Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Биологический факультет

На правах рукописи

ЗЮЗИНА АЛЁНА БОРИСОВНА

«РОЛЬ АТИПИЧНОЙ ИЗОФОРМЫ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С ЗЕТА В МЕХАНИЗМАХ ПОДДЕРЖАНИЯ ПАМЯТИ И ДОЛГОВРЕМЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ»

03.03.06 – нейробиология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Чл. корр. РАН, профессор, д.б.н.

Балабан П.М.

Москва 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ……	6
	ВВЕДЕНИЕ……	7
1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……	11
1.1.	Синаптическая пластичность и ее механизмы……..	11
1.2.	Протеинкиназа мю зета и ее роль в поддержании долговременной памяти……	16
1.3.	Общее представление о серотонине……	28
1.4.	Роль серотонинергической системы в механизмах обучения и памяти……	31
1.5.	Феномен реконсолидации……	34
2.	МЕТОДИКА……..	36
2.1.	Объект……	36
2.2.	Поведенческие методы исследования…….	36
2.2.1.	Выработка условного обстановочного оборонительного рефлекса…….	36
2.2.2.	Выработка условного рефлекса на отвергание пищи …..……	41
2.3.	Электрофизиологические методы исследования……..……	44
2.3.1.	Приготовление препарата изолированной центральной нервной системы виноградной улитки……..	44
2.3.2.	Приготовление препарата «исскуственный синапс»…….	49
2.3.3.1.	Приготовление полуинтактного препарата……	53
2.3.3.2.	Процедура обучения на полуинтактном препарате……..	54
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ……	56
3.1.	Выяснение роли протеинкиназы мю зета в поддержании долговременной фасилитации ВПСП различной эргичности премоторных интернейронов оборонительного поведения на препарате изолированной ЦНС виноградной улитки……	56

3.1.1. Эффект ZIP на потенциацию ответов премоторных париетальных интернейронов, вызванную тетанизацией интестинального нерва при тестирующей стимуляции второго кожного нерва…… 58
3.1.2. Эффект ZIP на потенциацию ответов премоторных париетальных интернейронов, вызванную тетанизацией интестинального нерва при тестирующей стимуляции интестинального нерва……. 61
3.1.3. Эффект ZIP на потенциацию ответов премоторных париетальных интернейронов, вызванную тетанизацией кожного нерва при тестирующей стимуляции второго кожного нерва…… 62
3.1.4. Влияние ZIP на глутаматергическую связь в непотенциированных нейронах…… 64
3.1.5. Влияние ZIP на холинергическую связь в непотенциированных нейронах……. 65
3.1.6. Влияние хелеритрина на амплитуду потенциированных ВПСП премоторных париетальных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки…… 66
3.1.7. Влияние CNQX на глутаматергическую связь……... 69
3.2. Выяснение роли протеинкиназы мю зета в поддержании долговременной фасилитации глутаматных ПСП премоторных интернейронов на модели «искусственный синапс»……. 71
3.2.1. Эффект ZIP/scrZIP на потенциированные ответы премоторного интернейрона оборонительного поведения……. 71
3.2.2. Эффект ZIP/scrZIP на непотенциированные ответы премоторного интернейрона оборонительного поведения…… 72
3.2.3. Эффект ZIP/scrZIP при одновременной регистрации ВПСП при стимуляции нерва и ответов на аппликацию глутамата…… 73
3.3. Определение активности идентифицированных нейронов

нервной системы виноградной улитки после выработки условного рефлекса пищевой аверсии на полуинтактном препарате…… 75
3.3.1. Изменения активности исследуемых идентифицированных нейронов после выработки условного рефлекса пищевой аверсии…… 75
3.3.2. Динамика ответов исследуемых нейронов при повторном тестировании……. 81
3.4. Исследование роли протеинкиназы мю зета в поддержании долговременной памяти в поведенческих экспериментах…… 83
3.4.1. Нарушения памяти, вызванные введением блокатора протеинкиназы мю зета ZIP……. 83
3.4.2. Определение временного окна действия ZIP……. 84
3.5. Определение роли серотонинергических нейронов в процессах угашения и реконсолидации памяти в поведенческих экспериментах…… 85
3.5.1. Исследование обстановочного компонента оборонительного поведения…… 86
3.5.1.1. Напоминание на фоне введенного 5,7-диокситриптамина приводит к стиранию обстановочной оборонительной памяти… 87
3.5.1.2. Введение миансерина при напоминании стирает обстановочную оборонительную память…….. 90
3.5.2. Исследование сигнального компонента оборонительной памяти 91
3.5.2.1. Напоминание на фоне введенного 5,7-диокситриптамина ухудшает сигнальный компонент оборонительной памяти…….. 92
3.5.2.2. Введение 5-гидрокситриптофана ослабляет токсическое действие 5,7-диокситриптамина…….. 95
4. ОБСУЖДЕНИЕ……. 98
4.1. Роль протеинкиназы мю зета в механизмах поддержания

долговременных синаптических изменений и памяти у виноградной улитки…….. 98
4.1.1. Активность гомолога протеинкиназы мю зета поддерживает долговременную фасилитацию у виноградной улитки……. 98
4.1.2. Гомолог протеинкиназы мю зета не нужен для долговременной фасилитации на модели искусственного синапса у виноградной улитки……. 99
4.1.3. Вероятный механизм, посредством которого протеинкиназа мю зета поддерживает синаптическую фасилитацию у виноградной улитки……. 101
4.1.4. Специфичность ZIP. Значение протеинкиназы мю зета для обучения и памяти……. 103
4.2. Роль серотонинергических модуляторных нейронов педального ганглия в процессе реконсолидации памяти…….. 104
4.2.1. Участие серотониновых нейронов в обучении, связанном с аверсивным поведением……. 106
4.2.2. Одна серотонинергическая (модуляторная) клетка способна обеспечивать подкрепление …… 107
4.2.3 Два компонента памяти: ключевой и контекстуальный…… 109
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ……. 112
6. ВЫВОДЫ…….. 115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…… 116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5,7-ДОТ – 5,7-диокситриптамин

ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал

Глу-ПСП – глутаматный постсинаптический потенциал

МП ПП – моторная программа пищевого поведения

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПКМЗ – протеинкиназа мю зета

ПКСЗ – протеинкиназа С зета

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

AMPAR – α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

CPEB – cytoplasmic polyadenylation element binding protein

BAPTA – 1,2-bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

CamKII – calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

CREB-1 – cAMP responsive element binding protein 1

GABAR – gamma-aminobutyric acid receptor

GluR2 – glutamate receptor 2

MAPK – mitogen-activated protein kinase

NMDAR – N-methyl-D-aspartic acid receptor

NSF – N-ethylmaleimide-sensitive factor

PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase

PICK1 – protein interacting with C kinase 1

PIN1 – protein interacting with NIMA1

PKA – protein kinase A

PKC – protein kinase C

scrZIP – scrambled zeta inhibitory peptide

ZIP – zeta inhibitory peptide

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Большинство исследований до недавнего времени было направлено на определение молекулярных механизмов формирования долговременной памяти, и лишь незначительная часть работ была посвящена определению нейрональных механизмов, ответственных за поддержание сформировавшейся долговременной памяти. Обнаружение протеинкиназы мю зета (ПКМЗ) – предполагаемой молекулы памяти сдвинуло чашу весов. Сейчас вопрос молекулярного механизма поддержания памяти один из главных. Многочисленные экспериментальные работы указывают на исключительно важную роль ПКМЗ в процессах поддержания долговременных изменений в синапсах. Существует большой объем данных, указывающих на универсальность механизма ее действия как для позвоночных животных (Pastalkova et al., 2006; Sacktor, 2012), так и для беспозвоночных: насекомых (Drier et al., 2002; Deng et al., 2015), моллюсков (Cai et al., 2011; Bougie et al., 2012). Эта протеинкиназа способна при определенных условиях образовывать самоподдерживающийся во времени молекулярный каскад (Sactor et al., 1993; Sactor, 2011) и, таким образом, «метить» потенцированный синапс (Sactor, 2011).

Для позвоночных животных Т. Сактором была предложена модель, согласно которой ПКМЗ усиливает синаптические связи между нейронами за счет встраивания в мембрану дополнительных глутаматных AMPA-рецепторов (AMPAR, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) (Yao et al., 2008, Sacktor, 2012) и подавления их интернализации (Migues et al., 2010). На морском моллюске аплизия, у которого обнаружен гомолог ПКМЗ (Bougie et al., 2009), также показано усиление транспорта AMPA-рецепторов в синапсы и их встраивания при развитии долговременной пластичности и выработке обучения (Li et al., 2005; Glanzman, 2010). Следует обратить внимание на связь гомолога ПКМЗ у аплизии с серотонином. Именно серотонин запускает в постсинаптической

клетке синтез кальпаина, который переводит протеинкиназу С зета (ПКСЗ) в конститутивно активную форму, отщепляя от неё регуляторный домен (Cai et al., 2011). Ранее было показано, что аппликация этого медиатора или внутриклеточная активация индивидуальных серотонергических нейронов являются основой для образования условных реакций у моллюсков. Иными словами серотонин запускает долговременные синаптические изменения, синтезируются новые молекулы ПКМЗ, сохраняющие эти изменения в течение долгого времени.

Исследования на высших животных сопряжены с большими методическими трудностями (исключительная сложность структуры мозга, большое количество нервных клеток, их малые размеры, затрудняющие идентификацию, сложность нервных путей и поведения этих животных). Использование в качестве объекта исследования беспозвоночных, в частности брюхоногих моллюсков, позволяет в значительной мере преодолеть эти трудности. Виноградная улитка – объект, обладающий следующими характеристиками: наличие гигантских и крупных нейронов, относительно просто организованная нервная система, возможность идентификации отдельных нервных элементов и определения их принадлежности к той или иной группе, наличие нескольких форм изменяемого поведения (т.е. объект способен к обучению) (Balaban, 2002). Благодаря этим особенностям, на виноградной улитке можно детально описать нервные сети, контролирующие те или иные поведенческие акты.

И в отличие от успехов в исследовании активности ПКМЗ в центральной нервной системе (ЦНС) лабораторных грызунов и морского моллюска аплизии, присутствие и роль ПКМЗ у виноградной улитки практически не была изучена. Это побудило нас к исследованию механизмов функционирования ПКМЗ у наземного моллюска виноградной улитки.

Цели и задачи работы

Цель настоящей работы заключалась в исследовании роли атипичной изоформы протеинкиназы С – ПКМЗ в механизмах поддержания

долговременной памяти и долговременных синаптических изменений виноградной улитки, а также понимание роли серотонина в этих процессах. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Изучить участие ПКМЗ в потенциации синаптической передачи различной эргичности у виноградной улитки.

2. Изучить участие ПКМЗ в поддержании потенциации ответов премоторных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки на аппликацию глутамата под давлением в модели искусственного синапса.

3. Изучить участие ПКМЗ в поддержании обстановочной памяти виноградной улитки.

4. Выяснить роль серотонина в феномене реконсолидации памяти.

Положения, выносимые на защиту

Протеинкиназа мю зета принимает участие в механизмах поддержания долговременной потенциации глутаматергических и холинергических синаптических ответов в премоторных интернейронах оборонительного поведения виноградной улитки.

Протеинкиназа мю зета необходима для поддержания долговременной обстановочной оборонительной памяти виноградной улитки

Участие серотонинергических нейронов подкрепления может быть ключевым условием при выборе, какой процесс будет протекать – угашение или реконсолидация – при повторной реактивации обстановочной памяти.

Научная новизна

Впервые показана роль ПКМЗ в механизмах поддержания долговременной памяти и долговременной фасилитации синаптических ответов различной эргичности на наземном моллюске. Обнаружено, что, ZIP (zeta inhibitory peptide) и scrZIP (scrambled zeta inhibitory peptide) оказывают неспецифичные кратковременные эффекты, не связанные с собственно синаптической пластичностью. Показано, что активность одиночного

серотонинергического нейрона может быть ключевым условием для запуска процесса реконсолидации.

Научно-практическая ценность работы

Исследование роли ПКМЗ и серотонина расширяет теоретические представления современной нейробиологии о механизмах обучения и памяти, как на клеточном уровне, так и на уровне целого организма. Представляет научный интерес и обнаруженная возможность сдвигать баланс между двумя процессами, постоянно протекающими в нашей памяти – угашением и реконсолидацией.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Синаптическая пластичность и ее механизмы

Одной из основных парадигм современной нейробиологии является то, что синаптическая пластичность составляет клеточную основу (механизм) обучения и памяти. Под пластичностью нейрона понимают временные изменения (ослабление или усиление) его активности при привыкании или облегчении (Котляр, 1986). По своей длительности такие изменения превышают обычные синаптические и импульсные процессы. Различные формы пластичности (габитуация, дегабитуация, гетеросинаптическое облегчение и ассоциативное обуславливание), в зависимости от вызывающего их способа, можно разделить на синаптические, предполагающие предварительную синаптическую активацию, и несинаптические, вследствие прямого действия медиатора на мембрану нейрона (Береговой, 1990). К синаптическим механизмам пластичности относятся факторы, влияющие на эффективность синапсов. Их можно разделить на пресинаптические и постсинаптические (Воронин, 1987). Мембранные механизмы включают в себя изменения клеточной возбудимости, которые определяются изменениями мембранного потенциала, порогом генерации потенциала действия, а также входным сопротивлением мембраны.

Синаптическая пластичность может быть гомосинаптической и гетеросинаптической. При этом гетеросинаптическая пластичность включает в себя взаимодействие двух разных входов, конвергирующих на одной клетке. Так происходит при фасилитации синаптических связей (сенсомоторного синапса) между центральным сенсорным и моторным нейронами, обеспечивающими проявление рефлекса отдёргивания жабры (Castellucci et al., 1970). Механорецепторные сенсорные нейроны, иннервирующие кожу сифона и дающие возбуждающие входы на моторные нейроны втягивания жабры, являются предположительно

глутаматергическими (Dale, Kandel, 1993; Trudeau, Castellucci, 1993; Conrad et al., 1999).

Механизмы синаптической пластичности интенсивно изучались как на беспозвоночных, так и на позвоночных животных. Очень результативными при анализе механизмов пластичности оказались эксперименты на беспозвоночных, в частности моллюсках (Kandel, 1980; Carew et al., 1981; Балабан, Захаров, 1992). Обнаружение в нейронах беспозвоночных многих медиаторов, гормонов и нейропептидов, присутствующих в мозге высших позвоночных животных, а также явное сходство процессов возбуждения и торможения на уровне отдельных нейронов, дают веские основания в пользу заключения о большом сходстве нейрональных механизмов пластичности синаптической передачи при обучении у беспозвоночных и позвоночных животных. Среди беспозвоночных львиная доля работ была выполнена на морском моллюске аплизии (Kandel, Schwartz, 1982).

Одной из наиболее популярных моделей для исследования механизмов синаптической пластичности на беспозвоночных является рефлекс отдергивания жабры у морского моллюска Aplysia californica, на базе которого довольно легко можно выработать условнорефлекторную реакцию (модель ассоциативного обучения). При обучении в данном случае условным стимулом служит прикосновение к сифону, а безусловным – электрический удар по хвосту. Биохимический анализ показал, что безусловный стимул вызывает выброс 5-НТ (серотонина), а условный – повышение концентрации Ca2+ внутри клетки. При совпадении во времени этих двух стимулов результатом служит повышение выработки цАМФ (циклический аденозинмонофосфат) в пресинаптическом нейроне. Такой механизм пластичности назвали пресинаптической фасилитацией, зависящей от активности (activity-dependent presynaptic facilitation) (Pinsker et al., 1970; Carew et al., 1971; Antonov et al., 2001).

Помимо описанных ранее сенсорного и моторного нейронов, в данном рефлексе участвует еще одно звено – особые фасилитирующие нейроны (не

обнаруженные у аплизии), активация которых и обеспечивает повышение эффективности сенсомоторного синапса в цепи рефлекса втягивания жабры (Castelucci, Kandel, 1976). Медиатором данных гипотетических нейронов аплизии является серотонин (Brunelli et al., 1976). В экспериментах in vitro было показано, что единичная короткая по продолжительности аппликация серотонина (5-10 минут) продуцирует кратковременные изменения синаптической эффективности (кратковременная фасилитация) (Bao et al., 1998), тогда как повторяющиеся аппликации серотонина вызывают изменения синаптической силы, которые могут продолжаться более чем неделю (долговременная фасилитация) (Montarolo et al., 1986).

Бирн и Кэндел (Byrne, Kandel, 1996) в электрофизиологических экспериментах нашли, что фасилитация, вызванная относительно коротким воздействием серотонина, обусловлена активацией аденилатциклазы и PKA (protein kinase A) в сенсорном нейроне в ответ на образование вторичного посредника цАМФ. Эта активация приводит к снижению выходящего калиевого тока в результате блокады потенциалзависимых калиевых каналов. Последнее ведет к увеличению длительности потенциала действия, концентрация внутриклеточного кальция возрастает, и количество выбрасываемого медиатора увеличивается. Более длительное воздействие серотонина вызывает активацию PKC (protein kinase C), которая также может увеличивать длительность пресинаптического спайка. Повторяющиеся несколько раз аппликации 5-HT через G-белок-связанные рецепторы ведут к значительному повышению внутриклеточной концентрации кальция в постсинаптическом нейроне (высвобождение кальция из инозитолтрифосфат-чувствительных запасников). Активируются ретроградные сигналы, посылаемые пресинаптическому нейрону, в результате выброс медиатора увеличивается (Antonov et al., 2003).

Чтобы исследовать точную роль пре- и постсинаптических механизмов, были проведены эксперименты на сенсомоторном синапсе в культуре клеток с различной длительностью воздействия серотонина (Jin et al., 2004, 2005).

При коротком воздействии серотонина, фасилитация была обусловлена преимущественно пресинаптическими механизмами; при длительном воздействии серотонина были задействованы как пресинаптические (PKC), так и постсинаптические (кальций и CamKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II)) механизмы.

Большинство работ по исследованию клеточных механизмов долговременной фасилитации были выполнены с использованием сенсомоторного синапса аплизии. Классическим протоколом служила пятикратная аппликация серотонина длительностью 5 минут с 15-минутными перерывами (Montarolo et al., 1986). Для развития долговременной фасилитации сенсомоторного синапса требуется CREB – cAMP response binding protein, транскрипционный фактор, зависящий от цАМФ. Наряду с CREB существуют и другие транскрипционные факторы, которые вносят свой вклад в регуляцию транскрипции. Активация этих генов, в свою очередь, стимулирует транскрипцию тех генов, которые запускают долговременные структурные изменения в сенсорных нейронах (Glanzman et al., 1990)

Интересным пресинаптическим механизмом, играющим важную роль при долговременной фасилитации, является выделение из сенсорного нейрона сенсорного нейрон-специфического нейропептида сенсорина (Brunet et al., 1991). Аппликация антител к сенсорину блокирует серотонин-зависимую долговременную фасилитацию в сенсомоторном синапсе (Hu et al., 2004). Выделение сенсорина может запускаться активацией PKA или PKC в зависимости от экспериментального протокола. Секретируемый сенсорин связывается с ауторецепторами на поверхности сенсорных нейронов, и, таким образом, активирует MAPK (mitogen-activated protein kinase), а затем CREB-1 (Martin et al., 1997). При этом пресинаптические структурные изменения, сопровождающие долговременную фасилитацию, не происходят в отсутствие контакта с мотонейроном (Glanzman et al.,1990). На выделение сенсорина из пресинаптической терминали в ответ на воздействие

серотонина оказывают влияние постсинаптические механизмы (Cai et al., 2008). Серотонин вызывает длительную активацию постсинаптических G-связанных рецепторов, что приводит к значительному повышению внутриклеточной концентрации кальция; быстрое возрастание внутриклеточного кальция активирует ретроградный сигнал, который запускает секрецию и повышенную экспрессию сенсорина. То есть для проявления устойчивых продолжительных пресинаптических изменений необходим ретроградный сигнал, который запускается увеличением постсинаптической концентрации кальция.

Долгое время в литературе господствовало мнение, что механизмы синаптической пластичности беспозвоночных преимущественно пресинаптические. Однако со временем данная точка зрения изменилась. Было обнаружено, что 5-НТ вызывает встраивание дополнительных рецепторов AMPA-типа в мембрану постсинаптической клетки (Chitwood et al., 2001). Эксперименты проводились на изолированных мотонейронах сифона в клеточной культуре. Осуществлялась стимуляция индивидуальных мотонейронов короткими аппликациями глутамата. Записывали глутаматные постсинаптические потенциалы (Глу-ПСП) с помощью острых микроэлектродов. 10-минутная аппликация серотонина на мотонейроны приводила к увеличению Глу-ПСП, которое сохранялось в течение более чем 40 минут. Длительное увеличение амплитуды Глу-ПСП зависело от повышения внутриклеточной концентрации кальция и блокировалось инъекцией кальций-хелатирующего агента BAPTA (1,2-bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) в мотонейроне (Adler et al., 1991). Тестирование с использованием антагонистов глутаматных рецепторов показало, что модуляторный эффект серотонина специфически связан с AMPAR. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что серотонин модулирует функциональную экспрессию AMPAR в мотонейроне, вызывая экзоцитоз и вставку новых AMPAR в плазматическую мембрану. Для проверки данного утверждения была произведена инъекция ингибитора

экзоцитоза, токсина ботулизма, в мотонейрон до аппликации серотонина. Присутствие токсина блокировало увеличение Глу-ПСП. Позднее были показаны аналогичные результаты (Li et al., 2005). Усиление экспрессии AMPAR было показано и при стимуляции хвостового нерва.

Вышеописанные результаты на аплизии напоминают результаты исследования синаптической пластичности и обучения у млекопитающих. В частности, изучение длительной потенциации в гиппокампе показало, что модуляция перемещения AMPAR также имеет важное значение (Malinow, 2003).

1.2. Протеинкиназа мю зета и ее роль в поддержании долговременной памяти

Ряд протеинкиназ играют важную роль в долговременной потенциации и других формах синаптической пластичности, которые составляют физиологический субстрат для долговременной памяти. Во многих работах исследовалась роль четырех главных киназ: CamKII, MAPK, PKA, PKC. Каждая из этих киназ активируется посттрансляционными механизмами, вторичными посредниками, которые переводят киназу из ее неактивной конформации в активную. Активность большинства из них критична в первые минуты после тетанической стимуляции, но не позже.

Протеинкиназы С – семейство протеинкиназ, включающее порядка 15 различных изоформ, каждая из которых выполняет свои индивидуальные функции в клетке (Newton, 2001). Большинство PKC состоит из двух доменов – регуляторного и каталитического. Регуляторный и каталитический домены протеинкиназы С зета (ПКСЗ) кодируются экзонами на 5’ и 3’ концах гена, а между ними находится большая некодирующая интронная область. N-концевой регуляторный домен белковой молекулы содержит область, функционирующую как псевдосубстрат, а его связывание с активным сайтом С-концевого каталитического домена блокирует работу ПКСЗ. Взаимодействие вторичных посредников с последовательностью

регуляторного домена PKC запускает временные конформационные изменения, приводящие к снятию аутоингибирования каталитического домена и активации киназы. После разрушения вторичного посредника ПКСЗ снова переводится в неактивную конформацию.

Показано, что в нервной системе ПКСЗ может подвергаться протеолитическому расщеплению с отделением регуляторного домена и образованием укороченной, постоянно активной изоформы – ПКМЗ. Согласно целому ряду работ последних лет, постоянно активная ПКМЗ является ключевым компонентом образования и поддержания долговременных изменений синаптической пластичности и памяти у беспозвоночных и позвоночных животных (Бородинова и др., 2017).

Первое упоминание о ПКМЗ было сделано группой ученых из США и Японии (Sactor et al., 1993). Было обнаружено, что концентрация ПКМЗ повышена и в фазу индукции, и в фазу поддержания долговременной потенциации. Позднее была представлена модель образования и действия ПКМЗ (рис. 1). Ген ПКСЗ имеет два промотера. Транскрипция с внутреннего промотера ведет к образованию матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) ПКМЗ, которая кодирует зета каталитический домен без регуляторного домена. После транскрипции мРНК ПКМЗ транспортируется к дендритам, где подвергается трансляционной репрессии PIN1 (protein interacting with NIMA1). При индукции длительной потенциации происходит активация NMDAR (N-methyl-D-aspartic acid receptor), что, в свою очередь, приводит к активации многих сигнальных путей с участием CaMKII, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), MAPK, PKA, которые необходимы для снятия трансляционного блока с синтеза ПКМЗ. Сразу после трансляции ПКМЗ имеет низкий уровень активности. Однако связываясь с PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1), которая фосфорилирует ПКМЗ, она превращается в конформацию с высоким уровнем активности. Для поддержания трансляции ПКМЗ в дендритах на высоком уровне существует петля положительной обратной связи между ПКМЗ и PIN1. Синтезированная

ПКМЗ фосфорилирует и ингибирует активность PIN1, поддерживая, таким образом, свой синтез на высоком уровне. ПКМЗ увеличивает число AMPAR на постсинаптической мембране за счет взаимодействия GluR2 (glutamate receptor 2) субъединицы AMPAR и транспортного белка NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor), потенциируя синаптическую передачу (Sacktor, 2011).

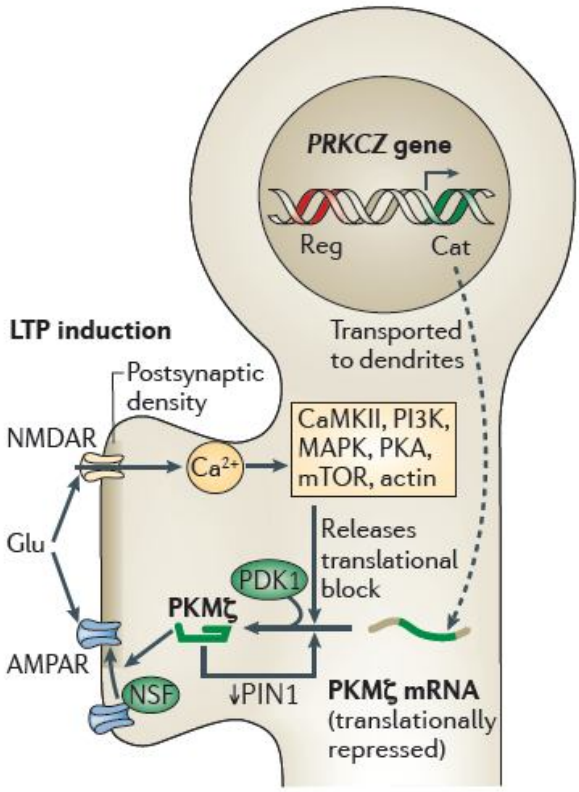


Рис. 1. Предположительная модель образования и действия ПКМЗ (Sacktor, 2011).

Основными способами определения роли ПКМЗ в современных исследованиях следует рассматривать применение фармакологических агентов – блокаторов (ZIP, хелеритрин) (Ling et al., 2006; Pastalkova et al., 2006) или использование генетических подходов (повышение или понижение экспрессии ПКМЗ, нокауты) (Shema et al., 2011).

Недавние исследования показали, что когда под действием ПКМЗ происходит перемещение AMPAR из внесинаптической области в

синаптическую, включаются гомеостатические силы, которые стремятся вернуть рецепторы на прежнее место, а синапс – в непотенциированное состояние. Таким образом, в процессе поддержания долговременной потенциации происходит постоянное соревнование между активностью ПКМЗ и гомеостатическими механизмами. Однако при аппликации ингибитора ПКМЗ ZIP, постсинаптические AMPAR активно удаляются из постсинапса, и синапс возвращается в наивное состояние (Serrano et al., 2005).

ZIP способен блокировать действие ПКМЗ in vivo и in vitro. На поведенческом уровне это приводит к нарушению памятного следа, выработанного за 1 день - 1 месяц до предъявления ZIP, на клеточном уровне при этом наблюдается прекращение долговременной потенциации (Shema et al., 2007; Kwapis et al., 2009). Хотя ZIP уменьшает число GluR2 AMPAR во фракции постсинаптического утолщения в базолатеральной амигдале у животных при выработке оборонительного условного рефлекса, он не оказывает влияния на те же самые области мозга необученных животных. Это наблюдение аналогично тому, что ZIP уменьшает AMPAR ответ в потенциированных синапсах, но не затрагивает непотенциированные синапсы (Pastalkova et al., 2006).

Участие ПКМЗ в поддержании длительной потенциации в гиппокампе млекопитающих было показано не только Сактором. Так ингибирование активности ПКМЗ на срезах гиппокампа млекопитающих через час после тетанизации устраняло AMPAR – опосредованную синаптическую потенциацию, то есть нарушало поддержание выработанной долговременной потенциации (Ling et al., 2002).

В работе по изучению влияния ПКМЗ на сохранность условного рефлекса пищевой аверсии было получено, что подавление активности ПКМЗ приводит к нарушению памяти, а повышение количества ПКМЗ, напротив, улучшает долговременную память (Shema et al., 2011).

В другом исследовании (Serrano et al., 2005) проводилось определение временного окна, в переделах которого активность ПКМЗ необходима для поддержания долговременной потенциации. Применяя ZIP в качестве специфического блокатора ПКМЗ на разных этапах долговременной потенциации, ими было обнаружено, что протеинкиназа необходима для поддержания поздней фазы долговременной потенциации.

Сложности истории о протеинкиназе добавляют некоторые исследования, обнаружившие, что нарушение долговременной памяти, вызванное сбоем в работе ПКМЗ, носит временный характер (Parsons, Davis, 2011). Исследователи показали, что ингибирование активности ПКМЗ при помощи ZIP не стирает память окончательно, а временно нарушает ее проявление. Они исследовали стартл реакцию крыс на звук. ZIP экспериментальным животным вводили в область амигдалы через неделю после выработки рефлекса. Тестирование проводили спустя два часа, два дня и 15 дней после введения ZIP. Когда тестирование проводилось 2 часа или два дня после введения ингибитора, проявление стартл реакции на звук нарушалось. Когда же тестирование проводилось спустя 15 дней после введения ZIP, экспериментальные животные показывали результаты аналогичные контрольной группе. Согласно последним данным, полное очищение тканей мозга после интракраниального введения ZIP происходит через 24 часа после введения (Kwapis et al., 2012). Объяснением временной зависимости эффективности действия ZIP может служить способность ZIP нарушать синтез ПКМЗ, что ведет к довольно длительным изменениям ее активности, поскольку существует положительная обратная связь между активностью ПКМЗ и ее синтезом. Поэтому при реактивации памятного следа в момент нарушения активности ПКМЗ память не имеет возможности рестабилизироваться, что приводит к постоянному исчезновению памяти. Через некоторое время уровень ПКМЗ восстанавливается, и в данном случае при реактивации этого будет достаточно для нормальной рестабилизации памяти и сохранения памятного следа.

При связывании феномена синаптической пластичности и памяти существует одна проблема - белки и другие молекулы, лежащие в основе синаптической пластичности, живут недолго, а память хранится годами. Поэтому появляется гипотеза синаптической метки (synaptic tag) - некий фонарик, который загорается в потенциированном синапсе и говорит: сюда надо больше рецепторов (Redondo, Morris, 2011). Одна из таких меток - ПКМЗ.

В процессе индукции памяти ПКМЗ синтезируется и улавливается в недавно активированных синапсах, которые подвергаются синаптическому мечению, возможно, посредством образования комплекса PICK1 (protein interacting with C kinase 1) димером и ПКМЗ. При поддержании потенциации увеличенное количесвто GluR2-содержащих AMPAR в постсинаптической области служит меткой, благодаря которой ПКМЗ поступает в потенциированный синапс. Таким образом, активность ПКМЗ обеспечивает одновременно два процесса: синаптическую потенциацию и свою доставку в потенциированный синапс. Исходя из предположения, что ПКМЗ работает в клетке как синаптическая метка, становится легко объяснить тот факт, что временное нарушение активности ПКМЗ, вызванное действием ZIP, сочетается с продолжительным нарушением долговременной памяти.

Свидетельства о функционировании молекулы ПКМЗ при поддержании долговременной памяти были получены на различных позвоночных животных с использованием многочисленных методик и областей мозга в качестве субстрата выработки памятного следа (Serrano et al., 2005; Pastalkova et al., 2006). Наряду с этим, необходимо уделить внимание и более простым в плане организации нервной деятельности животным – классу беспозвоночных. Работы в данном направлении были выполнены на улитках – Aplysia (Bougie et al., 2009; Cai et al., 2011), виноградной улитке Helix lucorum (Balaban et al., 2015; Solntseva et al., 2015), насекомых – Drosophila (Drier et al., 2002), таракане Leucophaea maderae

(Deng et al., 2015). Ключевой вопрос – имеется ли аналог ПКМЗ у беспозвоночных вообще, а если имеется, выполняет ли он схожую функцию.

Долговременная сенситизация рефлекса отдергивания жабры (неассоциативное обучение) морского моллюска Aplysia является простым и хорошо изученным вариантом долговременного обучения. У моллюска аплизии обнаружен аналог ПКМЗ млекопитающих, который, также как и у млекопитающих, является производным атипичной PKC, но образуется иным путем, а именно происходит кальций-зависимое расщепление PKC Apl II. Стоит заметить, что для процесса расщепления необходим синтез белков (Bougie et al., 2009, 2012). Как показывают исследования, введение в полость тела животного ZIP и хелеритрина (неспецифический блокатор PKC), нарушало поддержание долговременной сенситизации рефлекса отдергивания жабры (Cai et al., 2011), вероятно, путем ингибирования активности фермента атипичной ПКМЗ. Эти результаты хорошо согласуются с данными этих же исследователей по действию ZIP на долговременную фасилитацию связей между сенсорными и моторными нейронами Aplysia в клеточной культуре (Cai et al., 2011). Данные результаты вместе с ранее полученными (Bougie et al., 2009) подтверждают идею, что долговременная память у аплизии поддерживается через петлю положительной обратной связи, включающую протеинкиназа M Apl III – зависимое фосфорилирование белков. Возможно, активность протеинкиназы M Apl III поддерживает увеличенное количество AMPARs на постсинаптической мембране. В поддержку этому утверждению свидетельствуют данные о том, что воздействие хелеритрина приводит к уменьшению повышенного уровня экспрессии глутаматных рецепторов в ЦНС аплизии, характерного для долговременной сенситизации (Chen et al., 2008). Также для аплизии найдено, что для поддержания долговременной фасилитации необходимо присутствие CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein), обладающего прионоподобными свойствами, в течение двух дней с момента фасилитирующего воздействия. Поскольку действие ПКМЗ проявляется и

необходимо в тот же период долговременной фасилитации, появилось предположение, что CPEB взаимодействует с ПКМЗ, регулируя её образование (отщепление от молекулы PKC) напрямую или путём воздействия на протеазу, за счёт которой происходит это расщепление (Ezeani et al., 2012).

Зависит ли от активности ПКМЗ другие формы долговременной памяти Aplysia, такие как долговременное привыкание (Ezzeddine, Glanzman, 2003), классический условный рефлекс (Carew et al., 1981), на данный момент не определено. Здесь следует отметить, что не все формы памяти у позвоночных нуждаются в функционировании ПКМЗ (Shema et al., 2007).

Работы по исследованию данного вопроса проводились также и на виноградной улитке Helix lucorum (Solntseva et al., 2015). Исследования поведения животных в модели условного рефлекса пищевой аверсии показали, что блокатор ПКМЗ ZIP, но не его неактивный аналог scrZIP, устраняет оборонительную реакцию на пищевой стимул, используемый как условный раздражитель. При этом следует отметить, что ZIP вводили в двух временных точках без напоминания, а именно через 2 и 10 дней после завершения процедуры обучения. Было обнаружено, что введение ZIP вне зависимости от временного интервала полностью устраняло ранее выработанную память о негативном значении условного стимула. Повторное обучение приводило к восстановлению памяти.

