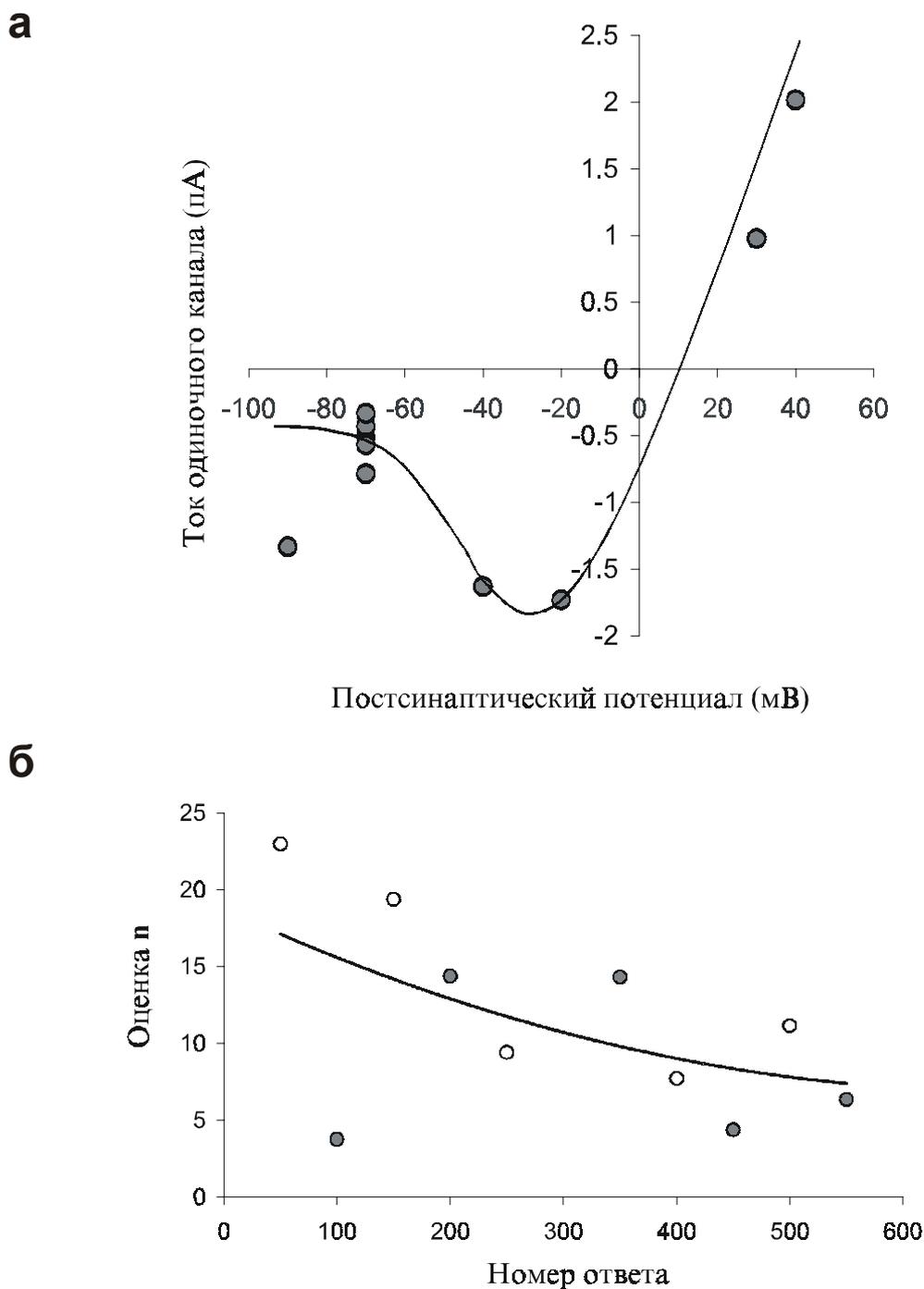


Рис. 9. Результаты метода НСФА для NMDA-опосредованных ответов

а - Кривая зависимости тока одиночного канала от потенциала на постсинаптической мембране. Точки - экспериментальные данные. Кривая - результаты использования более прямых к выделенным NMDA-каналам (см. комментарии в тексте).

б - Зависимость оценки количества каналов n , участвующих в ответе, от номера статистической группы. Кривая - линия тренда.

