

0-796292

*На правах рукописи*



**Валеева Гузель Равилевна**

**ПОСТСИНАПТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ  
КИСЛОТЫ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА НОВОРОЖДЕННЫХ  
КРЫС И МЫШЕЙ**

03.03.01 – физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань - 2012

Работа выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН, г. Казань) и в лаборатории ранней активности развивающегося мозга Средиземноморского института нейробиологии INMED INSERM U 901 – Université Aix-Marseille-II (г. Марсель) в рамках программы двойной аспирантуры под совместным русско-французским руководством.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, академик РАН  
Никольский Евгений Евгеньевич

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор, зав.  
кафедрой физиологии человека и животных  
Казанского (Приволжского) федерального  
университета  
Ситдикова Гузель Фаритовна

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КФУ



0000791075

доктор биологических наук, доцент  
кафедры физиологии ФГБОУ ВПО  
«Казанская государственная академия  
ветеринарной медицины имени Н.Э.  
Баумана»

Каримова Руфия Габдельхаевна

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт эволюционной  
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук

Защита состоится 29 июня 2012г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.02 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Автореферат разослан 28 мая 2012г. и размещен на сайте <http://www.mon.gov.ru/> и // [www.ksavm.senet.ru/](http://www.ksavm.senet.ru/)

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

Гильмутдинов Р.Я.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность исследования*

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является основным медиатором торможения в коре головного мозга взрослых млекопитающих. ГАМК вырабатывается особым классом нейронов – интернейронами, которые составляют примерно 10-20% от общего числа нейронов. В тормозных синапсах освобождение ГАМК вызывает активацию проницаемых для  $Cl^-$  ГАМК<sub>A</sub> рецепторов на постсинаптической мембране. Это приводит к кратковременному увеличению проводимости клеточной мембраны, лежащему в основе шунтирующего торможения, или гиперполяризации, приводящей к торможению вследствие удаления мембранного потенциала от порога генерации потенциала действия (ПД).

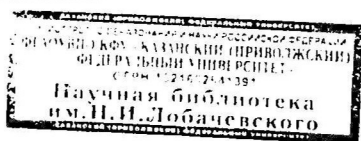
Нарушение ГАМКергического ингибирования приводит к изменениям в балансе между возбуждением и торможением и, как следствие, к изменениям активности нейрональных сетей. Изменение этого баланса в коре головного мозга часто сопровождается эпилептическими разрядами. Так, значительное количество врожденных и приобретенных эпилептических синдромов является следствием нарушения работы ГАМКергической тормозной системы. Интересно, что при некоторых эпилептических синдромах, а также в результате травмы или гипоксии происходит изменение полярности ГАМКергических ответов из гиперполяризующих в деполяризующие (Cohen *et al.*, 2002; Breitwieser *et al.*, 1996; van den Pol *et al.*, 1996; Khalilov *et al.*, 2003). Это происходит вследствие увеличения внутриклеточной концентрации  $Cl^-$  и сдвига потенциала реверсии ГАМК ответов ( $E_{\text{ГАМК}}$ ) к более положительным значениям. Таким образом теряется важный компонент ГАМКергического торможения, связанный с гиперполяризацией. Более того, при значительном увеличении внутриклеточной концентрации  $Cl^-$  деполяризующее действие ГАМК может приводить к клеточному возбуждению, то есть при этом может происходить качественное изменение в действии ГАМК от тормозного к возбуждающему.

Если возбуждающее действие ГАМК в ЦНС взрослого млекопитающего проявляется, в основном, в патологических состояниях, то на ранних этапах онтогенеза возбуждение, производимое активацией ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, считается общепринятым правилом (Freund & Buzsaki, 1996; Ben-Ari *et al.*, 1997; Leinekugel *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2000; Somogyi & Klausberger, 2005; Ben Ari *et al.*, 2007; Tepper *et al.*, 2010). Как

и в патологических состояниях, возбуждающее действие ГАМК в раннем онтогенезе объясняется повышенным содержанием СГ в незрелых нейронах и, как следствие, более положительным, чем потенциал покоя (ПП), значением потенциала реверсии ГАМК опосредованных ответов ( $E_{\text{ГАМК}}$ ). Возбуждающее действие ГАМК играет важную роль в генерации ранних паттернов сетевой нейрональной активности (в частности, так называемых гигантских деполяризующих потенциалов в гиппокампе) в то время, когда количество синаптических связей еще невелико. Считается, что на этих этапах развития малое количество синапсов, которые необходимы для активации нейрональной сети, компенсируется возбуждающим действием ГАМК.

Доказательства деполяризующего и возбуждающего действия ГАМК на незрелые нейроны были получены практически во всех структурах центральной нервной системы (ЦНС) у самых разных видов животных с помощью электрофизиологических и оптических экспериментальных методов. Это позволяет считать, что возбуждающее действие ГАМК является универсальным свойством развивающегося мозга. Однако несмотря на значительное количество данных, свидетельствующих о возбуждающем действии ГАМК на ранних этапах развития, совершенно неизученным остается вопрос о ключевом свойстве возбуждающей синаптической передачи, а именно о временных задержках проведения возбуждения в ГАМК синапсах и факторах, которые эти задержки определяют. Эта информация является ключевой для понимания механизмов работы развивающейся нейрональной сети гиппокампа, в которой ГАМКергическое возбуждение является одним из ключевых факторов. Кроме того, все наблюдения, свидетельствующие о деполяризующем и возбуждающем действии ГАМК на нейроны развивающегося мозга были получены с использованием *in vitro* препаратов срезов мозга и нейрональных культур, приготовление которых неизбежно приводит к повреждению нейронов и может вызывать изменение характера действия ГАМК от тормозного к возбуждающему, вторичному травме. Однако на сегодняшний день не известно, какой вклад нейрональная травма вносит в феномен возбуждающего действия ГАМК у новорожденных животных.

### **Цель и задачи исследования**



Целью данной работы было исследовать свойства возбуждающей ГАМКергической синаптической передачи в коре головного мозга крыс и мышей на ранних этапах постнатального развития.

*В соответствии с целью были сформулированы следующие задачи исследования:*

1. Определить роль травматизации нейронов в ходе приготовления срезов гиппокампа в возбуждающем действии ГАМК.
2. Определить временные характеристики возбуждения в ГАМКергическом синапсе развивающегося гиппокампа *in vitro*.
3. Выявить факторы, определяющие кинетику постсинаптического ГАМК<sub>A</sub> опосредованного ответа и свойства ГАМКергического возбуждения.