Факт того, что пептид ZIP способен стирать ранее выработанную память у таких различных в филогенетическом отношении животных, как грызуны и моллюски, оказался достаточно интригующим. Основываясь на анализе аминокислотной последовательности, гомолог атипичной PKC был также обнаружен у насекомых, например, пчел (Grunbaum, Muller, 1998), плодовых мух Drosophila (Drier et al., 2002). Подробный анализ относительно участия атипичной постоянно активной ПКМЗ в поддержании долговременной памяти у насекомых был выполнен на таракане Leucophaea maderae (Deng et al., 2015) и плодовой мушке Drosophila (Drier et al., 2002).

Ученые из США в качестве модельного объекта выбрали таракана Leucophaea maderae и модель условнорефлекторной пищевой реакции на запах. Неприятный животным запах сочетали с пищевым подкреплением. В итоге, животные, обученные пищевой реакции на ранее неприятный запах, проявляли сильно выраженное предпочтение к этому запаху. Системное введение хелеритрина или ZIP стирало долговременную память на запах у таракана. Повторное обучение, также как и в случае с Helix lucorum (Solntseva et al., 2015), приводило к выработке условнорефлекторной памяти заново. Данные результаты дают возможность с большой уверенностью судить о необходимости фермента ПКМЗ (или же других изоформ РКС) для поддержания долговременной памяти у Leucophaea maderae.

Для дрозофилы наиболее широко применяемым методом изучения ассоциативного обучения является условнорефлекторный оборонительный рефлекс на запах. Работая с данным типом рефлекса у Drosophila, группа ученых показала, что кормление мух блокатором атипичной РКС хелеритрином, а также экспрессия генов под контролем регуляторных элементов гена теплового шока, подавляющих активность атипичной ПКМЗ, нарушало поддержание долговременной памяти, в то время как схожая активация экспрессии гена атипичной ПКМЗ, приводила к усилению памяти. Вышеизложенные данные хорошо согласуются с главенствующей в данный момент точкой зрения о критической роли ПКМЗ в поддержании долговременных синаптических изменений, как на уровне целого организма, так и в экспериментах in vivo.

Несмотря на обилие сведений о критической роли ПКМЗ в образовании и поддержании долговременной потенциации/фасилитации/памятного следа, ряд исследователей получил отрицательные результаты при проверке места этой протеинкиназы в цепи реакций консолидации и хранения памяти (Lee et al., 2013; Volk et al., 2013). Из их работ можно сделать вывод, что ZIP, помимо своего влияния на функционирование ПКМЗ, также воздействует на ряд каких-то других ферментов, которые в норме участвуют в формировании

и поддержании долговременных синаптических изменений. В качестве таких киназ могут выступать ПКМ лямбда/тау. В лаборатории Сактора было показано компенсаторное увеличение фосфорилирования ПКМ лямбда/тау у нокаутов по гену ПКМЗ и/или ПКСЗ (Glanzman, 2013). Об участие ПКМ лямбда в процессах формирования и поддержания долговременной потенциации также свидетельствует работа, в которой применение селективного блокатора ПКМ лямбда вызвало исчезновение LTP.

Один из важных аспектов в экспериментальном изучении ПКМЗ является вопрос, связанный со scrZIP (пептид, имеющий такой же аминокислотный состав, что и ZIP, но другой порядок соединения этих аминокислот – обычно используется как контрольный пептид для ZIP). При этом в ряде недавних работ (Lee et al., 2013; Volk et al., 2013) было продемонстрировано наличие влияние scrZIP на активность ПКМЗ, а также его способность снимать долговременную потенциацию в гиппокампальных срезах (Volk et al., 2013). Введение scrZIP в амигдалу вызывало частичное стирание памяти условно-рефлекторного замирания (Kwapis et al., 2009). И поскольку scrZIP сам по себе имеет некоторое влияние на механизмы поддержание LTP и долговременной памяти, использование данного вещества в качестве инертного контроля к ZIP является не совсем корректным.

Еще в вышеуказанных работах (Lee et al., 2013; Volk et al., 2013) описывались эксперименты на нокаутных мышах, лишённых гена ПКМЗ и/или ПКСЗ либо во всём организме, либо только в ЦНС. Ни у тех, ни у других животных не наблюдалось нарушений долговременной потенциации при выработке памятного следа. Для объяснения экспериментов с нокаутами вполне подойдет версия, что нарушение активности ПКМЗ в клетках запустило компенасторные процессы, например, усиленное фосфолирирование близко родственных изоформ PKC (Selbie et al., 1993). То есть в нормальных условиях ПКМЗ играет решающую роль в поддержании памяти, при отсутствии функционально активной ПКМЗ для поддержания

памяти включаются другие механизмы (Tsokas et al., 2016). В данной работе Tsokas и коллеги показали, что в гиппокампе ПКСЗ/ПКМЗ-/- мышей наблюдается рост базового количества белковых молекул РКС лямбда, а также увеличивается «продолжительность жизни» этих молекул в потенциированных клетках. В норме поддержание долговременной потенциации in vitro и долговременной памяти in vivo опосредовано ПКМЗ, однако, как показано авторами, в отсутствие активной протеинкиназы лидирующая роль в поддержании длительных изменений пластичности в гиппокампе и сохранении пространственной памяти переходит к РКС лямбда (Tsokas et al., 2016). Таким образом, было экспериментально подтверждено, что в мозге нокаутных ПКСЗ/ПКМЗ-/- животных запускается дополнительный РКС лямбда-зависимый механизм сохранения долговременных пластических перестроек.

Отметим, что формирование и сохранение памятного следа представляет собой комплексный процесс, в котором в норме участвуют обе атипичные протеинкиназы. РКС лямбда, по некоторым данным, важна для формирования памяти на раннем этапе, поскольку регулирует количество постсинаптических GluR1-содержащих AMPA рецепторов в раннюю фазу долговременной потенциации (Ren et al., 2013). С другой стороны, ПКМЗ необходима и достаточна для поддержания долговременной потенциации и памяти. Кроме того, при недостаточности экспрессии ПКМЗ в мозге включается компенсаторное, РКС лямбда-опосредованное сохранение памятного следа.

На сегодняшний день считается, что влияние, оказываемое ПКМЗ на синаптические процессы, носит исключительно постсинаптический характер (все эффекты, по-видимому, постсинаптические), функционирует ли ПКМЗ как пресинаптический агент, может ли запускать пресинаптические изменения, которые будут принимать участие, содействовать в поддержании памяти (повышение выброса медиатора), пока не ясно. Есть некоторые данные, говорящие не в пользу наличия пресинаптического влияния ПКМЗ.

Например, проводилась работа по введению ПКМЗ в нейроны гиппокампа; пресинаптический выброс регистрировали в течение 30 минут, и за это время не было обнаружено никакого увеличения синаптического выброса (Ling et al., 2006)

Недавние исследования поставили рад вопросов, связанных со специфичностью действия ПКМЗ (Lee et al., 2013; Volk et al., 2013), а также о вероятном токсическом влиянии на нервные клетки фармакологических веществ, использованных в качестве ингибитора ПКМЗ. В одном из исследований на позвоночных было показано, что активность ПКСЗ приводит к увеличению скорости интернализации тормозных рецепторов к ГАМК – GABA(C)R – встречающихся преимущественно в сетчатке (Linck et al., 2015). Недавно вышла статья, демонстрирующая еще одну возможную сложность экспериментов по блокаде ПКМЗ с помощью ZIP: было показано токсическое действие ZIP на нейроны гиппокампа в культуре (Sadeh et al., 2015). Эффект имел дозозависимый характер, причем диапазон токсичных концентраций ZIP перекрывался с диапазоном концентраций блокатора, обычно используемых в исследованиях.

В подавляющем большинстве публикаций ПКМЗ оказывается необходима для поддержания долговременной памяти. При этом присутствует небольшой процент работ, где применение ZIP в поведенческих экспериментах не влияет на сохранность долговременной памяти. Например, известно, что обстановочное условно-рефлекторное избегание зависит от такой структуры, как дорсальный гиппокамп (Anagnostaras et al., 1999; Matus-Amat et al., 2004). Но применение ZIP не давало каких-либо результатов (не сокращало процент замирания у крыс на условный сигнал) (Kwapis et al., 2009). Объяснения для этого могут быть разными, например, гиппокамп не играет роли в поддержании обстановочной памяти, а лишь участвует в ее формировании. Довольно интересна работа (Hardt et al., 2010), в которой введение ZIP в гиппокамп через 24 часа или 6 дней после обучения вызывало стирание памяти о расположение объектов, с которыми животное

контактировало прежде, но не влияло на способность этих животных узнавать объекты по характерным отличительным признакам.

Поскольку данные о функции ПКМЗ в механизмах поддержания памяти, полученные путем аппликации ингибиторов, носят весьма неоднозначный характер, полагаться исключительно на них не представляется возможным. Нужно использовать более специфические способы для изменения активности ПКМЗ: экспрессия доминантно-негативной конструкции (Newton, 2003; Sossin, 2007), оверэкспрессия ПКМЗ в ЦНС, а также введение антисмысловых олигонуклеотидов ПКМЗ в мозг (Tsokas et al., 2012). Это обеспечит значительное укрепление представлений о ПКМЗ как о молекуле памяти.

1.3. Общее представление о серотонине

Открытие серотонина как биологической молекулы относится к концу 40-х годов. Рэпорт с коллегами были первыми, кому удалось изолировать, очистить и определить из крови вещество, вызывающее сокращение кровеносных сосудов. Позднее данное соединение было названо серотонин (класс моноаминов) (Rapport et al., 1947). Спустя почти 10 лет серотонин был обнаружен в мозге (Twarog, Page, 1953) и причислен к категории нейротрансмитеров (Marrazzi, Hart, 1955). На сегодняшний день серотонин представляется одним из важнейших нейромедиаторов. Помимо нервной системы, серотонин играет важную роль и в функционировании пищеварительной, сердечно-сосудистой систем. Нельзя не упомянуть вовлеченность серотонинергической системы и в процессы регуляции эмоциональной и болевой сферы. На данный момент известно, что серотонин опосредует формирование памяти различных видов животных (аплизии, пчелы, крысы, обезьяны и даже человека). Все это многообразие описанных функций серотонина связано со сложностью морфологической организации серотонинергической системы, многообразием рецепторов серотонина. Большой объем работ был направлен на определениее роли серотонина в

обучения и памяти. Серотонин, как показано в ряде работ, может быть вовлечен в формирование условно-рефлекторного поведения в таких структурах как миндалина (Schneider et al., 2003), стриатум (Prado-Alcala et al., 2003), гиппокамп (Haider et al., 2007), префронтальная кора (Clarke et al., 2004), ядро шва (Romanluk et al., 2001). Известно, что серотонинергические нейроны представлены в областях, ответственных за обучение и память, а также возрастные болезни (болезнь Альцгеймера), шизофрению, наркоманию, депрессию, стресс, дефицит внимания, гиперактивность и другие расстройства. Модулируя уровень серотонина различными способами, используя агонисты, антагонисты, ингибиторы обратного захвата, нейротоксины, можно менять ход когнитивных процессов (Meneses, 1998). При этом с каждым годом становится все больше данных, указывающих на способность серотонина модулировать обучение и воздействовать на память (Izquierdo, McGaugh, 2000; Barbas et al., 2003; Hawkins et al., 2006).

Важно иметь в виду, что различные способы истощения серотонина в нервной системе могут оказывать различные эффекты на обучение и память (Ogren, 1985). На ранних этапах исследований в данном направлении часто использовали ингибиторы триптофан гидроксилазы (хлорфенилаланин) (Tenen, 1967). Уже позднее начали использоваться селективные нейротоксины серотонинергических нейронов (5,6-диокситриптамин и 5,7-диокситриптамин (5,7-ДОТ)). 5,7-ДОТ отличается от серотонина наличием одной дополнительной гидроксильной группы. Применение нейротоксических аналогов серотонина является важным экспериментальным приемом для изучения роли серотонинергической системы в обучении и в контроле разных форм поведения (Балабан и др., 1992; Kemenes, 1997). Вследствие быстрого захвата 5,7-ДОТ нейронами, в которых 5,7-ДОТ подвергается самоокислению, а также ферментно-опосредованным окислительным реакциям выделяется ряд продуктов, например, 5-гидрокситриптамин-4,7-дион, токсичных для нейронов (Wrona et al., 1986; Tabatabaie et al., 1993). Токсические свойства 5,7-ДОТ проявляются

в подавлении синтеза серотонина (Vehovszky et al., 1988), обратимом разрушении терминалей серотонинергических нейронов, ведущему к подавлению их функции и, как следствие этого, снижению уровня серотонина в нервной системе. Нейроны, захватившие данный нейротоксин, по истечении месяца приобретают буро-коричневую окраску (Balaban et al., 1985). Значительное снижение уровня серотонина этим нейротоксином показано и в ЦНС аплизии (Glanzman et al., 1989), кроме того схожие явления наблюдаются и у позвоночных (Fonseca et al., 2006). Полное восстановление уровня серотонина наблюдается через 21 день (Hernandy et al., 1992). Предшественник серотонина триптофан может улучшать выполнение когнитивных задач животными, улучшать память (Haider et al., 2006). Позитивные эффекты воздействия триптофана на нервную систему были показаны не только на животных, но и на людях, на пациентах, страдающих болезнью альцгеймера и шизофренией (Levkovitz et al., 2003, Porter et al., 2003).

Естественно, что применение нейротоксина 5,7-ДОТ приводит к изменению поведения животных. Аплизии, например, после инъекции нейротоксина выделяют чернила, сжимаются в шар, через несколько минут после введения 5,7-ДОТ начинают производить педальные и параподиальные волны, характеризующие локомоцию этих животных, при этом не могут прикрепить ногу к субстрату (Glanzman et al., 1989). Немедленно после введения 5,7-ДОТ у виноградных улиток наблюдается нарушение локомоции: они демонстрируют повышенную возбудимость, интенсивно передвигаются, часто меняя направления. Через несколько часов поведение животных с введенным нейротоксином не отличается от поведенеия наивных животных. На клеточном уровне, на фоне применения 5,7-ДОТ невозможно гетеросинаптическое облегчение моносинаптических связей между сенсорными и моторными нейронами аплизии (Glanzman et al., 1989).

1.4. Роль серотонинергической системы в механизмах обучения и памяти

Серотонин контролирует такие важные формы поведения у моллюсков, как оборонительное и пищевое поведение, локомоция, репродукция, циркадные ритмы (Сахаров, Каботянский, 1986; Eskin et al., 1989; Захаров, 1992; Sahley, 1994; Katz, Frost, 1995; Levenson et al., 1999). У виноградной улитки показано наличие серотонинергических нейронов, выполняющих модуляторную функцию, кроме того, функционально схожие нейроны были обнаружены и в нервной системе другого вида улиток – аплизии (Glanzman et al., 1989; Zakharov et al., 1995; Иерусалимский и др., 1997). Много лет назад было показано, что у аплизии серотонин является фасилитирующим агентом (Brunelli et al., 1976). Аппликация серотонина вызывает увеличение длительности потенциала действия сенсорного нейрона и облегчение высвобождения медиатора из терминалей сенсорного нейрона (Clark, Kandel, 1993). У большинства беспозвоночных хорошо известно, что серотонин потенциирует оборонительные реакции, вызывает фасилитацию синаптических связей. У виноградной улитки не только убедительно показана роль серотонина в модуляции реакции на оборонительные стимулы, но и идентифицированы кластеры серотонергических нейронов, которые отвечают конкретно за пластичность оборонительных реакций (Zakharov et al., 1995). Всего в нервной системе улитки описано 3 группы серотонин-содержащих нейронов. Серотонинергические нейроны (1) церебральных ганглиев (20-30 клеток в каждом ганглии) посылают отростки, в основном, в буккальные ганглии и отвечают за активацию пищевого поведения. Самая крупная 5-НТ-содержащая клетка имеет гомологи у всех брюхоногих моллюсков со сходной функцией модуляции пищевого поведения (Nikitin, Balaban, 2011) и существенной ролью в пластичности пищевого поведения (Nikitin et al., 2013). Локально расположенная группа 5-НТ-содержащих нейронов из 30-40 клеток на границе (2) висцерального и правого париетального ганглиев посылает отростки во внутренние органы,

контролирует работу сердца. Оказалось, что две симметричные группы по 60-80 серотонинергических нейронов в ростральной части (3) педальных ганглиев модулируют нервную сеть, лежащую в основе оборонительных реакций улитки, причем, внутри группы нейроны связаны электрическими связями, и, только 2 самых крупных представителя этой группы посылают отростки в нейропили соседних ганглиев (Zakharov et al., 1995). Экспериментально доказано, что только один нейрон (педальный №4) из этой большой группы 5-НТ-содержащих клеток посылает отростки в париетальные ганглии, и его внутриклеточная активация может служить подкреплением при выработке ассоциативной условной связи (Balaban et al., 2001, 2004). В мировой литературе в настоящее время известны всего два примера, когда удалось показать, что внутриклеточно вызванная активность одной идентифицированной клетки может служить подкреплением в ассоциативном обучении: (1) октопаминергический нейрон у пчелы (Hammer, 1993), и (2) педальный серотонергический нейрон виноградной улитки (Balaban et al., 2001, 2004). Этот модулирующий (подкрепляющий) нейрон обладает спонтанной активностью и реагирует на опасные для животного стимулы (тактильные, химические) возбудительно-тормозной фазической реакцией и изменением частоты спонтанной активности. Так, при нанесении сильного тактильного раздражения, вызывающего фасилитацию ответов премоторных интернейронов оборонительного поведения, частота спонтанной активности модулирующего нейрона увеличивается вдвое на длительное время (минуты), создавая условия для фасилитации синаптических связей (Zakharov et al., 1995). Таким образом, для нейронной сети оборонительного поведения известна активность сенсорных клеток, премоторных интернейронов, запускающих оборонительные реакции, и модуляторных серотонергических нейронов, активность которых изменяет эффективность синаптических входов премоторных интернейронов оборонительного поведения. Один из подходов, нацеленных на выявление роли серотонинергических нейронов в пластичности памяти, это применение

селективного нейротоксина для данного типа нейронов. С помощью данного подхода и была показана особая роль идентифицированных серотонинергических нейронов в обеспечении пластичности на клеточном и поведенческом уровнях у наземного легочного моллюска Helix lucorum (Balaban et al., 1987, 2001, 2004). Негативное воздействие 5,7-ДОТ на обучение было показано и на другом объекте – пиявке, однако, в данном случае способность к обучению не исчезала полностью, а значительно ухудшалась, оставаясь при этом существенно лучше, чем при предъявлении несочетанных стимулов (Sahley, 1994; Burrell, Sahley, 1999). Таким образом, к настоящему времени накопился большой экспериментальный материал, свидетельствующий о связи уровня серотонина в нервной системе со способностью к обучению, что побудило нас к дальнейшему исследованию роли серотонина при обучении и реконсолидации, используя различные нейробиологические подходы.

Нейронная сеть пищевого поведения значительно хуже изучена в сенсорной части, но много известно о моторной программе пищевого поведения (МП ПП). Мотонейроны МП ПП расположены в буккальных ганглиях и могут работать и обеспечивать сложную последовательность движений радулы без участия остальных ганглиев, причем, запуск этой МП ПП может быть произведен активацией рецепторов губ улитки или повышением концентрации дофамина (Galanina et al., 1986). Активность этих элементов МП очень характерна и легко идентифицируема в активности, отводимой от нервов буккального ганглия при запуске ритмической активности нейронной сети, наблюдающейся при жевательных движениях. Возможно, что хемосенсорные элементы находятся в коже губных лопастей, а активация МП ПП запахами опосредована, опять же, расположенными на периферии обонятельными рецепторными клетками и нейронами тентакулярных ганглиев. Самые крупные 5-НТ-содержащие клетки церебральных ганглиев образуют моносинаптические связи с мотонейронами буккальных ганглиев и имеют обширное поле иннервации в нейропиле, две

симметричные клетки связаны слабой электрической связью. Эти клетки (гигантские церебральные №1) отвечают на положительные и отрицательные химические стимулы, не меняют свой ответ после обучения. В ответ на сильное тактильное раздражение отвечают длительной гиперполяризацией. Экспериментально установлено, что ответы этих нейронов на условный стимул не меняются после обучения и появления в интернейронах оборонительной системы ответов на пищу (Balaban et al., 2001).

1.5. Феномен реконсолидации

Одно из наиболее интересных свойств памяти заключается в том, что ранее консолидированная память может быть нарушена посредством многих факторов (например, блокада синтеза белка), если данные факторы применяются совместно с напоминанием о процедуре обучения. Те же самые амнестические агенты также оказывают разрушающее влияние и на только что сформированную память (Misanin et al., 1968; Nader et al., 2000; Sara, 2000; Anokhin et al., 2002). Согласно современной концепции о реконсолидации памяти, наша память обладает определенной лабильностью, нет ничего такого, что запоминается раз и навсегда (Nader, Hardt, 2009). При напоминании (реактивации памяти) наступает фаза дестабилизации, необходимая для процесса реконсолидации (Sara, 2000; Nader, 2003).

Контекстное обучение проводилось на многих беспозвоночных (Colwill et al., 1988; Haney, Lukowiak., 2001). У наземных улиток такой тип памяти был исследован подробно рядом авторов (Balaban, 1993; Balaban, Bravarenko, 1993). Кроме того, было показано существование фазы реконсолидации путем применения блокатора синтеза белка анизомицина сразу после процедуры напоминания, что приводило к повреждению обстановочной памяти, иными словами, животные забывали ранее выученный навык (Gainutdinova et al., 2005). Среди других беспозвоночных также был выявлен феномен рекосолидации. Совсем недавно феномен, схожий с реконсолидацией, был обнаружен в культуральных нейронах аплизии на

уровне моносинаптического соединения сенсорного и моторного нейронов (Cai et al., 2012; Lee et al., 2012).

Существует огромное количество экспериментальных данных, доказывающих участие серотонина в процессах обучения и памяти как среди моллюсков (Carew et al., 1983; Reissner et al., 2006), так и среди позвоночных (Cohen et al., 2015; Luo et al., 2015). О необходимости серотонина для формирования памяти можно судить по работам Клейна с соавторами, в которых он показал необходимость серотонина для индукции долговременной сенситизации (Klein et al., 1982), а также ряду работ, направленных на изучение клеточных механизмов классических условных рефлексов (Hawkins et al., 1983, 2015). Возможная значимость серотонина для феномена реконсолидации, а также участие в извлечении памяти ранее исследованы не были. В нашей работе мы исследовали вклад серотонина в феномен реконсолидации у наземных улиток, используя электрофизилогические эксперименты, региструя активность трех типов функционально и морфологически идентифицированных клеток до, в течение и после ассоциативного обучения in vitro, и поведенческие эксперименты, применяя нейротоксин 5,7-ДОТ, селективно нарушающий работу клеток серотонинергической системы. В поведенческих экспериментах проводилось сравнение роли серотонинергических нейронов в двух ситуациях при обучении: в первом случае, в качестве условного стимула служила обстановка, а во втором случае, в качестве условного стимула служил сигнальный раздражитель. Ассоциативные изменения, полученные в результате обучения, сравнивали у нормальных (без 5,7-ДОТ) животных и у животных с введенным нейротоксином.

2. МЕТОДИКА

2.1. Объект

Работа выполнена на взрослых особях Helix lucorum L., собранных в Крыму и содержащихся в террариумах в лабораторных условиях. В террариумах поддерживалась влажность, достаточное количество пищи, воды, невысокая концентрация животных, способствовавшие нормальному активному существованию животных. Во всех экспериментах использовали половозрелых особей, однородных по весу и размеру. До экспериментов улитки не менее двух-трех недель находились в активном состоянии. Центральная нервная система виноградной улитки чрезвычайно хорошо приспособлена для изучения вследствие достаточно крупных размеров тел почти всех ее нейронов, которые легко дифференцировать по местоположению, размеру, что является благоприятными условиями для нейрофизиологических исследований на уровне отдельных клеток.

2.2. Поведенческие методы исследования

2.2.1. Выработка условного обстановочного оборонительного рефлекса

Виноградная улитка, не имея средств активной защиты от врагов, почти на любое раздражение отвечает комплексом пассивно-оборонительных реакций. В этот комплекс входят реакции втягивания щупалец и всего тела в раковину, закрытие отверстия легочной полости. Эти ответы могут быть вызваны стимулами различной модальности. Один из компонентов комплекса оборонительных реакций виноградной улитки был выбран нами для проведения экспериментов по выработке обстановочного оборонительного рефлекса. Такой метод обучения давно и успешно применяется в нашей лаборатории при исследовании действия различных веществ на разные этапы формирования и хранения памяти (Balaban, 2002), включая реконсолидацию памяти при напоминании (Balaban et al., 2014).

Для проведения процедуры обучения улиток крепили к специальному кронштейну за раковину, и у них была возможность свободно передвигаться по покрытому токопроводящей фольгой шару, плавающему в воде с небольшим количеством NaCl. При выработке условнорефлекторной обстановочной реакции удары током (1с, 1-4мА) наносили металлическим электродом, который вручную подносили к дорзальному участку кожи ноги. Сила тока была подобрана индивидуально и была достаточна, чтобы заставить улитку полностью втянуть голову и переднюю часть ноги. Для тестирования оборонительных реакций улиток использовалось тактильное раздражение волосками Фрея, откалиброванными по весу (давление 25г/мм2). Омматофоры (задние щупальца) в ответ на выбранную интенсивность стимуляции сокращались незначительно, в районе 5-10% от максимальной длины. Раздражение наносилось в область, находящуюся на расстоянии несколько мм позади левого щупальца. Реакции задних щупалец на раздражение волосками Фрея регистрировались на видеокамеру, и потом по записи измерялась реакция в процентах от начальной длины. Животные тестировались в двух обстановках: в обстановке 1 – на плоской поверхности (стекло), привычной для улиток, поскольку они содержатся в стеклянных аквариумах; в обстановке 2 – на шаре, где проводилась процедура обучения (рис. 2). Стандартный протокол исследования предусматривал 2 дня привыкания к обстановке, улитки проводили в среднем 30 минут на шаре ежедневно, затем тестирование (Т) всех групп. После этого проводилось обучение путем нанесения электрошока в течение 10 дней только в одной обстановке (на шаре), и через день после окончания обучения тестирование (Т1) на память об обстановке. Процедура напоминания, а также последующие действия, определялись поставленными задачами.

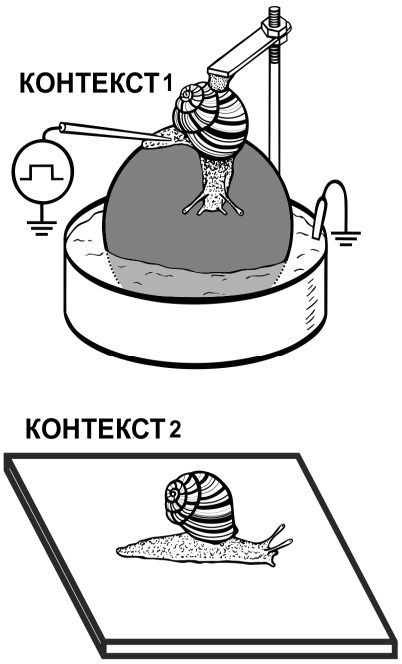


Рис. 2. Схематическое изображение контекста 1 и контекста 2, в которых проводилось обучение (только контекст 1) и тестирование (в обоих контекстах) реакции отдергивания щупальца.

В первом случае проведено две серии экспериментов по выяснению роли ПКМЗ. В первой из них животных разделили на три группы. После предварительного тестирования (Т), обучения и последующего тестирования (Т1), обученных животных разделили на три группы. На следующий день двум группам вводили ZIP (инъекция в полость тела, конечная расчетная концентрация вещества 2 мкМ), а еще одной – его неактивный аналог scrZIP (инъекция в полость тела, конечная расчетная концентрация вещества 2 мкМ). Одной из групп улиток с ZIP через 30 минут после введения вещества устроили напоминание: улиток сажали в экспериментальный контекст на 20 минут, но не наносили ударов электрическим током. Все группы животных протестировали повторно через 24 часа после введения веществ и напоминания (Т2). Во второй серии экспериментов всем трем группам улиток вводили ZIP и напоминали экспериментальную обстановку, но

введение ZIP проводили либо за 20 минут до напоминания, либо через 2 или 4 часа после него (рис. 3).

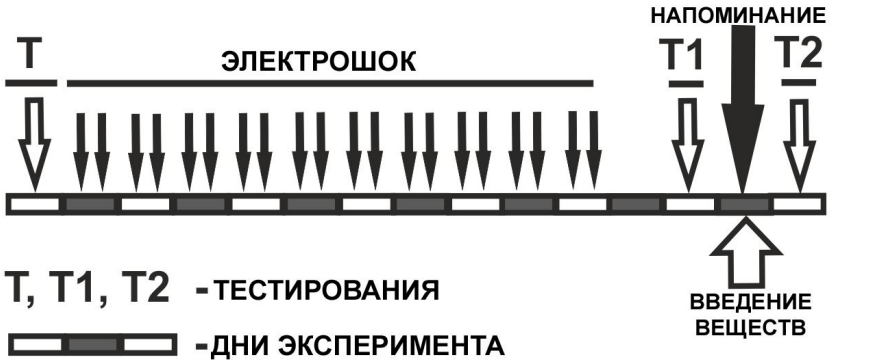


Рис. 3. Протокол проведения обстановочного обучения, светлые и темные сегменты означают дни эксперимента; Т – тестирование реакции сокращения щупальца в контексте 1 (шар) и контексте 2 (плоская поверхность - стекло).

Во втором случае для оценки возможной роли системы серотонинергических нейронов в процессе реконсолидации памяти у виноградной улитки, часть обученных животных (N=20) после Т1 получила инъекцию нейротоксина 5,7-ДОТ в дозе 20мг/кг веса улитки. Нейротоксин был растворен в растворе Рингера в объеме 0,1 мл и введен в гемоцель, кроме того, в раствор была добавлена 0,1% аскорбиновая кислота в качестве антиоксиданта. Через 48 часов после ведения нейротоксина первой части улиток с введенным ранее нейротоксином (N=5) вводили анизомицин (0,4 мг вещества на улитку), второй части (N=15) – раствор Рингера; группы 3 и 4 составляли животные без предварительного введения нейротоксина. Третьей группе вводили анизомицин (N=5), четвертой группе – раствор Рингера (N=10). Все вещества были растворены в растворе Рингера в объеме 0,2 мл и введены в гемоцель улиток. Всем четырем группам через тридцать минут после введения веществ устроили напоминание: улиток сажали в экспериментальный контекст на 20 минут, но не наносили ударов

электрическим током. После этого с интервалом в 24 часа проводили 3 тестирования (рис. 4).

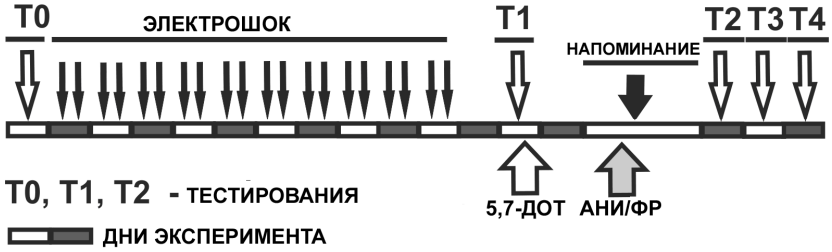


Рис. 4. Протокол проведения обстановочного обучения, светлые и темные сегменты означают дни эксперимента; Т0-4 – тестирование реакции сокращения щупальца в контексте 1 (шар) и контексте 2 (плоская поверхность - стекло).

В третьем случае данная экспериментальная модель была использована также для выяснения роли серотонинергических нейронов, однако, в данном случае вместо 5,7-ДОТ был использован неселективный антагонист серотониновых рецепторов второго типа 5-НТ2 миансерин. Через 24 часа после проведения Т1 животные были разделены на три группы. Улиткам первой группы вводили миансерин (инъекция в полость тела, конечная расчетная концентрация вещества 50 мкМ), улиткам второй группы – блокатор синтеза белка анизомицин (0,4 мг на улитку), улиткам группы 3 – раствор Рингера. Объемы вводимых веществ – 0,5 мл на улитку. После этого была проведена процедура напоминания об обстановке, в которой проводили обучение. Напоминание, как и в предыдущих экспериментах, заключалось в помещении улитки на 20 минут на шар без тестирования или предъявления стимулов. Все группы животных протестировали повторно 3 раза с интервалом 24 часа между тестированиями. Во всех поведенческих экспериментах применялся метод двойного слепого контроля (рис. 5).

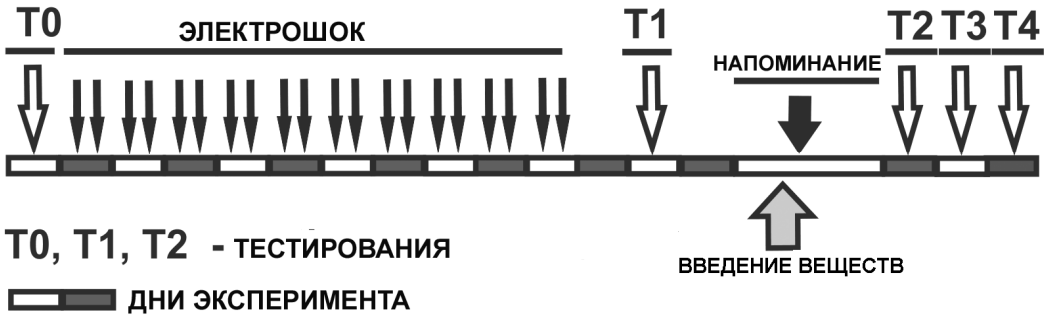


Рис. 5. Протокол проведения обстановочного обучения, светлые и темные сегменты означают дни эксперимента; Т0-4 – тестирование реакции сокращения щупальца в контексте 1 (шар) и контексте 2 (плоская поверхность - стекло).

2.2.2. Выработка условного рефлекса на отвергание пищи

Для выработки условного аверсивного рефлекса на запах моркови было использовано 25 улиток. Перед началом обучения улитки подвергались пищевой депривации в течение трех дней. На протяжении всего эксперимента животные не получали пищи. После предварительного тестирования (Т0), заключающегося в оценке латентного периода взятия пищи, проводилось обучение по следующей схеме. Улиток фиксировали за раковину так, чтобы они могли свободно ползать по шару, покрытому алюминиевой фольгой, плавающему в воде. В качестве условного стимула использовали морковный сок, в который обмакивали ватную палочку, расположенную на расстоянии 5 мм от нижних щупалец животного. Электрическая стимуляция (1-10мА, 0,5 с), использовавшаяся в качестве подкрепления, производилась с помощью макроэлектрода, прикладываемого к поверхности ноги животного, тогда как второй угольный электрод помещался в воду, в которой плавал шар. Подкрепление наносилось в момент начала поедания пищи. Подкрепление, выбранное нами, было средней интенсивности, улитка втягивала щупальца, переднюю часть тела и выделяла слизь. Регистрировали латентность захвата пищи от момента предъявления и число отказов от пищи. Пища была представлена животному на 120 сек, если улитка отказывалась брать морковь в течение этого периода,

считали это отказом. Сочетанные предъявления пищи и электрического тока проводились каждые 15-20 минут. Одна сессия включала 5 сочетаний. Обучение проводилось последовательно в течение 4 дней. Критерием обученности служил отказ от пищи в 4 последовательных пробах. Через 24 часа после обучающей серии проводилось тестирование выработанного рефлекса пищевой аверсии (Т1). При Т1 животные были помещены в экспериментальный контекст. Условный стимул предъявляли 3 раза с интервалом 5 минут. Латентный период консуматорной реакции оценивался в течение 120 сек. Если животное пыталось взять пищу, тестирование останавливали, животное не получало удар тока. После Т1, для исследования реакций улиток при сниженном уровне серотонина в нервной системе, части обученных животных (N=10) вводили в гемоцель нейротоксин 5,7-дигидрокситриптамин в дозе 20 мг/кг веса улитки в объеме 0,1 мл. Нейротоксин был растворен в растворе Рингера для холоднокровных, кроме того, в раствор была добавлена 0,1% аскорбиновая кислота в качестве антиоксиданта. Через 48 часов после ведения вещества улиткам с нейротоксином вводили раствор Рингера (n=10) – группа 1, второй группе (без нейротоксина) – раствор Ринегра (n=4), третьей группе (без нейротоксина) – анизомицин (N=3) (0,4 мг на улитку) и четвертой группе (без нейротоксина) – неселективный антагонист серотониновых рецепторов второго типа 5-НТ2 миансерин (n=8) (инъекция в полость тела, конечная расчетная концентрация вещества 50 мкМ). Объемы вводимых веществ – 0,5 мл на улитку. Всем четырем группам через тридцать минут после введения веществ устроили напоминание: улиток сажали в экспериментальный контекст, трижды предъявляли условный стимул на протяжении 20 минут. В случае если улитка пыталась взять морковь, ударов электрическим током не наносили. После этого с интервалом в 24 часа проводили 5 тестирований, группа 4 получала инъекцию миансерина ежедневно после каждого тестирования (рис. 6).