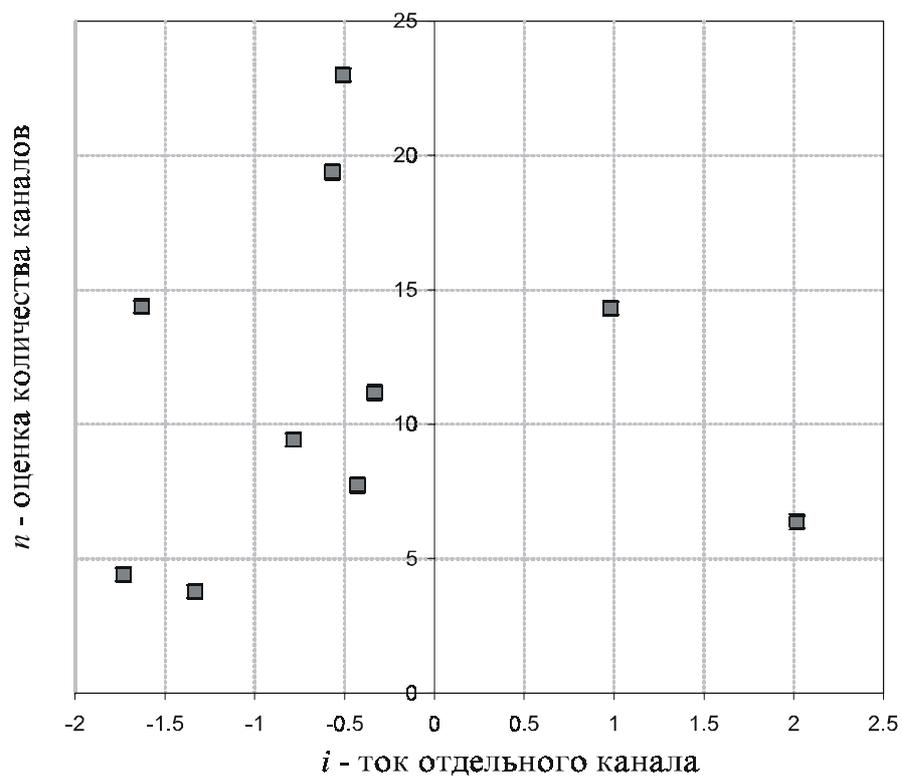
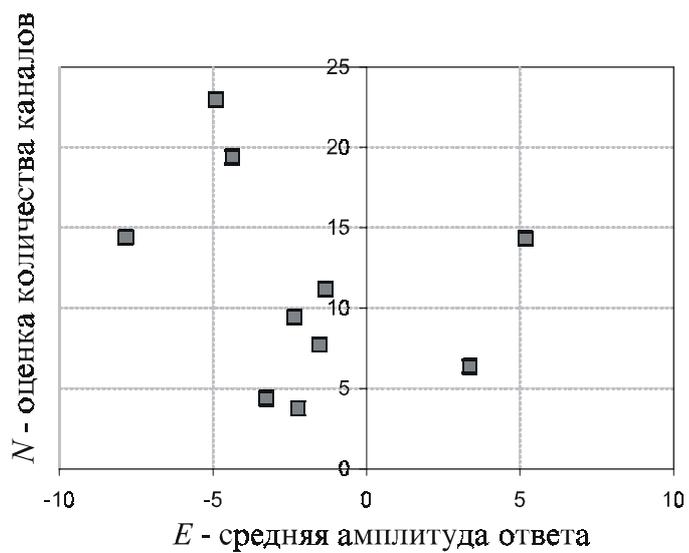
а**б**

Рис. 10. Результаты метода НСФА для NMDA-опосредованных ответов (продолжение)

а - Корреляционное поле для величин i и n .

б - Корреляционное поле для величин n и E .

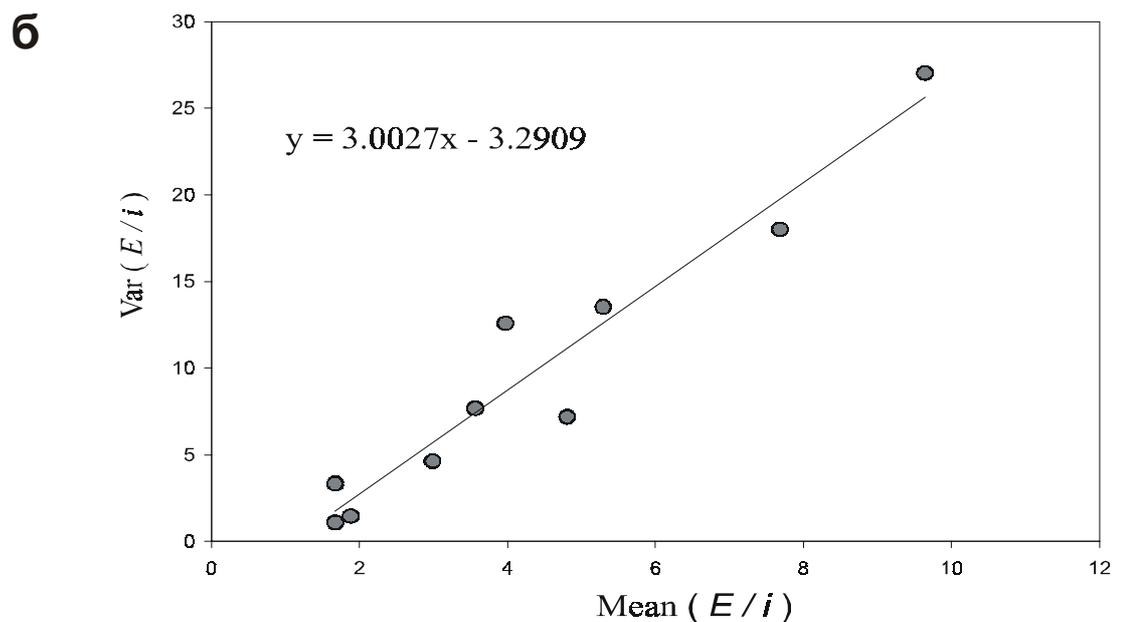
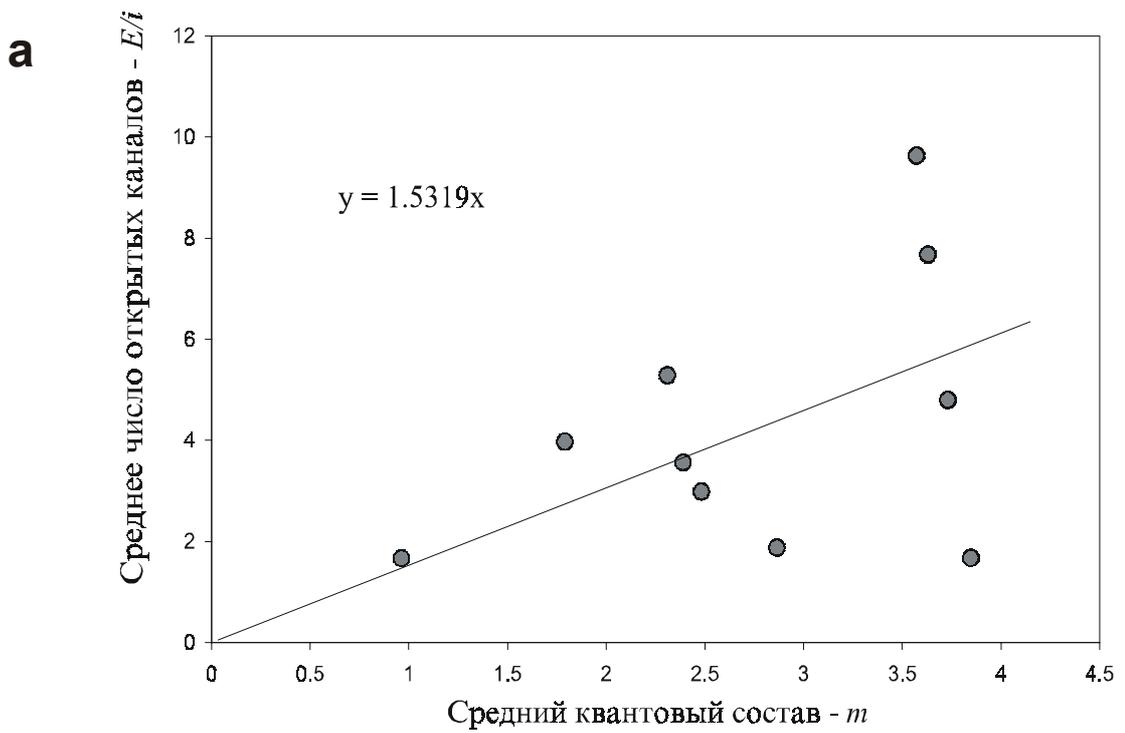