#### ***Положения, выносимые на защиту***

- Феномен смены тормозного действия ГАМК на возбуждающее вследствие повреждения нейронов при нарезке срезов гиппокампа обнаруживается в приповерхностной области среза в течение второй постнатальной недели. Однако нейрональная травма не является причиной возбуждающего действия ГАМК в развивающемся мозге крыс и мышей в ходе первой недели после рождения.
- Передача возбуждения в ГАМКергическом синапсе гиппокампа происходит с длительной и вариабельной задержкой, поскольку при физиологических значениях концентрации внутриклеточного хлора деполаризация постсинаптической мембраны, вызванная активацией ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, в большинстве случаев не достигает порога возникновения ПД. Достаточный для возбуждения уровень деполаризации достигается за счет активации подпороговой неактивируемой натриевой проводимости.

#### ***Научная новизна***

В ходе проведенных исследований был обнаружен феномен смены полярности ГАМК<sub>A</sub> опосредованных ответов нейронов, расположенных вблизи поверхности среза гиппокампа и повреждающихся вследствие перерезки их нейрональных отростков при нарезке срезов.

Впервые показано возбуждающее действие ГАМК на нейроны интактного гиппокампа мышей *in vitro* в первые дни постнатального развития.

Описаны временные характеристики возбуждения в ГАМКергическом синапсе гиппокампа новорожденных крыс. Показано, что передача возбуждения в развивающемся ГАМКергическом синапсе происходит с длительной и высоко варибельной задержкой.

Впервые установлены: (I) зависимость временных параметров проведения возбуждения в ГАМКергическом синапсе от концентрации  $Ca^{2+}$  в постсинаптическом нейроне и (II) участие подпороговой натриевой проводимости в генерации постсинаптических ПД.

### ***Научно-практическая значимость работы***

Характеристика действия ГАМК на постсинаптические нейроны коры развивающегося мозга крайне важна для понимания процессов, происходящих в ЦНС на ранних этапах развития организма, поскольку в гиппокампе как грызунов, так и приматов ГАМКергические синаптические контакты устанавливаются одними из первых в онтогенезе. Полученные данные также имеют большое значение для исследования физиологических паттернов сетевой активности развивающегося мозга, в которых ГАМКергическая нейротрансмиссия выполняет одну из ключевых ролей, и патологических состояний, связанных с нарушением ГАМКергического торможения, таких как эпилепсия и травма нейронов головного мозга. Данные о смене полярности ГАМК опосредованных ответов вследствие повреждения нейронов в процессе приготовления срезов гиппокампа позволяют расширить существующие представления о специфике этого, одного из наиболее популярных среди нейробиологов, объекта исследований, что дает возможность корректировать и вносить новые аспекты в интерпретацию получаемых с его помощью данных.

Результаты работы могут применяться в клинических исследованиях, нейропедиатрии, при разработке антиэпилептических фармакологических препаратов, а также при исследовании последствий травмирования нервной ткани.

### ***Апробация работы***

Результаты работы были представлены на Всероссийской научно-теоретической конференции «Физиологические механизмы адаптации

растущего организма», на Всероссийской научной конференции с международным участием «Теоретические основы физической культуры», на Коллоквиуме докторской школы биологических наук и наук о здоровье Средиземноморского университета Aix-Marseille II (XVIII<sup>e</sup> Colloque de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé), а также на международной конференции Society for Neuroscience of USA (2011, Washington DC).

Работа выполнена при поддержке стипендии правительства Франции для написания диссертации под совместным русско-французским руководством Bourse de these en co-tutelle (№2009 4711), грантами FRM, ANR, грантом Президента РФ «Ведущая научная школа» НШ-64631.2010.7, а также грантом Правительства РФ ведущим ученым №11.G34.31.0075.

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ (три из которых – в международных изданиях), и тезисы 4 докладов.

### ***Структура и объем диссертации***

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка используемой литературы и списка сокращений. Работа оформлена на 122 страницах и иллюстрирована 16 рисунками. Список литературы содержит 273 источника.

### ***Список используемых сокращений***

ГАМК-ПСП – ГАМКергический постсинаптический потенциал

ГАМК-ПСТ - ГАМКергический постсинаптический ток

ДС<sub>ГАМК</sub> – движущая сила ГАМК ответа

mГАМК-ПСП – смоделированный ГАМКергический постсинаптический потенциал

mM – ммоль/л

мкM – мкмоль/л

ПД – потенциал действия

ПП – потенциал покоя

E<sub>ГАМК</sub> - потенциал реверсии ГАМК ответа

INap – неинактивируемый натриевый ток

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Объекты и растворы*

Эксперименты проводили на препаратах срезов гиппокампа и интактного гиппокампа *in toto*. Для приготовления *in vitro* препаратов использовали лабораторных крыс линии Wistar и мышей линии Swiss. Все экспериментальные процедуры с использованием лабораторных животных проводили в соответствии с директивой Евросовета и Европарламента от 22 сентября 2010г. о защите животных, используемых в научных целях (Directive 2010/63/EU).

Толщина срезов, нарезаемых перпендикулярно длинной оси гиппокампа, составляла 450 мкм, за исключением экспериментов по исследованию глубинного профиля действия ГАМК, для которых использовали срезы, толщиной 550 мкм. Готовые препараты помещали в оксигенированный (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) раствор искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦСЖ) следующего состава (в мМ): NaCl 126, KCl 3.5, CaCl<sub>2</sub> 2.0, MgCl<sub>2</sub> 1.3, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, глюкоза 11 (pH 7.4), и выдерживали при комнатной температуре (20-22° С) около часа перед регистрацией. Для регистрации препарат размещали на нейлоновой сетке, расположенной вблизи основания перфузируемой камеры объемом 2 мл так, что непрерывно оксигенируемый раствор ИЦСЖ равномерно омывал препарат со всех сторон. Скорость перфузии при регистрации срезов составляла 2 мл/мин, тогда как интактный гиппокамп перфузировали со стандартной скоростью 4-6 мл/мин для обеспечения доступа кислорода к нейронам в глубине препарата. Скорость перфузии препарата интактного гиппокампа увеличивали до 8-10 мл/мин в экспериментах с аппликацией изогуацина, что обеспечивало кратковременность аппликации.

В экспериментах использовали следующие вещества (фирмы Sigma и фирмы Tocris): тетродотоксин (ТТХ), фенитоин, 6-циано-7-нитрокиноксалин-2,3-дион (CNQX), буметанид, изогуацина гидрохлорид, D-(-)-2-амино-5-фосфопентановая кислота (APV), (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-дихлорофенил)этил]амино-2-гидроксипропил](фенилметил)фосфорноватистой кислоты гидрохлорид (CGP55845), биккуллина метиодид.