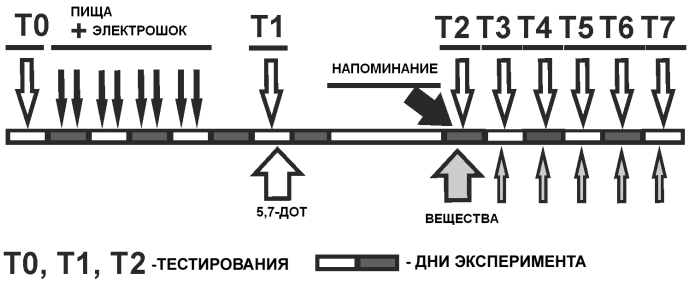


Рис. 6. Протокол проведения эксперимента по обучению пищевой аверсии, светлые и темные сегменты означают дни эксперимента; Т0-7 – тестирование реакции сокращения щупальца в контексте 1 (шар) и контексте 2 (плоская поверхность - стекло).

Продолжением данной серии экспериментов стало введение предшественника серотонина 5-гидрокситриптиофана (доза 10мг/кг, инъекция в полость тела, конечный объем 0,1 мл на 1 улитку) улиткам из группы 1 и 3. Тестирование проводилось через 1 час, 5 часов, 24 часа после введения 5-гидрокситриптофана. Во всех поведенческих экспериментах применялся метод двойного слепого контроля (рис. 7).

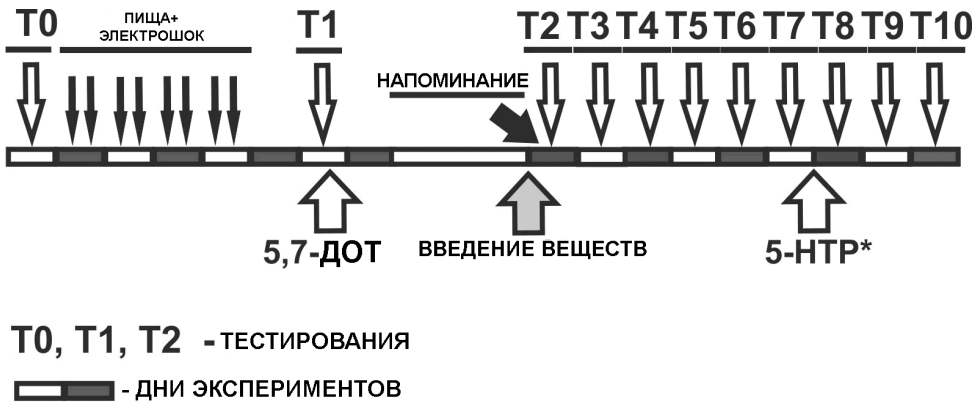


Рис. 7. Схема эксперимента, * - введение 5-гидрокситриптофана группе 1 и группе 3. Каждый блок представляет собой экспериментальный день.

2.3. Электрофизиологические методы иследования

2.3.1. Приготовление препарата изолированной центральной нервной системы виноградной улитки

Животное предварительно подвергалось холодному наркозу, для чего помещалось на лед на 15-20 минут. После этого животных наркотизировали изотоническим раствором $MgCl_2$, после чего разбивали раковину и закрепляли животное в восковой ванночке. Затем извлекали окологлоточное нервное кольцо, обрезая интестинальный, а также 2-й кожный нервы как можно дальше от ганглиев. Затем окологлоточное кольцо омывали раствором Рингера для холоднокровных, состав: 80 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 7 мМ $CaCl_2$, 5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ Trisma, pH 7.8 - и помещали в заполненную этим раствором препаровальную ванночку. При помощи пинцетов и ножниц удаляли толстые соединительнотканные оболочки ганглиев. Затем ЦНС обрабатывали протеазой XIV типа в течение 2-3 минут. После чего снимали тонкие оболочки. Активность нейронов регистрировали внутриклеточно по стандартной методике стеклянными микроэлектродами, заполненными 2 М раствором ацетата калия. Электроды имели сопротивление от 10 до 30 МОм.

В опытах регистрировали ВПСП гигантских командных нейронов Па2 и Па3, расположенных в левом и правом париетальном ганглиях. Для этого проводили стимуляцию интестинального и 2-го кожного нервов (рис. 8). Раздражение нервов осуществляли через полиэтиленовые засасывающие электроды. Регистрация длилась в течение 5-ти часов.

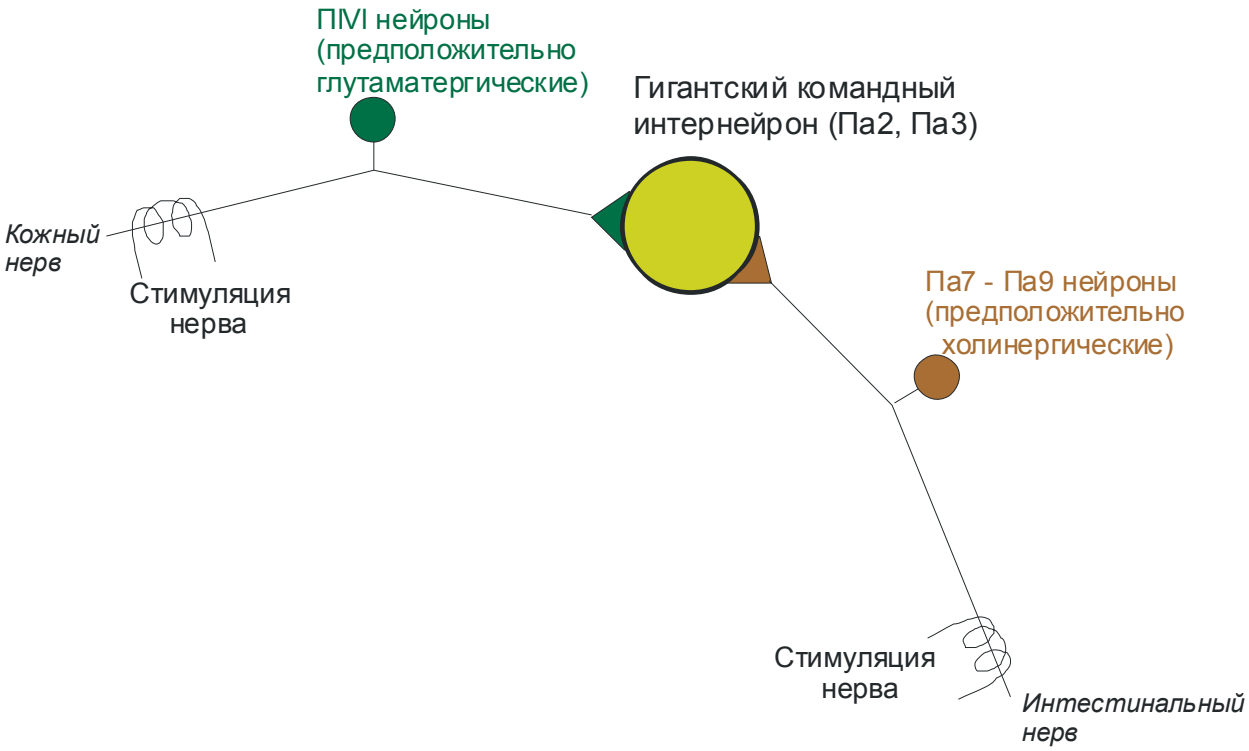


Рис. 8. Схематическое представление эксперимента.

Было проведено несколько серий опытов:

1. В первой серии экспериментов производилась тестирующая стимуляция кожного нерва, при этом потенциация вызывалась тетанизацией интестинального нерва с добавлением серотонина. Экспериментальный протокол включал в себя тестирование до тетанизации (5 стимулов), высокочастотную тетанизацию интестинального нерва совместно с аппликацией серотонина и посттетаническое тестирование. Тестируемый нерв (второй кожный нерв) и кондиционирующий нерв (интестинальный) раздражали регулярно раз в десять минут. Интенсивность раздражения была такой, чтобы вызвать ВПСП небольшой амплитуды (5-8 мВ). Тетанизационная серия состояла из пяти тетанизаций интестинального нерва с интервалом пять минут с частотой 10 Гц и добавления серотонина в концентрации 10-5 М на 2 минуты. 3 минуты осуществляли отмыв (рис. 9). Через 90 минут после последней тетанизации выключали проток и

апплицировали ZIP так, чтобы финальная концентрация составила 2*10-6М, либо scrZIP в той же финальной концентрации.

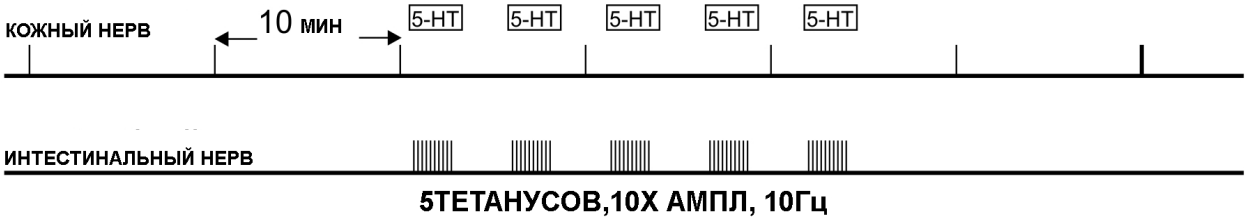


Рис. 9. Временное представление эксперимента.

2. Во второй серии экспериментов производилась тестирующая стимуляция интестинального нерва, при этом потенциация вызывалась тетанизацией того же интестинального нерва с добавлением серотонина. Экспериментальный протокол включал в себя тестирование до тетанизации (5 стимулов), высокочастотную тетанизацию интестинального нерва совместно с аппликацией серотонина и посттетаническое тестирование. Стимуляцию интестинального нерва проводили каждые десять минут. Интенсивность раздражения была такой, чтобы вызвать ВПСП небольшой амплитуды (5-8 мВ). Тетанизационная серия состояла из трех тетанизаций интестинального нерва с интервалом десять минут с частотой 10 Гц и добавления серотонина в концентрации 10-5 М на 5 минут. 5 минут осуществляли отмыв (рис. 10). Через 90 минут после последней тетанизации выключали проток и апплицировали ZIP так, чтобы финальная концентрация составила 2*10-6М, либо scrZIP в той же финальной концентрациии.

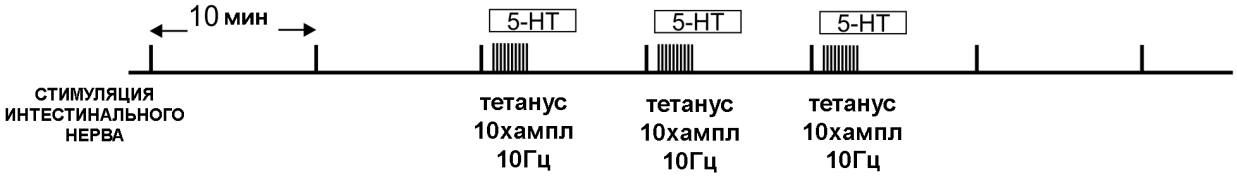


Рис. 10. Временное представление эксперимента.

3. В третьей серии экспериментов производилась тестирующая стимуляция кожного нерва, при этом потенциация вызывалась тетанизацией того же кожного нерва с добавлением серотонина. Экспериментальный протокол включал в себя тестирование до тетанизации (5 стимулов), высокочастотную тетанизацию второго кожного нерва совместно с аппликацией серотонина, и посттетаническое тестирование. Стимуляция кожного нерва проводили каждые десять минут. Интенсивность раздражения была такой, чтобы вызвать ВПСП небольшой амплитуды (5-8 мВ). Тетанизационная серия состояла из трех тетанизаций второго кожного нерва с интервалом десять минут с частотой 10 Гц и добавления серотонина в концентрации 10-5 М на 5 минут. 5 минут осуществляли отмыв (рис. 11). Через 90 минут после последней тетанизации выключали проток и апплицировали ZIP, так, чтобы финальная концентрация составила $2*10^{-6}$М, либо scrZIP с финальной концентрацией 10^{-6}М.

Рис. 11. Временное представление эксперимента.

4. В отдельной серии экспериментов проверялось влияние ZIP на амплитуду фонового (непотенциированного) ВПСП. Экспериментальный протокол включал в себя тестирование второго кожного и интестинального нервов раз в десять минут. Через 180 минут после начала записи в ванночку при помощи пипетки добавляли ZIP так, чтобы финальная концентрация составила $2*10^{-6}$М или scrZIP в той же финальной концентрации.

5. Также была проведена серия экспериментов, где в качестве блокатора использовался хелеритрин – блокатор PKC. В этой серии экспериментов производилась тестирующая стимуляция кожного нерва, при

этом потенциация вызывалась тетанизацией того же кожного нерва с добавлением серотонина. Экспериментальный протокол включал в себя тестирование до тетанизации (5 стимулов), высокочастотную тетанизацию второго кожного нерва совместно с аппликацией серотонина и посттетаническое тестирование. Стимуляция кожного нерва проводили каждые десять минут. Интенсивность раздражения была такой, чтобы вызвать ВПСП небольшой амплитуды (5-8 мВ). Тетанизационная серия состояла из трех тетанизаций второго кожного нерва с интервалом десять минут с частотой 10 Гц и добавления серотонина в концентрации 10-5 М на 5 минут. 5 минут осуществляли отмыв. Хелеритрин апплицировали в той же самой временной точке, что и ZIP в финальной концентрации 20 мкМ и 100 мкМ, а также на 30 минут раньше ZIP в концентрации 20 мкМ.

6. Для изучения влияния блокатора глутаматергической передачи на ВПСП, вызванные стимуляцией кожного нерва, была проведена следующая серия экспериментов. Экспериментальный протокол включал в себя стимуляцию второго кожного нерва 1 раз в десять минут. После трех стимуляций нерва непосредственно в экспериментальную чашку апплицировали CNQX в финальной концентрации 50*10-6М на 40 минут. После чего в течение 50 минут проводили отмывание препарата изолированной ЦНС.

Регистрация производилась при помощи АЦП Digidata1200 и программного обеспечения AxoScope 9.0. В этой же программе измеряли пиковые амплитуды ВПСП. Затем нормировали все величины относительно 5-го стимула до тетанизации. Вычисляли средние ± стандартные ошибки средних. Для статистической обработки результатов использовался критерий Манна-Уитни.

2.3.2. Приготовление препарата «искусственный синапс»

Как и в предыдущем случае для предотвращения операционного шока животных анестезировали изотоническим раствором MgCl2. После этого вырезалось окологлоточное кольцо ганглиев, с помощью пинцетов и ножниц отделяли париетальные ганглии. Грубые соединительнотканные оболочки снимали пинцетами, тонкие – также пинцетами, но после обработки протеазой XIV в течение 3 минут. После обработки протеазой препарат промывали большим количеством физиологического раствора. Далее, для приготовления препарата типа «искусственный синапс», большая часть ганглия вокруг премоторного интернейрона париетального ганглия оборонительного поведения удалялась механически, что позволило устранить синаптические входы на регистрируемый нейрон, и, таким образом, исследовать постсинаптический компонент пластичности. В экспериментах регистрировали командные нейроны Па2 и Па3. Для регистрации ответов командных нейронов использовали один электрод. Внутриклеточная стимуляция осуществлялась при введении второго электрода в сому нейрона (при введении двух микроэлектродов в сому нейрона проводили измерение входного сопротивления нейронов - методом пропускания фиксированного гиперполяризационнго тока длительностью 2с через один электрод и регистрации падения напряжения на мембране другим электродом).

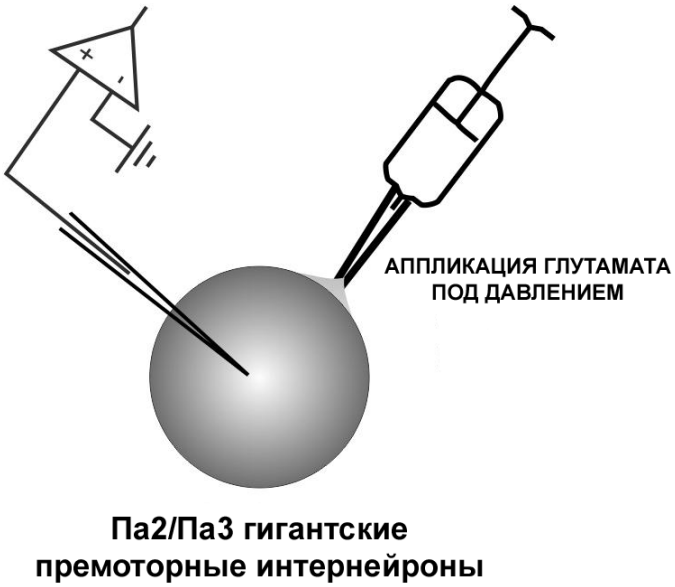


Рис. 12. Схематическое представление организации эксперимента на препарате «искусственный синапс».

Активность интернейронов регистрировали внутриклеточно по стандартной методике стеклянными микроэлектродами, заполненными 2М раствором CH_3COOK, имевшими сопротивление 10-20 МОм. Оцифровка сигнала производилась АЦП DIGIDATA 1200, соединённым с IBM-совместимым PC. Запись и просмотр сигнала вели с помощью программного обеспечения AxoScope 9.0, Axon Instruments.

Глутамат разводили в растворе Рингера (состав см. выше) с добавлением красителя Fast Green (0,15 %) до концентрации 2 ммоль/л. Инъекцию глутамата производили под давлением с помощью стеклянной пипетки с диаметром кончика примерно 1 мкм. Аппликацию глутамата на мембрану нейрона производили с помощью системы воздушной перфузии PV830 PicoPump, WPI; при давлении 70-80 p.s.i., время приложения этого давления (3-8 мс) подбирали таким образом, чтобы ответы в премоторном интернейроне в ответ на аппликацию на его поверхность глутамата имели изначально апмлитуду 3-10 мВ.

Нейроны, на которые инъецировали глутамат (рис. 12), непрерывно омывали раствором Рингера так, чтобы весь глутамат устранялся из ванночки протоком сразу после инъекции. Входную и выходную трубки протока устанавливали так, чтобы клетка находилась между ними.

На препарате данного типа было проведено два вида экспериментов. В первом из них после 15 минут стимуляции командного нейрона Глу с интервалом 1 мин, добавляли серотонин три раза в финальной концентрации 10-5М, каждый раз на 10 мин с последующим 10-минутным отмывом. В течение всего этого времени продолжали апплицировать глутамат. Через 90 мин после последней аппликации серотонина в ванночку с препаратом был добавлен ZIP/scrZIP в конечной концентрации 10-6 моль/л. Систему перфузии переключили в замкнутое состояние. При обработке результатов и построении графиков значения амплитуд 5-ти соседних Глу-ПСП усреднялись.

Вторая серия экспериментов представляла собой контрольную серию экспериментов без «фармакологической тетанизации», то есть без добавления серотонина. Однако ZIP и scrZIP были апплицированы в той же временной точке, что и в серии экспериментов с «фармакологической тетанизацией».

С аппликацией Глу на нейроны была проведена еще одна серия экспериментов, но в данном случае использовали препарат изолированной ЦНС, то есть синаптические входы на премоторные париетальные интернейроны оборонительного поведения были сохранены. Проводилась стимуляция второго кожного нерва каждые пять минут и регистрация ВПСП премоторных париетальных интернейронов. В интервалах между стимуляцией нерва на сому париетального интернейрона апплицировали глутамат с интервалом 1 минута. Параллельно с этим проводили регистрацию входного сопротивления нейронов (рис. 13).

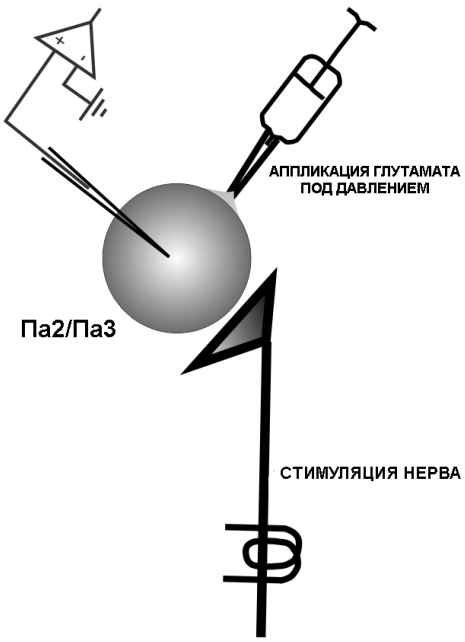


Рис. 13. Схематическое представление эксперимента с аппликацией глутамата на сому париетального нейрона и одновременной стимуляцией второго кожного нерва виноградной улитки.

2.3.3.1. Приготовление полуинтактного препарата

Животных анестезировали изотоническим раствором MgCl2. Полуинтактный препарат, использованный в наших экспериментах, представлял собой комплекс, состоящий из ЦНС и губы, расположенных в разных отделениях экспериментальной камеры. При приготовлении препарата все нервы церебрального ганглия сохраняли, колумелярную мышцу удаляли. При препаровке сохраняется голова улитки, с расположенными на ней щупальцами и губами. Губа и нервная система располагались в двух разных отделениях экспериментальной камеры, между отсеками экспериментальной камеры прокладывали слой вазелина (рис. 14). Между отсеками имелись две тонкие бороздки (щели), через которые пропускали нервы, именно эти бороздки заполняли слоем вазелина (вазелиновая перегородка). Губа находилась на дне одной из камер и была покрыты слоем физиологического раствора и влажной бумажкой (что позволяло избегать пересыхания чувствительного эпителия), за исключением момента аппликации сока, чтобы обеспеить контакт хеморецепторной области с раздражителем. Окологлоточное нервное кольцо, расположенное в соседнем отсеке, на протяжении всего эксперимента находилось под слоем физиологического раствора, включая моменты подачи морковного сока. Удаляли с помощью пинцетов наружные соединительнотканные оболочки над областью премоторных париетальных интернейронов, с церебральных ганглиев в области идентифицированных нейронов МтЦ1, а также в ростромедианной части педального ганлия, где располагались серотонинергические модулирующие нейроны, интересующий нас нейрон Пд4, отростки которого направлялись к премоторным париетальным интернейронам. После чего препарат обрабатывали протеазой тип XIV в течение 5 минут, и далее промывали большим количеством физиологического раствора. Во время ферментативной обработки губа уже находилась в отдельном отсеке экспериментальной камеры, что позволило избежать негативного действия протеазы на хеморецепторную область.

Тонкие оболочки удаляли с париетальных интернейронов, педальных нейронов. Тонкие оболочки в области над МтЦ1 не удаляли, чтобы не повредить нейроны. Состав физиологического раствора, который использовали во время приготовления препарата, полностью соответсвовал составу в предыдущих экспериментах. Постоянный проток отсутствовал, свежий физиологический раствор периодически добавляли с помощью пипетки.

2.3.3.2. Процедура обучения на полуинтактном препарате

В экспериментах на полуинтактных препаратах регистрировали активность гигантских серотонинсодержащих нейронов МтЦ1, лежащих на вентральной поверхности церебральных ганглиев, серотонинергических нейронов средних размеров в педальных ганглиях вблизи педальных коммисур на дорзомедиальной поверхности. Именно серотонинергический нейрон педальных ганглиев дает прямые входы на интернейроны оборонительного поведения, лежащие на дорсальной поверхности париетальных ганглиев, активность которых также регистрировалась в экспериментах. В экспериментах регистрировали ответы на предъявление пищи (морковный сок) или хинина на хеморецепторную поверхность головной части тела улиток. Оценивали ответы гигантских париетальных нейронов, запускающих закрытие дыхальца и сокращение мышц ноги, серотонинергических модулирующих нейронов, а также гигантских серотонинергических метацеребральных клеток, получающих хеморецепторную информацию от губы и участвующих в организации пищевого поведения. Ответ метацеребральных клеток использовался как контроль нормального функционального состояния нервной сеистемы, реагирующей на хемостимуляцию. В этой серии опытов аппликация капли морковного сока на губу полуинтактного препарата служила условным стимулом, аппликация одной капли хлористого хинина в концентрации 10-2 моль/л в ту же область служила подкреплением. После предъявления

стимулов губа тщательно отмывалась раствором Рингера. Интервал между сочестаниями составлял 10 минут. Сочетания наносились 10 раз. Тестирование изменений ответов нейронов проводилось через 90 минут после последнего сочетания (наненсения подкрепляющего стимула). Экспериментальный протокол включал в себя трехкратное тестирование до обучения, за которым следовало 10 сочетаний морковного сока с хинином (на губу наносилась капля сока, затем практически сразу же капля хинина), тестирование изменений ответов нейронов проводилось через 90 минут после последнего сочетания (наненсения подкрепляющего стимула).

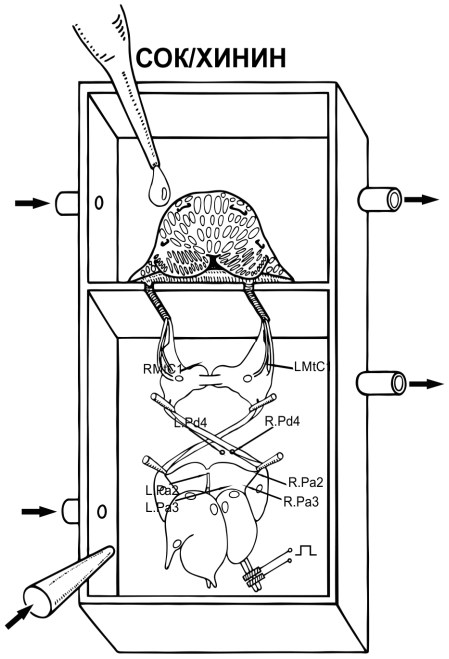


Рис. 14. Схема препарата ЦНС-губа. Относительный размер ЦНС увеличен, показана дорсальная сторона подглоточного комплекса и вентральная сторона церебральных ганглиев. Экспериментальная камера состояла из двух отсеков. Капля сока или хинина, апплицированная на губу, тщательно отмывалась при помощи физиологического раствора.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Выяснение роли протеинкиназы мю зета в поддержании долговременной фасилитации ВПСП различной эргичности премоторных интернейронов оборонительного поведения на препарате изолированной ЦНС виноградной улитки

Во всех экспериментах проводили стимуляцию второго кожного и интестинального нервов, что приводило к генерации суммарного ВПСП в премоторных париетальных интернейронах несколько разной формы. Примеры ответов представлены на рис. 15.

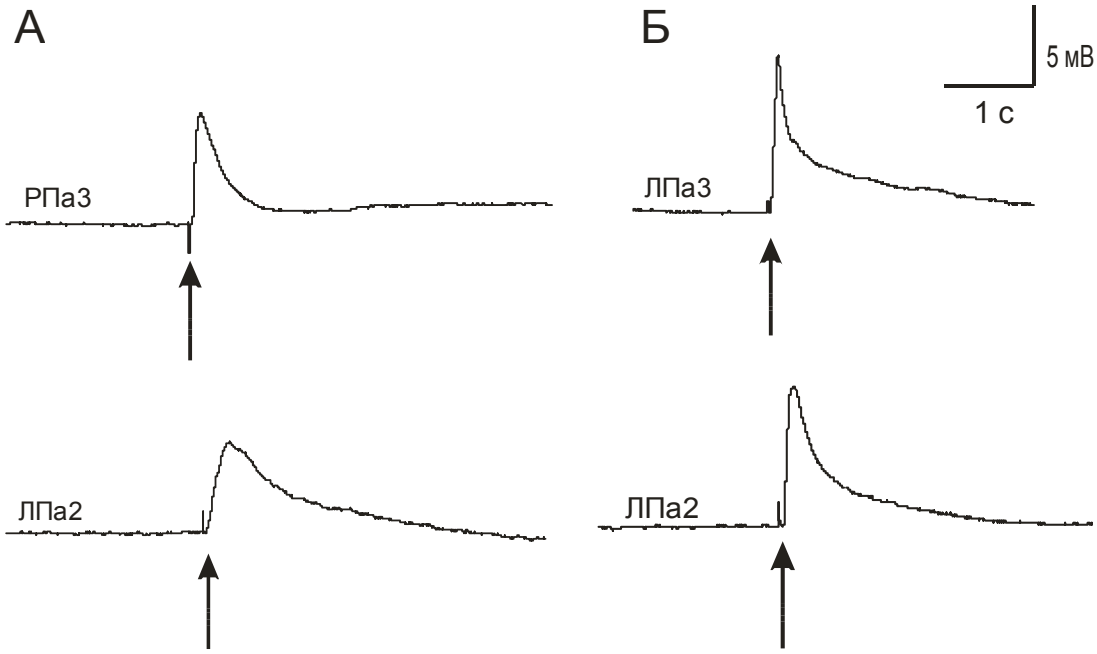


Рис. 15. ВПСП в премоторных интернейронах, вызванные стимуляцией интестинального (А) и кожного (Б) нервов. Стрелками показаны моменты стимуляции нервов. Калибровка для нейронов – 5 мВ, 1 с.

Для выработки потенциации в наших экспериментах мы использовали тетанизацию интестинального или кожного нервов с амплитудой стимула, увеличенной в 10 раз по сравнению с амплитудой, используемой для тестирующей стимуляции. Тетанизация с такими параметрами, как правило, вызывала генерацию потенциалов действия в премоторных нейронах (рис. 16).

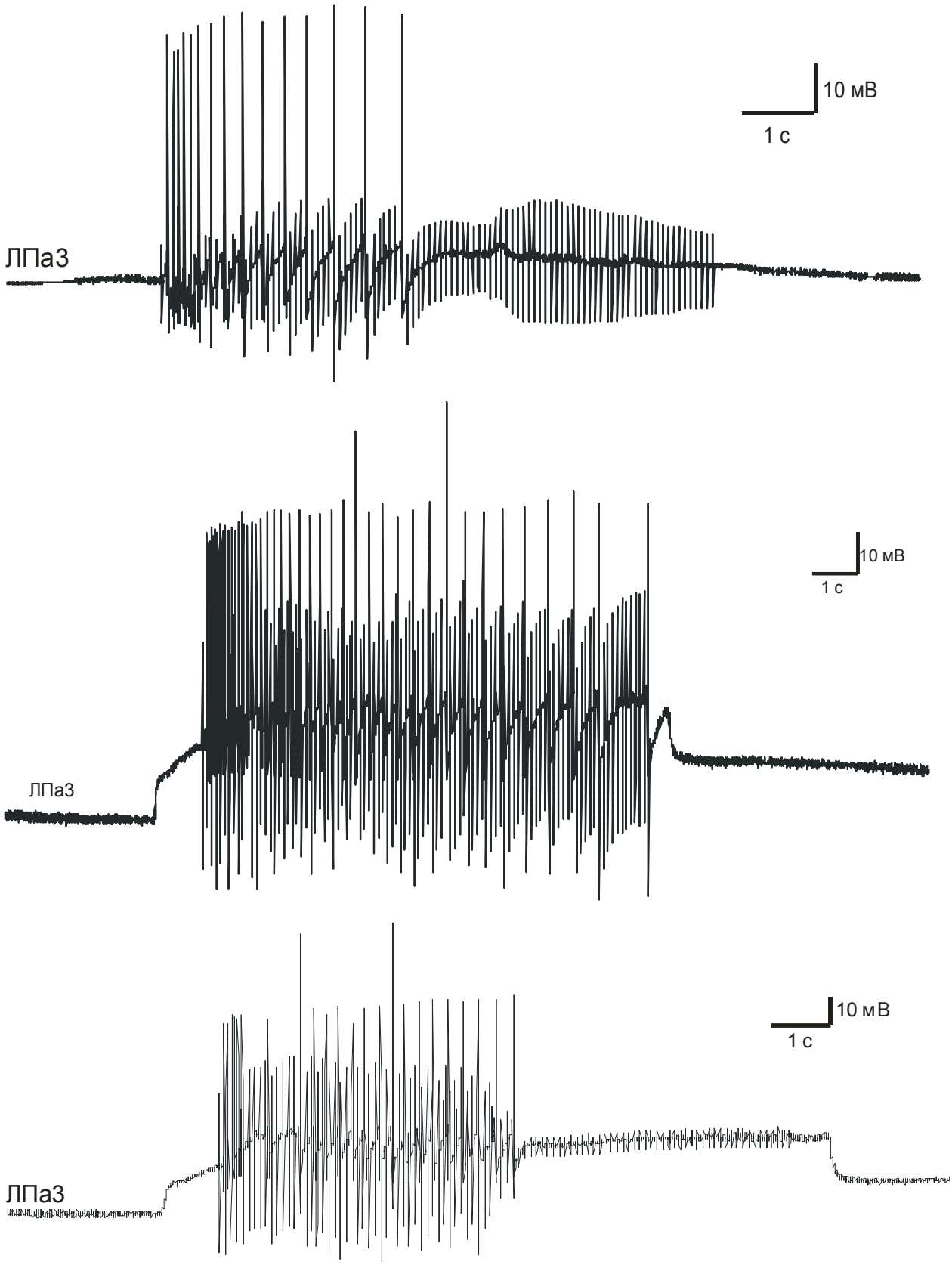

10 мВ
1 с
ЛПа3
10 мВ
1 с
ЛПа3
10 мВ
1 с
ЛПа3

Рис. 16. Ответы премоторных интернейронов на высокочастотную тетанизацию интестинального (кожного) нервов. Калибровка для нейронов – 10 мВ, 1 с.

3.1.1. Эффект ZIP на потенциацию ответов премоторных париетальных интернейронов, вызванную тетанизацией интестинального нерва при тестирующей стимуляции второго кожного нерва

Суммарные данные по всем опытам (рис. 17) показывают, что до тетанизации интестинального нерва тестирование вызывало небольшое уменьшение амплитуды ВПСП (в среднем на 20% к 50-й минуте эксперимента), которое продолжалось при последующем тестировании в контрольных нейронах (рис. 17, треугольники). После тетанизации интестинального нерва и аппликации серотонина (рис. 17, темные и светлые кружки) средние амплитуды ВПСП в нейронах возрастали (рис. 18). Однако в части экспериментов тетанизация интестинального нерва с добавлением серотонина приводила к выраженной депрессии синаптических ответов (рис. 19). Данная реакция синаптических ответов на тетанизацию интестинального нерва и серотонин наблюдалась в летний период (конец июля – начало августа). Далее, через 90 минут после последней тетанизации в зависимости от типа эксперимента в ванночку с изолированным препаратом ЦНС апплицировали ZIP (рис. 17, темные кружки) или scrZIP (рис. 17, светлые кружки). Действие ZIP начиналось через 10-20 минут и являлось долговременным. После его аппликации и до конца эксперимента у нейронов (n=5) наблюдалось уменьшение амплитуды потенциированных ВПСП (рис. 18) и приближение ее к контрольному уровню. Различия между контрольной серией экспериментов и экспериментов с добавлением ZIP статистически не достоверны начиная со 140 минуты и до конца эксперимента. Тогда как в экспериментах со scrZIP (n=11) амплитуда ВПСП нейронов оставалась на прежнем потенциированном уровне. Отличия величины амплитуды ВПСП премоторных интернейронов при действии ZIP от величины амплитуды

ВПСП в экспериментах с аппликацией scrZIP достоверны со 170 до 220 минуты эксперимента ($p < 0,05$).