Рис. 11. Два способа оценки среднего количества NMDA-каналов в одной активной зоне

а - Оценка среднего количества каналов в активной зоне с помощью восстановления линейной закономерности между средним квантовым составом и средним числом каналов, открывающихся во время ответа.

б - Оценка среднего количества каналов в активной зоне с помощью применения метода НСФА к процессу выброса везикул нейромедиатора (см. комментарии и ссылки в тексте).

На Рис. 9б представлен график зависимости общего количества каналов n от времени (вернее, от номера статистической группы). Видно, что эта величина имеет тенденцию к уменьшению – видимо, вследствие эффекта низкочастотной депрессии [23]. Величина n может производить впечатление недостоверной, поскольку её оценка производится по некой выборке "хорошо различимых ответов", составленной практически вручную. Однако высокая корреляция величины n с нормированной средней амплитудой ответа E_k/i_k (Рис. 9в) подтверждает, по крайней мере, принципиальную осмысленность её использования.

На Рис. 10а и Рис. 10б показаны корреляции величин i и E , а также n и E . Отсутствие значимых корреляций можно воспринимать как свидетельство того, что эти оценки действительно являются новыми величинами, а не взятыми с некоторым разбросом производными старых.

На Рис. 11 представлены два способа оценки ещё одного параметра синаптической передачи: среднего количества каналов в одной активной зоне. На Рис. 11а по оси абсцисс отложена оценка среднего квантового состава m , полученная с помощью квантового анализа, тогда как по оси ординат отложено отношение E_k/i_k – "нормированная величина среднего ответа". Если количество каналов в одной активной зоне примерно постоянно в пределах синапса, между этими параметрами должна существовать линейная связь. Нечто подобное мы и видим на рисунке, хотя, к сожалению, разброс значений оказывается слишком большим для однозначного проведения прямой. Второй способ (Рис. 11б) заключается в повторном использовании флюктуационного анализа – теперь уже не на уровне открытия каналов, а на уровне выброса молекул нейромедиатора [8, 22]. Знание величин i_k позволяет нормировать величины ответов и работать с безразмерными "количествами открытых каналов", таким образом отрешившись от смены потенциалов постсинаптической мембраны и сосредоточившись только на следствии этой смены: тонких эффектах потенциации и депрессии, которые при этом неизбежны. Откладывая по оси абсцисс нормированное среднее (по статистическим группам), а по ординате – нормированную вариацию ответов, мы должны получить параболу или, по крайней мере, её начальный линейный участок. Это и видно на Рис. 11б.

Оценки, полученные двумя разными способами, отличаются примерно в два раза. Причиной этого, видимо, следует считать недостаточно точное определение величин среднего квантового состава. Большие погрешности при оценке m возможны, это связано с трудностями оценки уровня фонового шума, так как при работе с NMDA-ответами достаточно частыми становятся спонтанные и отсроченные ответы. Оценка среднего

количества NMDA-каналов в одной активной зоне $N_{NMDA} = 3$ вполне разумна и согласуется с общими физиологическими данными об этих синапсах.

В заключение данного раздела работы следует отметить, что несмотря на значительные величины токов индивидуальных NMDA-каналов (1-2 пА) достоверность оценки величин i и n НСФА оказалась довольно невысокой, что связано с очень малым количеством каналов, участвующих в каждом отдельном ответе, а также со спецификой магниевого блока в этих каналах. Для улучшения ситуации приходилось использовать различные ухищрения – такие как более строгий подбор ответов по амплитуде, более точное определение одной из точек параболы (соответствующей фоновому шуму) и "насильственное" проведение кривой через неё и т. д.

Совместное использование метода НСФА и компонентного анализа. Результаты симуляций

Вклад первой и второй компонент определялся набором коэффициентов, распределённых биномиально, с разными параметрами распределений для первой и второй компоненты. Выбор пригодных для анализа ответов производился с помощью тех же программ и по тем же критериям, что и при работе с реальными данными. Результаты обрабатывались с помощью алгоритма НСФА.

В серии проведенных симуляций компоненты имели разную форму "идеального ответа" (Рис. 12а) – одна компонента была "медленной" (похожей на NMDA-ответ), другая – "быстрой" (близкой по форме к типичному AMPA-ответу). Всё множество из 250 ответов было разделено на 4 группы (обе компоненты малы, обе компоненты велики, первая компонента преобладает, вторая компонента преобладает) так, чтобы в каждой группе содержалось примерно равное число ответов (Рис. 12б). Алгоритм НСФА применялся к каждой группе по отдельности. В результате обеих для групп с преобладанием одной из компонент были получены результаты, совпадающие со входными параметрами модели в пределах 10% погрешности. Группа с малыми обеими компонентами дала оценку для i , близкую к значению i для медленной компоненты; группа со смесью обеих компонент дала в качестве оценки взвешенное среднее значений токов канала для первой и второй компоненты.

