

На правах рукописи

МАСАЛОВ  
ИГОРЬ СЕРГЕЕВИЧ

СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ  
ПЕРЕДАЧИ В ДОРСОЛАТЕРАЛЬНОМ ЯДРЕ АМИГДАЛЫ КРЫСЫ

03.03.01 – Физиология



АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

---

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ 2011

Работа выполнена в лаборатории эволюции межнейронного взаимодействия (заведующий лабораторией – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН Н.П.Веселкин) Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник

Е.А. ЦВЕТКОВ

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Н.П. ЕРОФЕЕВ

доктор биол. наук

Н.Я. ЛУКОМСКАЯ

Ведущая организация:

Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН (Санкт-Петербург)

Защита состоится «12» апреля 2011 г. в «12» часов на заседании кандидатского совета Д.002.127.01 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Автореферат разослан «\_» \_\_\_\_\_ 2011 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук



М.Н. Маслова

## АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Модуляция синаптической передачи является одним из важнейших фундаментальных механизмов, обеспечивающих функционирование центральной нервной системы. В основе этого механизма лежат процессы, связанные с действием различных нейромедиаторов и нейромодуляторов: глутамата, ГАМК, допамина, норадреналина, ацетилхолина, серотонина на пре- и постсинаптическом уровне (Николлс и др., 2003). Особый интерес у современных исследователей вызывает серотонинергическая модуляция синаптической передачи. Известно, что серотонин регулирует многие системы головного мозга, в том числе лимбическую, ответственную за формирование эмоциональных состояний у человека и млекопитающих (LeDoux, 2000).

Одним из элементов лимбической системы является амигдала (миндалина) – подкорковая структура головного мозга. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что в функциональном плане амигдала отвечает за экспрессию страха, тревоги и агрессии, выработку аверсивных условно-рефлекторных реакций, а также формирование эмоциональной памяти (Amunts et al., 2005). Сенсорная информация о внешнем мире поступает в амигдалу через ее дорсолатеральное ядро, на клетках которого происходит широкая конвергенция входов из различных зон сенсорной коры больших полушарий, ядер таламуса и многих других структур мозга (LeDoux, 2000; LeDoux et al., 1990; Sah et al., 2003; Tsvetkov et al., 2004). Одной из важнейших функций дорсолатерального ядра амигдалы является первичная обработка сенсорной информации, поступающей в амигдалу, ее фильтрация и передача в нижележащие ядра амигдалы для дальнейшей обработки (LeDoux, 2000; Pitkanen et al., 1997). Регуляция этой функции крайне важна для нормальной работы всей амигдалы в частности и лимбической системы в целом.

В настоящий момент имеются данные о том, что в процессе регуляции первичной обработки сенсорной информации, поступающей в дорсолатеральное ядро амигдалы, серотонин может играть значительную роль (LeDoux, 2000; Radja et al., 1991; Stutzmann and LeDoux, 1999; Stutzmann et al., 1998). Свидетельством в пользу этого является тот факт, что нейрональные элементы получают обильные серотонинергические входы из дорсальных ядер шва ствола мозга (Sadikot and Parent, 1990), а на мембранах амигдалярных нейронов обнаружены серотониновые рецепторы различных типов (Radja et al., 1991; Sadikot and Parent, 1990). Также имеются данные о том, что некоторые современные высокоэффективные антидепрессанты такие, как флуокситин (прозак), пароксетин (паксил), сертралин (золофт), флуоксамин (феварин) и др, действие которых основано на блокаде обратного захвата серотонина, модулируют эмоциональные состояния, связанные с функциями амигдалы (Fournier et al., 2010). Высокая эффективность этих фармакологических препаратов является дополнительным свидетельством того, что серотонин играет особую роль в генезе многих психопатологических состояний человека.

Таким образом, на сегодняшний день изучение роли серотонина в модуляции синаптической передачи в дорсолатеральном ядре амигдалы представляется **актуальным**. Полученные сведения могут быть полезны для более глубокого понимания механизмов функционирования этой структуры, механизмов модуляции ее активности, а также механизмов коррекции некоторых эмоциональных расстройств, связанных с активностью амигдалы.