Таким образом, ZIP нарушает длительную гетеросинаптическую потенциацию глутаматергических ВПСП в командных интернейронах, вызванных стимуляцией кожного нерва.

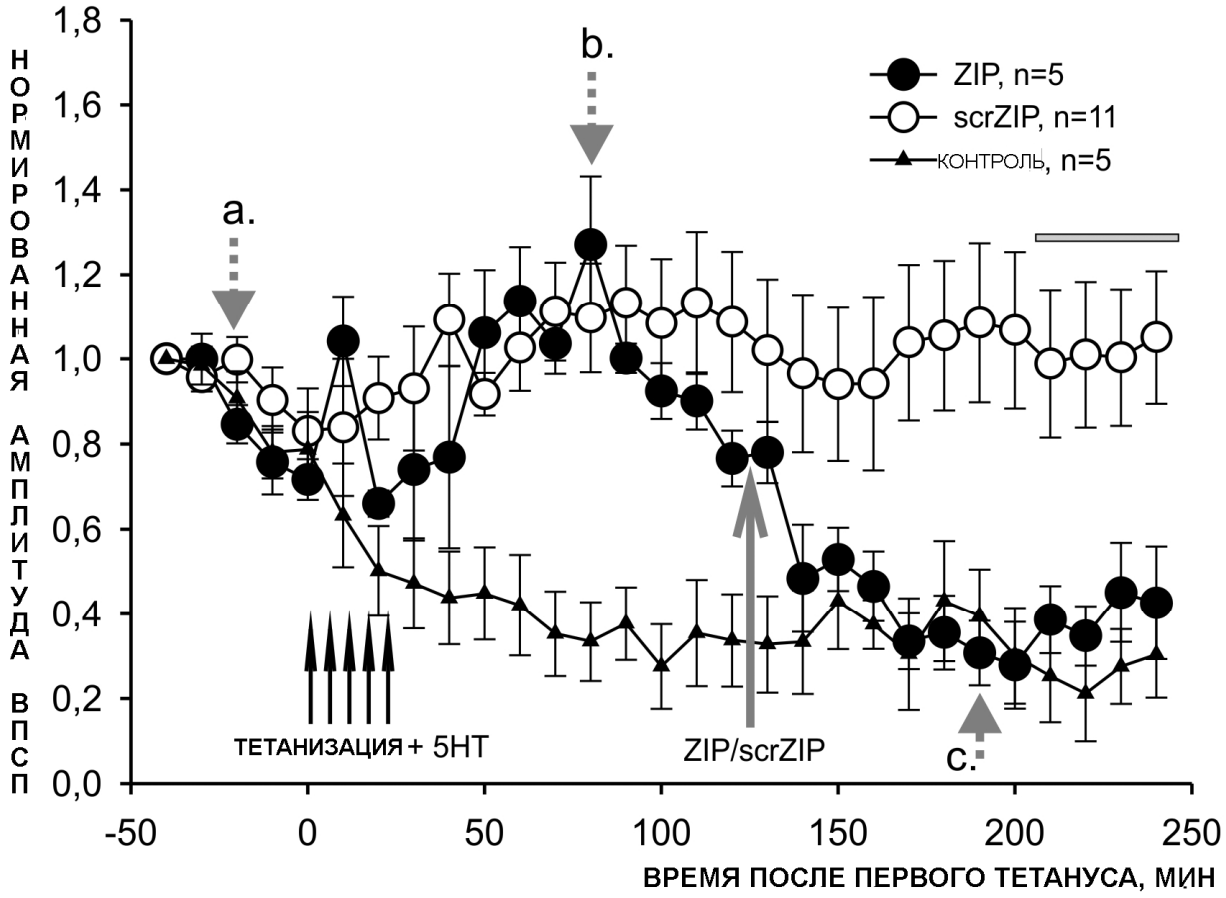


Рис. 17. Влияние ZIP и scrZIP на долговременную потенциацию в премоторных париетальных интернейронах, вызванную тетанизацией интестинального нерва при тестирующей стимуляции второго кожного нерва. Треугольники – контрольные эксперименты без тетанизации (n=5). Светлые круги – эксперименты с тетанизацией интестинального нерва и аппликацией scrZIP (n=11). Темные круги – эксперименты с тетанизацией интестинального нерва и аппликацией ZIP (n=5). Вертикальные отрезки – стандартная ошибка среднего. Аппликация ZIP/scrZIP на долговременную потенциацию отмечена стрелкой.

Рис. 18. a. ВПСП премоторного париетального интернейрона до тетанизации нерва. b. Увеличение амплитуды ВПСП премоторного париетального интернейрона в ответ на высокочастотную стимуляцию нерва. c. Снижение амплитуды ВПСП премоторного париетального интернейрона при аппликации ZIP.

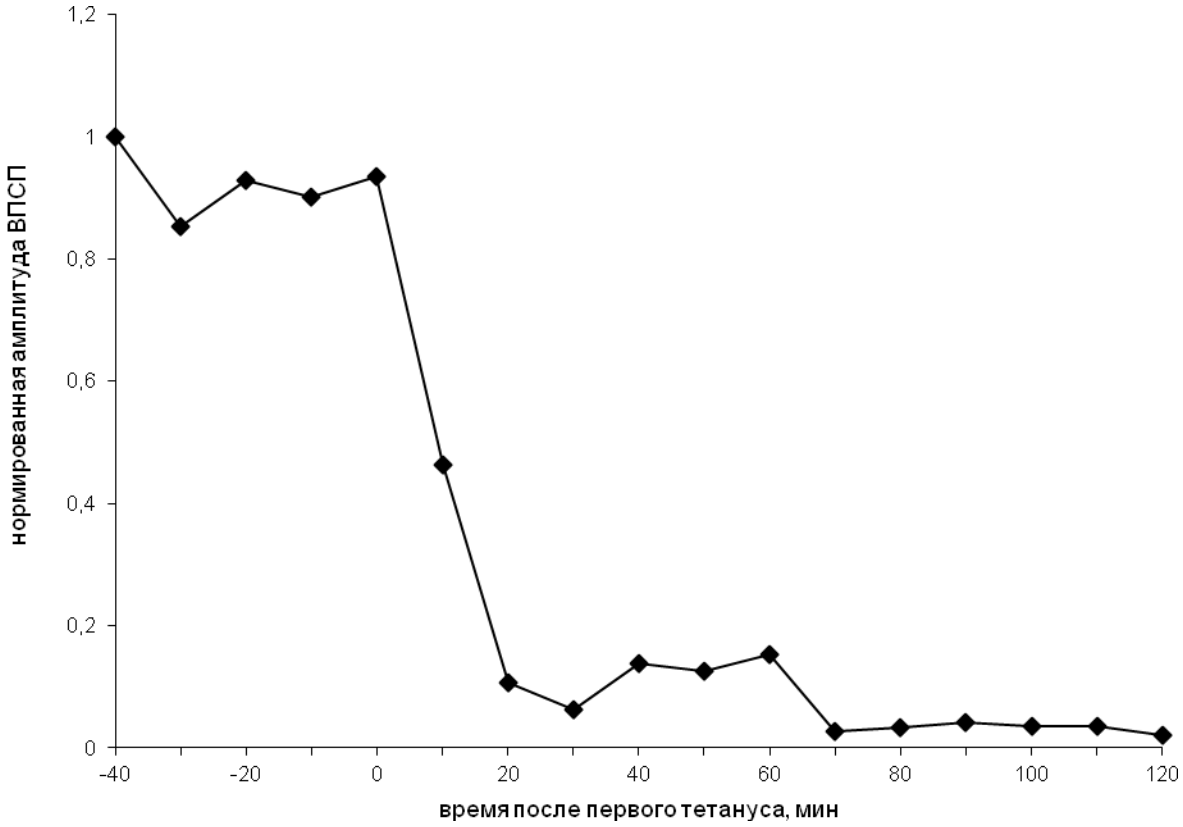


Рис. 19. Депрессия синаптических ответов при стимуляции второго кожного нерва, вызванная высокочастотной тетанизацией (в момент 0) интестинального нерва совместно с аппликацией серотонина.

3.1.2. Эффект ZIP на потенциацию ответов премоторных париетальных интернейронов, вызванную тетанизацией интестинального нерва при тестирующей стимуляции интестинального нерва

В ходе эксперимента в контрольной серии амплитуда ВПСП премоторных интернейронов, полученная в результате стимуляции интестинального нерва, уменьшилась приблизительно на 60% к концу эксперимента относительно начальной амплитуды. Потенциация в данной серии экспериментов была получена при тетанизации интестинального нерва совместно с аппликацией серотонина. Тетанизация интестинального нерва совместно с аппликацией серотонина приводила к значительному увеличению амплитуды ВПСП по тетанизированному входу. Через 90 минут после последней тетанизации в ванночку с изолированной ЦНС добавляли ZIP или scrZIP. Долговременное увеличение амплитуд ВПСП командных интернейронов, вызванное тетанической стимуляцией интестинального нерва и серотонином, сохранялось при аппликации scrZIP (n=5). В то время как ZIP (n=11) приводил к исчезновению длительной потенциации холинергических ВПСП премоторных интернейронов, полученных при стимуляции интестинального нерва (рис. 20). Ответы командных нейронов приближались к контрольному уровню; разница амплитуд ВПСП в контрольной серии и серии с аппликацией ZIP статистически не достоверна на 180, 200, 210, 230 и 240-й минутах эксперимента. Различия между экспериментами с аппликацией ZIP и scrZIP статистически достоверны, начиная со 150 минуты и до конца эксперимента ($p < 0,05$).

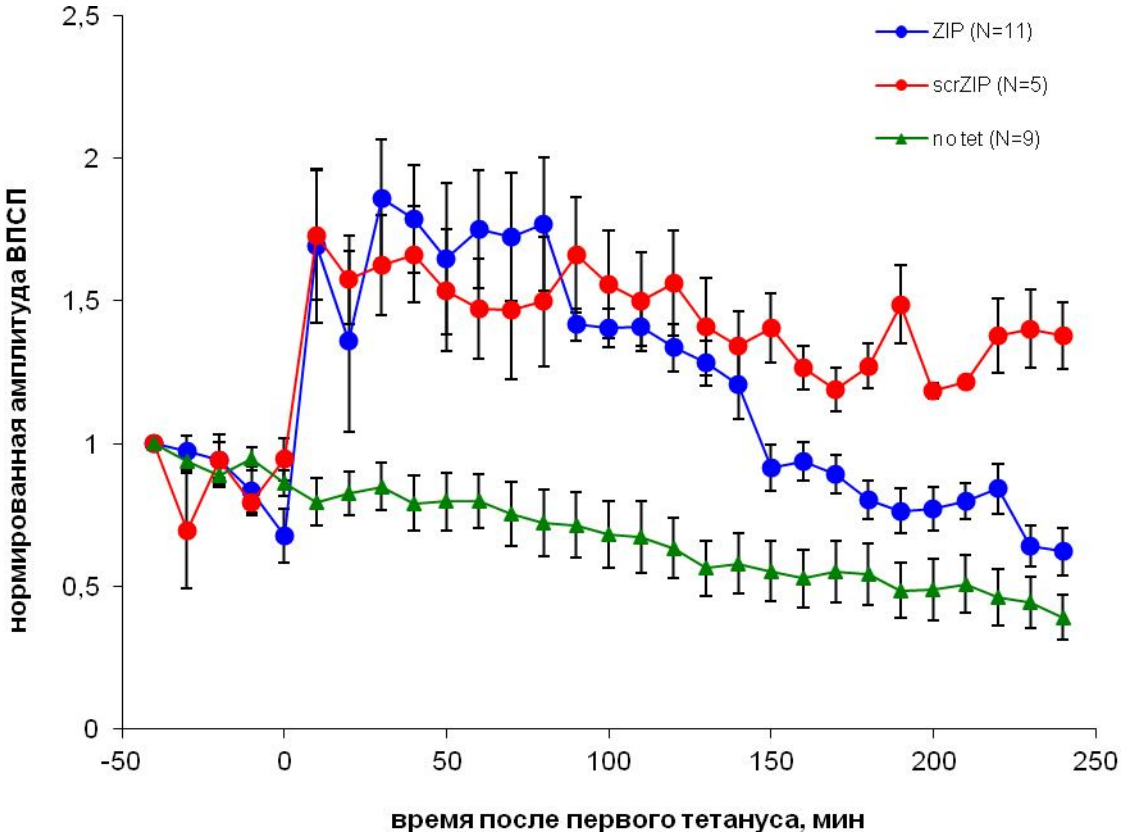


Рис. 20. Влияние ZIP и scrZIP на долговременную потенциацию в премоторных париетальных интернейронах, вызванную тетанизацией интестинального нерва, при тестирующей стимуляции интестинального нерва. Красные кружки – контрольные эксперименты без тетанизации (n=9). Синие кружки – эксперименты с тетанизацией интестинального нерва и аппликацией scrZIP (n=5). Зеленые треугольники – эксперименты с тетанизацией интестинального нерва и аппликацией ZIP (n=11). Вертикальные отрезки – стандартная ошибка среднего. Аппликация ZIP/scrZIP на долговременную потенциацию отмечена стрелкой.

3.1.3. Эффект ZIP на потенциацию ответов премоторных париетальных интернейронов, вызванную тетанизацией кожного нерва при тестирующей стимуляции второго кожного нерва

Во всех экспериментах первые 40 минут до тетанизации второго кожного нерва и добавления серотонина в ванночку с изолированной ЦНС наблюдалось постепенное снижение амплитуды ВПСП премоторных интернейронов. Так, средняя величина амплитуды ВПСП, как в контрольной серии опытов, так и в опытах с потенциацией составила примерно 80% к 50-й минуте эксперимента от исходной амплитуды ВПСП при первой стимуляции.

Аппликация ZIP в экспериментах (n=12) вызывала постепенное снижение амплитуды ВПСП в потенциированных нейронах до контрольного уровня. На 230-й минуте не наблюдается статистической разницы между контрольным экспериментом и экспериментом с ZIP. Аппликация scrZIP (n=13) не оказывала влияния на потенциацию (рис. 21, 22). Различия в величине амплитуды экспериментов с аппликацией ZIP и scrZIP статистически достоверны на 210, 230, 240-й минутах эксперимента.

Таким образом, ZIP нарушает длительную потенциацию глутаматергических ВПСП, полученных при стимуляции второго кожного нерва.

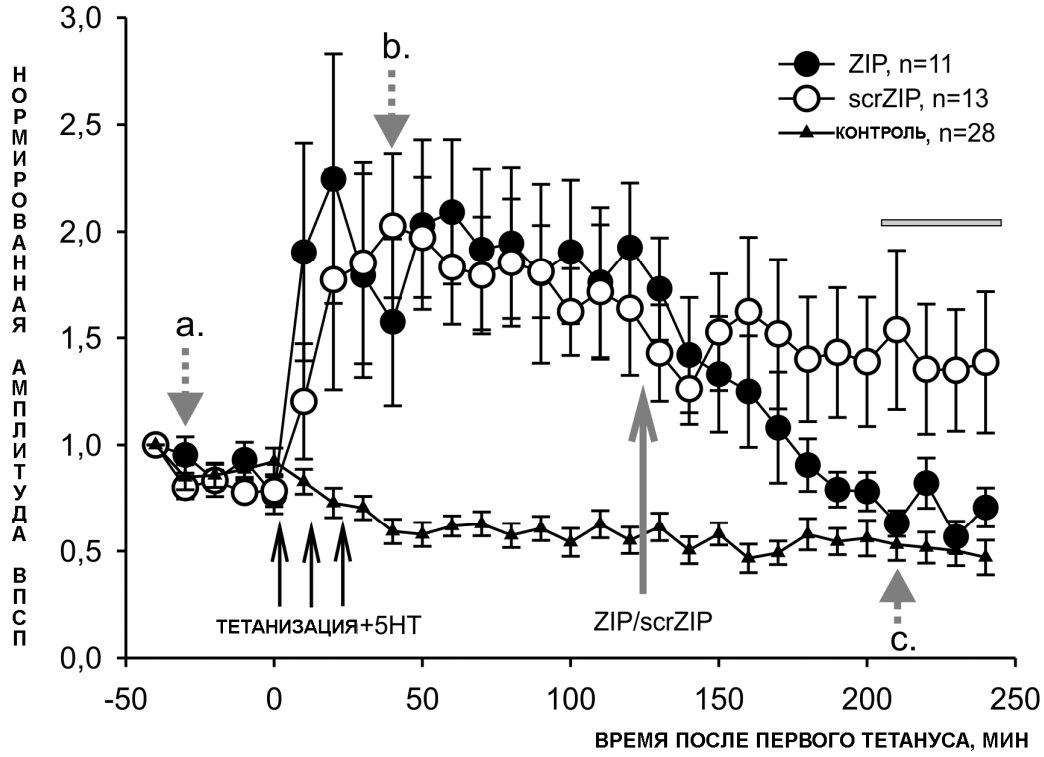


Рис. 21. Влияние ZIP и scrZIP на долговременную потенциацию в премоторных париетальных нейронах, вызванную тетанизацией кожного нерва, при тестирующей стимуляции второго кожного нерва. Треугольнички – контрольные эксперименты без тетанизации (n=25). Светлые круги – эксперименты с тетанизацией второго кожного нерва и аппликацией scrZIP (n=13). Темные круги – эксперименты с тетанизацией второго

кожного нерва и аппликацией ZIP (n=12). Вертикальные отрезки – стандартная ошибка среднего. Аппликация ZIP/scrZIP на долговременную потенциацию отмечена стрелкой.

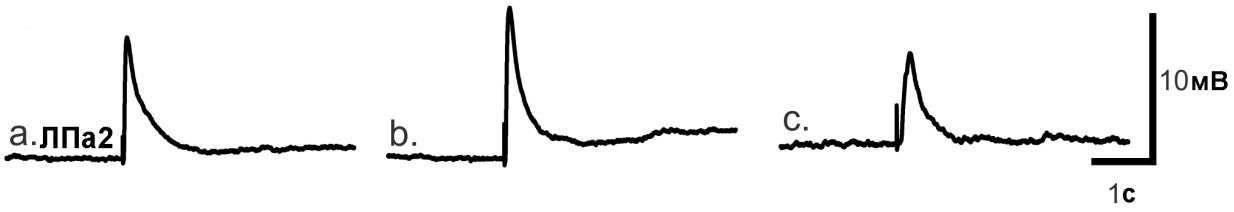


Рис. 22. a. ВПСП премоторного париетального интернейрона до тетанизации нерва. b. Увеличение амплитуды ВПСП премоторного париетального интернейрона в ответ на высокочастотную стимуляцию нерва. c. Снижение амплитуды ВПСП премоторного париетального интернейрона при аппликации ZIP.

3.1.4. Влияние ZIP на глутаматергическую связь в непотенциированных нейронах

Итак, как показали проведенные эксперименты, аппликация ZIP приводила к снижению амплитуды потенциированного ВПСП до непотенциированных значений. Однако, вполне возможно, что ZIP снижает амплитуду любого ВПСП, вне зависимости от того, был он потенцирован или нет. Для проверки этого предположения мы поставили следующую серию экспериментов. Тестирующая стимуляция второго кожного нерва проводилась каждые десять минут. Длительные интервалы между стимулами применялись с целью уменьшения депрессии исследуемой связи. Регулярная стимуляция без тетанизации проводилась в течение 5 часов и приводила к уменьшению синаптических ответов на 40-60 % к концу опытов относительно начальных амплитуд. Аппликация ZIP не вызывала изменения амплитуды ВПСП премоторных париетальных интернейронов. Достоверных отличий между кривой привыкания с добавлением ZIP и аппликации scrZIP не обнаружено (рис. 23).

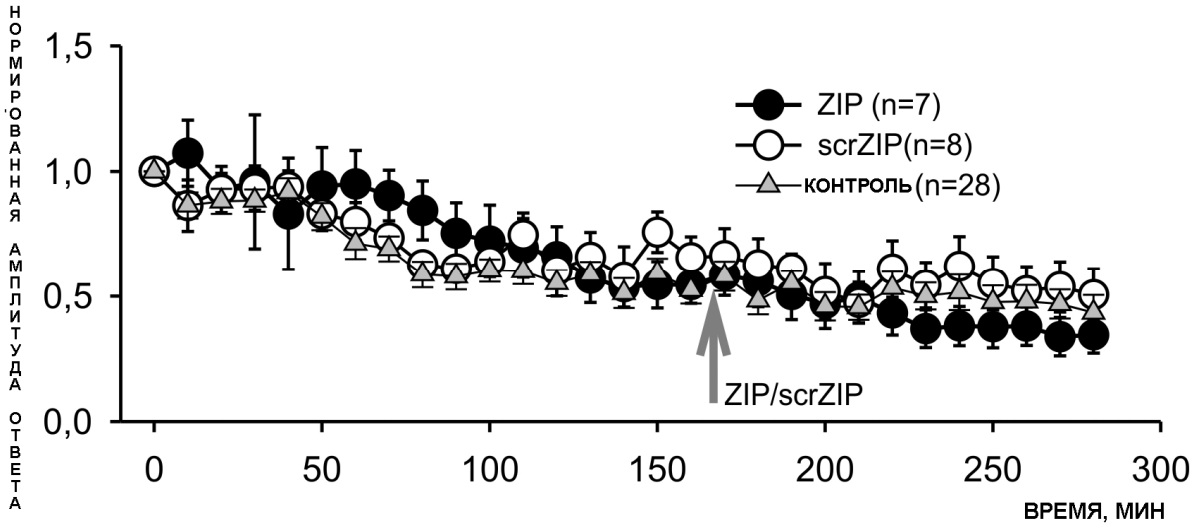


Рис. 23. Изменение амплитуды ВПСП (кривая привыкания) в премоторных париетальных интернейронах при стимуляции второго кожного нерва с аппликацией ZIP (n=7) и scrZIP (n=8). Исходная амплитуда ВПСП при первой стимуляции во всех экспериментах принята за единицу.

3.1.5. Влияние ZIP на холинергическую связь в непотенциированных нейронах

В данной серии экспериментов стимуляцию интестинального нерва проводили с 10-минутным межстимульным интервалом. 10-минутные интервалы между тестирующими стимулами были выбраны для того, чтобы уменьшить степень привыкания ВПСП в премоторных интернейронах. В течение 5 часов эксперимента амплитуда ВПСП уменьшалась на 60-80% к концу опытов относительно исходной амплитуды. Аппликация ZIP осуществлялась в том же временном периоде, что и в опытах с потенциацией. Действие ZIP на непотенциированные премоторные интернейроны виноградной улитки не приводило к уменьшению амплитуды ВПСП (рис. 24), тогда как в потенциированных нейронах ZIP приводил к снятию эффекта потенциации и уменьшению амплитуды ВПСП до контрольного уровня (рис. 20). Достоверных отличий между кривой привыкания с добавлением ZIP и аппликации scrZIP не обнаружено.

Таким образом, ZIP не влияет на амплитуду ВПСП непотенциированных нейронов в ответ на стимуляцию обоих нервов (второго кожного и интестинального).

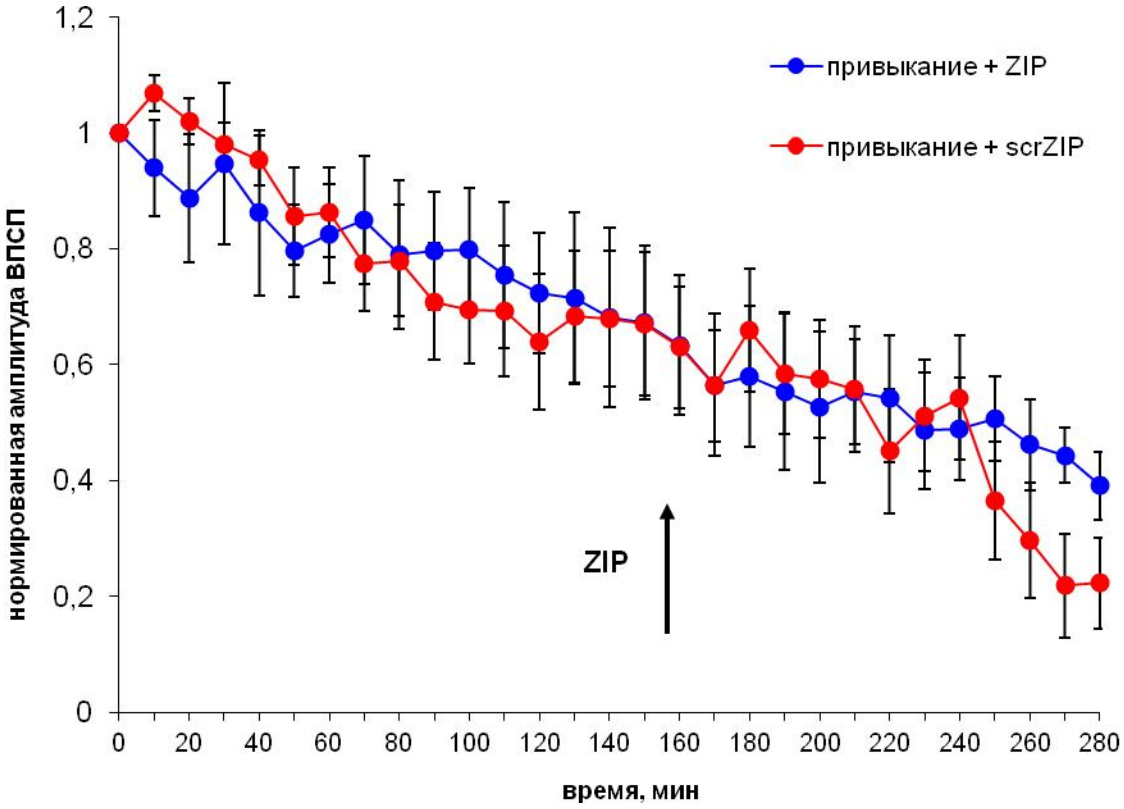
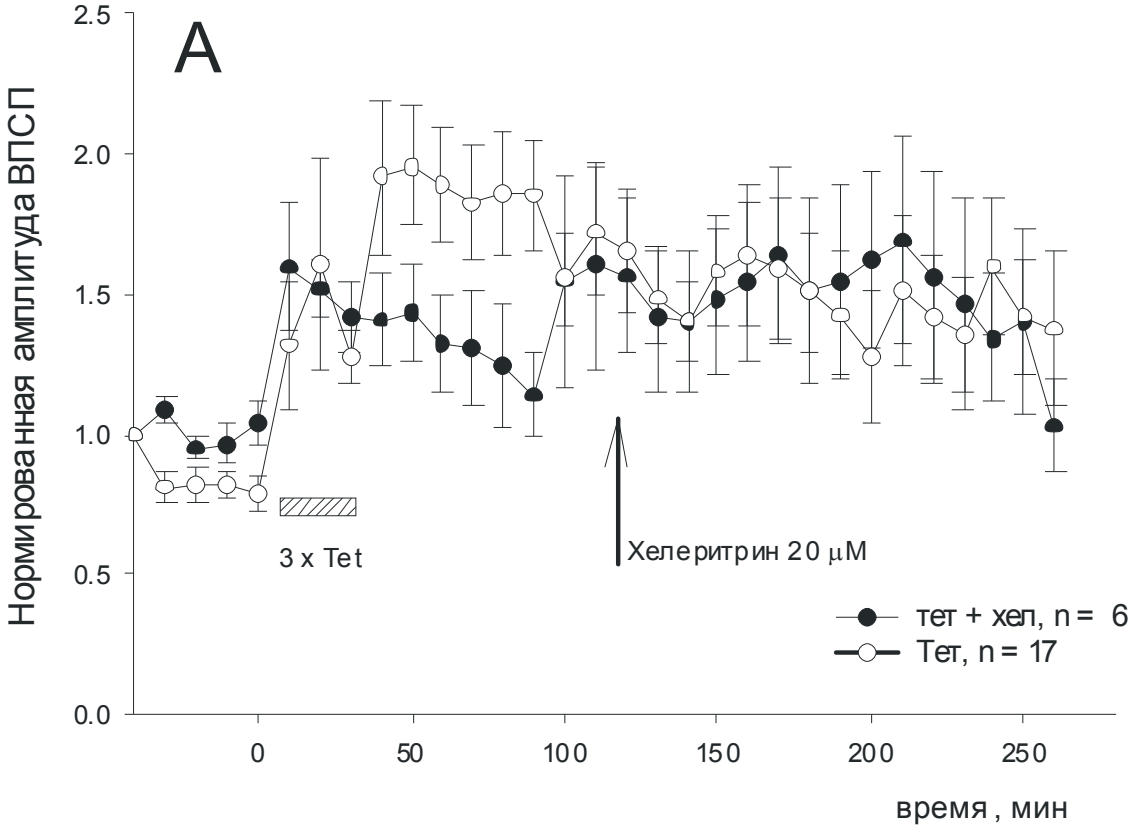


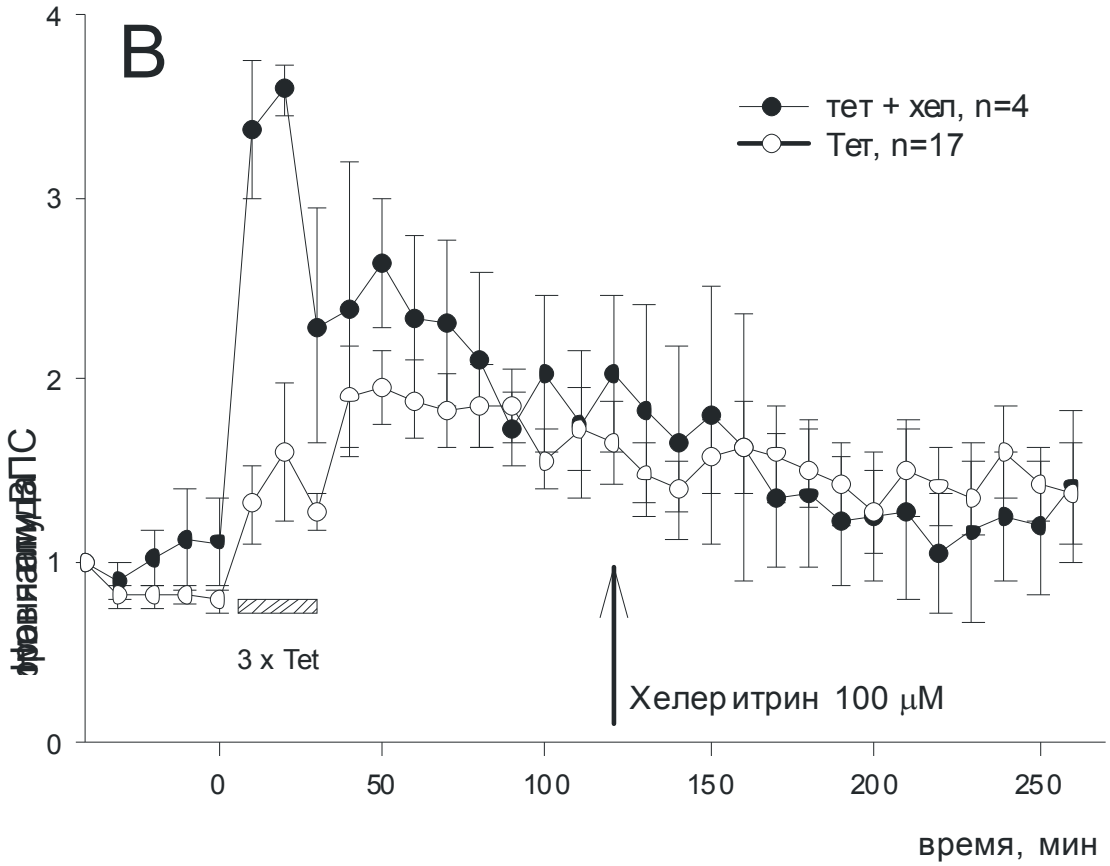
Рис. 24. Изменение амплитуды ВПСП (кривая привыкания) в премоторных париетальных интернейронах при стимуляции интестинального нерва с аппликацией ZIP (n=9) и scrZIP (n=9). Исходная амплитуда ВПСП при первой стимуляции во всех экспериментах принята за единицу.

3.1.6. Влияние хелеритрина на амплитуду потенциированных ВПСП премоторных париетальных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки

Поскольку ПКМЗ является изоформой РКС, мы решили проверить влияние хелеритрин хлорида (неспецифического блокатора РКС) на долговременную потенциацию ВПСП премоторных париетальных

интернейронов виноградной улитки. Во всех экспериментах тетанизация второго кожного нерва одновременно с добавлением серотонина приводила к выраженной долговременной потенциации ВПСП премоторных интернейронов. Аппликация в ванночку с препаратом ЦНС специфического ингибитора РКС хелеритрин хлорида вне зависимости от его концентрации (20 мкМ и 100 мкМ) и временной точки нанесения (через 90 минут после последней тетанизации как и ZIP – A/B; через 60 минут после последней тетанизации – C) не вызывала снижение амплитуды исследованных ВПСП (рис. 25). Достоверных отличий между кривой привыкания с добавлением хелеритрина и контрольной кривой привыкания не обнаружено.




B
тет + хел, n=4
Тет, n=17
3 x Tet
Хелеритрин 100 μM
время, мин

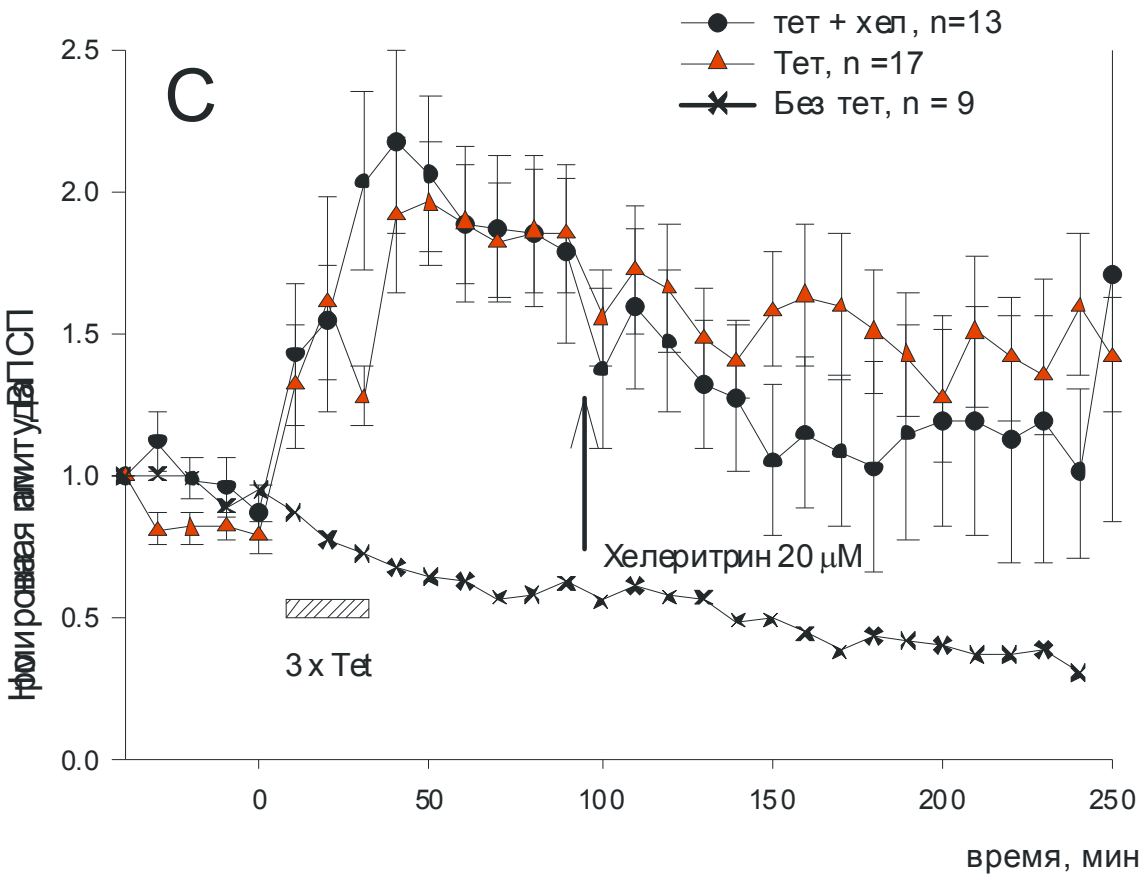

C
тет + хел, n=13
Тет, n =17
Без тет, n = 9
Хелеритрин 20 μM
3 x Tet
время, мин

Рис. 25. Влияние хелеритрина на долговременную потенциацию в премоторных париетальных интернейронах при стимуляции второго кожного нерва. А. Аппликация хелеритрина в концентрации 20 мкМ в той же временной точке, что и ZIP. В. Аппликация хелеритрина в концентрации 100мкМ в той же временной точке, что и ZIP. С. Аппликация хелеритрина в концентрации 20 мкМ на 30 минут раньше ZIP.