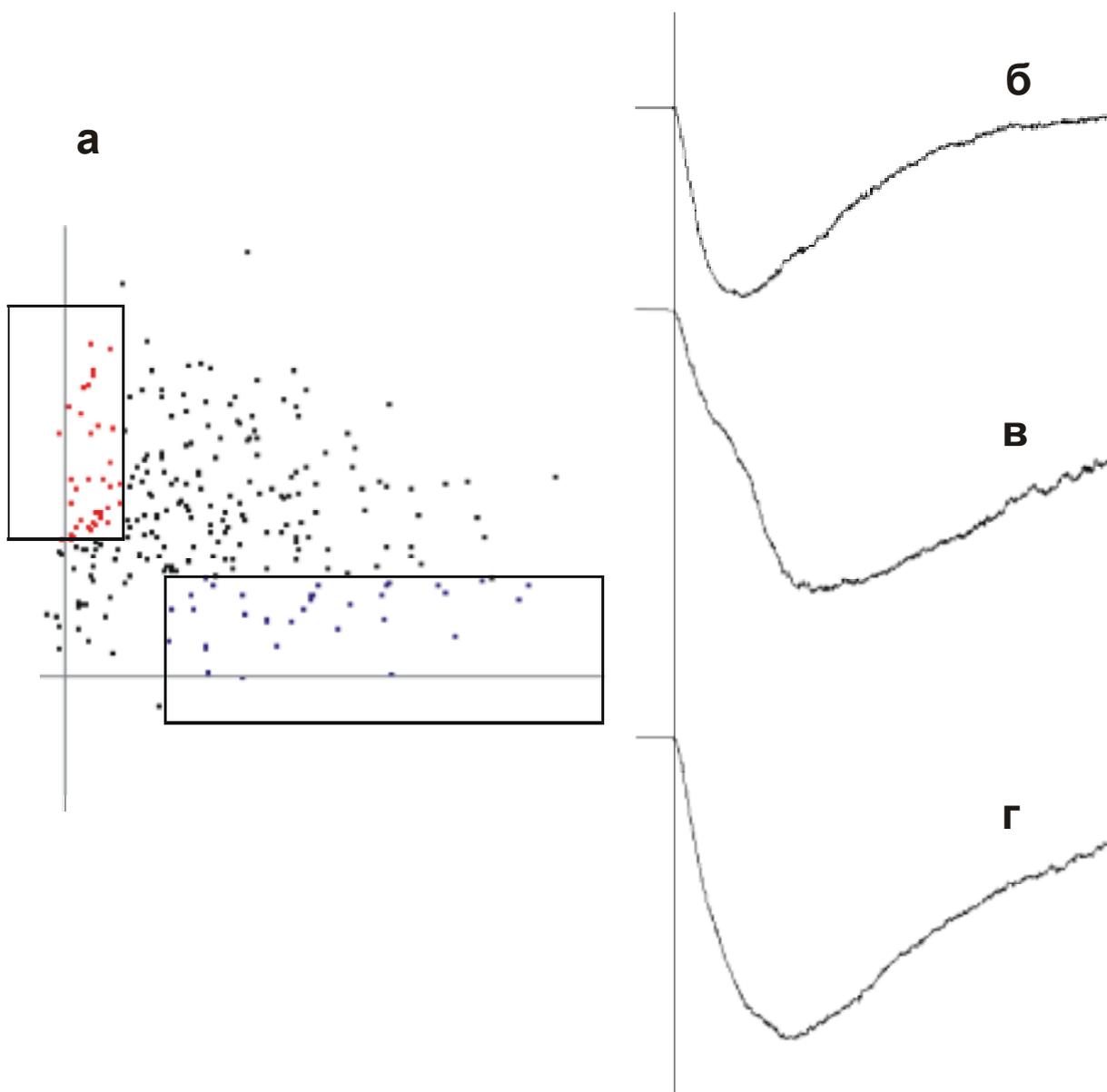


Рис. 12. Применение метода главных компонент к анализу смешанных двухкомпонентных сигналов (компьютерная симуляция активности каналов)

а - Диаграмма распределения ответов в пространстве амплитудных (ковариационных) коэффициентов первой и второй компонент.

б - "Чистая" первая компонента (среднее по точкам, попавшим в область, вытянутую вдоль оси ординат)..

в - "Чистая" вторая компонента (среднее по точкам, лежащим вблизи оси абсцисс).

г - Среднее по сигналам, представляющим собой сумму первой и второй компонент.