В связи вышесказанным перед выполнением данной работы были поставлены следующие **задачи**:

- Изучить синаптическую активность проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы крысы.
- Изучить влияние серотонина (5-НТ) на амплитудно-частотные

характеристики миниатюрных спонтанных постсинаптических трансмембранных токов проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы крысы

- Изучить воздействие серотонина на амплитуду постсинаптических токов проекционных нейронов, вызванных стимуляцией кортикальных афферентных возбуждающих входов в амигдалу.

- Исследовать роль рецепторов серотонина различных типов в модуляции синаптических входов на проекционные нейроны дорсолатерального ядра амигдалы крысы.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЙ.**

Результаты исследований, проведенных на переживающих фронтальных срезах головного мозга крысы показали, что аппликация серотонина приводит к уменьшению частоты, но не оказывает влияния на амплитуду глутамат- и ГАМКергических миниатюрных спонтанных постсинаптических токов, регистрируемых на проекционных нейронах. Это свидетельствует о серотонинергической модуляции синаптической активности проекционных нейронов на пресинаптическом уровне. Впервые было показано, что серотонин уменьшает амплитуду глутаматергических постсинаптических токов проекционных нейронов, вызванных электрической стимуляцией кортико-амигдалярных афферентных волокон, входящих в амигдалу в составе наружной капсулы, а также уменьшает амплитуду ГАМКергических постсинаптических токов проекционных нейронов, вызванных электрической стимуляцией тормозных интернейронов дорсолатерального ядра амигдалы. Таким образом, были впервые получены данные о модулирующем действии серотонина на миниатюрные возбуждающие и тормозные постсинаптические токи, а также на постсинаптические токи на мембранах проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы крысы,

вызванные стимуляцией кортико-амигдалярных волокон. С помощью антагонистов серотониновых рецепторов были идентифицированы типы 5-НТ рецепторов, ответственные за эффекты серотонина на синаптическую активность проекционных нейронов. Установлено, что блокада 5-НТ<sub>1,2</sub> рецепторов малеатом метилсергида подавляет модулирующее действие серотонина на амплитуду вызванных постсинаптических токов проекционных нейронов, а блокада 5-НТ<sub>3,4</sub> рецепторов не оказывает действия на эффекты серотонина на синаптическую активность проекционных нейронов.

### **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.**

Серотонин оказывает модулирующее действие на возбуждающие и тормозные постсинаптические токи, регистрируемые на мембране проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы.

Модуляция серотонином возбуждающих и тормозных постсинаптических токов проекционных нейронов осуществляется за счет активации 5-НТ<sub>1,2</sub> рецепторов, локализованных на тормозных интернейронах и аксонах кортико-амигдалярных волокон.

### **ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ.**

Результаты проведенного исследования представляют интерес для общей нейрофизиологии, нейробиологии, физиологии нервной клетки и медицины. Полученные результаты характеризуют синаптическую активность нейронов амигдалы, лежащую в основе функционирования важнейшей структуры головного мозга, участвующей в выработке условно-рефлекторного страха и формировании эмоциональной памяти. Они вносят

вклад в понимание механизмов регуляции сигнального взаимодействия нервных клеток и роли серотонина в модуляции синаптической передачи. Полученные результаты впервые характеризуют механизм серотонинергической модуляции возбуждающей и тормозной синаптической активности проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы и имеют существенное значение для понимания нейронных механизмов функционирования амигдалы. Результаты настоящей работы могут быть использованы для дополнения и уточнения уже имеющихся данных о роли серотонина в регуляции синаптической передачи в центральной нервной системе млекопитающих.

### **АППРОБАЦИЯ РАБОТЫ**

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на следующих научных собраниях: на Двенадцатой Всероссийской медико-биологической конференции молодых ученых (С-Петербург, 2009); на XXI съезде Физиологического общества им. И.Павлова (Калуга, 19-25 сентября 2010 г.)

**ПУБЛИКАЦИИ:** Основные результаты диссертации отражены в пяти публикациях, 3 в журнальных статьях и 2 в материалах конференций.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ:** Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитированной литературы. Изложена на 162 страницах машинописного текста, иллюстрирована 29 рисунками и 3 таблицами. Библиография включает 226 наименований.