3.1.7. Влияние CNQX на глутаматергическую связь

Ранее было показано, что CNQX – блокатор глутаматных рецепторов не-NMDA типа у позвоночных животных, большей частью блокирует ВПСП в премоторных интернейронах оборонительного поведения виноградной улитки, возникающие при внутриклеточной стимуляции механосенсорных нейронов PIVI, моносинаптически связанных с премоторными интернейронами посредством нейротрансмиттера глутамата (рис. 8) (Bravarenko et al., 2003). PIVI нейроны посылают свои отростки во второй кожный нерв (Malyshev, Balaban, 2002) и, по всей видимости, активация именно этих клеток при стимуляции кожного нерва приводит к генерации комплексного ВПСП в премоторных нейронах. Для того чтобы убедиться, что ВПСП в премоторных интернейронах, возникающий в результате стимуляции кожного нерва, так же как и моносинаптический ВПСП от PIVI клеток является глутаматергическим, мы исследовали влияние CNQX на глутаматергические ВПСП в премоторных париетальных интернейронах, возникающие при стимуляции второго кожного нерва. Второй кожный нерв стимулировали раз в десять минут. Во всех экспериментах (n=7 с CNQX и n=8 контроль) за время первых трех стимулов (до аппликации CNQX) наблюдалось небольшое снижение амплитуды ВПСП. Аппликация блокатора приводила к значительному снижению амплитуды исследуемых ВПСП. Амплитуда ВПСП через 40 минут после введения CNQX составила 37,2% от контрольного уровня амплитуды ВПСП премоторных интернейронов. После начала отмыва амплитуда ВПСП постепенно возрастала и составила 88,8% от контрольного уровня по окончанию отмыва (рис. 26).

Таким образом, аппликация CNQX – блокатора глутаматных рецепторов не-NMDA типа – приводит к достоверному снижению амплитуды ВПСП в премоторных интернейронах, возникающих при стимуляции второго кожного нерва, так же как и при моносинаптической стимуляции.

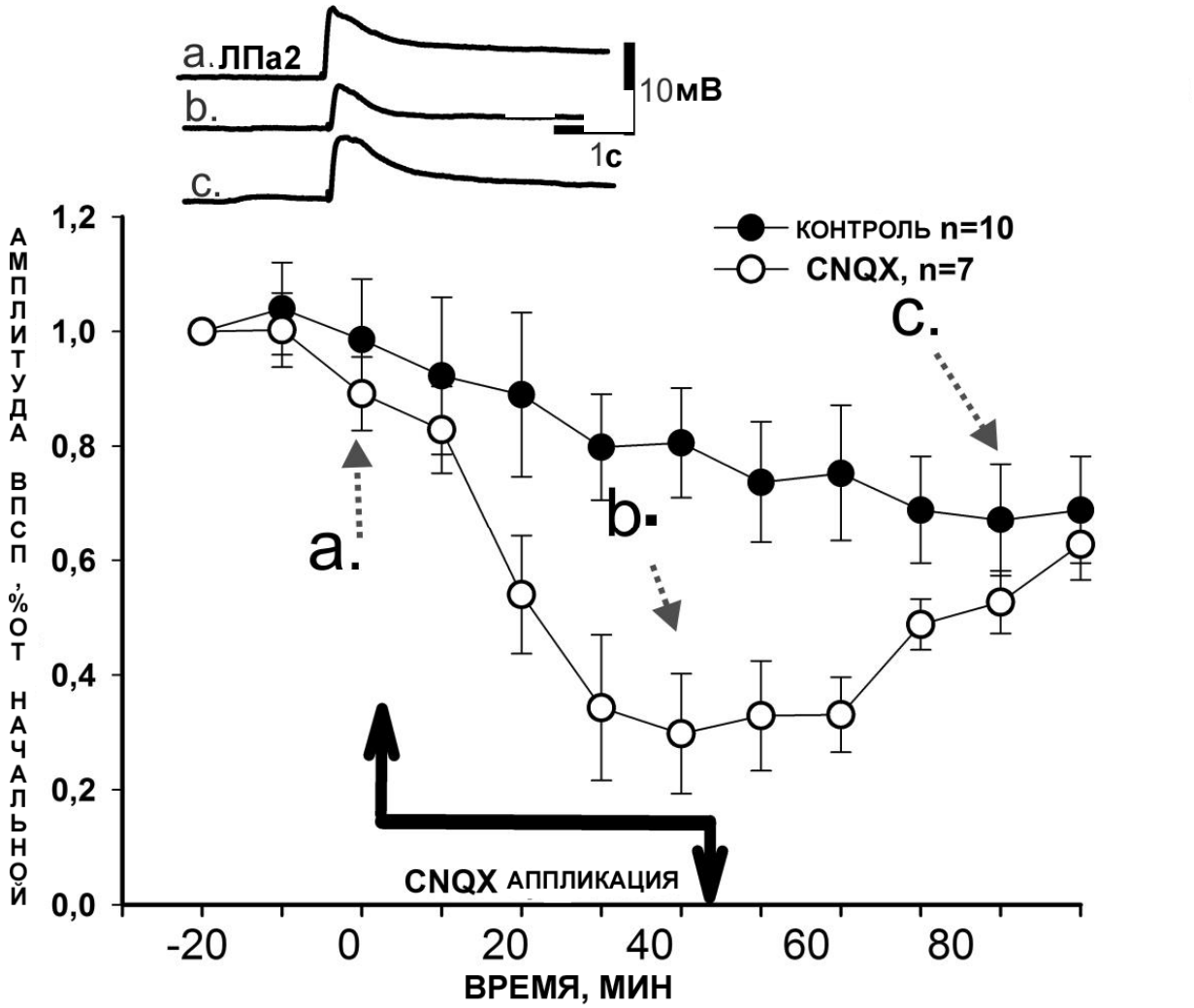


Рис. 26. Влияние CNQX на глутаматергические ВПСП в премоторных интернейронах, полученные в результате стимуляции второго кожного нерва. Эксперименты с аппликацией CNQX – n=7. Контрольные эксперименты – n=8. Момент аппликации CNQX указан стрелкой. Временной интервал, в течение которого в ванночке присутствовал CNQX, показан линией.

3.2. Выяснение роли протеинкиназы мю зета в поддержании долговременной фасилитации глутаматных ПСП премоторных интернейронов на модели «искусственный синапс»

Для того чтобы изучить участие постсинаптических механизмов в поддержании долговременной фасилитации независимо от пресинаптических механизмов, мы разработали эксперименты, в которых медиатор аппликировался непосредственно на сому премоторного париетального нейрона оборонительного поведения. Ранее было показано, что применение серотонина в экспериментах на препарате «искусственный синапс» ведет к долговременной фасилитации Глу-ПСП (Balaban et al., 2004).

3.2.1. Эффект ZIP/scrZIP на потенциированные ответы премоторного интернейрона оборонительного поведения

В контрольных экспериментах регулярная аппликация глутамата 1 раз в минуту вызывала медленное привыкание Глу-ПСП. 3-х кратная аппликация серотонина в другой серии экспериментов приводила к достоверному долговременному увеличению амплитуды Глу-ПСП (рис. 27). Применение ZIP/scrZIP спустя 90 минут после последней аппликации серотонина вызывало резкое кратковременное падение амплитуды Глу-ПСП с последующим постепенным восстановлением. Таким образом, к финалу записей (временное окно 170-185 минут) в экспериментах с аппликакцией ZIP/scrZIP, Глу-ПСП не отличались достоверно от фасилитированных Глу-ПСП в экспериментах без ZIP ($p<0,001$, критерий Манна-Уитни).

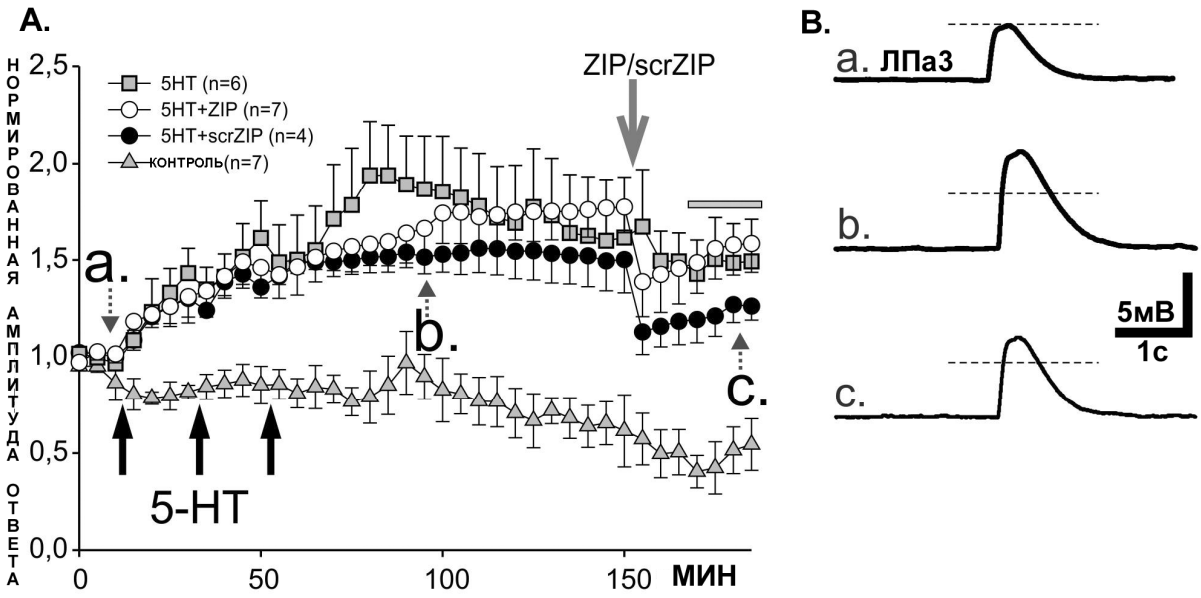


Рис. 27. А. Эффекты ZIP/scrZIP на Глу-ПСП, вызыванные аппликацией глутамата на сому нейрона, в экспериментах на модели «искусственный синапс». Усредненные данные по 4 сериям экспериментов демонстрируют отсутсвие влияния ZIP на долговременную фасилитацию Глу-ПСП. Каждая точка на графике представляет собой усредненое значение за 5 минутный интервал. Горизонтальной серой полоской обозначена область для статистической обработки данных. В. Примеры ответов в разных временных точках.

3.2.2. Эффект ZIP/scrZIP на непотенциированные ответы премоторного интернейрона оборонительного поведения

Мы провели дополнительную серию экспериментов без аппликации серотонина, направленную на определение влияния ZIP/scrZIP на непотенциированные Глу-ПСП. Было обнаружено, что ZIP и его контрольный пептид scrZIP вызывают достоверное кратковременное падение амплитуды ответов (с 98.8+/-1.6% до 70.2+/-2.1% для ZIP и с 98.4+/-2.2% до 68.6+/-2.9% для scrZIP) (рис. 28). Через 20 минут после аппликации ZIP/scrZIP амплитуда Глу-ПСП восстановилась до 96.1+/-2.7% для ZIP и 92.8+/-2.5% для scrZIP.

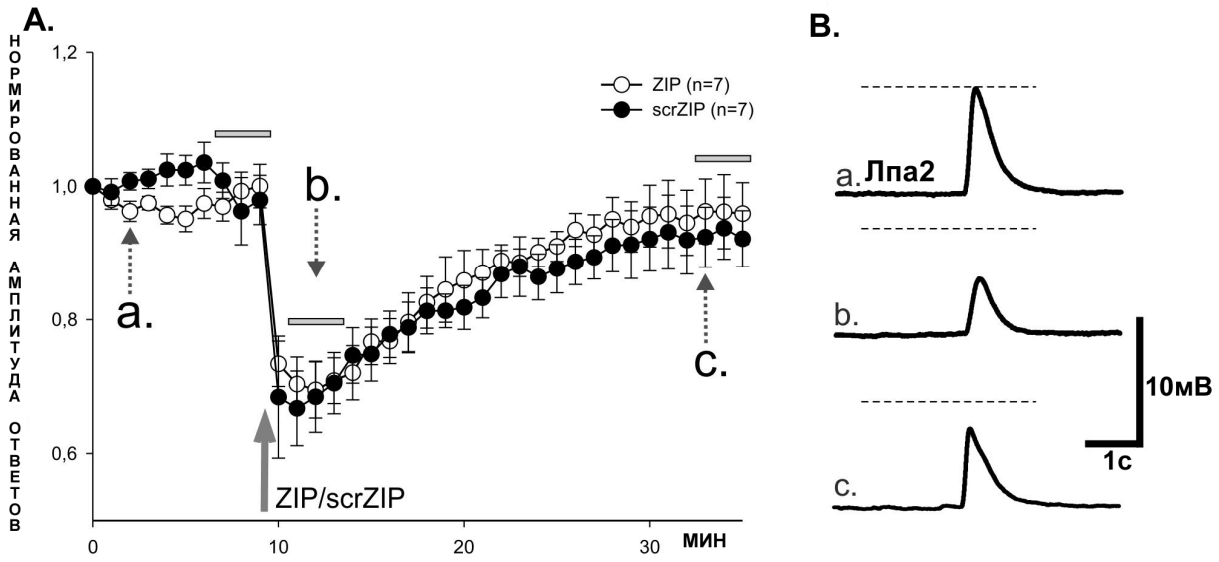


Рис. 28. А. Влияние ZIP/scrZIP на амплитуду Глу-ПСП на препарате «искусственный синапс». Горизонтальной серой полоской показана область, ответы из которой были использованы для статистического анализа. В. Примеры ответов в разных временных точках.

3.2.3. Эффект ZIP/scrZIP при одновременной регистрации ВПСП при стимуляции нерва и ответов на аппликацию глутамата

Как описывалось в методике, препарат «искусственный синапс», на котором проводилась данная серия экспериментов, представлял собой ростральную часть париетальных ганглиев, содержащую премоторные интернейроны оборонительного поведения. Возможно, обнаруженный кратковременный эффект ZIP/scrZIP (резкое уменьшение амплитуды с последующим постепенным восстановлением) - не что иное, как артефакт данного способа препаровки. Для того чтобы разрешить сложившуюся ситуацию, в специальной серии экспериментов на препарате изолированной ЦНС (см. разделы с гомо- и гетеросинаптической фасилитацией) проводилась одновременная стимуляция кожного нерва, а в промежутках - аппликация глутамата с использованием давления на сому того нейрона, чья активность регистрировалась; параллельно мы измеряли входное сопротивление интересующей нас клетки (рис. 13; рис. 29; рис. 30). Согласно

результатам, ZIP и scrZIP вызывают кратковременное падение амплитуды Глу-ПСП, не оказывая влияние на ВПСП, вызванные стимуляцией второго кожного нерва, и величину входного сопротивления (рис. 29; рис. 30). Поэтому эффекты ZIP/scrZIP на Глу-ПСП следует определять как неспецифические, проявляющиеся только в данной модели.

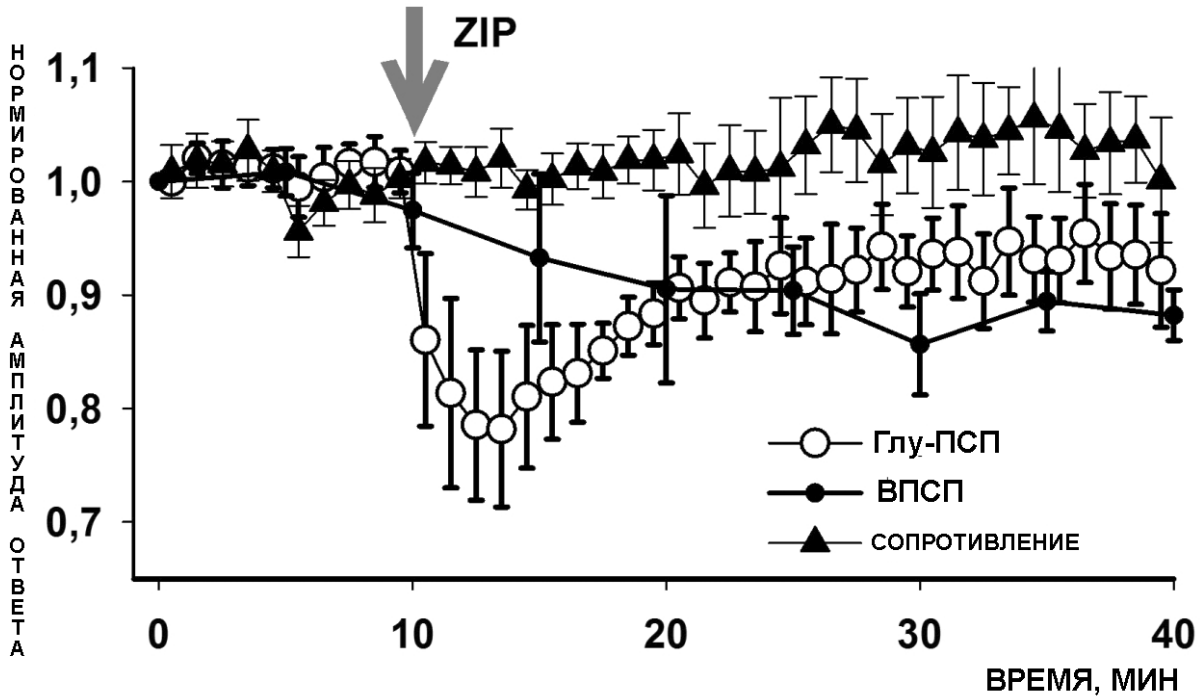


Рис. 29. Эффект ZIP на Глу-ПСП в условиях сохранности пресинаптических входов.

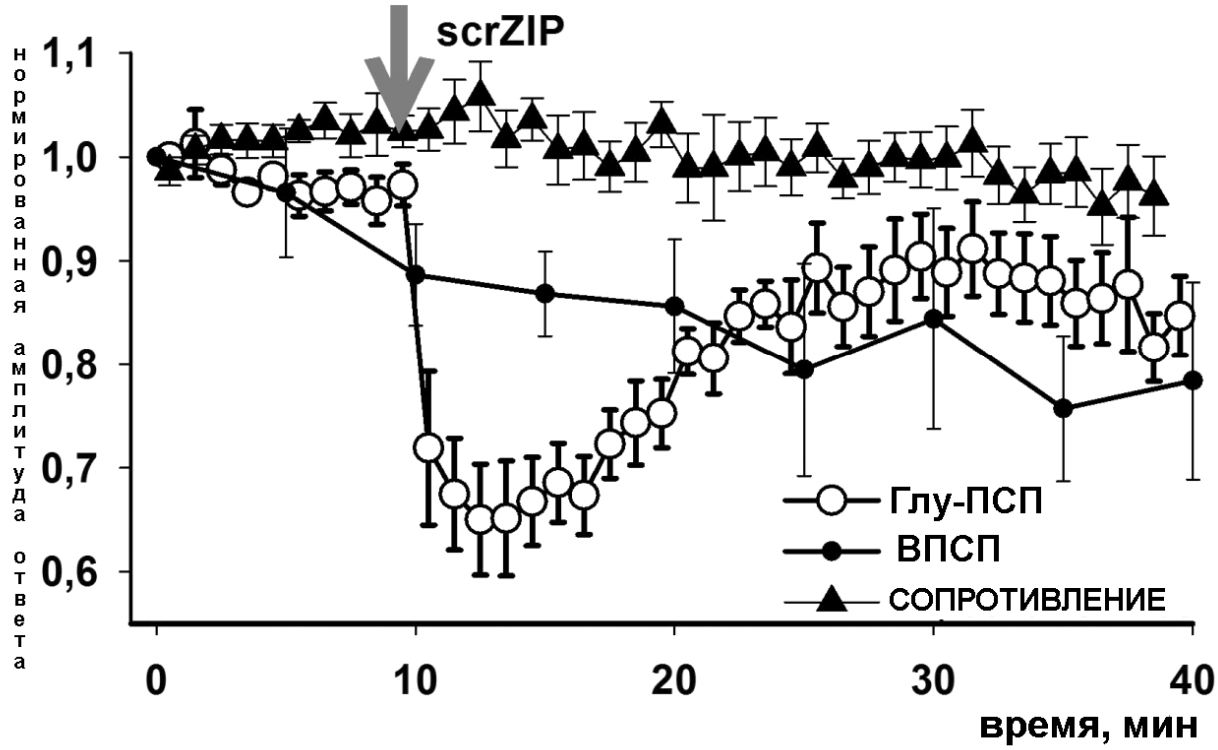


Рис. 30. Эффект scrZIP на Глу-ПСП в условиях сохранности пресинаптических входов.

3.3. Определение активности идентифицированных нейронов нервной системы виноградной улитки после выработки условного рефлекса пищевой аверсии на полуинтактном препарате

3.3.1. Изменения активности исследуемых идентифицированных нейронов после выработки условного рефлекса пищевой аверсии

В данном исследовании мы решили использовать преимущества полуинтактного препарата «ЦНС-губа», на котором можно записывать активность функционально идентифицированных нейронов, принадлежащих к трем разным функциональным классам, до, в течение и после процедуры обучения. Для записи были выбраны метацеребральные гигантские серотонинергические нейроны (МтЦ1, левый или правый), которые, как известно, участвуют в пищевом поведении и получают информацию обо всех типах химической стимуляции. Данные клетки также служили как сигнал, что

полуинтактный препарат нормально реагирует на условный стимул (капля сока) и на безусловный подкрепляющий стимул (капля хинина). Параллельно велась запись электрической активности одного из четырех гигантских париетальных премоторных интернейронов оборонительного поведения, реагирующего на опасные стимулы и меняющего свои ответы на пищу после проведения процедуры аверсивного условного обучения (Balaban et al., 1987). Третий тип исследованных клеток – нейромодуляторные гигантские серотонинергические клетки Пд4 (Balaban et al., 1987; Zakharov et al., 1995). Внутриклеточная активация данных клеток может рассматриваться как подкрепление для выработки ассоциативных изменений, проявляющихся в увеличении амплитуды синаптических ответов париетальных гигантских интернейронов, ответственных за отдергивание щупалец (Balaban et al., 2001). В каждом эксперименте мы записывали ответы левого или правого педального нейрона 4 для отслеживания изменения его активности.

Пример опыта, в котором капля морковного сока предъявлялась совместно с каплей хинина, показан на рис. 31. У нейронов, вовлеченных в реализацию оборонительного поведения (премоторные париетальные интернейроны (верхняя кривая), педальные серотонинергические нейроны (нижняя кривая)) отсутствовала реакция на сок. Церебральные нейроны, участвующие в пищевом поведении (средняя кривая), отвечали на каплю сока увеличением частоты потенциалов действия, что свидетельствовало о сохранности сенсорных путей и нормальном восприятии химической информации. Аппликация хинина вызывала сильную деполяризацию, сопровождающуюся спайковыми разрядами, у нейронов оборонительного поведения (верхняя кривая), ответ средней интенсивности у нейронов пищевого поведения (средняя кривая), и значительное увеличение частоты спайков педального серотонинергического нейрона (нижняя кривая). Максимальная реакция у исследуемых клеток в ответ на подкрепляющий раздражитель наблюдалась в интервале 15-20 сек с момента нанесения хинина.

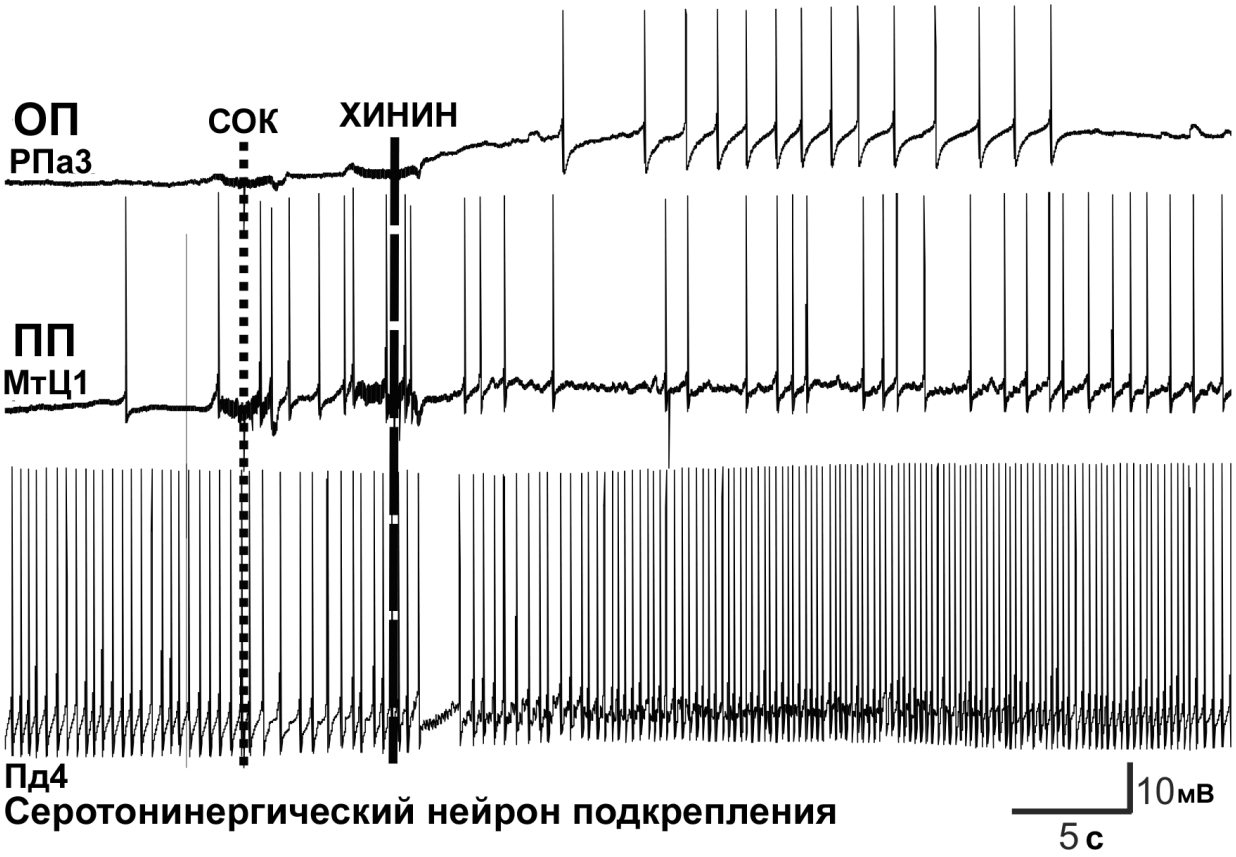


Рис. 31. Пример опыта, в котором капля морковного сока предъявлялась совместно с каплей хинина.

Результаты электрофизиологических экспериментов суммированы в табл. 1. Статистическая оценка данных до и после обучения (мВ для Па2/3 нейронов и частота в % для остальных нейронов) показала, что изменение реакции в ответ на условный стимул серотонинергического педального нейрона 4 и премоторного париетального интернейрона было достоверным, а изменение активности метацеребрального нейрона пищевого поведения носило недостоверный характер.

Табл. 1. Ответы идентифицированных нейронов на сок на полуинтактном препарате «ЦНС-губа» виноградной улитки. В молчащих нейронах длительная деполяризация (на интервале 20 сек после нанесения стимула) больше чем 2 мВ рассматривалась как ответ. В спонтанно активных нейронах максимальное изменение (за период 20 сек после нанесения стимула)

частоты больше, чем на 20% относительно уровня до нанесения стимула, рассматривалось как ответ.

23 препарата, по 2 ответа от каждого идентифицированного нейрона	До обучения, Общее количество ответов		После обучения, Общее количество ответов	
	Есть реакция	Нет реакции	Есть реакция	Нет реакции
Па3/2 (Левый/правый премоторный интернейрон #2, 3)	8	38	39	7
	Wilcoxon Signed Rank Test Z-Statistic (based on positive ranks) = 4,059 P = <0,001			
МтЦ1 (Левый/правый гигантский серотонинергический церебральный нейрон #1)	45	1	42	4
	Z-Statistic (based on positive ranks) = -0,429 P(exact)= 0,674 (Non-significant)			
Пд4 (правый/левый серотонинергический педальный нейрон # 4)	10	36	37	9
	Z-Statistic (based on positive ranks) = -3,763 P = <0,001			

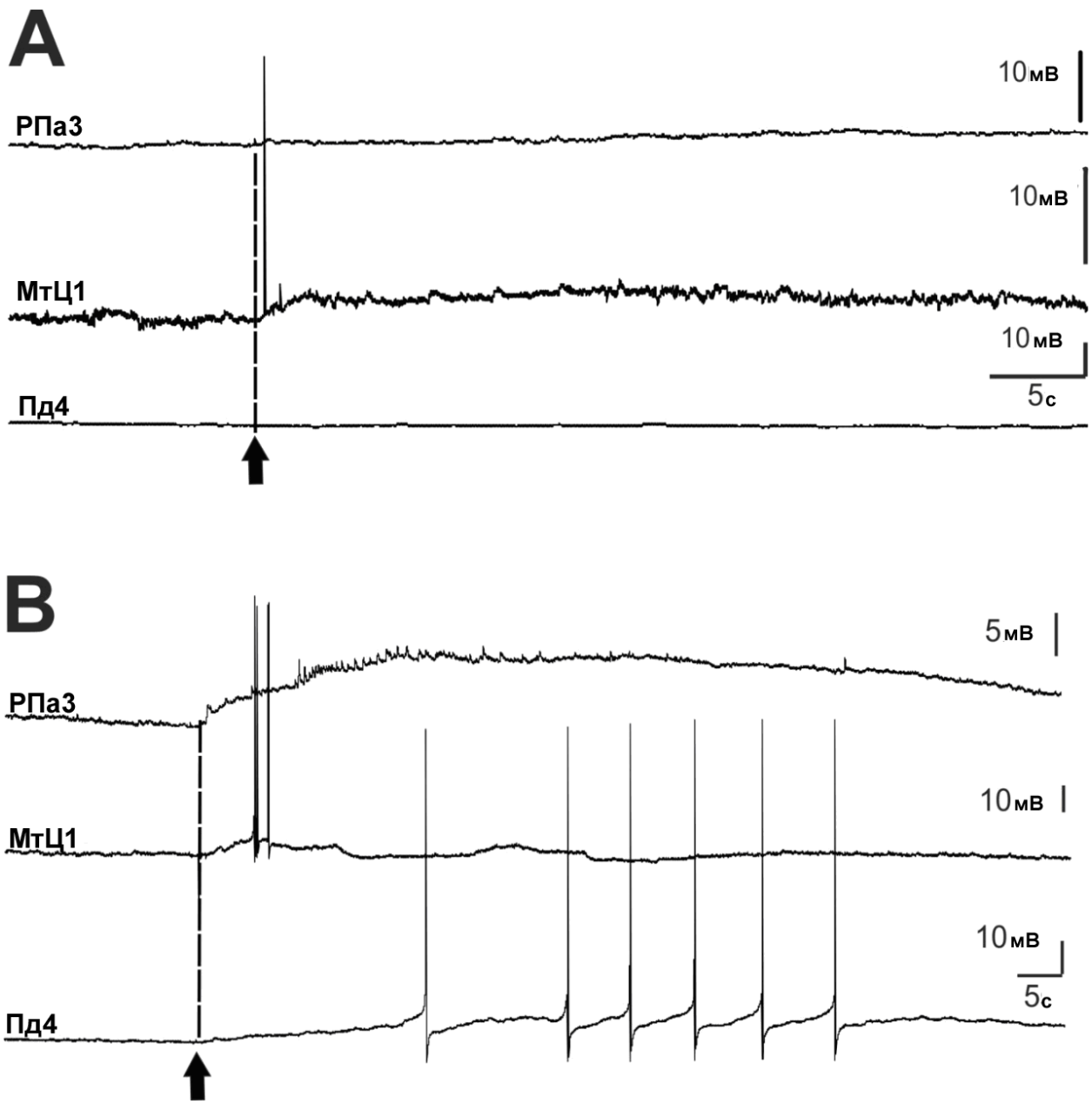


Рис. 32. Пример изменения ответов на аппликацию сока (стрелочка и пунктирная линия) идентифицированных функционально различных нейронов в препарате с низким уровнем спонтанной активности до (А) и после (В) 10 сочетанных предъявлений сока и хинина.