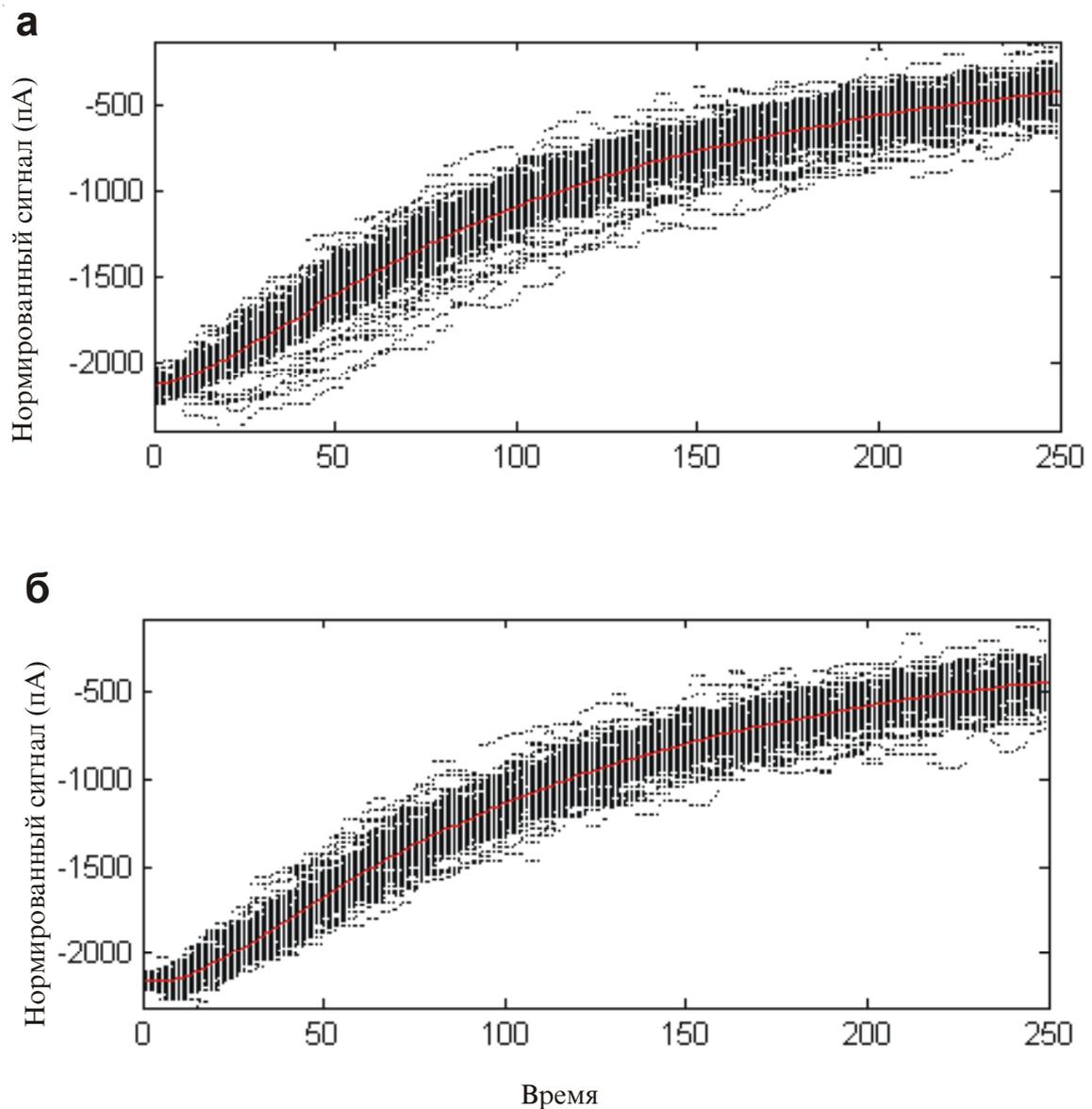


Рис. 13. Сравнение хода нормированных ответов для алгоритма без сдвигов латентностей и со сдвигом. Использованы АМРА-опосредованные ответы
а - Алгоритм без сдвига латентностей. Видны ошибки алгоритма нормировки (в окно для вычисления нормировочного коэффициента, выставленное по среднему ответу, попадает не максимум ответа, а промежуток рядом с максимумом, что приводит к неверному определению амплитуды).
б - Алгоритм со сдвигом латентностей. Нормированные ответы лежат гораздо более плотно.