### **МЕТОДИКА И ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ.**

В качестве модельного препарата в настоящем исследовании использовались переживающие фронтальные срезы головного мозга крысы

линии *Vistar*. Исследование проводилось на фронтальных срезах головного мозга 20-25 дневных крыс. Для извлечения мозга, крысу декапитировали, после чего вскрывали черепную коробку и в охлажденном до 5°C растворе №1 (таблица 1) извлекали головной мозг. Далее после отсечения ствола мозга и мозжечка оставшийся фрагмент головного мозга, содержащий в себе амигдалу, крепили с помощью цианоакрилатного клея на платформе вибротома. Фронтальные срезы толщиной 250-300 мкм изготавливались на вибротоме HM650V (Microm, США) в аэрируемом карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>) растворе №1 (табл. 1) при температуре 5-10°C.

Для электрофизиологических экспериментов использовали срезы, включающие дорсолатеральное ядро амигдалы. Соответствующие срезы выбирались визуально и после этого перемещались в электрофизиологическую камеру и фиксировались там скобой с нейлоновыми нитями. Объем камеры составлял 0.5 мл. В ходе экспериментов срезы находились в постоянном потоке раствора №1, аэрируемого карбогеном. В ходе тестов нормальный физиологический раствор №1 путем переключения заменяли на экспериментальный, в который добавляли различные фармакологические препараты: тетродотоксин (1 мкМ), пикротоксин (50 мкМ), CNQX (20 мкМ), D-APV (20 мкМ), малеат метилсергида (30 мкМ), SDZ202-557 (30 мкМ) а также 5-НТ (30 мкМ). В работе использовались препараты фирм Sigma и Tocris (США).

Запись вызванной и спонтанной активности проекционных нейронов производили в конфигурации целая клетка при фиксации мембранного потенциала или трансмембранного тока. В работе использовали усилители EPC8 (НЕКА Elektronik, Германия). Данные оцифровывались с помощью аналого-цифровых преобразователя Digidata-1200 (Axon Instruments, США) и записывались на жесткий диск



программой WinWCP 4.2.2 (University of Strathclyde, Великобритания). Анализ проводили с помощью программ CLAMPFIT 8.1, Microsoft Excel. Доверительный интервал средних величин указан как стандартная ошибка. Статистическое сравнение средних величин проводили с использованием критерия Стьюдента.

Пипетки для клампа изготавливали на кузнице P87 (Sutter Instrument Company, США) из стеклянных трубок марки «Пирекс» с двумя внутренними микрофиламентами (фирма: Garner Glass Company, США). Внутренний и внешний диаметр заготовок составлял – 1.15 и 1.65 мм, соответственно. Диаметр кончика готовой пипетки находился в пределах 0.5-0.7 мкм. В зависимости от целей эксперимента пипетки заполнялись пипеточным раствором №2, №3 или №4 (см. табл. 1), сопротивление пипеток после заполнения составляло 3-6 МОм. В ходе эксперимента пипетки крепились в держатель, управляемый манипулятором MP225 (Sutter Instrument Company, США).

Стимуляцию кортикальных входов осуществляли через биполярный электрод локальным электрическим раздражением волокон, идущих в составе наружной капсулы. Интенсивность раздражающего стимула подбиралась таким образом, чтобы вызванный ответ в режиме фиксации потенциала на уровне  $-70$  мВ находился в пределах 50-80 пА, что составляет  $\sim 20-25\%$  от максимальной амплитуды ответов. Длительность раздражающего импульса была во всех тестах одинакова и составила – 100 мкс. Регистрацию вызванных ответов осуществляли при фиксации потенциала.

Средние значения частот и амплитуд постсинаптических токов проекционных нейронов даны со средней квадратичной ошибкой (стандартной ошибкой) и рассчитывались по методике, описанной в литературе (Лакин, 1980). Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента (Лакин, 1980).