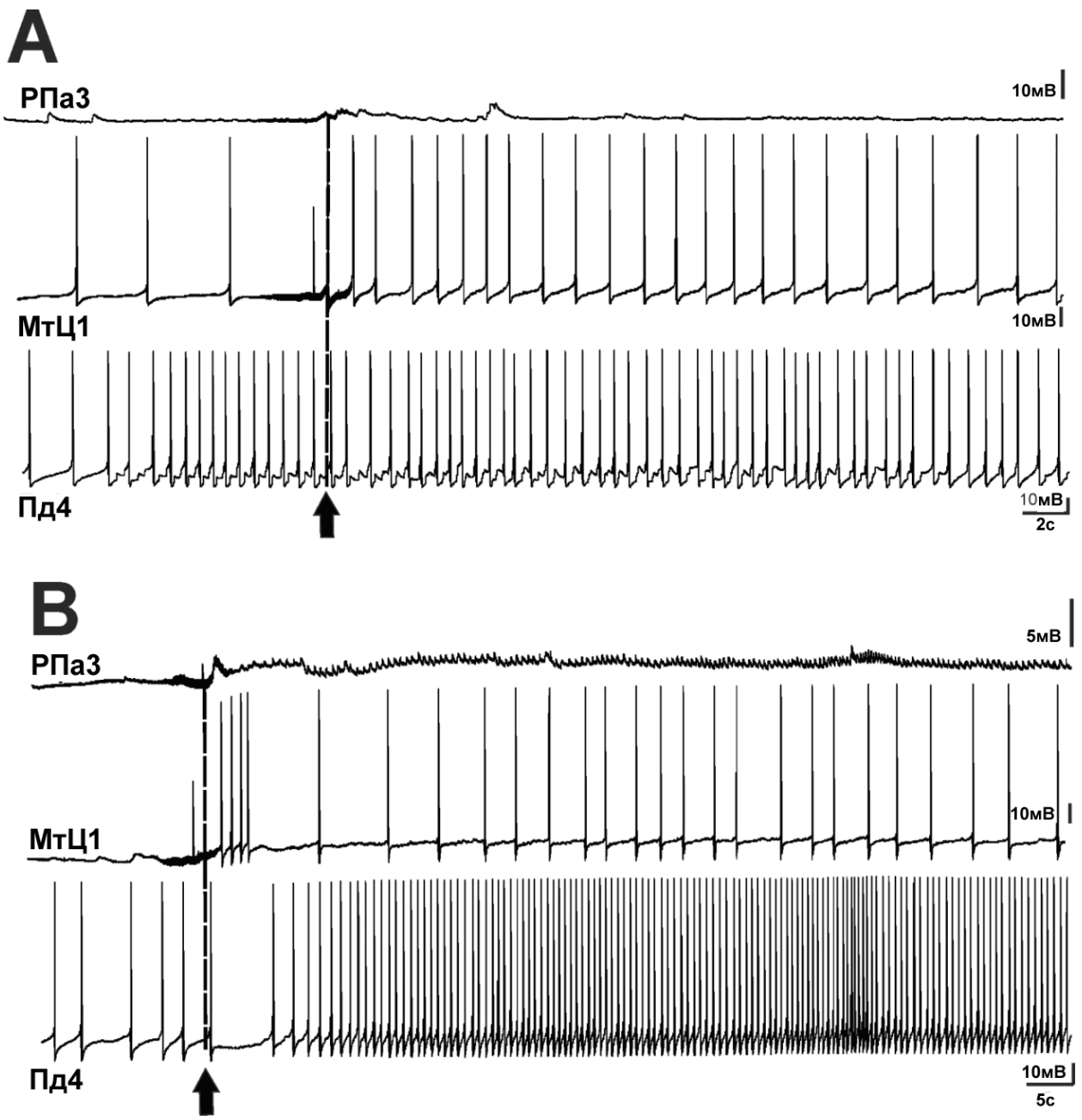


Рис. 33. Пример изменения ответов на аппликацию сока (стрелочка и пунктирная линия) идентифицированных функционально различных нейронов в препарате с высоким уровнем спонтанной активности до (А) и после (В) 10 сочетанных предъявлений сока и хинина.

Примеры изменения ответов идентифицированных нейронов после проведения обучения представлены на рис. 32, 33. Ответы идентифицированных нейронов на представленных записях, полученных при аппликации капли сока на полуинтактный препарат виноградной улитки,

различаются по уровню спонтанной активности. Интересно, что в тех препаратах (12 из 23), спонтанная активность в которых изначально практически отсутствовала, изменения носили более выраженный характер. Гигантские париетальные интернейроны, обеспечивающие запуск отдергивания щупалец (Па2/3), после обучения на аппликацию сока реагировали сильной деполяризацией с многочисленными ВПСП, проявляющимися на ее фоне (рис. 33). Ответы метацеребральных серотонинергических нейронов пищевого поведения не меняются достоверно во всех проведенных экспериментах. Тогда как в педальных клетках (модулирующих синаптические входы к париетальным интернейронам Па2/3) достоверные изменения ответов были обнаружены. По сути, изменения, наблюдаемые в париетальных интернейронах и педальных серотонинергических нейронах, были аналогичными.

3.3.2. Динамика ответов исследуемых нейронов при повторном тестировании

Пример конкретного одиночного эксперимента представлен на рис. 34. На нем отражены нормированные изменения ответов париетальных нейронов в мВ деполяризации, рассчитанные от начального значения потенциала, и процент изменения максимальной частоты спайков в ответ на аппликацию сока в педальных нейронах. Параллелизм изменения ответов этих двух типов нейронов очевиден.

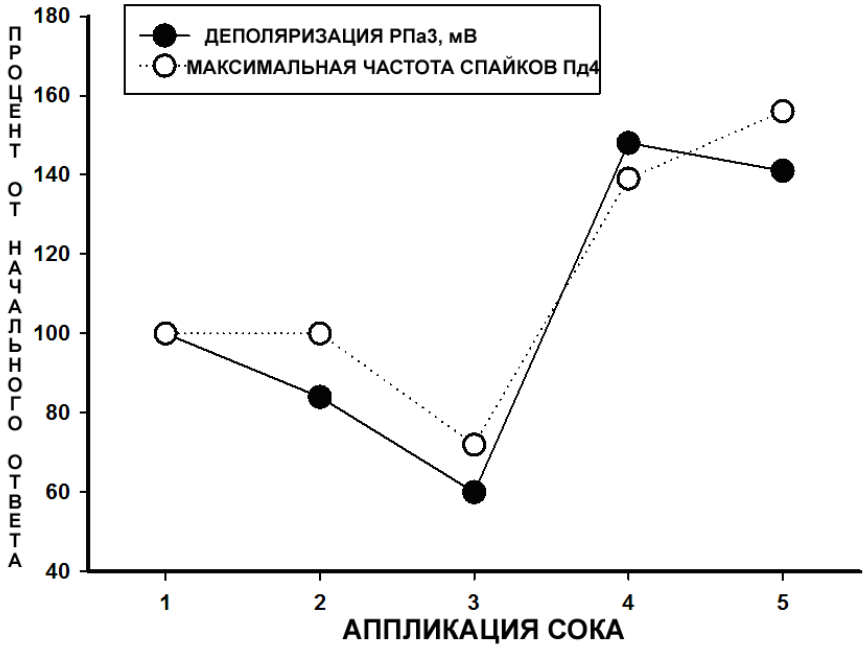


Рис. 34. Динамика изменения максимальной активности после обучения in vitro в париетальном премоторном интернейроне РПа3 (величина максимальной деполяризации на временном отрезке 15-25 сек после аппликации сока, и в педальном серотонинергическом нейроне Пд4 (максимальная частота потециалов действия на временном отрезке 15-25 сек после аппликации сока) в ответ на последовательные 5 аппликаций сока с 5-ти минутным интервалом. Активность нейронов записывалась параллельно. Пример одиночного эксперимента.

Полученные результаты позволяют предположить, что идентифицированный серотонинергический педальный нейрон 4, помимо модуляторного воздействия на пресинаптический вход командных нейронов (Zakharov et al., 1995), активируется при реактивации памяти, и его активность может быть необходима для запуска процесса реконсолидации. Причиной подобного рода догадок послужили особенности изменения активности педального серотонинергического нейрона. Он изменяет свои ответы на условный раздражитель после ассоциативного аверзивного обучения на полуинтактном препарате «ЦНС-губа» виноградной улитки и начинает отвечать на ранее индиферентный условный сигнал.

3.4. Исследование роли протеинкиназы мю зета в поддержании долговременной памяти в поведенческих экспериментах

3.4.1. Нарушения памяти, вызванные введением блокатора протеинкиназы мю зета ZIP

В этой серии экспериментов мы исследовали участие ПКМЗ в поддержании обстановочной памяти у наземного моллюска виноградной улитки. До проведения процедуры обучения мы протестировали улиток в 2-х различных контекстах (на шаре и на плоской поверхности-стекле) (рис. 35, Т, до обучения). Во всех трех группах амплитуда сокращения щупальца не отличалась достоверно в обоих контекстах. После проведения обучения условная реакция всех трех групп животных отличалась достоврено на шаре и стекле (рис. 35, Т1, после обучения, $p < 0.001$ для всех групп, непараметрический критерий Вилкоксона, $z = 3.6$ для G1, $z = 3.9$ для G2, $z = 3.5$ для G3). Через 24 часа после Т1 группе 2 проводили процедуру напоминания (на шаре в течение 20 минут) совместно с введением ZIP, группам 1 и 3 вводили ZIP/scrZIP, соответсвенно, без напоминания. При тестировании Т2 было обнаружено, что животные из группы 1 не различают контекстов, в то время как группы 2 и 3 делают это с высокой степенью достоверности (рис. 35, Т2, $p < 0.001$ для G2 и G3, непараметрический критерий вилкоксона, $z = 3.7$ для G2, $z = 3.4$ для G3). Такие результаты указывают на то, что блокада ПКМЗ ведет к стиранию памяти, в то же время блокада киназы в условиях реактивации памяти (что подразумевает наличие реконсолидации) приводит к сохранению памяти. Проведенные эксперименты позволяют утверждать, что ПКМЗ необходима для поддержания обстановочной памяти виноградной улитки.

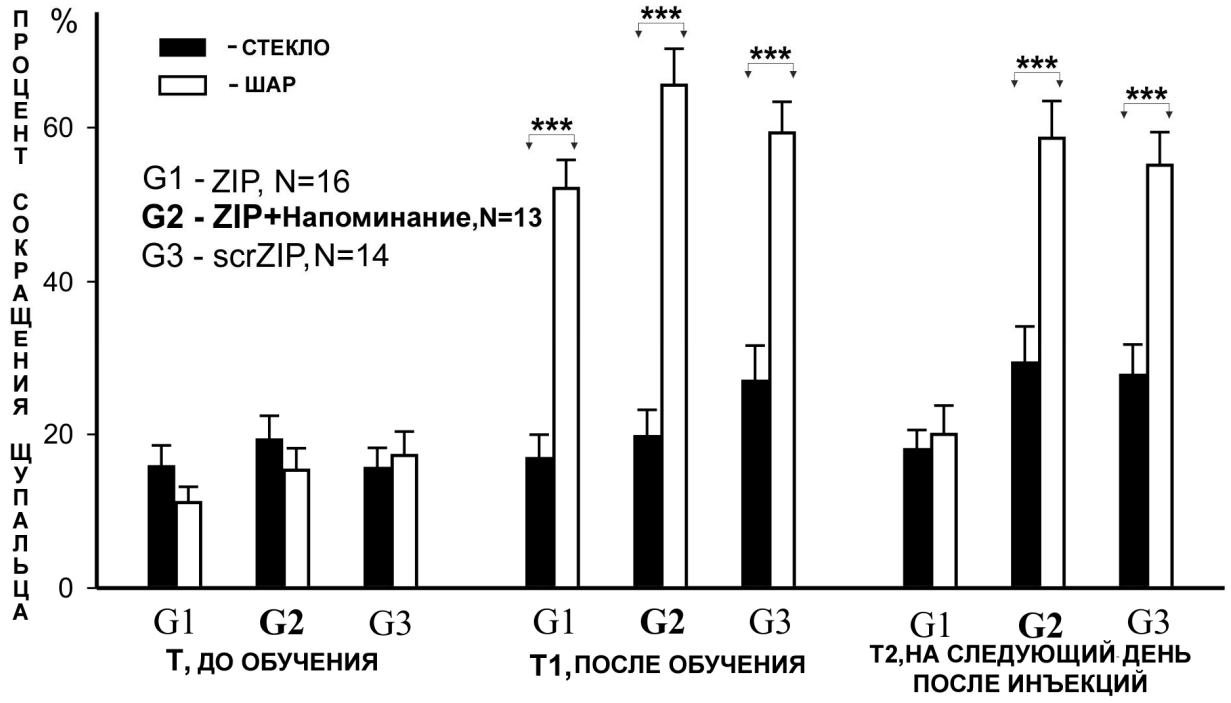


Рис. 35. ZIP нарушает долговременную обстановочную оборонительную память у виноградной улитки. На рисунке показаны средние значение амплитуды отдергивания щупальца по группе, а также ошибка среднего. Группа 1 (G1) – n=16; группа 2 (G2) – n=13; группа3 (G3) – n=14. Группе 1 был введен ZIP без напоминания, группе 2 ZIP был введен за 20 минут до напоминания, группе 3 был введен контрольный пептид scrZIP с напоминанием. По оси y – нормированная амплитуда сокращения щупальца в процентах от начальной длины. Для статистической обработки данных использовался непараметрический критерий Вилкоксона, ***<0,001.

3.4.2. Определение временного окна действия ZIP

По современным представлениям реконсолидация происходит в течение приблизительно 4 часов после напоминания. Мы решили проверить, будет ли эффективен ZIP после реактивации памяти в этом временном окне. В данном эксперименте на этапах до обучения (Т) и после обучения (Т1) мы повторили условия предыдущего. Улитки тестировались в двух различных контекстах; при тестировании до обучения различий в восприятии контекстов обнаружено не было; после обучения все улитки достоверно отделяли один контекст от другого (рис. 36). Интересным моментом данного эксперимента было изменение схемы напоминания и введения ZIP (за 20

минут до напоминания – G1, через 2 часа после напоминания – G2, через 4 часа после напоминания – G3). При тестировании спустя 24 часа было обнаружено, что улитки первой группы по-прежнему достоверно различают оба контекста, а вот поведение улиток групп 2 и 3 изменилось, они перестали отличать один контекст от другого (рис. 36). Из полученных результатов следует, что ZIP начинает эффективно действовать на память спустя 2 часа и более после напоминания. Объяснение, по-видимому, заключается в том, что при реконсолидации памяти во временном интервале от 2 часов и более синтезируются новые молекулы ПК мю зета, которые служат мишенью для пептида блокатора.

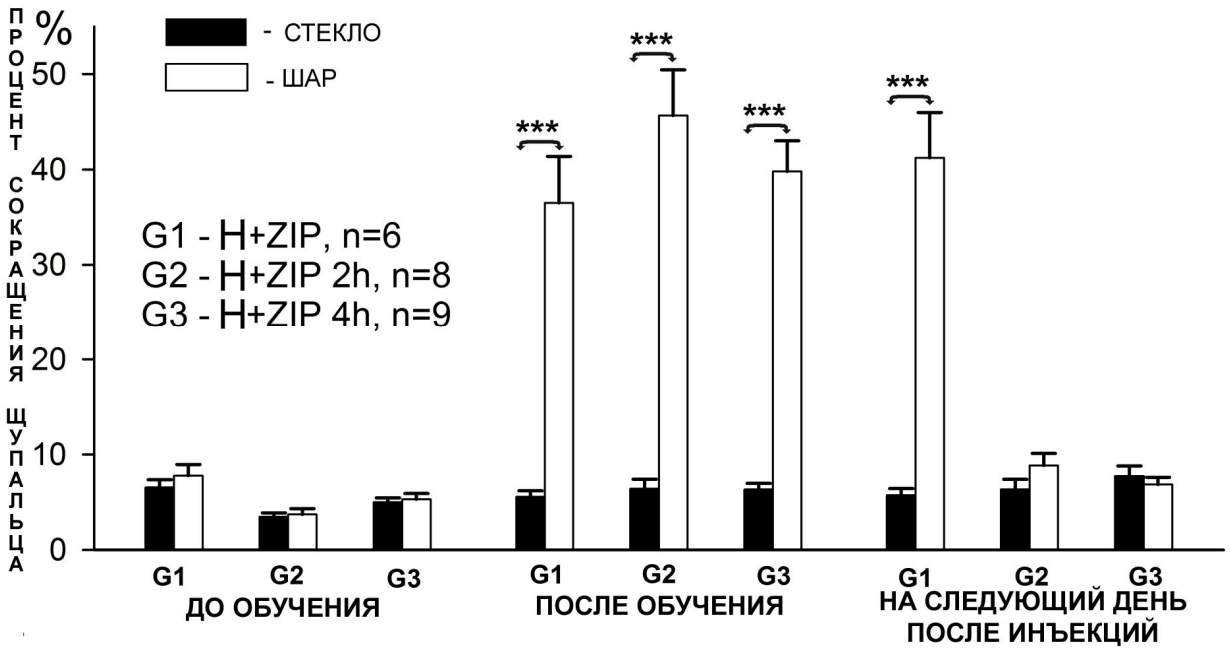


Рис. 36. Определение временного окна действия ZIP. На рисунке показаны средние значение амплитуды отдергивания щупальца по группе, а также ошибка среднего. Группам 1 (G1), 2(G2), 3(G3) после T1 было проведено напоминание (H), совмещенное с инъекцией ZIP: группе 1 ZIP ввели за 20 минут до напоминания; группе 2 – через 2 часа после напоминания; группе 3 – через 4 часа после напоминания.

3.5. Определение роли серотонинергических нейронов в процессах угашения и реконсолидации памяти в поведенческих экспериментах

Мы показали, что блокатор ПКМЗ ZIP нарушает сформировавшуюся память как после обучения, так и после напоминания (при введении блокатора через 2 или 4 часа после напоминания), а также снижает амплитуду ВПСП после выработки долговременной фасилитации. Из более ранних работ известно, что в основе обучения оборонительной реакции у улитки лежит выработка долговременных пластических изменений синаптических входов от сенсорных нейронов на премоторные интернейроны оборонительного поведения, и что этот процесс модулируются группой серотонинергических нейронов в педальном ганглии улитки (Balalan, 2002). По аналогии с данными, полученными на аплизии, можно предположить, что серотонин запускает в постсинаптической клетке синтез кальпаина, который переводит ПКС-зета в конститутивно активную форму, отщепляя от неё регуляторный домен (Cai et al., 2011). В то же время, роль серотонина в процессах воспроизведения и реконсолидации памяти при напоминании остается малоизученной. Понимание роли серотонина в изменениях уже сформированной памяти помогло бы нам понять механизмы, запускающие синтез и процессинг атипичной РКС при реконсолидации памяти. Для достижения данной цели мы подробно изучили роль серотонина в процессе реконсолидации памяти при обучении с использованием различных фармакологических агентов, снижающих активность серотониновой системы, а также исследовали изменения в активности модуляторных серотонинергических нейронов при выработке аверсивной реакции на пищевой стимул на полуинтактном препарате.

3.5.1. Исследование обстановочного компонента оборонительного поведения

Во всех экспериментах, проведенных согласно данной парадигме, животные были тестированы до обучения в двух экспериментальных контекстах (Т0), затем подвергались воздействию электрического тока только в одном из контекстов (на шаре) в течение нескольких дней, затем

следовало тестирование на выявление способности животных различать предложенные ему варианты обстановки: плоская стеклянная поверхность, соотвествующая стенкам террариума, в котором животные содержались между экспериментальными сессиями, и пластиковый шар, свободно плавающий в воде.

3.5.1.1. Напоминание на фоне введенного 5,7-диокситриптамина приводит к стиранию обстановочной оборонительной памяти

При тестировании до обучения амплитуда отдергивания щупалец в ответ на тестовый стимул не отличалась среди всех групп животных в обоих контекстах (используемый критерий оценки ANOVA, см. T0, первые два столбика для каждой группы на рис. 37). После тестирования экспериментальную и контрольную группы животных подвергали воздействию электрического тока на шаре в течение 10 дней, в результате чего при тестировании через сутки (T1), согласно усредненным данным, во всех группах реакция сокращения щупалец в ответ на тестирующий стимул была достоверно больше в обстановке, в которой животные получали отрицательное подкрепление (на шаре), по сравнению с нейтральным контекстом ($p<0.001$, Wilcoxon signed-rank test, «N» для каждой группы показано на рис. 37). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что животные показывают увеличение интенсивности защитной реакции только в той среде, в которой они подергались болевому воздействию. Этот вывод согласуется с допущением, что улитки способны различать контексты, что очень важно для нас, поскольку позволяет исключить эффект сенситизации в результате действия электрического тока.

В данной серии экспериментов нашей целью было показать эффекты, связанные с нарушением работы серотонинергической системы улиток, поэтому группам 2 и 3 был введен нейротоксин 5,7-ДОТ после проведения T1. Спустя 48 часов всем животным было проведено напоминание (20 минут

на шаре без воздействия электрошока) о среде, в которой они подвергались электрошоку. Для доказательства протекания феномена реконсолидации группы 1 и 2 получили инъекцию блокатора синтеза белка анизомицина на фоне напоминания, остальные группы получили инъекции физиологического раствора. Результаты, полученные при последующих тестированиях (T2-T4), указывают на сохранность обстановочной ассоциативной памяти у виноградных улиток контрольной группы (рис. 37, G4). Группа животных (G1), получившая инъекцию анизомицина, демонстрировала полное отсутствие памяти об обстановке. Эти результаты полностью согласуются с описанными ранее данными относительно феномена реконсолидации у виноградных улиток (Gainutdinova et al., 2005), а также свидетельствуют в пользу того, что в нашей серии экспериментов после напоминания произошла реконсолидация. Животные, получившие инъекцию анизомицина на фоне ранее введенного 5,7-ДОТ также показали ухудшение памяти на следующий день после напоминания (рис. 37, G2, тестирование T2), незначительное восстановление памяти еще через сутки (T3), полное отсутствие памяти об обстановке при следующем тестировании супстя 24 часа (T4).

Наиболее интересные результаты при проведении трех последовательных тестирований каждые 24 часа (рис. 37, T2, T3, T4) были получены в третьей группе, которой был введен только нейротоксин после тестирования T1. Эти улитки продемонстрировали недостоверное ухудшение памяти относительно T1 при тестировании T2, которое продолжалось при последующий двух тестированиях (T3, T4) и завершилось полным отсутствием памяти об обстановке. Несколько напоминаний (каждое тестирование можно рассматривать как процедуру напоминания, потому что животные проводили на шаре при тестированиях 20 минут) у животных с поврежденной серотонинергической системой приводят к значительному ухудшению памяти вплоть до ее полной потери, тогда как в контрольной

группе (G4) серия напоминаний запускает процесс реконсолидации и способствует поддержанию памяти на определенном уровне (рис. 37).

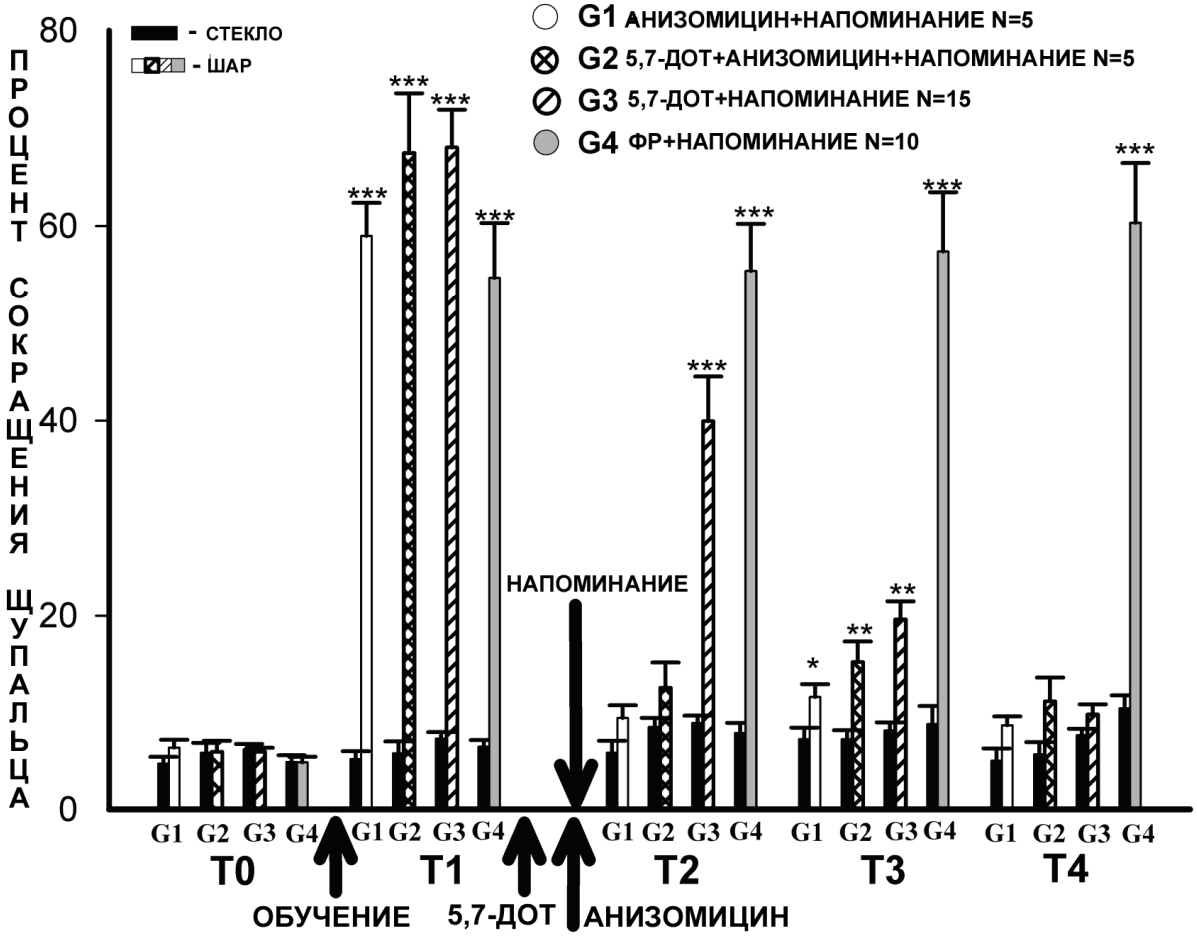


Рис. 37. Динамика реакции отдергивания щупальца 4-х групп улиток в парадигме обстановочного обучения. Усредненные результаты поведенческих тестов показывают, что при блокаде серотонинергической системы (G3) нейротоксином 5,7-ДОТ при проведении последовательных тестирований после обучения, память об обстановке постепенно идет на спад (Т2, Т3) и к заключительному тестированию полностью стирается (Т4). * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0.001$ здесь и на других рисунках. G1 – группа улиток с напоминанием и введением анизомициа, G2 – Группа улиток с напоминанием, введением 5,7-ДОТ и анизомицина, G3 – группа улиток с напоминанием и введением 5,7-ДОТ, G4 – группа улиток с напоминанием и введением физиологического раствора. Результаты тестирований, выполненных во втором контексте (стекло), показаны

черными столбиками для всех групп, результаты тестирований в первом контексте (на шаре) имеют различный рисунок.

3.5.1.2. Введение миансерина при напоминании стирает обстановочную оборонительную память

В следующей серии экспериментов мы решили нарушить работу серотонинергических нейронов используя миансерин, неселективный антагонист рецепторов серотонина второго типа 5-HT2. Группе 2 (G2) был введен анизомицин перед проведением процедуры напоминания, при последующих тестах для данных животных было характерно отсутствие обстановочной памяти (рис. 38), что свидетельствовало в пользу наличия феномена реконсолидации в данной серии экспериментов. Группа 3 (G3) служила контрольной и демонстрировала отличную память на протяжении всего эксперимента во всех тестах (рис. 38). Группа 1 (G1), которой однократно был введен миансерин перед напоминанием, продемонстрировала схожие показатели с контрольной группой при тестировании T2, однако затем мы наблюдали достоверное снижение ($p<0,01$, критерий манна-Уитни) в последующих тестах (рис. 38). Эти результаты подтверждают необходимость в неповрежденной серотонинергичекой системе для нормального процесса реконсолидации обстановочной памяти.

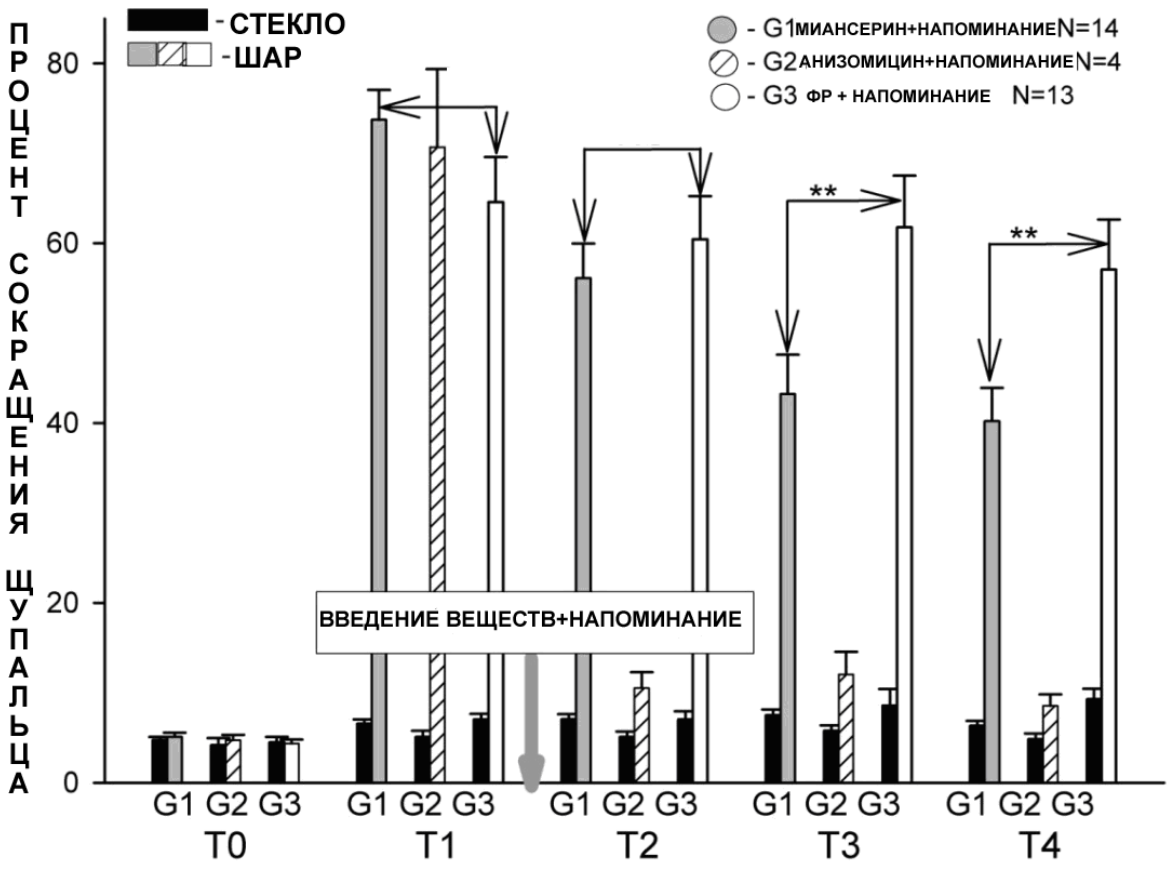


Рис. 38. Динамика реакции отдергивания щупальца 3-х групп улиток в парадигме обстановочного обучения. В результате инъекции миансерина, вызывающего частичную блокаду серотонинергической системы (G1), память сохраняется при первом тестировании, но достоверно ослабевает при последующих двух тестированиях ($p<0.01$; T3-;). G1 – группа улиток с напоминанием и введением миансерина после T1; G2 – группа улиток с напоминанием и введением анизомицина; G3 – группа с напоминанием и введением физиологического раствора (контрольная группа). Вещества (анизомицин, миансерин) вводились однократно.

3.5.2. Исследование сигнального компонента оборонительной памяти

В электрофизиологических экспериментах мы провели исследование активности идентифицированных нейронов в ответ на сигнальный стимул (капля сока), в то время как феномен реконсолидации у виноградных улиток был показан в условиях другой модельной парадигмы – на модели обстановочной памяти. Поэтому мы решили провести серию экспериментов,

демонстрирующих существование феномена реконсолидации у виноградных улиток в ответ на сигнальный условный стимул схожий с тем, который использовался в электрофизиологичекской серии экспериментов in vitro. В поведенческих экспериментах предъявление пищи (морковного сока, нанесенного на ватку) сопровождалось применением электрического тока к ноге животного в момент, когда животное пыталось поглотить пищу. Латентности пищевых реакций регистрировались в ходе эксперимента.

3.5.2.1. Напоминание на фоне введенного 5,7-диокситриптамина ухудшает сигнальный компонент оборонительной памяти

В настоящих экспериментах в полном соответствии с ранними данными коллег (Balaban et al., 1987) наблюдалось достоверное увеличение латентности пищевой реакции виноградной улитки после пяти обучающих сессий, включающих сочетании пищи с отрицательным подкреплением, во всех группах животных, у которых проводили процедуру обучения (Т1 на рис. 39). До обучения все улитки брали пищу практически в 100% случаев, что характерно для наивного животного, причем латентность захвата при поднесении моркови на расстояние 5 мм составляла в среднем 20-30 сек. Латентный период после обучения был достоверно больше, чем у наивных животных. При тестировании Т1 лишь в 13% (табл. 2.) случаев наблюдалась пищевая реакция. Животные всех четырех групп отказывались прикасаться к пищевому стимулу после обучения, в некоторых случаях после предъявление пищи наблюдалась оборонительная реакция. Ранее было показано одними исследователями (Balaban et al., 1987) и многократно подтверждено другими (Nikitin et al., 2016), что данное изменение пищевого поведения специфично только для того вида пищи или запаха, которые сочетались с электрошоком. Одной из групп вводили нейротоксин 5,7-ДОТ после проведения Т1, после двухдневного отдыха была проведена серия последовательных тестирований (Т2-7) с интервалом в 24 часа. Перед тестированием Т2 всем животным вводили либо контрольный раствор, либо анизомицин (однократно перед Т2),

либо миансерин (многократно, после каждого тестирования - напоминания). Группа, которой ранее был введен нейротоксин, получила инъекцию контрольного раствора. Результаты второго тестирования Т2 не отличались от результатов Т1 – все улитки с высокой достоверностью демонстрировали аверсивную память на условный стимул (рис. 39). Т2 можно рассматривать как первое напоминание (предъявление условного стимула запаха моркови на шаре в течение 20 минут без применения электрошока). Последующие тесты (Т3-7) показали, что контрольная группа улиток G1 прекрасно помнит, что запах моркови ранее сочетался с электрошоком и с высокой степенью достоверности отказывается от предъявленного условного стимула ($p<0,001$ для всех тестов, тест Вилкоксона). Группа с анизомицином на третьем тестировании Т3 показала достоверное ухудшение памяти и полное отсутствие памяти при тестированиях Т4-7 (недостоверное отличие от Т0). Это подтверждает наличие реконсолидации (требующей синтез белков) в этой серии экспериментов, так же как и в предыдущих. Группа улиток G3, подвергшаяся повреждению серотонинергической системы при помощи нейротоксина 5,7-ДОТ, сохранила память о негативном значении сигнального раздражителя, при этом наблюдалось достоверное отличие латентности взятия пищи в тестированиях Т4-7 от тестирования Т0. Но в то же время значения латентности реакции были достоверно ниже значений при тестировании сразу после обучения Т1 и Т2. Стоит отметить, что спустя 2 дня после введения нейротоксина все группы имели хорошую память (Т2), включая улиток с нарушенной серотонинергической системой, а каждая реактивация памяти (каждое тестирование рассматриваем как напоминание) на фоне 5,7-ДОТ вызывало постепенное стирание памяти (Т3-7, рис. 39). Группа улиток G4, которой проводили регулярные инъекции миансерина, сохранила память на уровне схожем с контрольной группой на протяжении всего эксперимента.