### *Внеклеточная и пэтч-кламп регистрация активности нейронов*

Внеклеточную регистрацию полевых потенциалов и популяционной активности нейронов проводили при помощи электрода, изготовленного из

вольфрамовой проволоки, диаметром 50 мкм, располагаемого в СА3 области пирамидного слоя клеток гиппокампа. Для регистрации нейрональной активности на разной глубине гиппокампального среза использовали шестнадцатиканальный силиконовый датчик с расстоянием между соседними расположенными в один ряд электродами в 50 мкм. Диаметр электродов датчика также составлял 50 мкм. Усиление и оцифровку регистрируемых сигналов (с частотой 10 кГц) осуществляли с помощью изготовленного по заказу многоканального усилителя (x1000, фильтр 0.1 Гц-4 кГц) и аналого-цифрового преобразователя Digidata 1440A. Для анализа популяционной активности нейронов данные внеклеточной регистрации фильтровали с помощью фильтра высоких частот (>200 Гц), на рисунках также представлены отфильтрованные записи.

Пэтч-кламп регистрацию проводили с использованием усилителей Axopatch 200A и EPC-9. Пэтч пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров. Внутрипипеточный раствор для пэтч-кламп регистрации в конфигурации «целая клетка» содержал (в мМ): глюконат калия (0-135) или KCl (0-135); MgCl<sub>2</sub> 2; Hepes 10; Mg-АТФ 4; Na-ГТФ 0.3; для выведения рН раствора до значения 7.3 использовали КОН.

#### ***Регистрация ответов, вызванных синаптической активацией ГАМК<sub>A</sub> рецепторов***

Синаптические ГАМК<sub>A</sub> опосредованные ответы вызывали с помощью электрической стимуляции ГАМКергических терминалей, образующих синаптические контакты на поверхности нейронов СА3 области гиппокампа. Электрическую стимуляцию осуществляли биполярным электродом, изготовленным в виде стеклянной тета-пипетки или парной изолированной нихромовой проволоки, на расстоянии до 500 мкм от регистрирующего электрода в присутствии антагонистов ионотропных глутаматных (10 мкМ CNQX, 40 мкМ APV) и ГАМК<sub>B</sub> (1 мкМ CGP 55845) рецепторов. Отдельные эксперименты, в которых ответы на электрическую стимуляцию частично или полностью сохранялись в присутствии антагониста ГАМК<sub>A</sub> рецепторов бикукуллина (20 мкМ), из дальнейшего анализа исключали.

В экспериментах с пэтч-кламп регистрацией ГАМКергических ПСП в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока порог возникновения постсинаптических ПД определяли как значение мембранного потенциала, при котором величина  $dU/dt$  превышала 10 В/с (Stuart *et al.*, 1997; Fricker *et al.*, 1999). Величину задержки проведения ГАМК опосредованного возбуждения определяли как время между началом стимула и пиком ПД,

генерируемого постсинаптической клеткой. Оценку длительности задержки и вероятности возникновения ПД в каждой клетке проводили среди сотни вызванных ГАМКергических постсинаптических потенциалов (ГАМК-ПСП).

#### ***Моделирование ГАМКергических постсинаптических потенциалов***

Смоделированные ГАМК-ПСП (мГАМК-ПСП) получали, подавая через пэтч электрод на мембрану регистрируемой клетки ток в форме ГАМКергического постсинаптического тока (ГАМК-ПСТ), полученный путем усреднения сотни спонтанных ГАМК-ПСТ, предварительно зарегистрированных в режиме фиксации потенциала в присутствии антагонистов ионотропных глутаматных рецепторов аналогично процедуре, описанной для глутаматергических синапсов (Fricker & Miles, 2000). Для каждого нейрона подбирали такую амплитуду ГАМК-ПСТ, которая была необходима для активации околороговых ответов.

#### ***Регистрация активности одиночных НМДА и ГАМК каналов***

Для регистрации активности одиночных ГАМК<sub>A</sub> каналов в пэтч-кламп конфигурации «на клетке» использовали внутрипипеточный раствор следующего состава (в мМ): NaCl 120, TEA-Cl 20, KCl 5, 4-аминопиридин 5, CaCl<sub>2</sub> 0.1, MgCl<sub>2</sub> 10, глюкоза 10, Hepes-NaOH 10 и ГАМК. pH раствора выводили до значений 7.2-7.3. ГАМК (1-2 мкМ) добавляли из замороженного матричного раствора в день эксперимента. Движущую силу ГАМК<sub>A</sub> опосредованных ответов рассчитывали по вольт-амперной характеристике токов, протекающих через ГАМК<sub>A</sub> каналы (Tyzio *et al.*, 2006), и корректировали на величину ошибки в 2 мВ (Tyzio *et al.*, 2008).

ПП нейронов определяли по вольт-амперной характеристике токов, протекающих через одиночные НМДА каналы (Leinekugel *et al.*, 1997; Tyzio *et al.*, 2003). Поскольку НМДА токи реверсируют приблизительно около 0 мВ (Nowak *et al.*, 1984), то при регистрации в конфигурации «на клетке» реверсия происходит при потенциале на пэтч пипетке, равном ПП клетки. Внутривнутрипипеточный раствор для регистрации НМДА каналов содержал ИЦСЖ без Mg<sup>2+</sup>, 10 мкМ НМДА, 10 мкМ глицина и 1 мкМ стрихнина. Многоуровневые, а также короткие открывания НМДА каналов в анализ не включали.

#### ***Статистический анализ данных***

Полученные данные анализировали автономно с использованием следующего программного обеспечения: пакет pClamp 10.0 (Molecular Devices), miniAnalysis (Synaptosoft), IGOR Pro (WaveMetrics), MATLAB

(MathWorks), Statistica 10 (StatSoft), Origin 7.0 (Microcal Software). Групповые данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Статистическую оценку существования различий в сравниваемых выборках оценивали для 5% уровня значимости с помощью Т-критерия Стьюдента и критерия согласия Колмогорова-Смирнова.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. ГАМК опосредованное возбуждение *in vitro* - физиологический феномен или результат травматизации нейронов?

Возбуждающее действие ГАМК не ограничивается классическим эффектом на незрелые нейроны развивающегося мозга *in vitro*. Согласно данным литературы, ГАМК может оказывать деполяризующий и возбуждающий эффект на зрелые нейроны, подвергавшиеся различным видам травмирующего воздействия, таким как нарушение осмотического баланса, перегрев и перерезка аксонов (van den Pol *et al.*, 1996; Nabekura *et al.*, 2002), а также сопровождающим некоторые патологические состояния ЦНС (Cohen *et al.*, 2002; Khalilov *et al.*, 2003; De Koninck, 2007; Price *et al.*, 2009a).