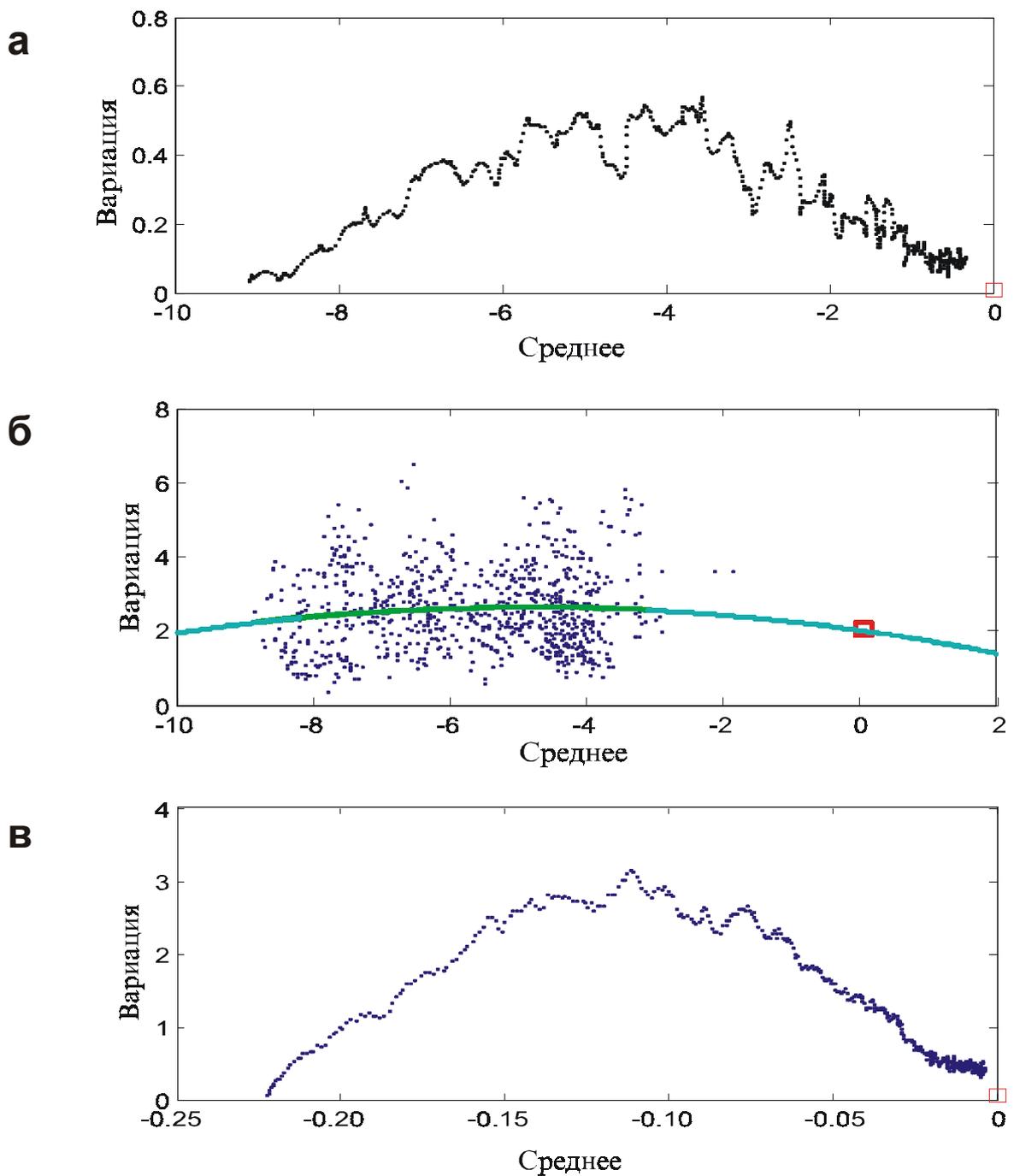


Рис. 14. Примеры НСФА-парабол, полученные для разных источников сигнала
а - Парабола, построенная для симуляционных данных. Величина выборки $N = 22$;
б - Парабола, построенная для NMDA-ответов. Величина выборки $N = 8$ (согласно результатам симуляций - нижний предел возможности получения достоверных оценок). Парабола проводится через облако точек и особую точку (уровень шума), отмеченную маленьким квадратом (правая часть графика).
в - Парабола, построенная для AMPA-ответов. Величина выборки $N = 74$.

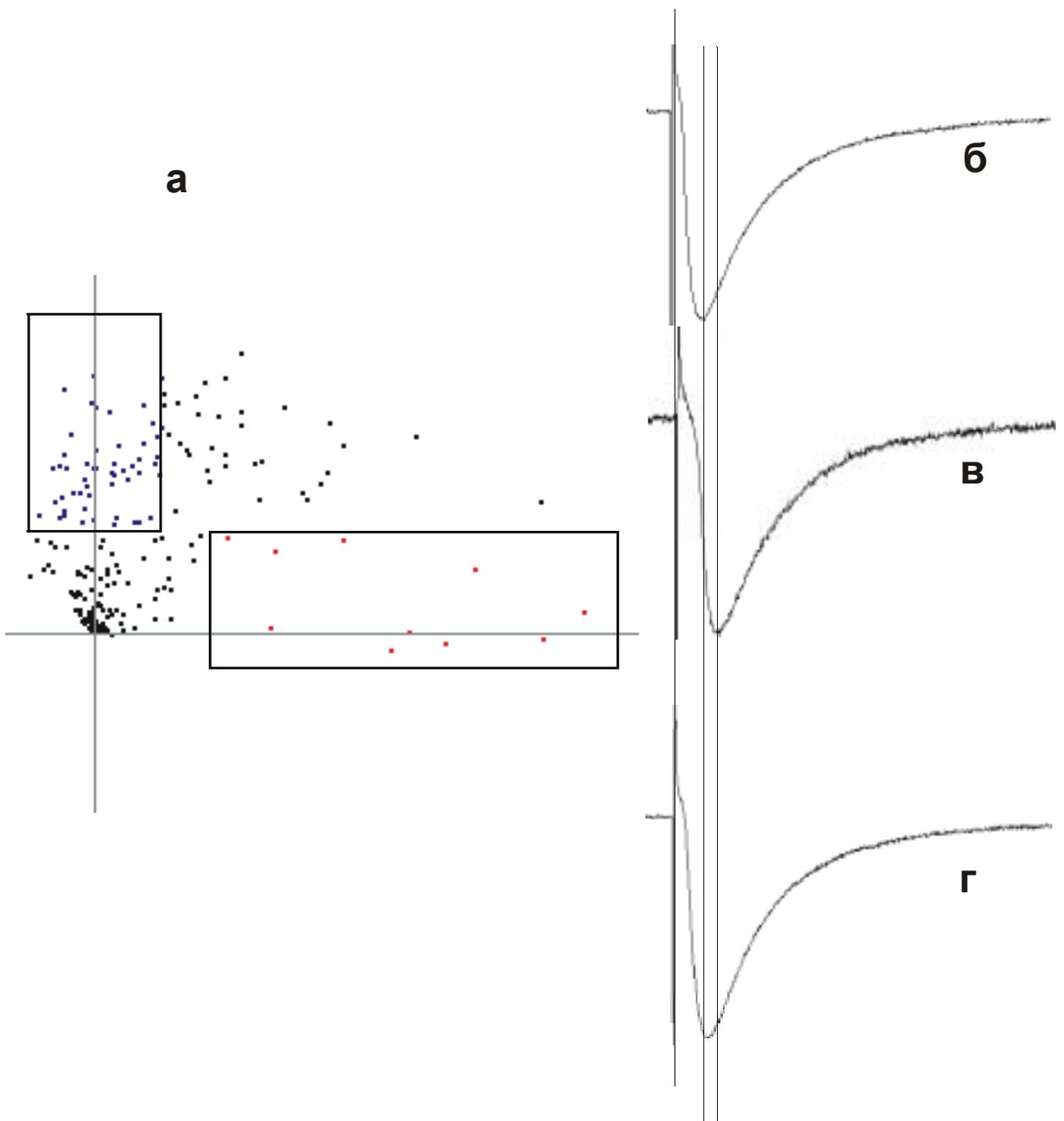


Рис. 15. Применение метода главных компонент к анализу смешанных двухкомпонентных сигналов (АМРА-опосредованные ответы, компоненты имеют разную латентность)

а - Диаграмма распределения ответов в пространстве амплитудных (ковариационных) коэффициентов первой и второй компонент.

б - "Чистая" первая компонента (среднее по точкам, попавшим в область, вытянутую вдоль оси ординат)..

в - "Чистая" вторая компонента (среднее по точкам, лежащим вблизи оси абсцисс).

г - Среднее по сигналам, представляющим собой сумму первой и второй компонент.

Применение компонентного анализа и метода НСФА к ответам, опосредованным АМРА-каналами, для изучения долговременной потенциации

Чтобы проверить показанный в работе [6] эффект увеличения тока отдельного АМРА-канала при долговременной потенциации были поставлены эксперименты по протоколам вызова ДП; полученные данные сначала анализировались без применения дополнительных методов разделения ответов на статистические группы, затем анализ повторялся на группах, выделенных при помощи компонентного анализа (Рис. 15). В обоих случаях анализ производился двумя способами: либо НСФА применялся непосредственно к выборке ответов, либо сначала производилось *выравнивание латентностей* ответов в группе. Латентность определялась по положению максимума сильно отфильтрованного симметричным фильтром сигнала, что примерно соответствует нахождению середины кривой ответа вблизи её максимума (там где она приблизительно симметрична). Такое определение латентности не соответствует общепринятому, однако для нужд НСФА такой алгоритм подходит лучше.