Табл. 2. Процент пищевых реакций улиток.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
5,7-ДОТ n=10	100	10	6.7	76.7	86.7	87.5	87.5	90.5
ФР n=4	100	12.5	6.25	0	12.5	12.5	12.5	44.4
Анизомицин n=3	100	12.5	12.5	91.7	100	100	100	100
Миансерин n=8	100	16.7	8.3	29.2	58.3	66.7	66.7	60

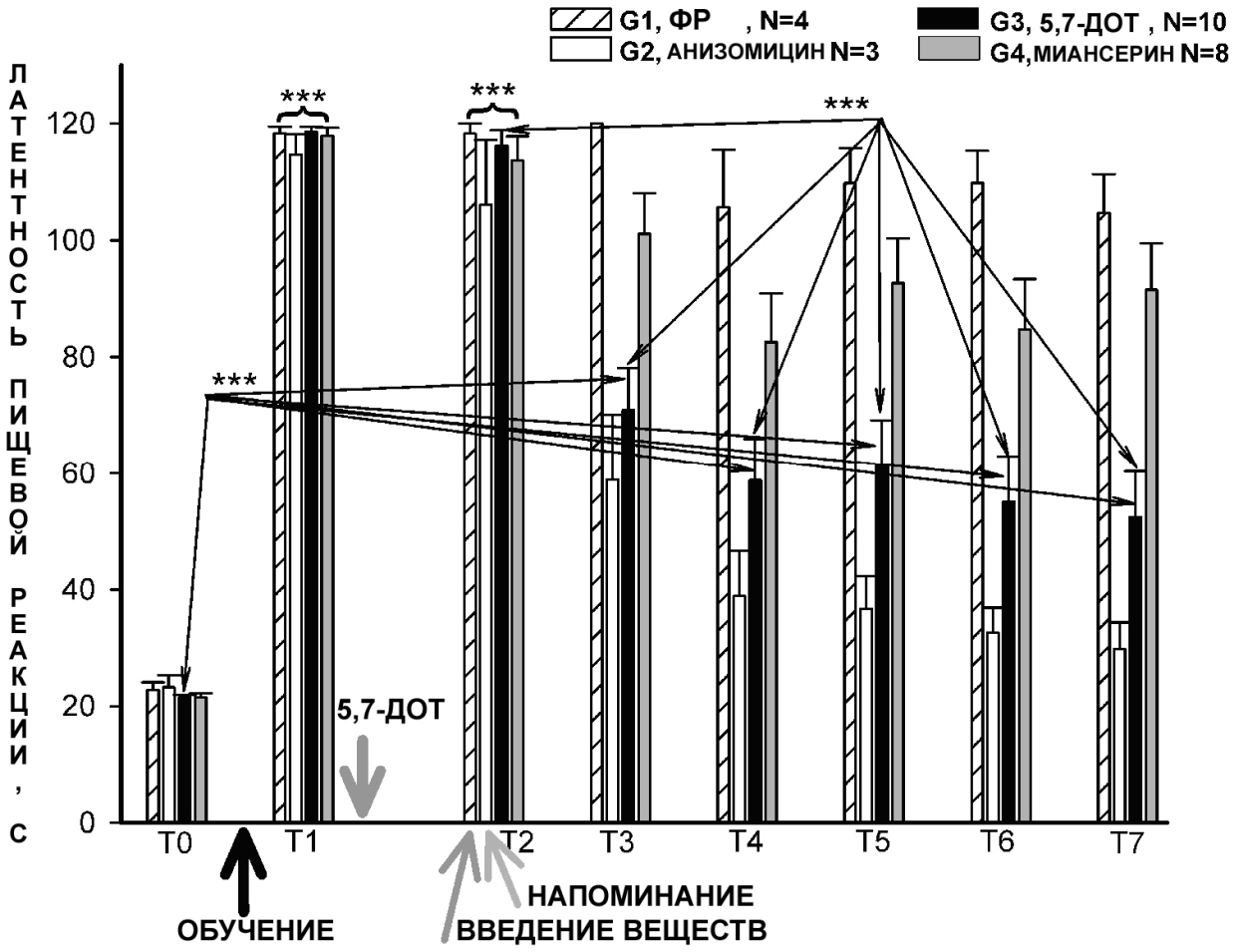


Рис. 39. Изменение латентности взятия пищи виноградной улиткой при обучении пищевой аверсии (сочетанное предъявлении пищи и тока).Усредненные результаты тестирования латентности пищевых реакций показывают, что латентность ответов после обучения выросла достоверно у всех групп (Т1), память у контрольных животных сохранялась на протяжении всех тестирований (Т2-7), тогда как группа, получившая инъекцию анизомицина до проведения процедуры напоминания, демонстрировала отсутствие памяти (Т4-7). У улиток, подвергшихся блокаде серотонинергической системы

(G3) с помощью 5,7-ДОТ, память сохранялась только при первом тестировании после введения нейротоксина (Т2), после чего наблюдалось достоверное снижение латентности пищевой реакции (Т3-Т7), что свидетельствовало об ослаблении ранее приобретенной памяти (Т1). Однако даже в заключительном тестировании (Т7) значение латентности взятия пищи достоверно превышало то же значение до обучения (Т0). Группа G4, получающая инъекции миансерина (частичная блокада серотонинергической системы), вела себя схожим образом с контрольной группой (G1).

3.5.2.2. Введение 5-гидрокситриптофана ослабляет токсическое действие 5,7-диокситриптамина

В предыдущей серии экспериментов (см. раздел 3.5.2.1.) нам удалось показать, что напоминание на фоне введенного 5,7-диокситриптамина ухудшает сигнальный компонент оборонительной памяти. Целью следующих экспериментов было выяснить, что же произойдет с памятью на фоне временного увеличения концентрации серотонина. Двум группам улиток из предыдущего исследования (рис. 39) (группа 2, получившая после обучения условному рефлексу пищевой аверсии однократную инъекцию анизомицина на фоне напоминания – рассматривалась нами как контрольная; группа 3 – с введенным нейротоксином 5,7-ДОТ после обучения) вводили предшественник серотонина 5-гидрокситриптиофан после тестирования Т7 (рис. 39). После введения 5-гидрокситриптофана через 1 час, 5 часов, 24 часа проводили тестирование. Во всех поведенческих экспериментах применялся метод двойного слепого контроля (рис. 7).

Из литературных данных известно, что максимальная концентрация серотонина достигается через 1 час после введения предшественника 5-гидрокситриптофана. Именно с этой временной точки мы начинали тестирования. Достоверных изменений латентного периода пищевой реакции у обеих групп после введения предшественника не обнаружено. Число пищевых реакций в группе 2 (введенный ранее анизомицин) также не изменилось, при этом в группе 1 с введенным ранее нейротоксином наблюдалось снижение числа пищевых реакций с 90,5% до 39% через 5 часов

после введения 5-гидрокситриптофана. Через 24 часа число пищевых реакции вернулось к исходному значению. Латентный период пищевой реакции в данной группе также увеличился через 5 часов после введения предшественника (рис. 40; рис. 41).

Таким образом, наблюдается отчётливая тенденция к восстановлению сигнального компонента оборонительной памяти у улиток с блокированной серотонинергической системой на фоне введения 5-гидрокситриптофана, однако, достоверных отличий выявить не удалось, что вероятно связано с небольшим объемом выборки. В контрольной группе улиток (с анизомицином) подобной тенденции не было показано, поскольку отсутсвие памяти в этой группе не связано с функционированием серотониновых нейронов, а, следовательно, и введение предшественника серотонина никаким образом не влияет на память этих животных.

Из литературных данных известно, что предшественник серотонина триптофан может улучшать выполнение когнитивных задач животными, улучшать память (Haider et al., 2006.). Позитивные эффекты воздействия триптофана на нервную систему обнаружены не только на животных, но и на людях, на пациентах, страдающих болезнью альцгеймера и шизофренией (Levkovitz et al., 2003). В рамках этих работ легко объяснить полученные нами данные о том, что при аппликации предшественника серотонина (концентрация серотонина увеличивается) у животных с нейротоксином наблюдается некоторое восстановление памяти. Возможно, такое введение представляло собой нечто подобное активации модулирующих серотонинергических нейронов, активация которых необходима для преобладания реконсолидации над угашением. Стоит отметить, что от уровня серотонина в ЦНС зависит, например, скорость привыкания премоторных интернейронов оборонительного поведения (Malyshev et al., 1998) и скорость привыкания эффекторной реакции улиток к ритмическому тактильному стимулу (Балабан, Захаров, 1992).

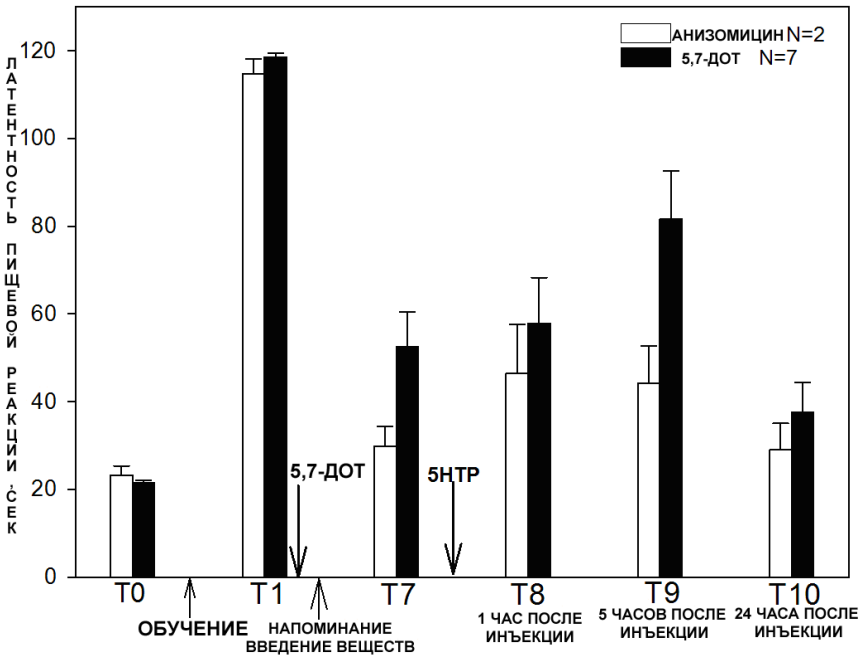


Рис. 40. Изменение латентности пищедобывательных реакций у улиток до обучения, после обучения и после напоминаний.

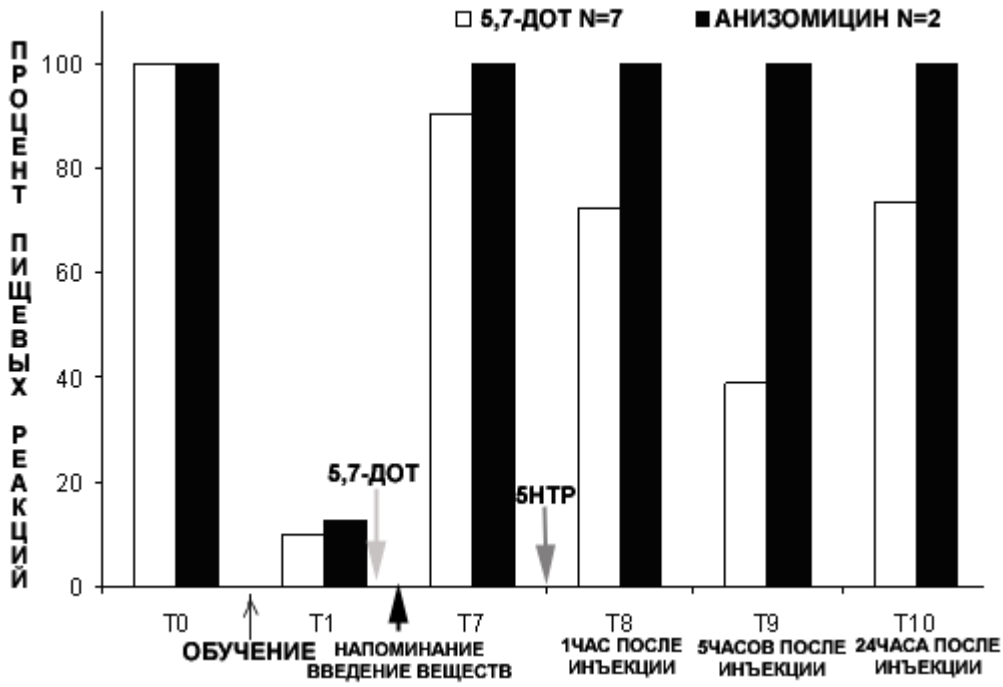


Рис. 41. Изменение проявления пищедобывательных реакций у улиток до обучения, после обучения и после напоминаний. По оси ординат – средний процент пищевых реакций по всем животным в группе.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Роль протеинкиназы мю зета в механизмах поддержания долговременных синаптических изменений и памяти у виноградной улитки

4.1.1. Активность гомолога протеинкиназы мю зета поддерживает долговременную фасилитацию у виноградной улитки

Один из разделов данной работы был посвящен исследованию влияния блокатора ПКМЗ на пластичность синаптических входов от сенсорных нейронов на гигантские премоторные интернейроны. В нескольких сериях опытов вырабатывали долговременную фасилитацию синаптических входов и анализировали изменение амплитуды ВПСП после выработки в ответ на добавление ZIP.

В первой серии применялся протокол гомосинаптической тетанизирующей стимуляции: высокочастотная стимуляция нерва с одновременной аппликацией серотонина вызывала долговременное увеличение амплитуды комплексного ВПСП в ответ на тестовую стимуляцию этого же нерва. Тестовая стимуляция нерва без тетанизации вызывала постепенное уменьшение амплитуды ВПСП со временем. Аппликация ZIP через полтора часа после выработки долговременной фасилитации вызывала существенное падение амплитуды ВПСП. ScrZIP не вызывал снижения амплитуды ВПСП при добавлении через 90 мин после стимуляции. Также мы проверили возможные эффекты ZIP и scrZIP на амплитуду ВПСП без тетанизации. Достоверных отличий между амплитудой ответов в контроле и на фоне ZIP или scrZIP не было обнаружено. Вторая серия экспериментов проводилась по протоколу гетеросинаптической фасилитации, в котором тестовая стимуляция осуществлялась по одному нерву (кожному), а тетанизирующая – по другому (интестинальному). Такая модель более адекватна реальному поведению улитки при обучении, когда ей наносят тестирующее раздражение на передний конец ноги (в область иннервации кожных нервов), а электрический шок – на задний конец,

иннервируемый интестинальным нервом. Результаты оказались сходными с эффектом ZIP на амплитуду ВПСП после выработки гомосинаптической пластичности: в контроле без выработки тетанизации амплитуда ВПСП постепенно снижалась, аппликация ZIP уменьшала амплитуду ВПСП до близких к контрольным значениям, а scrZIP не вызывал снижения ответов. Полученные результаты позволяют предположить участие ПКМЗ в выработке гомо- и гетеросинаптической пластичности в нервной системе виноградной улитки. Кроме того, следует заметить, что полученные результаты прекрасно сочетаются с обнаруженным ранее влиянием ZIP на долговременную фасилитацию у аплизии (Cai et al., 2011), а также на поддержание долговременной потенциации в гиппокампе грызунов (Ling et al., 2002; Pastalkova et al., 2006).

4.1.2. Гомолог протеинкиназы мю зета не нужен для долговременной фасилитации на модели искусственного синапса у виноградной улитки

Часть электрофизиологических опытов была выполнена на модели «искусственного синапса», в которой большая часть ганглия вокруг командного интернейрона удалялась механически, что позволяло устранить синаптические входы на регистрируемый нейрон и, таким образом, исследовать постсинаптический компонент пластичности. Из литературы известно, что входы сенсорных нейронов на командные нейроны, по крайней мере, частично, являются глутаматергическими (Bravarenko et al., 2003). Кроме того, в текущем исследовании мы проверили эффект блокатора глутаматергической передачи CNQX и показали, что он значительно снижает амплитуду ВПСП, вызванных стимуляцией кожного нерва, что подтверждает участие глутамата и его рецепторов в исследуемых синаптических ответах.

В контрольных экспериментах аппликация глутамата с частотой 1 раз в минуту вызывала медленное снижение амплитуды ответов за счет привыкания. Долговременное увеличение амплитуды ответов вызывали

троекратным добавлением серотонина с интервалом 10 минут (Balaban et al., 2004). В данной модели добавление ZIP спустя 90 мин приводило к кратковременному падению амплитуды ответов с последующим частичным её восстановлением. Средняя амплитуда ответов после добавления ZIP достоверно не отличалась от контрольных опытов по выработке долговременной пластичности без добавления блокатора. Отсутствие эффекта ZIP на долговременную фасилитацию в этих условиях, вероятно, можно объяснить очень низкой концентрацией молекул ПКМЗ в телах исследуемых нейронов, о чем свидетельствуют результаты иммунохимического анализа распределения ПКМЗ в теле и отростках нейронов улитки (Balaban et al., 2015). Интересно, что scrZIP оказывал сходный с ZIP эффект. Кроме того, ZIP и scrZIP вызывали кратковременное и статистически значимое снижение амплитуды непотенциированных ответов в опытах без добавления серотонина. Кратковременное (минуты) уменьшение ответов на глутамат в результате аппликации ZIP и scrZIP описано впервые. Исследование канальных механизмов данного явления может представлять интерес в дальнейшем. Для выяснения механизмов действия ZIP были проведены дополнительные эксперименты, в которых на препарате нервной системы улитки сочетали на одном нейроне регистрацию ВПСП в ответ на стимуляцию нерва, ответов на аппликацию глутамата, и измерение входного сопротивления клетки. Было установлено, что ZIP и scrZIP вызывают только падение амплитуды ответов на глутамат, но не изменяют амплитуду ВПСП и входное сопротивление нейрона. Таким образом, можно предположить, что в модели «искусственного синапса» ZIP и scrZIP оказывают неспецифичные кратковременные эффекты, не связанные с собственно синаптической пластичностью. Возможно, в этих эффектах участвуют соматические рецепторы к глутамату.

4.1.3. Вероятный механизм, посредством которого протеинкиназа мю зета поддерживает синаптическую фасилитацию у виноградной улитки

В экспериментах нашей лаборатории было впервые показано, что гомолог ПКМЗ присутствует в транскриптоме нервной системы виноградной улитки (Balaban et al., 2015), а его блокатор ZIP оказывает влияние на сохранение памяти у обученных улиток, равно как и на поддержание долговременной фасилитации синаптических связей в нервной системе. Полученные данные вносят вклад в гипотезу об универсальности механизма поддержания памяти за счет постоянной активности атипичной изоформы ПКСЗ как для позвоночных, так и для беспозвоночных животных: лабораторных грызунов (Pastalkova et al., 2006; Sacktor, 2012), насекомых (Drier et al., 2002; Deng et al., 2015), моллюсков (Bougie et al., 2012; Cai et al., 2011). В поведенческих экспериментах действие ZIP, но не его неактивного аналога, приводило к нарушению памяти. При этом напоминание через 20 минут после инъекции ZIP снимало этот эффект, скорее всего за счет запуска процесса реконсолидации, при котором заново синтезируются молекулы ПКМЗ. Если же ZIP вводили не за 20 мин до обучения, а через два или четыре часа после него, то память после напоминания нарушалась. Таким образом, процесс реконсолидации памяти может запускаться даже при кратковременной блокаде ПКМЗ и обновленная память переходит в долговременную форму приблизительно через 2 часа после напоминания, когда образуется молекулярный субстрат для ZIP (Debiec et al., 2002; Duvarci et al., 2005). Эти данные согласуются с полученными ранее в нашей лаборатории результатами о том, что при напоминании на фоне блокады белкового синтеза память ещѐ сохраняется через 4 часа после напоминания, но исчезает через сутки (Balaban et al., 2014). На морском моллюске аплизия ранее был показан механизм перехода ПКСЗ в активную форму, который может объяснить полученные нами данные. У аплизии гомолог ПКМЗ (PKM Apl III) не синтезируется с отдельной молекулы РНК, лишенной

последовательности регуляторного домена ПКСЗ, как у позвоночных (Hernandez et al., 2003), а образуется посредством расщепления исходной молекулы ПКСЗ кальпаином (Bougie et al., 2009). Недавно было продемонстрировано, что этот процесс требует синтеза кальпаина de novo, который запускается в ответ на пластические изменения в нейронах (Bougie et al., 2012), в частности, на ранних стадиях формирования памяти. В электрофизиологических экспериментах мы показали, что ПКМЗ участвует в поддержании долговременной фасилитации в нейронной сети оборонительного поведения улитки. Наши результаты по воздействию ZIP на амплитуду ВПСП после выработки пластичности на препарате нервной системы улитки хорошо согласуются с литературными данными по действию ZIP на долговременную фисилитацию связей между сенсорными и моторными нейронами Aplysia в клеточной культуре (Cai et al., 2011), а также с данными о нарушении долговременной вызванной потенциации в гиппокампе грызунов (Ling et al., 2002; Pastalkova et al., 2006). Из более ранних работ нашей лаборатории известно, что в синаптических связях между сенсорными нейронами и командными нейронами оборонительного поведения, которые изучались в текущем исследовании, выделяется глутамат (Bravarenko et al., 2003). Для позвоночных животных Т. Сактором предложена модель, согласно которой ПКМЗ усиливает синаптические связи между нейронами за счет встраивания в мембрану дополнительных глутаматных AMPA рецепторов (Yao et al., 2008, Sacktor, 2012) и подавления их интернализации (Migues et al., 2010). На морском моллюске Aplysia также показано усиление транспорта AMPA-рецепторов в синапсы и их встраивания при развитии долговременной пластичности и выработке обучения (Li et al., 2005; Glanzman, 2010). Выработка синаптической пластичности как у аплизии, так и у виноградной улитки, зависит от серотонинергической модуляции глутаматергических синапсов (Balaban, 2002). Можно предположить, что у виноградной улитки долговременная синаптическая фасилитация обуславливается встраиванием AMPA-

рецепторов в постсинаптическую мембрану. Возможно, что этот процесс, как и у аплизии, требует запускаемого серотонином кальпаин-зависимого превращения неактивной формы ПКСЗ в активную, как уже упоминалось ранее (Bougie et al., 2012). В противоречие с данной гипотезой на настоящий момент вступают результаты, полученные на модели “искусственного синапса”, в которой ZIP не вызывал долговременного уменьшения амплитуды ответов на аппликацию глутамата на тело клетки. Возможно, это связано с небольшой концентрацией молекул протеинкиназы в телах премоторных интернейронов, что подтверждается данными иммуноцитохимического исследования (Balaban et al., 2015). Этот вопрос будет исследован в дальнейшем, но нельзя исключить, что, по крайней мере, часть эффектов ZIP на поведение и синаптическую пластичность в наших опытах объясняется действием на какие-то другие элементы нейронной сети, помимо глутаматергических синапсов сенсорных нейронов на премоторных интернейронах.

4.1.4. Специфичность ZIP. Значение протеинкиназы мю зета для обучении и памяти

В настоящее время существует множество данных об участии ПКМЗ или её гомологов в обучении и поддержании пластичности у самых разных животных: моллюсков Helix и аплизия (Cai et al., 2011), насекомых – мух Drosophila (Drier et al., 2002) и тараканов Rhyparobia (Deng et al., 2015), позвоночных – мышей и крыс (Sacktor, 2012). Несмотря на это, специфичность действия ZIP и степень участия ПКМЗ в поддержании долговременной пластичности ставится под сомнение некоторыми исследователями. Так, было показано сохранение памяти и возможность выработки долговременной потенциации у мышей, нокаутных по ПКМЗ (Volk et al., 2013; Lee et al., 2013). Возможно, это связано с компенсаторным усилением активности других сигнальных каскадов, замещающих ПКМЗ, в частности ПКМ лямбда (Kwapis, Helmstetter, 2014; Tsokas et al., 2016). Кроме

того, в некоторых работах введение неактивного аналога ZIP – scrZIP – также блокировало ПКМЗ, хотя и с существенно меньшей эффективностью (Lee et al., 2013). Тем не менее, в наших экспериментах scrZIP не оказывал влияния на сохранение памяти у улиток и амплитуду ВПСП в командных нейронах, хотя мы и наблюдали сходные кратковременные эффекты ZIP и scrZIP на величину глутаматных ответов в модели «искусственного синапса». Можно заключить, что, хотя в нашей работе не исследовался вопрос специфичности воздействия ZIP на активность именно атипичной ПКМЗ, сам факт действия ZIP на память и синаптическую пластичность не вызывает сомнения. Недавно вышла статья, демонстрирующая еще одну возможную сложность экспериментов по блокаде ПКМЗ с помощью ZIP: было показано токсическое действие ZIP на нейроны гиппокампа в культуре (Sadeh et al., 2015). Эффект имел дозозависимый характер, причем диапазон токсичных концентраций ZIP перекрывался с диапазоном концентраций блокатора, обычно используемых в исследованиях. В настоящее время токсичность ZIP продемонстрирована только на культуральных нейронах, которые отличаются от нейронов in vivo по ряду параметров, и вопрос о наличии побочного действия ZIP в целых животных и препаратах нервной системы остается не проясненным. В наших исследованиях мы не отмечали увеличения смертности животных после инъекции ZIP или резкого долговременного изменения состояния и электрофизиологических характеристик нейронов в препаратах изолированной нервной системы после аппликации блокатора.

4.2. Роль серотонинергических модуляторных нейронов педального ганглия в процессе реконсолидации памяти

В этом разделе следует заметить, что применяемый нами нейротоксин 5,7-ДОТ лишь один из способов нарушения работы серотонинергической системы, при котором уменьшение количества серотонина в клетках носит хронический характер. Выделяясь из серотонинергических терминалей,

серотонин может воздействовать на несколько типов рецепторов, расположенных пре - или постсинаптически. Поскольку серотонин выделяется паракринным путем, он может воздействовать на большое количество клеток посредством диффузии. Недостаточное количество и фрагментарность работ по изучению рецепторов серотонина у улиток не позволяет с точностью выбрать блокатор какого-то определенного типа рецепторов. Способность серотонина модулировать синаптическую передачу обширна и многообразна, осуществляется через большое количество рецепторов (Fink, Göthert, 2007), эта модуляция носит весьма сложный характер, направленность действия серотонина может также определяться областью его воздействия (Fink, Göthert, 2007). Кроме того, на беспозвоночных использование всех фармакологических препаратов вызывает некоторые затруднения и в силу того, что последние разрабатывались в большинстве своем для позвоночных животных. На наземных улитках ранее было установлено наличие метиотепин-чувствительных рецепторов серотонина (метиотепин – неселективный антагонист рецепторов серотонина 1,2,5,6 и 7 типов) на телах премоторных интернейронов оборонительного поведения (Pivovarov, Nistratova, 2003; Abramova et al., 2006). Метиотепин также применялся в исследовании роли серотонина в реконсолидации памяти виноградной улитки (Nikitin, Solntseva, 2013). Для дополнительной оценки влияния серотонина на феномен реконсолидации мы выбрали миансерин (антагонист рецепторов серотонина 2 типа). Использование любых блокаторов по сравнению с нейротоксином 5,7-ДОТ ожидаемо даст не такой выраженный результат, т.к. антагонисты, например, могут иметь недостаточную степень сродства к рецептору. О сложности и противоречивых результатах, полученных при использовании различных антагонистов, говорят множество работ даже на позвоночных животных (Stiedl et al., 2000; Schneider et al., 2003). Поэтому выявленные некоторые отличия в действии 5,7-ДОТ и миансерина на феномен реконсолидации памяти не вызывает большого удивления. Целью нашей

работы не было установления участия данного типа рецепторов в поддержании памяти и ее реконсолидации, однако на основании полученных данных можно сказать, что рецепторы серотонина второго типа характерны для нервной системы виноградных улиток и непосредственно задействованы в поддержании ассоциативной памяти у данного животного.

4.2.1. Участие серотониновых нейронов в обучении, связанном с аверсивным поведением

Каждый знает, что улитка от прикосновения может спрятаться в раковину, продемонстрировав пассивную оборонительную реакцию. Сила такой поведенческих реакций будет определяться активностью специальных клеток, выделяющих серотонин.

На данный период времени большинство ученых сходится во мнении, что серотонин необходим для обучения. Тщательное исследование функциональной роли этого нейромодулятора в обучении, связанном с аверсивным поведением, проводилось П.М Балабаном.

В его работах сообщалось, что улитки способны выстраивать ассоциации между запахом/вкусом пищи и опасными стимулами (сигнальная память), а также ассоциации между определенной обстановкой и опасными стимулами (Balaban, 1993, 2002). Для изучения функции серотониновых нейронов было выбрано временное нарушение их работы. Применение нейротоксина 5,7-ДОТ (селективно повреждающего серотонинергические нейроны) перед обучением блокировало формирование памяти обоих видов (сигнальная и обстановочная память) (Balaban et al., 1987; Balaban, Bravarenlo., 1993). Эти результаты свидетельствуют в пользу несомненной роли серотонинергических нейронов в развитии памяти с отрицательным подкреплением. Исходя из этих данных, в наших экспериментах мы тестировали именно аверсивную память после нарушения серотонинергической системы путем анализа активности идентифицированных нейронов, вовлеченных в нейронную сеть,

обеспечивающую реализацию аверсивного поведения. Также мы сделали попытку описать условия, в которых повторное напоминание ведет к угашению или реконсолидации ключевой и обстановочной памяти.

Изменения памяти животных, найденные нами в эксперименте, мы рассматриваем как результат «отключения» серотониновых нейронов, поскольку именно эти нейроны необходимы и достаточны для формирования аверзивной памяти (Balaban et al., 2001). А любое изменение в работе нейронов должно быть отражено в реализации обеспечиваемой ими формы поведения.

4.2.2. Одна серотонинергическая (модуляторная) клетка способна обеспечивать подкрепление

Как было известно из ранних работ Кэндела на аплизии, серотонин может модулировать работу нервной сети, лежащей в основе оборонительных реакций. В связи с этим был предпринят интенсивный поиск клеток, активность которых, может модулировать работу нейронов, вовлеченных в контроль оборонительного поведения виноградной улитки. Применяя локальную стимуляцию групп нервных клеток присасывающим электродом удалось установить, что только активация группы серотонинергических нейронов педального ганглия вызывает эффект увеличения ВПСП в премоторных интернейронах оборонительного поведения в ответ на тестирующее раздражение кожного нерва (Балабан, Захаров, 1992; Zakharov et al., 1995). Этот эффект полностью сходен по динамике и длительности с эффектом аппликации серотонина. Учитывая возможность того, что экстраклеточная стимуляция может активировать и другие нейроны, были проведены эксперименты с внутриклеточной стимуляцией некоторых крупных идентифицируемых нейронов из этой группы. При появлении потенциалов действия в исследуемом серотонинергическом нейроне со сравнительно большой частотой в командном нейроне было отмечено появление деполяризационной волны и

увеличение амплитуды суммарного ВПСП. Позже было установлено, что только один нейрон из группы ростральных расположенных педальных серотониновых нейронов – Пд4 – посылает свои отростки в париетальный ганглий, и, таким образом, потенциально может модулировать синаптический вход париетальных командных нейронов в ответ на стимуляцию интестинального нерва. Было показано, что внутриклеточная активация только этого нейрона из всей группы в сочетании со стимуляцией интестинального нерва приводит к долговременной потенциации ВПСП в париетальных премоторных интернейронах (Balaban et al., 2001). Эти данные позволяют считать исследованные серотонинергические нейроны участвующими в пластических изменениях в дуге оборонительного условного рефлекса.

Полученные нами данные говорят в пользу значимости одиночной клетки не только как модулирующей системы, способной изменять эффективность синаптической связи (Балабан, Захаров, 1992), но и как подкрепляющей системы оборонительного поведения виноградной улитки.

Анализ изменения активности идентифицированных нейронов после оборонительного обучения in vitro, проведенный в настоящей работе, показал, что модуляторные серотонинергические нейроны пищевого поведения не демонстрируют достоверных изменений, тогда как ответы на пищу в премоторных интернейронах оборонительного поведения изменяются качественно, от подпороговых ВПСП к сильной деполяризации и множественным ВПСП (рис.33). Ответы на пищу у идентифицированных серотонинергических нейронов, вовлеченных в оборонительное поведение, также изменялись от полного отсутствия реакции до процедуры обучения к высокочастотному спайковому разряду в ответ на предъявление пищи после обучения, что означает, что **при реактивации оборонительной памяти серотонинергические клетки активируются**, и что они непосредственно вовлечены в процесс запуска реконсолидации. В работе мы отмечали параллелизм в динамике ответов двух типов нейронов: премоторного

интернейрона и педального нейрона (рис. 34). Активация педального нейрона каким-то образом моделирует эффекты, вызываемые в командных нейронах при оборонительном подкреплении. Сама собой напрашивается мысль, что активность серотонинергических нейронов (Пд4) и есть существенная часть подкрепления. Экспериментально показано, что изменение частоты спонтанной активности серотонинергических нейронов определяет возбудимость премоторных интернейронов рефлекторной дуги оборонительного рефлекса (Zakharov et al. 1995). Поэтому выключение серотонинергических нейронов в поведенческих опытах ведет к ослаблению активности премоторных интернейронов, запускающих оборонительное поведение в норме. В нашем случае такого запуска не происходило, улитка демонстрировала отсутствие оборонительной реакции (рис. 37). Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что активность одного нейрона может иметь первостепенное значение для сохранения памяти при реактивации.

4.2.3. Два компонента памяти: ключевой и контекстуальный

В настоящем исследовании мы попытались исследовать роль серотонина в реконсолидации условного оборонительного рефлекса (исследование ключевого и контекстуального компонентов), используя нейротоксин 5,7-ДОТ, который через высоко специфичный механизм обратного захвата избирательно поступает в клетки, продуцирующие серотонин. Проводилось гистологическое исследование наличия обратного захвата у всех улиток, которым вводился нейротоксин – у всех животных через 2 месяца после введения обнаружены коричневые гранулы в серотонергических нейронах, свидетельствующие об избирательном захвате и последущем через 25 дней окислении нейротоксина (работу выполнил В.Н. Иерусалимский). Роль серотонина в реконсолидации условных оборонительных реакций изучали путем сравнения изменений ассоциативных изменений у контрольных улиток и у животных, которым был введен 5,7-ДОТ до экспериментов.

По результатам исследования стало ясно, что серотонин необходим не только для процесса консолидации, но и для процесса реконсолидации обстановочной аверсивной памяти. Группа, которой был введен только нейротоксин после тестирования Т1, продемонстрировала недостоверное ухудшение памяти (Т2) относительно первого тестирования (Т1), которое продолжалось при последующий двух тестированиях и завершилось полным отсутствием памяти об обстановке. Несколько напоминаний (каждое тестирование) у животных с поврежденной серотонинергической системой приводило к значительному ухудшению памяти вплоть до ее полной потери, тогда как в контрольной группе память сохранялась на определенном достаточно высоком уровне (рис. 37).

Качественно отличные результаты были получены относительно ключевого компонента аверсивной памяти, где было продемонстрировано, что серотонин необходим только в течение фазы консолидации для этого типа памяти. Эти улитки сохранили память о негативном значении сигнального раздражителя, наблюдалось достоверное отличие латентности взятия пищи в заключительных тестированиях от латентности до процедуры обучения. Но, в то же время, значения латентности реакции были достоверно ниже значений при тестировании сразу после обучения. Стоит отметить, что спустя 2 дня после введения нейротоксина все группы имели хорошую память (Т2), включая улиток с нарушенной серотонинергической системой. Каждая реактивация памяти (каждое тестирование) в обоих случаях (обстановочная/ ключевая память) на фоне 5,7-ДОТ вызывала постепенное стирание памяти (Т3-7, рис. 39). Только в первом случае животное забыло все, чему ее учили (обстановочная память); во втором случае (ключевая память) была достоверно ухудшена, но даже после 5 реактиваций памяти сохранялась. Частичное ухудшение памяти в экспериментах с ключевым раздражителем предполагает, что присутствовал некоторый обстановочный компонент, чувтсвительный к действию 5,7-ДОТ. Этот обстановочный

компонент неизбежно появился вследствие того, что животное проходило процедуру обучения и тестирования в одинаковых условиях.

Причиной данного отличия может быть разница в нейронных сетях (различных проекциях серотонинергических нейронов), обеспечивающих обстановочную и сигнальную память.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из направлений исследования в диссертационной работе было изучение роли атипичной изоформы протеинкиназы С зета в механизмах поддержания памяти и долговременных изменений синаптической эффективности в нервной системе виноградной улитки. Мы показали, что блокада ПКМЗ нарушает сформировавшуюся память как после обучения, так и после напоминания и запуска процесса реконсолидации (при введении блокатора ZIP через 2 или 4 часа после напоминания), а также снижает амплитуду ВПСП после выработки долговременной фасилитации. Проведенные эксперименты позволяют утверждать, что ПКМЗ необходима для поддержания долговременной обстановочной памяти и долговременных изменений синаптической эффективности у виноградной улитки. Предполагается, что одним из факторов, запускающих синтез новых молекул ПКМЗ, является серотонин, так как ранее было показано, что аппликация этого медиатора или внутриклеточная активация индивидуальных серотонергических нейронов являются основой для образования условных реакций у моллюсков. В настоящей работе исследована роль серотонинергических нейронов в реконсолидации памяти в электрофизиологических экспериментах и было показано, что серотонинергические клетки изменяют свои ответы в результате ассоциативного обучения и участвуют в реактивации памяти.