В связи с этим возникает вопрос, не является ли ГАМК опосредованное возбуждение в синапсах развивающегося мозга *in vitro* следствием посттравматического изменения характера действия ГАМК? Как известно, основные доказательства деполяризующего и возбуждающего действия ГАМК на незрелые нейроны были получены с помощью *in vitro* препаратов срезов мозга, диссоциированных нейронов и нейрональных культур. Во время нарезки срезов нейроны сильно повреждаются, особенно те из них, которые расположены вблизи поверхности среза (Bak *et al.*, 1980). Еще большим повреждающим воздействиям нейроны подвергаются во время диссоциации из ткани и пересадки клеточных культур. Кроме того известно, что хотя ГАМК возбуждает нейроны в срезах гиппокампа в течение первой недели после рождения, в интактном *in vitro* препарате целого гиппокампа (*in toto*), где степень повреждения нейронов достаточно ограничена по сравнению со срезом (Khalilov *et al.*, 1997), ГАМК оказывает противоположное тормозное воздействие на активность нейронов у животных, в возрасте 5-7 дней постнатального развития (Dzhala *et al.*, 2010).

Для проверки гипотезы о возможной роли нейрональной травмы, сопутствующей приготовлению срезов мозга, в возбуждающем действии

ГАМК на ранних этапах онтогенеза 1) проводили более детальный анализ действия ГАМК в препаратах *in toto* гиппокампа начиная с первого дня после рождения в течение всей последующей недели, а также 2) оценивали действие ГАМК на разных глубинах среза гиппокампа новорожденных животных, исходя из представления о том, что если возбуждающее действие ГАМК является следствием травматизации клеток при нарезке срезов, то оно должно быть наиболее выраженным вблизи поверхности среза, где больше поврежденных клеток.

### ***1.1. Действие ГАМК в синапсах интактного гиппокампа *in vitro* в ходе первой постнатальной недели.***

С помощью внеклеточной регистрации популяционной активности нейронов (ПАН) пирамидного слоя интактного гиппокампа новорожденных мышей исследован эффект кратковременной аппликации селективного агониста ГАМК<sub>A</sub> рецепторов изогуацина (10 мкМ в течение 1 мин) начиная с первого дня до конца первой недели постнатального развития. В контрольных условиях ПАН, представляющая собой внеклеточные ПД от десятков нейронов, окружающих регистрирующий электрод, была сгруппирована в гигантские деполяризующие потенциалы (ГДП), характерный для данного возраста паттерн активности гиппокампальной сети нейронов. В интактном *in toto* гиппокампе мышей в возрасте от одного до трех дней после рождения (P1-3) аппликация изогуацина вызывала кратковременное увеличение частоты организованной в ГДП активности нейронов от  $0.5 \pm 0.1 \text{ c}^{-1}$  до  $1.4 \pm 0.2 \text{ c}^{-1}$  ( $n=8$  мышей;  $P < 0.001$ ). Возбуждающие ответы на аппликацию изогуацина также наблюдали в интактном гиппокампе мышей в течение четвертого и пятого постнатальных дней (P4-5), но не в гиппокампах животных старше P5. Активация ГАМК<sub>A</sub> рецепторов синаптической ГАМК, высвобождаемой в ответ на электрическую стимуляцию ГАМКергических терминалей в присутствии антагонистов ГАМК<sub>B</sub> рецепторов и ионотропных рецепторов глутамата, также вызывала повышение ПАН в *in toto* препаратах гиппокампа мышей в возрасте P2-3. При этом наблюдалось двенадцатикратное увеличение частоты ПАН относительно базового уровня активности ( $n=3$  мыши;  $P < 0.05$ ), и этот эффект блокировался антагонистом ГАМК<sub>A</sub> рецепторов бикакуллином (20 мкМ). Напротив, в *in toto* гиппокампах животных старше P3 синаптическая активация ГАМК<sub>A</sub> рецепторов оказывала угнетающий эффект на активность нейронов, в 0.3 раза снижая частоту ПАН по сравнению с базовым уровнем

активности. Данный эффект также устранялся с помощью бикикуллина ( $n=3$  мыши;  $P<0.05$ ).

Таким образом, активация ГАМК<sub>A</sub> рецепторов как с помощью экзогенного агониста, так и эндогенной ГАМК, высвобождающейся при активации ГАМК синапсов, приводит к возбуждению нейронов интактного гиппокампа мышей в первые дни постнатального развития. Возбуждение в ответ на активацию ГАМК<sub>A</sub> рецепторов сменяется торможением к концу первой постнатальной недели. При этом возрастное изменение эффекта синаптической ГАМК происходит раньше, чем смена эффекта изогувацина, что характерно и для срезов гиппокампа (Tuzio et al., 2007; Tuzio et al., 2008).

### ***1.2. Движущая сила ГАМК<sub>A</sub> опосредованных ответов в синапсах интактного гиппокампа новорожденных мышей.***

ГАМК оказывает возбуждающее действие на незрелые нейроны благодаря деполяризованным значениям потенциала реверсии ГАМК ответов ( $E_{\text{ГАМК}}$ ) и деполяризующей движущей силе ( $ДС_{\text{ГАМК}}$ ), действующей на трансмембранные ГАМК<sub>A</sub> опосредованные токи. Для оценки  $ДС_{\text{ГАМК}}$  в нейронах *in toto* гиппокампа на второй и пятый дни после рождения проводилась регистрация токов, протекающих через одиночные ГАМК<sub>A</sub> каналы, в пэтч-кламп конфигурации «на клетке». Параллельно, с помощью регистрации токов, протекающих через НМДА каналы, в том же препарате оценивали мембранный потенциал покоя (ПП) нейронов - второй параметр, определяющий величину  $ДС_{\text{ГАМК}}$ . Оказалось, что на второй день после рождения в большинстве зарегистрированных нейронов  $E_{\text{ГАМК}}$  имеет деполяризующие значения в диапазоне от 1 до 20 мВ, составляя в среднем  $9\pm 2$  мВ ( $n=10$  клеток). При этом среднее значение ПП нейронов в этом возрасте было равным  $-74\pm 2$  мВ ( $n=4$  клетки).  $E_{\text{ГАМК}}$  в нейронах интактного гиппокампа двухдневной мыши, рассчитанный как разница между средним значением ПП и  $ДС_{\text{ГАМК}}$ , был равным  $-66\pm 2$  мВ ( $n=10$  клеток). Напротив, в нейронах *in toto* гиппокампа пятидневной мыши значение  $E_{\text{ГАМК}}$  было более негативным по сравнению с животными в возрасте P2 и составляло  $-78\pm 1$  мВ ( $n=12$  клеток). Среднее значение  $ДС_{\text{ГАМК}}$  при этом было равным  $-8\pm 1$  мВ ( $n=12$  клеток), а ПП был немного более деполяризованным, чем в нейронах интактного гиппокампа двухдневного животного ( $-71\pm 4$  мВ;  $n=11$  клеток).