Аргументацией в пользу использования такого алгоритма может служить Рис. 13. Видно, что значительный разброс в координатах максимумов приводит к увеличению вариации хода ответов. После того, как все ответы были приведены к одной латентности, вариация стала меньше. Легко понять, что первый график соответствует сильному завышению оценки для i по сравнению с действительным её значением. В то же время Рис. 15 не оставляет сомнений в том, что изучаемые ответы содержат как минимум две компоненты близкой формы, но разной латентности.

Результаты анализа нейронов представлены в табл. 1. К сожалению, в данный момент не накоплено достаточных данных, которые могли бы придать полученным результатам статистическую значимость. Пока по подобным протоколам записано и обчислено всего два нейрона, поэтому эти результаты следует расценивать как предварительные. Приведём их здесь в виде набора тезисов (или гипотез):

1. Если при наличии нескольких разнолатентных компонент применять алгоритм НСФА ко всей совокупности ответов, оценки для параметра i часто оказываются заметно большими, чем аналогичные оценки, рассчитанные с помощью НСФА по выборке "чистых компонент".
2. Причиной завышения оценок является смешение в сигналах двух разных компонент. Этот тезис подкрепляется тем фактом, что оценка i по группе ответов, представляющих собой "равные смеси" двух компонент также оказывается завышено по сравнению с оценками, выполненными на "чистых компонентах".

3. Завышение оценок происходит из-за разной формы сигналов в разных компонентах, – в частности, завышение происходит в случае разной латентности двух выделенных компонент. Свидетельством в пользу такого механизма может служить уменьшение оценок для i при применении алгоритма "выравнивания латентностей".
4. Ещё одним подтверждением в пользу этого механизма служит то, что уменьшение оценки для i при использовании сдвига латентностей происходит в основном на "неоднородных" данных – на полной выборке или на выборке "бикомпонентных ответов". Чистые компоненты демонстрируют уменьшение оценки для i только в случае, когда даже чистая компонента обладает значительным разбросом латентностей (1 нейрон).

Для проверки этих предварительных результатов были проведены компьютерные симуляции. Генерировались двухкомпонентные ответы с биномиальным распределением амплитудных коэффициентов. Обе компоненты имели форму "быстрых" ответов, но их латентности различались – в одной группе экспериментов на величину порядка времени нарастания, во второй группе – на величину примерно в 10 раз меньшую. Были получены следующие результаты: В первой группе оценки, даваемые для параметра i методом НСФА практически не отличались от действительного значения этой величины для любых выборок ответов. Во второй группе (в которой компоненты были расположены более "тесно") было отмечено примерно двукратное завышение оценки параметра i в "полной выборке" по сравнению со значениями, рассчитанными по изолированным компонентам. Эти результаты согласуются со сделанными предположениями, хотя проблема, несомненно, нуждается в дальнейшем рассмотрении и изучении.

Подытоживая сказанное можно выдвинуть следующую гипотезу:

Описанное в литературе [6] увеличение оценки амплитуды отдельных АМРА-каналов, возможно, по крайней мере отчасти, связано с потенциацией прежде пресинаптически молчащих (или малоэффективных) синапсов или активных зон. Таким образом, после потенциации однокомпонентный ответ становился бикомпонентным, а это – вследствие небольших различий в форме и латентности компонент – приводило к увеличению variability отдельных ответов, а в итоге, и к завышению оцениваемой величины i .

Эта гипотеза нуждается в дальнейшей проверке, прежде всего, путём постановки новых экспериментов по аналогичным протоколам, а также путём дополнительных компьютерных симуляций.

Выводы

- В настоящей работе было показано, что в отсутствие NMDA-блока деполяризация постсинаптической мембраны может приводить к развитию потенциации, причём потенцияция эта носит пресинаптический характер;
- были предложены и проанализированы различные модификации метода нестационарного флюктуационного анализа, продемонстрированы возможности их применения в различных условиях, указаны некоторые недостатки и ограничения этих методов;
- произведен анализ фармакологически изолированных NMDA-ответов; для каналов интактного синапса построена кривая зависимости тока отдельного канала от потенциала на мембране; показано её совпадение с кривой, полученной более прямыми, но менее "физиологическими" методами на выделенных экстрасинаптических каналах;
- на основе полученных данных продемонстрирована возможность оценки новых, недоступных для оценки другими способами, параметров (таких как среднее количество NMDA-каналов в одной активной зоне);
- показана принципиальная возможность совместного использования компонентного анализа и группы алгоритмов НСФА; с помощью сочетания обоих методов проанализированы записи AMPA-каналов до и после потенциации, выдвинута гипотеза о том, что кажущееся увеличение тока отдельного канала по крайней мере отчасти является артефактом; предложены факты в защиту этой гипотезы (продемонстрировано завышение оценок тока отдельного канала, даваемых алгоритмом НСФА на выборках ответов с небольшим разбросом латентностей) и указана возможность дальнейшей работы в этом направлении.