**Таблица №1. Растворы, используемые в экспериментах на срезах.**

	Номера растворов и концентрации веществ (мМ/л)			
	Наружный раствор	Внутрипипеточные растворы		
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
NaCl	119,0	—	—	—
KCl	2,5	—	125,0	—
K-gluconate	—	125,0	—	—
CsMeS	—	—	—	125,0
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,5	—	—	—
MgSO <sub>4</sub>	1,0	—	—	—
MgCl <sub>2</sub>	—	1,0	1,0	1,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3	—	—	—
NaHCO <sub>3</sub>	26,0	—	—	—
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10,0	—	—	—
HEPES	—	10,0	10,0	10,0
EGTA	—	0,2	0,2	0,2
Na-ATP	—	2,0	2,0	2,0
Mg-GTP	—	0,1	0,2	0,2
pH	7,4	7,2	7,2	7,2
Осмолярность мОсм	320,0	295-300	295-300	295-300

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Характеристика активности проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы.**

Объектом исследования являлись проекционные нейроны дорсолатерального ядра амигдалы, их выбор осуществляли визуально по пирамидоподобной форме и размеру 10-20 мкм. Кроме того, у этих нейронов отчетливо выражена аккомодация потенциалов действия, тогда как у тормозных интернейронов дорсолатерального ядра амигдалы такой особенности нет. Сопротивление мембраны проекционных нейронов находилось в пределах 60-120 МОм, что также отличало их от интернейронов, у которых этот показатель часто достигал значения 1 ГОм.

Первая часть исследования была посвящена изучению общей спонтанной синаптической активности проекционных нейронов. Известно, что общая спонтанная активность включает в себя события, обусловленные случайным появлением потенциалов действия в нейронах нервной сети амигдалы, и фракцию миниатюрных постсинаптических токов, появление которых обусловлено случайным высвобождением нейромедиатора из пресинаптических терминалей. Медиаторная природа спонтанных постсинаптических токов (сПСТ) проекционных нейронов оказалась неоднородной: часть из них реверсировала при деполяризации клетки до уровня -50 мВ. Реверсировавшие сПСТ блокировались пикротоксином, а нереверсировавшие – CNQX. Это говорит о ГАМКергической природе первых из них и глутаматергической – вторых. В контрольных условиях средние значения частот сПСТ составили:  $1.24 \pm 0.25 \text{ с}^{-1}$  (n=6) для глутаматергических и  $1.18 \pm 0.17$  (n=6)  $\text{с}^{-1}$  - для ГАМКергических сПСТ. Соотношение частот глутамат- и ГАМКергических спонтанных ПСТ

составило –  $f_{\text{Глу}}/f_{\text{ГАМК}} = 1.09 \pm 0.21$  ( $n=6$ ). Данный факт свидетельствует о значительном количестве тормозных синапсов, образуемых на проекционных нейронах амигдалы. Это может быть объяснено либо значительным представительством ГАМКергических интернейронов среди нервных клеток дорсолатерального ядра амигдалы (ДЛА), либо обширной зоной арборизации их аксонов. С целью выяснения, какое из предположений является верным было проведено исследование миниатюрной спонтанной постсинаптической активности проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы, регистрируемой при блокировании спайк-обусловленных ПСТ тетродотоксином (ТТХ, 1 мкМ).

Миниатюрная синаптическая активность проекционных нейронов также оказалась неоднородной и включала в себя глутамат- и ГАМКергические события. Средняя частота первых составила  $1.05 \pm 0.41 \text{ с}^{-1}$  ( $n=3$ ), вторых —  $0.79 \pm 0.36 \text{ с}^{-1}$  ( $n=3$ ). Анализ полученных записей не выявил достоверного смещения соотношения частот глутамат- и ГАМКергических ПСТ, следовательно относительно высокая частота спонтанных ГАМКергических ПСТ объясняется обширной арборизацией интернейрональных аксонов в дорсолатеральной амигдале. В пользу данного предположения свидетельствуют данные литературы, согласно которым относительное число интернейронов в дорсолатеральном ядре амигдалы невелико и не превышает 5% от общего числа нервных клеток в данной структуре (Rainnie et al., 1991; Sosulina et al., 2006).