Полученные данные свидетельствуют о том, что как и в срезах, ГАМК деполяризует нейроны интактного *in toto* гиппокампа, и деполяризующий ГАМК ответ сменяется на гиперполяризующий к пятому дню постнатального

развития. Это согласуется с выявленным в интактном гиппокампе возрастным изменением эффекта синаптической ГАМК на ПАН с возбуждающего в течение P1-3 на тормозный начиная с P4.

### ***1.3. Профиль действия ГАМК на разных глубинах гиппокампального среза в зависимости от возраста животного .***

С помощью многоканального силиконового датчика, содержащего 16 электродов, расположенных в один ряд на расстоянии 50 мкм друг от друга, оценивались внеклеточные ответы нейронов на разных глубинах среза гиппокампа крыс в возрасте от четырех до двадцати девяти дней после рождения, вызванные активацией ГАМК<sub>A</sub> рецепторов.

В течение первых двух недель после рождения ПАН в контрольных условиях была организована в виде ГДП, которые генерировались синхронно по всей глубине среза. Ни в одном из экспериментов ингибирования ПАН в глубине среза во время поверхностных ГДП не наблюдали. В ходе первой недели постнатального развития (P4-5) кратковременная аппликация агониста ГАМК<sub>A</sub> рецепторов изогуваина (10 мкМ в течение 1 мин) вызвала синхронное повышение частоты ПАН по всей глубине среза. При этом на поверхностных электродах частота ПАН в присутствии изогуваина увеличивалась по отношению к базовому уровню активности в 1,6 раз, а на глубинных электродах в 2 раза (n=5 срезов; P<0.001). В течение второй недели после рождения (P7-15) изогуваин также вызывал возбуждающий эффект, равновыраженный на всех глубинах. Так, частота ПАН при аппликации изогуваина на поверхности и в глубине среза увеличивалась, соответственно, в 2.4 и 2.8 раза (n=19 срезов; P<0.001). Смена эффекта изогуваина от возбуждающего к тормозному происходила в конце второй недели после рождения, что соответствует существующим в литературе данным (Khazipov *et al.*, 2004; Tyzio *et al.*, 2008). В 2/3 всех зарегистрированных срезов, начиная с P19, нейрональная активность в контроле была организована в острые волны (sharp waves; Ylinen *et al.*, 1995), которые ингибировались изогуваиноом одинаково эффективно по всей глубине среза. При этом частота ПАН у крыс, в возрасте P19-29, снижалась в 0.7 раз в присутствии изогуваина как на поверхностных, так и на глубинных электродах (n=7 срезов; P<0.01).

Поскольку одну из ключевых ролей в генерации сетевых событий в гиппокампе выполняют глутаматергические связи (Buzsaki, 1986; Khazipov *et*

al., 1997;Bolea et al., 1999), то на следующем этапе исследования оценивали ГАМК<sub>A</sub> рецептор опосредованные эффекты изогувацина на разных глубинах среза в присутствии блокаторов глутаматных (CNQX, APV), а также ГАМК<sub>B</sub> (CGP55845) рецепторов. В течение первой недели после рождения (P4-5) изогувацин увеличивал частоту ПАН по всей глубине среза, без каких-либо различий в величине ответа между электродами, расположенными на разных глубинах (n=6 срезов). В ходе второй недели (P7-15) изогувацин оказывал возбуждающий эффект в приповерхностной области среза, однако на глубинных участках регистрации подавлял активность нейронов (n=18 срезов; P<0.001 по сравнению с поверхностью). Во время третьей и четвертой недель постнатального развития такого изменения полярности ГАМК ответов в приповерхностной области среза не наблюдали, и изогувацин неизменно вызывал равномерное ингибирование ПАН по всей глубине среза (n=5 срезов).

При аппликации изогувацина происходит активация как синаптических, так и экстрасинаптических ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, поэтому также проводили оценку внеклеточного ответа нейронов на разной глубине среза на активацию только синаптических ГАМК<sub>A</sub> рецепторов эндогенной ГАМК, высвобождаемой при электрической стимуляции ГАМКергических терминалей. В соответствии с данными, полученными с помощью изогувацинового теста, синаптическая активация ГАМК<sub>A</sub> рецепторов вызывала увеличение частоты ПАН по всей глубине среза в течение первой постнатальной недели (n=7 срезов). Начиная со второй недели и до конца первого месяца постнатального развития электрическая стимуляция неизменно вызывала ингибирование активности нейронов на всех регистрируемых глубинах среза (n=24 среза).

Таким образом, ни один из трех тестов не выявил функциональных различий в действии ГАМК на нейроны, расположенные у поверхности и в глубине гиппокампального среза новорожденных крыс в течение первой недели после рождения. Однако в течение второй постнатальной недели с помощью изогувацинового теста в присутствии блокаторов глутаматных и ГАМК<sub>B</sub> рецепторов показано изменение полярности ГАМК<sub>A</sub> опосредованных ответов вблизи поверхности среза, где нейроны подвергаются наибольшей травматизации при нарезке срезов. Данный феномен не наблюдался у животных в возрасте P19-29, что может быть связано с повышенной скоростью гибели поврежденных нейронов в срезах гиппокампа более взрослых животных, тогда как у крыс в возрасте P7-15 нейроны,

находящиеся в зоне повреждения, остаются функциональными, демонстрируя инверсию полярности ГАМК<sub>A</sub> опосредованных ответов.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что на самых ранних этапах постнатального развития ГАМК оказывает деполяризующее действие на нейроны как в гиппокампальных срезах, так и в интактном гиппокампе. При этом возбуждающее действие ГАМК в ходе первой недели постнатального развития не является следствием повреждения нервной ткани вследствие перерезки нейрональных отростков во время приготовления срезов мозга.