В поведенческой серии экспериментов было показано, что нарушение функционирования серотонинергической системы при помощи нейротоксина 5,7-ДОТ после того, как память сформирована, не влияет на память при однократном тестировании, но приводит к полному стиранию обстановочного компонента оборонительной памяти после нескольких последовательных реактиваций памяти. Сигнальная память на запах, ранее сочетающийся с отрицательным подкреплением, была достоверно ухудшена, но даже после нескольких реактиваций памяти сохранялась. Частичное ухудшение памяти в экспериментах с ключевым раздражителем

предполагает, что присутствовал некоторый обстановочный компонент, чувтсвительный к действию 5,7-ДОТ. Этот обстановочный компонент неизбежно появился вследствие того, что животное проходило процедуру обучения и тестирования в одинаковых условиях. Таким образом, участие модулирующих серотонинергических нейронов подкрепления может быть ключевым условием при выборе, какой процесс будет протекать – угашение или реконсолидация – при повторной реактивации обстановочной памяти. Для сигнальной памяти такая зависимость не была установлена.

Полученные результаты с разных сторон указывают на важнейшую роль серотонина как фактора подкрепления при запуске процесса реконсолидации оборонительного рефлекса и формирования следа долговременной памяти с участием молекул ПКМЗ.

Следует отметить, что мы не считаем серотонин универсальным модулятором, предназначенным в филогенезе для регуляции процесса реконсолидации. Скорее всего, для каждой формы обучения (положительное или отрицательное подкрепление) и для разных видов животных характерны свои модуляторы, или, скорее, наборы модуляторов, обеспечивающих функционирование нейронных механизмов данной формы поведения как в норме, так и при пластических модификациях поведения.

Реконсолидация и угашение памяти представляют собой эволюционно консервативные явления, которые наблюдаются у большинства позвоночных и беспозвоночных животных, что позволяет предположить, что эти феномены отражают основные характеристики образования и хранения памяти. Большое разнообразие строения мозга у различных видов позвоночных и беспозвоночных животных не позволяет считать феномены реконсолидации и угашения системными свойствами мозга, а скорее базовыми нейронными механизмами, которые могут быть обнаружены у любых животных с достаточно развитой нервной системой, независимо от конкретной архитектуры мозга. Базовым механизмом хранения долговременных синаптических изменений в нервной системе также можно

считать и контролируемый ПКМЗ молекулярный каскад доставки AMPA глутаматных рецепторов в постсинапс, который также обнаружен у всех детально изученных модельных организмов.

6. ВЫВОДЫ

Протеинкиназа М зета участвует в поддержании долговременной гетеро- и гомосинаптической фасилитации, вызванной афферентной стимуляцией и аппликацией серотонина в премоторных нейронах оборонительного поведения виноградной улитки.

Активность протеинкиназы М зета необходима для поддержания и сохранения долговременной памяти у виноградной улитки. Протеинкиназа М зета является основным кандидатом на роль специфического молекулярного звена во время консолидации, хранения и реконсолидации памяти.

Ответы модуляторного серотонинергического нейрона Пд4 на пищевой стимул появляются после сочетаний пищи с отрицательным подкреплением и наблюдаются при реактивации аверсивной памяти и запуске процесса реконсолидации.

Нарушение функционирования серотонинергической системы при помощи нейротоксина 5,7-ДОТ после того, как память сформирована, не влияет на память при однократном тестировании, но приводит к полному стиранию обстановочной памяти после нескольких последовательных реактиваций памяти.

Участие модуляторных серотонинергических нейронов системы подкрепления может быть ключевым условием при выборе, какой процесс будет протекать – угашение или реконсолидация – при повторной реактивации обстановочной памяти.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабан П.М., Захаров И.С. Обучение и развитие: общая основа двух явлений. М.: Наука, 1992. 150 с.
2. Балабан П.М., Максимова О.А., Браваренко Н.И. Пластические формы поведения виноградной улитки и их нейронные механизмы // Журн. высш. нервн. деят. 1992. Т. 42. № 6. С. 1208-1220.
3. Береговой Н.А., Гайнутдинов Х.Л., Сафронова О.Г., Савоненко А.В. Изменение поведения при выработке долговременной сенситизации оборонительного рефлекса у виноградной улитки // Журн. высш. нерв. деят. 1990. Т. 40. № 3. С. 594-596.
4. Бородинова А.А., Зюзина А.Б., Балабан П.М. Роль атипичных протеинкиназ в поддержании долговременной памяти и синаптической пластичности // Биохимия. 2017. Т. 81. № 3.
5. Воронин Л.Л. Исследование элементарных нейрофизиологических механизмов обучения // Успехи физиол. наук. 1987. Т. 18. № 2. С. 76-97.
6. Захаров И.С. Оборонительное поведение виноградной улитки // Журн. высш. нервн. деят. 1992. Т. 42. № 6. С. 1156-1169.
7. Иерусалимский В.Н., Захаров И.С., Балабан П.М. Сравнение серотонин- и дофаминергической нейронных систем у половозрелых и ювенильных наземных моллюсков Helix и Eobania // Журн. высш. нернв. деят. 1997. Т. 47. № 3. С. 563-576.
8. Котляр Б.И. Пластичность нервной системы. М.: Изд-во МГУ, 1986. 240 с.
9. Сахаров Д.А., Каботянский Е.А. Интеграция поведения крылоногого моллюска дофамином и серотонином // Журн. общей биол. 1986. Т. 47. № 2. С. 234-245.
10. Abramova M.S., Nistratova V.L., Moskvitin A.A., Pivovarov A.S. Methiothepin-Sensitive Serotonin Receptors Are Involved in the Postsynaptic Mechanism of Sensitization of the Defensive Response in the Common Snail // Neurosci. Behav. Physiol. 2006. V. 36(6). P. 589-596.

11. Adler E.M., Augustine G.J., Duffy S.N., Charlton M.P. Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse // J. Neurosci. 1991. V. 11. P. 1496–1507.
12. Anagnostaras S.G., Maren S., Fanselow M.S. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination // J. Neurosci. 1999. V. 19(3). P. 1106-1114.
13. Anokhin K.V., Tiunova A.A., Rose S.P. Reminder effects - reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks // Eur. J. Neurosci. 2002. V. 15. P. 1759-1765.
14. Antonov I., Antonova I., Kandel E.R., Hawkins R.D. The contribution of activity-dependent synaptic plasticity to classical conditioning in Aplysia // J. Neurosci. 2001. V. 21. P. 6413–6422.
15. Antonov I., Antonova I., Kandel E.R., Hawkins R.D. Activity-dependent presynaptic facilitation and hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in Aplysia // Neuron. 2003. V. 37(1). P. 135-147.
16. Balaban P.M. Behavioral neurobiology of learning in terrestrial snails // Prog. Neurobiol. 1993. V. 41. P. 1-19.
17. Balaban P.M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail // Neurosci. Biobehav. Rev. 2002. V. 26. P. 597-630.
18. Balaban P.M., Zakharov I.S., Matz V.N. Method of vital selective staining of serotonergic nerve cells by 5,7-dihydroxytryptamine // Dokladi Akademii Nauk USSR. 1985. V. 283. P. 735-738.
19. Balaban P.M., Vehovszky A., Maksimova O.A., Zakharov, I.S. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine on the food-aversive conditioning in the snail Helix lucorum L. // Brain Research. 1987. V. 404. P. 201-210.
20. Balaban P., Bravarenko N. Long-term sensitization and environmental conditioning in terrestrial snails // Exp. Brain Research. 1993. V. 96. P. 487-493.

21. Balaban P., Bravarenko N.I., Maksimova O.A., Nikitin E., Ierusalimsky V.N., Zakharov I.S. A single serotonergic modulatory cell can mediate reinforcement in the withdrawal network of the terrestrial snail // Neurobiol. Learn. Mem. 2001. V. 75. P. 30-50.
22. Balaban P.M., Korshunova T.A., Bravarenko N.I. Postsynaptic calcium contributes to reinforcement in a three-neuron network exhibiting associative plasticity // Eur. J. Neurosci. 2004. V. 19. P. 227-233.
23. Balaban P.M., Roshchin M., Timoshenko A.K., Gainutdinov K.L., Bogodvid T.K., Muranova L.N., Zuzina A.B., Korshunova T.A. Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails // Eur. J. Neurosci. 2014. V. 40(6). P. 2963-2970.
24. Balaban P.M., Roshchin M., Timoshenko A.Kh., Zuzina A.B., Lemak M., Ierusalimsky V.N., Aseyev N.A., Malyshev A.Y. Homolog of protein kinase Mzeta maintains context aversive memory and underlying long-term facilitation in terrestrial snail Helix // Front. Cell. Neurosci. 2015. V. 9. Article 222.
25. Bao J.-X., Kandel E.R., Hawkins R.D. Involvement of presynaptic and postsynaptic mechanisms in a cellular analog of classical conditioning at Aplysia sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture // J. Neurosci. 1998. V. 18. P. 458–466.
26. Barbas D., DesGroseillers L., Castellucci V.F., Carew T.J., Marinesco S. Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization inAplysia: evidence of diverse serotonin receptor subtypes // Learn. Mem. 2003. V. 10. P. 373–386.
27. Bougie J.K., Lim T., Farah C.A., Manjunath V., Nagakura I., Ferraro G.B., Sossin W.S. The atypical protein kinase C in Aplysia can form a protein kinase M by cleavage // J. Neurochem. 2009. V. 109. P. 1129 –1143.
28. Bougie J.K., Cai D., Hastings M., Farah C.A., Chen S., Fan X., McCamphill P.K., Glanzman D.L., Sossin W.S. Serotonin-induced cleavage of the atypical

protein kinase C Apl III in Aplysia // J. Neurosci. 2012. V. 32(42). P. 14630-14640.

29. Bravarenko N.I., Korshunova T.A., Malyshev A.Y., Balaban P.M. Synaptic contact between mechanosensory neuron and withdrawal interneuron in terrestrial snail is mediated by l-glutamate-like transmitter // Neuroscııo Lett. 2003. V. 341. P.237-240.
30. Brunelli M., Castellucci V., Kandel E.R. Synaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia: possible role of serotonin and cyclic AMP // Science. 1976. V. 194. P. 1178–1181.
31. Brunet J.F., Shapiro E., Foster S.A., Kandel E.R., Iino Y. Identification of a peptide specific for Aplysia sensory neurons by PCR-based differential screening // Science. 1991. V. 252. P. 856–859.
32. Burrell B.D., Sahley C.L. Serotonin depletion does not prevent intrinsic sensitization in the leech // Learn. Mem. 1999. V. 6(5). P. 509-520.
33. Byrne J.H., Kandel E.R. Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence // J. Neurosci. 1996. V. 16. P. 425–435.
34. Cai D., Chen S., Glanzman D.L. Postsynaptic regulation of long-term facilitation in Aplysia // Curr. Biol. 2008. V. 18. P. 920-925.
35. Cai D., Pearce K., Chen S., Glanzman D.L. Protein kinase M maintains long-term sensitization and long-term facilitation in aplysia // J. Neurosci. 2011. V. 31. P. 6421-6431.
36. Cai D., Pearce K., Chen S., Glanzman D.L. Reconsolidation of long-term memory in Aplysia // Curr. Biol. 2012. V. 22. P. 1783-1788.
37. Carew T.J., Castellucci V.F., Kandel E.R. An analysis of dishabituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in Aplysia // Int. J. Neurosci. 1971. V. 2. P. 79-98.
38. Carew T.J., Walters E.T., Kandel E.R. Classical conditioning in a simple withdrawal reflex in Aplysia californica // Science. 1981. V. 219. P. 397-400.

39. Carew T.J., Hawkins R.D., Kandel E.R. Differential classical conditioning of a defensive withdrawal reflex in Aplysia californica // Science. 1983. V. 219. P. 397-400.
40. Castellucci V., Pinsker H., Kupfermann I., Kandel E.R. Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in Aplysia // Science. 1970. V. 167(3926). P. 1745-1748.
41. Castellucci V., Kandel E.R. Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in Aplysia // Science. 1976. V. 194. P. 1176-1178.
42. Chen S., Fulton D., Rivera E., Glanzman D.L. Changes in glutamate receptor mRNA levels during sensitization of Aplysia californica // Soc. Neurosci. Abstr. 2008. V. 34. P. 880.
43. Chitwood R.A., Li Q., Glanzman D.L. Serotonin facilitates AMPA-type responses in isolated siphon motor neurons of Aplysia in culture // J. Physiol. 2001. V. 534. P. 501–510.
44. Clark G.A., Kandel E.R. Induction of long-term facilitation in Aplysia sensory neurons by local application of serotonin to remote synapses // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1993. V. 90(23). P. 11411-11415.
45. Clarke H.F., Dalley J.W., Crofts H.S., Robbins T.W., Roberts A.C. Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion // Science. 2004. V. 304. P. 878–880.
46. Cohen J.Y., Amoroso M.W., Uchida N. Serotonergic neurons signal reward and punishment on multiple timescales // Elife. 2015. 4.
47. Colwill R.M., Absher R.A., Roberts M.L. Context-US learning in Aplysia californica // J. Neurosci. 1988. V. 8. P. 4434-4439.
48. Conrad P., Wu F., Schacher S. Changes in functional glutamate receptors on a postsynaptic neuron accompany formation and maturation of an identified synapse // J. Neurobiol. 1999. V. 39. P. 237–248.
49. Croll R.P. Distribution of monoamines within the central nervous system of the juvenile pulmonate snail, Achatina fulica // Brain Res. 1988. V. 460. P. 29-49.

50. Dale N., Kandel E.R. L-glutamate may be the fast excitatory transmitter of Aplysia sensory neurons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 7163–7167.
51. Debiec J., LeDoux J.E., Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus // Neuron. 2002. V. 36. P. 527–538.
52. Deng Z., Lubinski A.J., Page T.L. Zeta inhibitory peptide (ZIP) erases long-term memories in a cockroach // Neurobiol. Learn. Mem. 2015. V. 118. P. 89-95.
53. Drier E.A., Tello M.K., Cowan M., Wu P., Blace N., Sacktor T.C., Jin J.C. Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in Drosophila melanogaster // Nat. Neurosci. 2002. V. 5. P. 316–324.
54. Duvarci S., Nader K., LeDoux J.E. Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning // Eur. J. Neurosci. 2005. V. 21. P. 283–289.
55. Eliot L.S., Hawkins R.D., Kandel E.R., Schacher S. Pairing-specific, activity-dependent presynaptic facilitation at Aplysia sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture // J.Neurosci. 1994. V. 14. P. 368-383.
56. Eskin A., Garcia K.S., Byrne J.H. Information storage in the nervous system of Aplysia: specific proteins affected by serotonin and cAMP // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86(7). P. 2458-2462.
57. Ezzeddine Y., Glanzman D.L. Prolonged habituation of the gill-withdrawal reflex in Aplysia depends on protein synthesis, protein phosphatase activity, and postsynaptic glutamate receptors // J. Neurosci. 2003. V.23. P. 9585–9594.
58. Ezeani M., Abe M., Onyeanusi J.C., Nnatuanya I.N., Elom S.O. A Prion like-protein, protein kinase m zeta and memory maintenance // J. Med. Med. Sci. 2012. V. 3. P. 550–555.
59. Fink K.B., Göthert M. 5-HT Receptor regulation of neurotransmitter release // Pharmacol. Rev. 2007. V. 59. P. 360–417.

60. Fonseca R., Vabulas R.M., Hartl F.U., Bonhoeffer T., Nägerl U.V. A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP // Neuron. 2006. V. 52(2). P. 239-245.
61. Gainutdinova T.H., Tagirova R.R., Ismailova A.I., Muranova L.N., Samarova E.I., Gainutdinov K.L., Balaban P.M. Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis // Learn. Mem. 2005. V. 12. P. 620-625.
62. Galanina G.N., Zakharov I.S., Maximova O.A., Balaban P.M. Role of giant serotonergic cell of the snail cerebral ganglia in feeding behavior // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. I.P. Pavlov. 1986. V. 36. P. 110-116.
63. Glanzman D.L. Common mechanisms of synaptic plasticity in vertebrates and invertebrates // Curr. Biol. 2010. V. 20(1). P. 31–36.
64. Glanzman D.L. PKM and the maintenance of memory // F1000 Biol. Rep. 2013. V. 5. P. 4.
65. Glanzman D.L., Mackey S.L., Hawkins R.D., Dyke A.M., Lloyd P.E., Kandel E.R. Depletion of serotonin in the nervous system of Aplysia reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as heterosynaptic facilitation produced by tail shock // J. Neurosci. 1989. V. 12. P. 4200-4213.
66. Glanzman D.L., Kandel E.R., Schacher S. Target dependent structural changes accompanying long-term synaptic facilitation in Aplysia neurons // Science. 1990. V. 249. P. 799–802.
67. Granzow B., Kater S.B. Identified higher-order neurons controlling the feeding motor program of Helisoma // Neurosci. 1977. V. 2. P. 1049-1063.
68. Grunbaum L., Muller U. Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee // J. Neurosci. 1998. V. 18. P. 4384–4392.
69. Haider S., Khaliq S., Ahmed S.P., Haleem D.J. Long-term tryptophan administration enhances cognitive performance and increases 5HT metabolism in the hippocampus of female rats // Amino Acids. 2006. V. 31. P. 421–425.

70. Haider S., Khaliq S., Haleem D.J. Enhanced serotonergic neurotransmission in the hippocampus following tryptophan administration improves learning acquisition and memory consolidation in rats // Pharmacol. Rep. 2007. V. 59. P. 53–57.
71. Hammer M. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees // Nature. 1993. V. 366. P. 59–64.
72. Hammer M., Menzel R. Learning and memory in the honeybee // J.Neurosci. 1995. V. 15. P. 1617-1630.
73. Haney J., Lukowiak K. Context learning and the effect of context on memory retrieval in Lymnaea // Learn. Mem. 2001. V.8. P. 35-43.
74. Hardt O., Migues P.V., Hastings M., Wong J., Nader K.. PKMzeta maintains 1-day- and 6-day-old long-term object location but not object identity memory in dorsal hippocampus // Hippocampus. 2010. V. 20(6). P. 691-695.
75. Hawkins R.D., Abrams T.W., Carew T.J., Kandel E.R. A cellular mechanism of classical conditioning in Aplysia: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation // Science. 1983. V. 219. P. 400-405.
76. Hawkins R.D., Kandel E.R., Bailey C.H. Molecular mechanisms of memory storage in Aplysia // Biol. Bull. 2006. V. 210. P. 174–191.
77. Hawkins R.D., Byrne J.H. Associative learning in invertebrates // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. V. 7(5). pii: a021709.
78. Hernandez A.I., Blace N., Crary J.F., Serrano P.A., Leitges M., Libien J.M., Weinstein G., Tcherapanov A., Sacktor T.C. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 40305–40316.
79. Hernandy L., Hiripi L., Vehovszky A., Kemenes G., Rozsa K. Ultrastructural, biochemical and electrophysiological changes induced by 5,6-dihydroxytryptamine in the CNS of the snail Helix Pomatia L // Brain Res. 1992. V. 578(1-2). P. 221-234.

80. Hirayama K., Moroz L.L., Hatcher N.G., Gillette R. Neuromodulatory control of a goal-directed decision // PLoS One. 2014. 9:e102240.
81. Hu J.Y., Glickman L., Wu F., Schacher S. Serotonin regulates the secretion and autocrine action of a neuropeptide to activate MAPK required for long-term facilitation in Aplysia // Neuron. 2004. V. 43. P. 373–385.
82. Ierusalimsky V.N., Balaban P.M. Primary sensory neurons containing command neuron peptide constitute a morphologically distinct class of sensory neurons in the terrestrial snail // Cell Tissue Res. 2007. V. 330. P. 169-177.
83. Ierusalimsky V.N., Balaban P.M. Two morphological sub-systems within the olfactory organs of a terrestrial snail // Brain Research. 2010. V. 1326. P. 68-74.
84. Il-Han J., Janes T., Lukowiak K. The role of serotonin in the enhancement of long-term memory resulting from predator detection in Lymnaea // J. Exp. Biol. 2010. V. 213. P. 3603-3614.
85. Izquierdo I., McGaugh J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation // Behav. Pharmacol. 2000. V. 11. P. 517–534.
86. Jin I., Kandel E.R., Hawkins R.D. Pre- and postsynaptic mechanisms of facilitation at Aplysia sensory-motor synapses: time and state dependence revisited // Soc. Neurosci. Abstr. 2004. V. 30. P. 515.
87. Jin I., Kandel E.R., Hawkins R.D. The roles of PKA, PKC, and CamKII in facilitation at Aplysia sensory-motor neuron synapses depend on the duration of exposure to 5HT // Soc. Neurosci. Abstr. 2005. P. 540-545.
88. Kandel E.R. Cellular insights into the multivariant nature of arousal // Neural Mechanisms in Behaviour/ Ed. By D.McFFadden, 1980. P. 260-291.
89. Kandel E.R., Schwartz J.H. Molecular biology of an elementary form of learning: modulation of transmitter release by cuclic AMP // Science. 1982. V. 218. P. 433-443.

90. Katz P.S., Frost W.N. Intrinsic neuromodulation in the Tritonia swim CPG: serotonin mediates both neuromodulation and neurotransmission by the dorsal swim interneurons // J. Neurophysiol. 1995. V. 74(6). P. 2281-2294.
91. Kemenes G. In vivo neuropharmacological and in vitro lager ablation techniques as tools in the analysis of neuronal circuits underlying behavior in a molluscan model system // Gen. Pharmacol. 1997. V. 29(1). P. 7-15.
92. Klein M., Camardo J., Kandel, E.R. Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1982. V. 79. P. 5713-5717.
93. Kwapis J.L., Jarome T.J., Lonergan M.E., Helmstetter F.J. Protein kinase Mzeta maintains fear memory in the amygdala but not in the hippocampus // Behav. Neurosci. 2009. V. 123. P. 844–850.
94. Kwapis J.L., Jarome T.J., Gilmartin M.R., Helmstetter F.J. Intra-amygdala infusion of the protein kinase Mzeta inhibitor ZIP disrupts foreground context fear memory // Neurobiol. Learn. Mem. 2012. V. 98(2). P. 148-153.
95. Kwapis J.L., Helmstetter F.J. Does PKM(zeta) maintain memory? // Brain Res. Bull. 2014. V. 105. P. 36-45.
96. Lee S.H., Kwak C., Shim J., Kim J.E., Choi S.L., Kim H.F., Jang D.J., Lee J.A., Lee K., Lee C.H., Lee Y.D., Miniaci M.C., Bailey C.H., Kandel E.R., Kaang B.K. A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in Aplysia // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2012. V. 109. P. 14200-14205.
97. Lee A.M., Kanter B.R., Wang D., Lim J.P., Zou M.E., Qiu C., McMahon T., Dadgar J., Fischbach-Weiss S.C., Messing R.O. Prkcz null mice show normal learning and memory // Nature. 2013. V. 493(7432). P. 416–419.
98. Levenson J., Byrne J.H., Eskin A. Levels of serotonin in the hemolymph of Aplysia are modulated by light/dark cycles and sensitization training // J. Neurosci. 1999. V. 19(18). P. 8094-8103.

99. Levkovitz Y., Ophir-Shaham O., Bloch Y., Treves I., Fennig S., Grauer E. Effect of l-tryptophan on memory in patients with schizophrenia // J. Nerv. Ment. Dis. 2003. V. 191. P. 568–573.

100. Li Q., Roberts A.C., Glanzman D.L. Synaptic facilitation and behavioral dishabituation in Aplysia: dependence on release of Ca2 from postsynaptic intracellular stores, postsynaptic exocytosis, and modulation of postsynaptic AMPA receptor efficacy // J. Neurosci. 2005. V.25. P. 5623–5637.

101. Ling D.S., Benardo L.S., Serrano P.A., Blace N., Kelly M.T., Crary J.F., Sacktor T.C. Protein kinase Mζ is necessary and sufficient for LTP maintenance // Nature Neurosci. 2002. V. 5. P. 295–296.

102. Ling D.S., Benardo L.S., Sacktor T.C. Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors // Hippocampus. 2006. V. 16(5). P. 443-452.

103. Linck L., Binder J., Haynl C., Enz R. Endocytosis of GABA(C) receptors depends on subunit composition and is regulated by protein kinase C-ζ and protein phosphatase 1 // J. Neurochem. 2015. V. 134(2). P. 233-246.

104. Luo M., Zhou J., Liu Z. Reward processing by the dorsal raphe nucleus: 5-HT and beyond // Learn Mem. 2015. V.22. P. 452-460.

105. Malinow R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2003. V. 358(1432). P. 707-714.

106. Malyshev A.Yu., Bravarenko N.I., Pivovarov A.S., Balaban P.M. Effects of serotonin levels on postsynaptically induced potentiation of snail neuron responses //Neurosci. Behav. Physiol. 1998. V. 28(5). P. 556-563.

107. Malyshev A.Y., Balaban P.M. Identification of mechanoafferent neurons in terrestrial snail: response properties and synaptic connections // J. Neurophysiol. 2002. V. 87. P. 2364-2371.

108. Marrazzi A.S., Hart E.R. Relationship of hallucinogens to adrenergic cerebral neurohumors // Science. 1955. V. 121. P. 365–367.

109. Martin K.C., Michael D., Rose J.C., Barad M., Casadio A., Zhu H., Kandel E.R. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is

required for long-term facilitation in Aplysia // Neuron. 1997. V. 18. P. 899–912.

110. Matus-Amat P., Higgins E.A., Barrientos R.M., Rudy J.W.. The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations // J. Neurosci. 2004. V. 24(10). P. 2431-2439.

111. Meneses A. Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory // Rev. Neurosci. 1998. V. 9. P. 275–289.

112. Migues P.V., Hardt O., Wu D.C., Gamache K., Sacktor T.C., Wang Y.T., Nader K. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking // Nature Neurosci. 2010. V. 13. P. 630–634.

113. Misanin J.R., Miller R.R., Lewis D.J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace // Science. 1968. V. 160. P. 554-555.

114. Montarolo P.G., Goelet P., Castellucci V.F., Morgan J., Kandel E.R., Schacher S. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia // Science. 1986. V. 234. P. 1249–1254.

115. Nader K. Memory traces unbound // Trends Neurosci. 2003. V. 26. P. 65–72.

116. Nader K., Schafe G.E., Le Doux J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval // Nature. 2000. V. 406. P. 722–726.

117. Nader K., Hardt O. A single standard for memory: the case for reconsolidation // Nat. Rev. Neurosci. 2009. V. 10. P. 224–234.

118. Newton A.C. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions // Chem. Rev. 2001. V. 101. P. 2353-2364.

119. Newton A.C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm // Biochem. J. 2003. V. 370(Pt 2). P. 361-371.

120. Nikitin E.S., Balaban P.M. Functional organization and structure of the serotonergic neuronal network of terrestrial snail // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. 2011. V. 61(6). P. 750-762.

121. Nikitin E.S., Balaban P.M., Kemenes G. Nonsynaptic plasticity underlies a compartmentalized increase in synaptic efficacy after classical conditioning.// Curr. Biol. 2013. V. 23(7). P. 614-619.

122. Nikitin V.P., Solntseva S.V. Peculiarities of Amnesia Development during Memory Reconsolidation Impairment Induced by Isolated or Combined Treatment with Neurotransmitter Receptor Antagonists // Bull. Exp. Biol. Med. 2013.V. 155(1). P. 6-10.

123. Nikitin V.P., Solntseva S.V., Kozyrev S.A., Nikitin P.V., Shevelkin A.V. Different components of conditioned food aversion memory// Brain Res. 2016. V. 1642. P. 104-113.

124. Ogren S.O. Evidence for a role of brain serotonergic neurotransmission in avoidance learning// Acta Physiol. Scand. 1985. V. 125. P. 1–71.

125. Osborne N.N. Putative neurotransmitters and their coexistence in gastropod molluscs. In: V. Chan-Palay, and S.L. Palay editors, Coexistence of Neuroactive Substances in Neurons, New York: Wiley, 1984. P. 395-410.

126. Parsons R.G., Davis M. Temporary disruption of fear potentiated startle following PKMzeta inhibition in the amygdale // Nat. Neurosci. 2011. V. 14. P. 295-296.

127. Pastalkova E., Serrano P., Pinkhasova D., Wallace E., Fenton A.A., Sacktor T.C. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP // Science. 2006. V. 313. P. 1141–1144.

128. Pinsker H., Kupfermann I., Castellucci V., Kandel E.R. Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in Aplysia // Science. 1970. V. 167. P. 1740–1742.

129. Pivovarov A.S., Nistratova V.L. Modulatory serotonin receptors on the soma of command neurons in edible snail // Bull. Exp. Biol. Med. 2003. V. 136(2). P. 114-116.

130. Porter R.J., Lunn R.S., O'Brien J.T. Effects of acute tryptophan depletionon cognitive function in Alzheimer's disease and in the healthy elderly // Psychol. Med. 2003. V. 33. P. 41–49.

131. Prado-Alcala R.A., Ruiloba M.I., Solana-Figueroa R., Medina C., Salado-Castillo R., Quirarte G.L. Regional infusions of serotonin into the striatum and memory consolidation // Synapse. 2003. V. 47. P. 169–175.

132. Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. Purification of the substance which is respon-sible for vasoconstrictor activity of serum // Fed. Proc. 1947. V. 6(1Pt2). P. 184.

133. Redondo R.L., Morris R.G.M. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis // Nat. Rev. Neurosci. 2011. V. 12. P. 17-30.

134. Reissner K.J., Shobe J.L., Carew T.J. Molecular nodes in memory processing: insights from Aplysia // Cell. Mol. Life Sci. 2006. V. 63. P. 963-974.

135. Ren S.Q., Yan J.Z., Zhang X.Y., Bu Y.F., Pan W.W., Yao W., Tian T., Lu W. PKC lambda is critical in AMPA receptor phosphorilation and synaptic incorporation during LTP // EMBO J. 2013. V. 32(10). P. 1365-1380.

136. Romanluk A., Koprowska M., Krotowicz M., Strzeilczuk M., Wleczorek M. Effects of 8-OH-DPAT administration into the dorsal raphe nucleus and dorsal hippocampus on fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats // Behav. Brain Res. 2001. V. 120. P. 47–57.

137. Sacktor TC. How does PKMzeta maintain long-term memory? // Nat. Rev. Neurosci. 2011. V. 12. P. 9 –15.

138. Sacktor T.C. Memory maintenance by PKMzeta - an evolutionary perspective // Mol. brain. 2012. V. 5(1). P. 31.

139. Sacktor T.C., Osten P., Valsamis H., Jiang X., Naik M.U., Sublette E. Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1993. V. 90(18). P. 8342–8346.

140. Sadeh N., Verbitsky S., Dudai Y., Segal M.. Zeta Inhibitory Peptide, a Candidate Inhibitor of Protein Kinase Mζ, Is Excitotoxic to Cultured Hippocampal Neurons // J. Neurosci. 2015. V. 35(36). P. 12404-12411.

141. Sahley C.L. Serotonin depletion impairs but does not eliminate classical conditioning in the leech Hirudo medicinalis // Behav. Neurosci. 1994. V. 108(6). P. 1043-1052.

142. Sara S.J. Strengthening the shaky trace through retrieval // Nat. Rev. Neurosci. 2000. V. 1. P. 212-213.

143. Schneider A.M., Wilkins E., Firestone A., Everbach E.C., Naylor J.C., Simson P.E. Enhanced retention in the passive-avoidance task by 5-HT1Areceptor blockade is not associated with increased activity of the central nucleus of the amygdale // Learn. Mem. 2003. V. 10. P. 394–400.

144. Selbie L.A., Schmitz-Peiffer C., Sheng Y., Biden T.J. Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells // J. Biol. Chem. 1993. V. 268(32). P. 24296-24302.

145. Serrano P., Yao Y., Sacktor T.C. Persistent phosphorylation by protein kinase Mζ maintains late-phase long-term potentiation // J. Neurosci. 2005. V. 25. P. 1979–1984.

146. Shema R., Sacktor T.C., Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM // Science. 2007. V. 317. P. 951–953.

147. Shema R., Haramati S., Ron S., Hazvi S., Chen A., Cacktor T.C., Dudai Y. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex // Science. 2011. V. 331. P. 1207-1210.

148. Solntseva S.V., Kozyrev S.A., Nikitin V.P. Involvement of Mζ-Like Protein Kinase in the Mechanisms of Conditioned Food Aversion Memory Reconsolidation in the Helix lucorum // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. V. 159(2). P. 192-196.

149. Stiedl O, Misane I, Spiess J, Ogren S.O. Involvement of the 5-HT1Areceptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice // J. Neurosci. 2000. V. 20(85). P. 15–27.

150. Tabatabaie T., Goyal R.N., Blank C.L., Dryhurst G.. Further insights into the molecular mechanisms of action of the serotonergic neurotoxin 5,7-dihydroxytryptamine // J. Med. Chem. 1993. V. 36(2). P. 229–236.

151. Tenen S.S. The effects of p-chlorophenylalanine, a serotonin depletor, on avoidance acquisition, pain sensitivity and related behavior in the rat // Psychopharmacologia. 1967. V. 10. P. 204–219.

152. Trudeau L.E., Castellucci V.F. Excitatory amino acid neurotransmission of sensory-motor and interneuronal synapses of Aplysia californica // J. Neurophysiol. 1993. V. 70. P. 1221–1230.

153. Tsokas P., Hsieh C., Yao Y., Lesburgueres E., Wallace E., Tcherepanov A., Jothianaadan D., Hartley B., Pan L., Rivard B., Farese R., Sajan M., Bergold P., Hernandez A., Cotrell J., Shouval H., Fenton A., Sacktor T. Compensation for PKMz in long-term potentiation and spatial long-term memory in mutant mice // eLife. 2016. 5: e14846.

154. Twarog B.M., Page I.H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination // Am. J. Physiol. 1953. V. 175. P. 157–161.

155. Vehovszky A., Kemenes G., Hiripi L., Hernandi L. Reversible effect of 5,6-DHT treatment on Helix: a combined behavioral , electrophysiological and biochemical study // Symposia Biologica Hungarica. 1988. V. 36. P. 403-409.

156. Vehovzsky A., Hernadi L., Elekes K., Balaban, P. Serotonergic input on identified command neurons in Helix // Acta Biol. Hung. 1993. V. 44. P. 97-101.

157. Volk L.J., Bachman J.L., Johnson R., Yu Y., Huganir R.L. PKM-ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory // Nature. 2013. V. 493(7432). P. 420–423.

158. Weiss K.R., Kupfermann I. Homology of the giant serotonergic neurons (metacerebral cells) in Aplysia and pulmonate mollusks // Brain Research. 1976. V. 117. P. 33-49.

159. Wrona M.Z., Lemordant D., Lin L., Blank C.L., Dryhurst G. Oxidation of 5-hydroxytryptamine and 5,7-dihydroxytryptamine. A new oxidation pathwayand formation of a novel neurotoxin // J. Med. Chem. 1986. V. 29(4). P. 499–505.

160. Yao Y., Kelly M.T., Sajikumar S., Serrano P., Tian D., Bergold P.J., Frey J.U., Sacktor T.C. PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors // J. Neurosci. 2008. V. 28(31). P. 7820-7827.

161. Zakharov I.S., Balaban P.M. Neural mechanisms of age-dependent changes in avoidance behavior of the snail Helix lucorum // Neurosci. 1987. V. 23. P. 721-729.

162. Zakharov I.S., Ierusalimsky V.N., Balaban P.M. Pedal serotonergic neurons modulate the synaptic input of withdrawal interneurons in Helix // Invert. Neurosci. 1995. V. 1. P. 41-51.