Список литературы

1. Andrey V. Astrelin, Maxim V. Sokolov, Thomas Behnisch, Klaus G. Reymann, Leon L. Voronin; "Principal component analysis of minimal excitatory postsynaptic potentials"; *Journal of Neuroscience Methods* 1998, vol. 79, pp. 169-186.
2. Баязитов И.Т., Воронин Л.Л., Касьянов А.М., Клещевников А.М., Кульчицкий С.В., Самецкий Е.А.; "Долговременная потенциация AMPA- и NMDA-компонент минимальных постсинаптических токов в области CA1 гиппокампа крыс"; *Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова* 2001, 87 N4, стр. 448-458.
3. N. Beretta, A.V. Rossokhin, E. Cherubini, A.V. Astrelin and L.L. Voronin; "Long-term synaptic changes induced by intracellular tetanization of CA3 pyramidal neurons in hippocampal slices from juvenile rats"; *Neuroscience* 1999 vol. 93 no. 2 pp. 469-477.
4. N. Beretta, A.V. Rassokhin, A.M. Kasyanov, M.V. Sokolov, E. Cherubini, L.L. Voronin; "Postsynaptic hyperpolarization increases the strength of AMPA-mediated synaptic transmission at large synapses between mossy fibers and CA3 pyramidal cells"; *Neuropharmacology* 2000, vol. 39 pp2288-2301.
5. Clark K.A., Randall A.D. and Collingridge G.L.; "A comparison of paired-pulse facilitation of AMPA and NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic currents in the hippocampus"; *Experimental Brain Research* 101 (1994), 272-278.
6. Tim A. Benke, Andreas Lüthi, John T.R. Isaac and Graham L. Collingridge; "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity"; *Nature* 1998 June 25, 393(6687):793-7.
7. Timothy A. Benke, Andreas Lüthi, Mary J. Palmer, Martin A. Wikström, William W. Anderson, John T.R. Isaac and Graham L. Collingridge; "Mathematical modelling of non-stationary fluctuation analysis for studying channel properties of synaptic AMPA-receptors"; *J Physiol.* 2001 Dec 1; 537(Pt 2):407-20.

8. John D. Clements and R. Angus Silver; "Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach"; Trends Neurosci. 2000 Mar; 23(3):105-13.
9. Jean Clos, Yves Muller; "Neurobiologie cellulaire"; Nathan Universite; 1999
10. Raymond Dingledine, Karin Borges, Derek Bowie, and Stephen F. Traynelis; "The Glutamate Receptor Ion Channels"; Pharmacol Rev. 1999 Mar; 51(1):7-61.
11. Dittman J.S., Kreitzer A.C., Regehr W.G.; "Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals"; Journal Neuroscience 2000 Feb 15; vol. 20 no. 4 pp. 1374-85.
12. Dobrunz L.E., Stevens C.F.; "Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses"; Neuron 1997 Jun; vol. 18 no. 6 pp. 995-1008.
13. Feldman D.E., Nicoll R.A., Malenka R.C.; "Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses"; Journal Neurobiology 1999 Oct; vol. 41 no. 1 pp. 92-101.
14. Sonia Gasparini, Chiara Saviane, Leon L. Voronin, and Enrico Cherubini; "Silent synapses in the developing hippocampus: Lack of functional AMPA receptors or low probability of glutamate release?"; PNAS 2000 August, vol. 97, no. 17, pp. 9741-9746.
15. Isaac J.T., Nicoll R.A., Malenka R.C.; "Silent glutamatergic synapses in the mammalian brain"; Can J Physiol Pharmacol 1999 Sep; vol. 77 no. 9 pp. 735-7.
16. Robert L. Isaacson, Karl H. Pribram; "The Hippocampus"; Plenum Press, NY
17. U. Kuhnt and L.L. Voronin; "Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in area CA1 of guinea-pig hippocampal slices: application of quantal analysis"; Neuroscience 1994; vol. 62 no. 2 pp. 391-397.

18. Liao D., Scannevin R.H., Huganir R.; "Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors"; *Journal Neuroscience* 2001 Aug 15; vol. 21 no. 16 pp. 6008-17.
19. Liao D., Hessler N.A., Malinow R.; "Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice"; *Nature* 1995 Jun 1; vol. 375 no. 6530 pp. 400-4.
20. John E. Lisman, Jean-Marc Fellous and Xiao-Jing Wang; "A role for NMDA-receptor channels in working memory"; *Nature Neuroscience* 1998 August, vol. 1 no. 4.
21. Losi G., Prybylowski K., Fu Z., Luo J.H., Vicini S.; "Silent synapses in developing cerebellar granule neurons"; *Journal Neurophysiology* 2002 Mar; vol. 87 no. 3 pp. 1263-70.
22. Meyer A.C., Neher E., Schneggenburger R.; "Estimation of quantal size and number of functional active zones at the calyx of held synapse by nonstationary EPSC variance analysis"; *Journal Neuroscience* 2001 Oct 15; vol. 21 no. 20 pp. 7889-900.
23. Saviane C., Savtchenko L.P., Raffaelli G., Voronin L.L., Cherubini E.; "Frequency-dependent shift from paired-pulse facilitation to paired-pulse depression at unitary CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus"; *Journal Physiology* 2002 Oct 15; vol. 544 no. 2 pp. 469-76.
24. M.V. Sokolov, A.V. Rossokhin, T. Behnisch, K.G. Reymann and L.L. Voronin; "Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation of minimal excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices: a patch-clamp study"; *Neuroscience* 1998, vol. 65 no.1 pp. 1-13.
25. Torii N., Tsumoto T., Uno L., Astrelin A.V., Voronin L.L.; "Quantal analysis suggests presynaptic involvement in expression of neocortical short- and long-term depression"; *Neuroscience* 1997 Jul; vol. 79 no. 2 pp. 317-21.

26. Ramirez O.A., Orsingher O.A., Carrer H.F.; "Differential threshold for long-term potentiation in the hippocampus of rats with inborn high or low learning capacity"; *Neuroscience Letters* 1988 Oct 17; vol. 92 no. 3 pp. 275-9.
27. Roger D. Traub and Andrea Bibbig; "A Model of High-Frequency Ripples in the Hippocampus Based on Synaptic Coupling Plus Axon–Axon Gap Junctions between Pyramidal Neurons"; *The Journal of Neuroscience* 2000 March 15, vol. 20 no. 6 pp. 2086–2093.
28. Leon L. Voronin; "Synaptic Modifications and Memory. An Electrophysiological Analysis"; Springer-Verlag Berlin Heideberg; 1993.
29. Voronin L.L., Kuhnt U., Gusev A.G., Hess G.; "Quantal analysis of long-term potentiation of "minimal" excitatory postsynaptic potentials in guinea pig hippocampal slices: binomial approach"; *Experimental Brain Research* 1992; vol. 89 no. 2 pp. 275-87.