## **2. Характеристика передачи возбуждения в ГАМКергическом синапсе.**

### ***2.1. Синаптическая задержка в ГАМКергическом синапсе гиппокампа.***

Для оценки временных характеристик ГАМКергического возбуждения определяли величину задержки проведения ПД в синапсах, образованных ГАМКергическими интернейронами на поверхности клеток CA3 области гиппокампа. Постсинаптические ответы, опосредованные активацией ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, вызывали электрической стимуляцией ГАМКергических терминалей в присутствии антагонистов ионотропных глутаматных и ГАМК<sub>B</sub> рецепторов в срезах гиппокампа новорожденных крыс в возрасте от двух до шести дней после рождения. Регистрацию постсинаптических ПД от десятков нейронов, возникающих в ответ на стимуляцию, производили внеклеточно с тем, чтобы не нарушить внутриклеточную концентрацию СГ и ПП регистрируемых клеток. Было показано, что пик распределения задержек отдельных ПД в ходе ответа приходился на  $28 \pm 6$  мс после стимула, полуширина распределения составляла  $71 \pm 13$  мс, а постоянная времени спада  $76 \pm 18$  мс ( $n=8$ ). Эти данные свидетельствуют о том, что задержка проведения ПД в возбуждающем ГАМКергическом синапсе длительна и высоко вариабельна.

### ***2.2. Зависимость временных параметров ГАМК опосредованного возбуждения от внутриклеточной концентрации СГ.***

#### ***2.2.1. Синаптическая задержка и концентрация СГ внутри клетки***

В отличие от классических возбуждающих медиаторов (ацетилхолин, глутамат), активирующих неселективную монокатионную проводимость с потенциалом реверсии трансмембранного тока около 0 мВ и движущей

силой, по величине равной ПП, ГАМК<sub>A</sub>-опосредованные ответы характеризуются значительно более негативным значением потенциала реверсии, а значит, относительно небольшой движущей силой. Вероятно, это является главным фактором, определяющим свойства медленного ГАМКергического возбуждения. Для проверки данной гипотезы определяли зависимость временных параметров ГАМКергического возбуждения от величины потенциала реверсии ГАМК<sub>A</sub>-опосредованных ответов ( $E_{\text{ГАМК}}$ ). Изменение потенциала реверсии ГАМКергических ответов осуществляли путем изменения внутриклеточной концентрации хлора с помощью замены  $\text{Cl}^-$  в пипеточном растворе ( $[\text{Cl}^-]_p$ ) на эквивалентное количество глюконата при регистрации в пэтч-кламп конфигурации «целая клетка». Было показано, что длительность и вариабельность величины задержки проведения ПД уменьшаются с увеличением  $[\text{Cl}^-]_p$ , то есть со сдвигом  $E_{\text{ГАМК}}$  в сторону более положительных значений. Величина задержки проведения возбуждения в ГАМКергическом синапсе подчинялась гамма распределению. Значения пика распределения (моды) и дисперсии величины задержки, а также параметры формы  $k$  и масштаба  $\theta$  распределения приведены для разных значений  $[\text{Cl}^-]_p$  в таблице 1.

**Таблица 1** – Параметры распределения величины задержки проведения возбуждения в ГАМКергическом синапсе при различной концентрации  $\text{Cl}^-$  в регистрирующей пипетке ( $[\text{Cl}^-]_p$ ).

$[\text{Cl}^-]_p$ , мМ	Мода, мс	Дисперсия, мс <sup>2</sup>	$k$	$\theta$	N
18	48	277	10	5	2
30	29	355	4	9	14
50	17	32	11	2	2
140	8	16	6	2	8

Естественно было предположить, что снижение концентрации внутриклеточного  $\text{Cl}^-$  и, как следствие, сдвиг  $E_{\text{ГАМК}}$  к более негативным значениям должно увеличивать значение и вариабельность величины задержки проведения ПД. Для уменьшения внутриклеточной концентрации  $\text{Cl}^-$  использовали буметанид, блокатор  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  котранспортера NKCC1, поддерживающего повышенное содержание хлора в незрелых нейронах. С помощью внеклеточной регистрации ПД от популяции нейронов CA3 области среза гиппокампа, вызванных фармакологически изолированными ГАМК-ПСП, было обнаружено, что буметанид, блокирующий активность

НКСС1 в концентрации 0.3-0.6 мкМ, действительно увеличивает длительность задержки ПД, а также полуширину и постоянную времени спада внеклеточно регистрируемого ответа. (n=4).

Таким образом, результаты регистрации в конфигурации «целая клетка» при разных значениях  $[Cl^-]_n$  и эффект низких концентраций буметанида на ГАМК-ПСП опосредованный ответ популяции нейронов свидетельствуют о том, что временные параметры возбуждения в ГАМКергическом синапсе зависят от внутриклеточной концентрации  $Cl^-$  в постсинаптическом нейроне.

### ***2.3. Движущая сила ГАМК ответа, мембранный потенциал покоя и порог генерации ПД в нейронах СА3 области среза гиппокампа<sup>1</sup>.***

Возбуждающее действие ГАМК определяется тремя параметрами: движущей силой ГАМК ( $DC_{ГАМК}$ ), мембранным потенциалом покоя клетки (ПП) и порогом генерации ПД. С помощью регистрации активности одиночных ГАМК<sub>A</sub> каналов в конфигурации «на клетке», которая не нарушает внутриклеточной концентрации  $Cl^-$  (Tuzio et al., 2006), мы оценивали  $DC_{ГАМК}$  в пирамидных нейронах СА3 области гиппокампа. Согласно вольт-амперной характеристике  $DC_{ГАМК}$  в пирамидных клетках гиппокампа крыс в возрасте от двух до пяти дней после рождения была равной  $16.5 \pm 1.6$  мВ (n=32 клетки), что близко к значениям, опубликованным другими авторами (Tuzio et al., 2008). Мембранный потенциал покоя нейронов измеряли с помощью регистрации активности НМДА каналов, являющихся сенсорами потенциала, в режиме «на клетке» (Tuzio et al., 2003). Полученный как потенциал реверсии токов, протекающих через НМДА каналы, ПП пирамидных клеток СА3 области гиппокампа оказался равным  $-78.8 \pm 3.1$  мВ (n=14). Зная эти значения, определили величину  $E_{ГАМК}$  ( $E_{ГАМК} = ПП - DC_{ГАМК}$ ), которая оказалась равной  $-61.4 \pm 5.4$  мВ. При этом величина порога генерации ПД, запускаемых ГАМКергическими ПСП при регистрации в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока, варьировала в диапазоне от  $-63$  до  $-34$  мВ со средним значением, равным  $-45.9 \pm 6.5$  мВ (n=11 клеток).

Таким образом, перекрываются лишь небольшие области значений  $E_{ГАМК}$  и порога генерации ПД, в большинстве же случаев величина  $E_{ГАМК}$  в нейронах не достигает порога генерации ПД. Это свидетельствует о том, что

<sup>1</sup> Исследования, представленные в данном подразделе, выполнены совместно с Романом Тизио (R. Tuzio).

возбуждающее действие ГАМК требует активации дополнительной подпороговой проводимости, которая увеличивает ГАМК-ПСП и доводит уровень мембранного потенциала до порогового значения.

#### **2.4. Роль неинактивируемого натриевого тока в ГАМКергическом возбуждении.**

Известно, что неинактивируемый натриевый ток ( $I_{NaP}$ ), который присутствует в пирамидных клетках СА3 области развивающегося гиппокампа (McBain & Dingledine, 1992) и активируется при значении мембранного потенциала около  $-60$  мВ, является причиной медленной регенеративной деполяризации, запускающей спонтанное спайкование незрелых нейронов СА3 области гиппокампа (Sipila *et al.*, 2005; Sipila *et al.*, 2006a). Так как  $E_{ГАМК}$  находится вблизи порога активации  $I_{NaP}$ , то возникла гипотеза о том, что  $I_{NaP}$  может принимать участие в формировании возбуждающего механизма действия ГАМК, увеличивая ГАМК-ПСП и доводя уровень деполяризации мембранного потенциала до порога генерации ПД. Для проверки этой гипотезы, исследовали эффекты блокаторов натриевых каналов ТТХ и фенитоина на ГАМК-ПСП. Поскольку блокада натриевых каналов вызывает пресинаптическое ингибирование, то для исследования использовали модель ГАМК-ПСП (мГАМК-ПСП), подавая через пэтч электрод на мембрану регистрируемой клетки ток в форме ГАМК-ПСТ, предварительно полученный в режиме фиксации потенциала. Эксперименты проводили в присутствии антагонистов глутаматных и ГАМК рецепторов. В этих условиях аппликация блокатора потенциалзависимых натриевых каналов ТТХ ( $1$  мкМ) не только ингибировала ПД, вызванные мГАМК-ПСП, но также подавляла увеличение мГАМК-ПСП подпороговой потенциалзависимой проводимостью. Интегральный ответ, рассчитанный как площадь мГАМК-ПСП (для тех мГАМК-ПСП, которые не привели к генерации ПД), уменьшался под действием ТТХ от  $4851 \pm 591$  мкВ·с до  $3536 \pm 574$  мкВ·с, что составило  $70 \pm 5$  % от контрольных значений ( $n=6$ ;  $P<0.01$ ). ТТХ также уменьшил полуширину мГАМК-ПСП от  $132 \pm 15$  мс до  $110 \pm 11$  мс, то есть до  $85 \pm 5$  % от контрольной величины ( $n=6$ ;  $P<0.001$ ). Антиэпилептический препарат фенитоин ( $200$  мкМ), более предпочтительно блокирующий повторные открывания натриевых каналов и  $I_{NaP}$  (Kuo & Bean, 1994; Segal & Douglas, 1997), также предотвращал увеличение мГАМК-ПСП, уменьшая интегральный ответ до  $70 \pm 5$  % от контрольных значений (от

7585±549 мкВ·с до 5239±555 мкВ·с;  $n=3$ ;  $P<0.01$ ), а полуширину ответа от 182±10 мс до 146±2 мс ( $n=3$ ;  $P<0.01$ ). Фенитоин также полностью подавлял ПД, вызванные мГАМК-ПСП.

Совокупность этих данных подтверждает участие INaP в увеличении подпороговых деполяризующих ГАМК-ПСП и роль этого увеличения в реализации возбуждающего действия ГАМК на незрелые нейроны СА3 области гиппокампа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многочисленные доказательства возбуждающего действия ГАМК на нейроны различных структур развивающегося мозга *in vitro*, а также на свидетельства существования случаев деполяризующего действия ГАМК в ЦНС взрослых животных, до настоящего времени нигде не рассматривался аспект временных характеристик ГАМКергического возбуждения. Поэтому центральной находкой данного исследования является то, что передача возбуждения в ГАМКергических синапсах мозга новорожденных животных происходит медленно и характеризуется высокой вариабельностью величины задержки. Это было показано с помощью неинвазивной внеклеточной регистрации популяционной активности нейронов, при которой не нарушаются ни потенциал покоя, ни внутриклеточная концентрация хлора в нейронах, а также с помощью пэтч-кламп регистрации в конфигурации «целая клетка» при повышенном содержании  $Cl^-$  во внутрипипеточном растворе. В работе также показана зависимость временных характеристик ГАМКергического возбуждения от концентрации  $Cl^-$  в постсинаптическом нейроне: значение и вариабельность величины задержки проведения ПД уменьшались при искусственном повышении концентрации внутриклеточного хлора во время регистрации в конфигурации «целая клетка», и, напротив, увеличивались при снижении уровня внутриклеточного хлора с помощью блокатора  $Na^+/K^+/2Cl^-$  котранспортера буметанида. Сравнение физиологических значений ПП,  $DS_{\text{ГАМК}}$  и порога генерации ПД привело к заключению о том, что при физиологических значениях концентрации внутриклеточного хлора деполяризующие ГАМК-ПСП не достигают порога возникновения ПД, и для генерации возбуждения в постсинаптическом нейроне требуется активация дополнительной подпороговой потенциалзависимой проводимости. Существование такого промежуточного этапа в генерации ПД, вероятно,

является ключевым фактором, обуславливающим медленное проведение возбуждения в ГАМКергическом синапсе. Помимо полученных данных, ряд фактов свидетельствует тому, что неинактивируемая натриевая проводимость вносит свой вклад в возбуждающее действие ГАМК, усиливая ГАМК опосредованную деполяризацию нейронов. Во-первых,  $I_{NaP}$  присутствует в незрелых пирамидных нейронах СА3 области гиппокампа (McBain & Dingledine, 1992) и обеспечивает их спонтанное возбуждение (Sipila *et al.*, 2005; Sipila *et al.*, 2006a). Во-вторых, порог активации  $I_{NaP}$  находится около -60 мВ (Sipila *et al.*, 2006a), что близко к значению мембранного потенциала, которое достигают ГАМК-ПСП. В-третьих, то, что ГДП, в которых возбуждающая ГАМКергическая проводимость играет превалирующую роль, блокируются ингибиторами  $I_{NaP}$  фениитоном и рилузолем (Sipila *et al.*, 2006a) также согласуется с нашими наблюдениями. Вариабельность величины задержки ПД в ГАМКергическом синапсе, вероятно, отражает динамические изменения состояния потенциалзависимых проводимостей. На уровне популяции вариабельность увеличивается также и вследствие гетерогенности нейронов по внутриклеточному содержанию  $Ca^{2+}$ , которое влияет на величину синаптической задержки. Таким образом, данное исследование изменяет традиционную точку зрения о том, что ГАМК-ПСП напрямую активируют ПД (Ben Ari, 2002; Ben Ari *et al.*, 2007). Однако вполне вероятно, что предложенный механизм генерации возбуждения в ГАМКергическом синапсе не является единственно возможным. Вполне вероятны случаи, при которых  $E_{ГАМК}$  достигает или превышает порог генерации ПД, например, в клетках с сильно деполяризованным значением  $E_{ГАМК}$  на очень ранних этапах развития, вследствие эпилептогенного процесса (Cohen *et al.*, 2002; Khalilov *et al.*, 2003; Huberfeld *et al.*, 2006), травмы (Pieraut *et al.*, 2007) или в клетках с относительно негативным порогом генерации ПД, таких как интернейроны неокортекса (Rheims *et al.*, 2008).

Сдвиг  $E_{ГАМК}$  в сторону более положительных значений показан для различных видов нейрональной травмы, включая повреждение нейронов вследствие нарушения осмотического баланса, аксотомии, продолжительной эпилептической активности, ишемии (van den Pol AN *et al.*, 1996; Ben Ari, 2002; Ben Ari *et al.*, 2007; Inglefield & Schwartz-Bloom, 1998; Galeffi *et al.*, 2004). Все эти наблюдения приводят к предположению о том, что возбуждающее действие ГАМК в срезах мозга новорожденных животных могло бы быть не возрастным феноменом, что предполагает традиционная точка зрения о действии ГАМК в ЦНС на ранних этапах онтогенеза, а лишь частным

случаем нейрональной травмы, связанным с перерезкой отростков нервных клеток при приготовлении срезов. В пользу этого предположения свидетельствует и отсутствие деполяризующего действия ГАМК в не требующих нарезки *in toto* препаратах интактного гиппокампа, что было показано в исследованиях на животных в возрасте от пяти до семи дней постнатального развития. В данном исследовании, у крыс в течение второй недели после рождения нами, действительно, было обнаружено изменение полярности гиперполяризующих ответов нейрональной популяции на активацию ГАМК<sub>A</sub> рецепторов в приповерхностной области среза гиппокампа, где нейроны в большей степени подвержены повреждению во время нарезки срезов. Однако в течение первой постнатальной недели каких-либо различий в возбуждающем действии ГАМК на нейроны, расположенные в глубине и на поверхности среза, выявлено не было. Более того, возбуждение, наблюдаемое в ответ на действие экзогенного агониста ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, а также на синаптически высвобождаемую ГАМК, было обнаружено в *in toto* препарате интактного гиппокампа в течение первых нескольких дней после рождения, что отвергает гипотезу о нейрональной травме как причине деполяризующего и возбуждающего действия ГАМК на клетки мозга новорожденных животных *in vitro*.

## ВЫВОДЫ

1. Возбуждающее действие ГАМК в головном мозге крыс и мышей в течение первой недели постнатального развития не является артефактом, связанным с повреждением нейронов при приготовлении срезов мозга.
2. В ходе второй недели после рождения травматизация нейронов при нарезке срезов приводит к изменению действия ГАМК с тормозного на возбуждающее в поверхностном слое среза гиппокампа.
3. Задержка проведения возбуждения в ГАМКергическом синапсе гиппокампа новорожденных крыс длительна и высоко вариабельна, ее величина имеет значения в диапазоне от 10 до 200 мс с модой около 28 мс.
4. Временные и вероятностные параметры задержки проведения ПД в возбуждающем ГАМКергическом синапсе гиппокампа имеют обратную зависимость от концентрации  $Cl^-$  в постсинаптическом нейроне.
5. При физиологических значениях внутриклеточной концентрации  $Cl^-$  деполяризация постсинаптической мембраны, опосредованная активацией ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, не достигает порога генерации ПД. Для генерации возбуждения в постсинаптическом нейроне требуется активация подпороговой неинактивируемой натриевой проводимости.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

### *Публикации в журналах, рекомендованных ВАК:*

1. **Valeeva G.**, Abdullin A., Tyzio R., Skorinkin A., Nikolski E., Ben-Ari Y., Khazipov R. Temporal coding at the immature depolarizing GABAergic synapse. *Front. Cell. Neurosci.*, 2010, V. 4, pii. 17.
2. Petrov K.A., Yagodina L.O., **Valeeva G.R.**, Lannik N.I., Nikitashina A.D., Rizvanov A.A., Zobov V.V., Bukharaeva E.A., Reznik V.S., Nikolsky E.E., Vyskočil F. Different sensitivities of rat skeletal muscles and brain to novel anti-cholinesterase agents, alkylammonium derivatives of 6-methyluracil (ADEMS). *Br. J. Pharmacol.*, 2011, V. 163, №4, P. 732-744.
3. **Валеева Г. Р.**, Хазипов Р. Н., Никольский Е.Е. Возбуждающее действие ГАМК в онтогенезе. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, 2011, Т. 97, № 11, С. 1179-1186.
4. Dzhala V., **Valeeva G.**, Glykys J., Khazipov R., Staley K. Traumatic alterations in GABA signaling disrupt hippocampal network activity in the developing brain. *J. Neurosci.*, 2012, V.32, №12, P. 4017-4031.

### *Тезисы докладов:*

1. **Валеева Г.Р.**, Мухтаров М.Р., Хазипов Р.Н. О природе необычайно длительной задержки в возбуждающем ГАМК-ергическом синапсе гиппокампа новорожденных крысят. Тезисы IX Всероссийской научно-теоретической конференции «Физиологические механизмы адаптации растущего организма», октябрь 2008г., Казань, С. 24-25.
2. Абдуллин А.Р., **Валеева Г. Р.**, Скоринкин А.И., Хазипов Р.Н. Синаптические механизмы синхронизации нейрональной активности в развивающемся мозге. Тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием «Теоретические основы физической культуры», октябрь 2009г., Казань, С.3-4.
3. **Valeeva G.** Spike Timing at the immature depolarizing GABAergic synapse. *Proceedings of XVIIIè Colloque de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé*, 31 May – 1 June, 2010, Marseille, France.
4. V. Dzhala, **G. Valeeva**, R. Khazipov, K. Staley. Network effects of traumatic neuronal chloride accumulation. *Neuroscience Meeting Planner*, 12-16 November, 2011, Washington, DC, Program No. 249.07. Online.





**Формат издания 60x84 1/15, V 1.0 п.л., тир. 100 экз. заказ А 26  
Отпечатано в типографии И.П.Чермяниной А.П.**

10 =