Таким образом, исследование спонтанных постсинаптических токов, регистрируемых на проекционных нейронах ДЛА, позволило нам получить важную информацию о синаптической передаче в дорсолатеральном ядре амигдалы. Однако эта информация ограничена сведениями о процессах, обусловленных случайным выделением нейромедиатора из пресинаптической терминали и случайным появлением потенциалов действия в нервной цепи. В связи с этим, следующий этап

исследования был посвящен изучению характеристик постсинаптических токов проекционных нейронов, вызванных электрической стимуляцией кортикальных афферентных волокон, входящих в амигдалу в составе наружной капсулы.

Регистрируемые в данных условиях постсинаптические ответы проекционных нейронов имели сложную медиаторную природу и состояли из двух фаз: входящего и выходящего тока. Фармакологический анализ показал, что первая фаза (входящий ток) является моносинаптической и вызвана активацией возбуждающих входов на проекционные нейроны, а вторая фаза (выходящий ток) представляет дисинаптический компонент, опосредованный тормозными интернейронами, получающими возбуждающие афферентные входы из коры. Такая форма ответа, показанная в нашем исследовании подтверждается данными литературы, из которых известно, что интернейроны дорсолатерального ядра амигдалы образуют тормозные синапсы на проекционных нейронах и наряду с последними получают возбуждающие глутаматергические входы из коры или таламуса (Mahanty and Sah, 1999; Szinyei et al., 2000). С целью более детального исследования проводился анализ изолированных компонентов этих постсинаптических токов, регистрируемых на проекционных нейронах дорсолатерального ядра амигдалы в ответ на стимуляцию кортико-амигдалярных афферентных волокон наружной капсулы.

Вызванные моносинаптические глутаматергические ПСТ, регистрировались при блокировании ГАМКергической синаптической передачи пикротоксином (100 мкМ). В этих условиях ответы имели короткий и постоянный латентный период, что свидетельствует об их моносинаптической природе (Huang and Kandel, 1998). Величина ответа зависела от силы стимуляции. Для проведения тестов использовали силу раздражения, которая на 5% превышала пороговое значение. Для проведения оценки вольт-амперной зависимости ВПСТ измеряли пиковую

амплитуду зарегистрированного тока (рис.6:1) и сопоставляли ее со значением мембранного потенциала. Токи регистрировались при значениях мембранного потенциала от  $-70$  до  $+50$  мВ с шагом в 20 мВ. Временная динамика нисходящей фазы исследуемых ответов, так же как и их амплитуда, проявляла зависимость от мембранного потенциала. При отрицательных значениях последнего нисходящая фаза ответов была значительно короче по сравнению с таковой у ответов, зарегистрированных при положительном мембранном потенциале. Полученный факт свидетельствует о том, что глутаматергический ответ, вызванный стимуляцией кортико-амигдалярных волокон, неоднороден по составу и имеет сложную природу, то есть предполагается участие в его генерации АМПА и НМДА рецепторов.

Соответствующие компоненты глутаматергического постсинаптического тока разделялись при использовании CNQX (20 мкМ) для изоляции НМДА-опосредованного компонента и D-APV (20 мкМ) для изоляции АМПА-опосредованного компонента. Вольт-амперная характеристика АМПА-опосредованного тока хорошо аппроксимировалась линейной функцией:  $I_{max}=a*V_m+b$ , где  $a$  и  $b$  – коэффициенты линейной функции,  $I_{max}$  – пиковая амплитуда тока и  $V_m$  – мембранный потенциал, при котором этот ток ( $I_{max}$ ) регистрировался. Потенциал реверсии ( $V_{rev} = -b/a$ ) составил в среднем  $-0.1 \pm 2.1$  мВ ( $n=11$ ). Вольт-амперная характеристика НМДА-тока имела N-образную форму и не аппроксимируется линейной функцией. Последнее связано с тем, что при отрицательных значениях мембранного потенциала ниже  $-40$  мВ НМДА каналы заблокированы ионом магния и непроницаемы для катионов (Nowak et al., 1984). Соотношение амплитуд АМПА и НМДА компонентов, регистрируемых при потенциалах  $-70$  и  $+50$  мВ, составило  $3.63 \pm 0.44$  ( $n=8$ ). Наличие НМДА и АМПА-составляющих в ВПСТ проекционных нейронов амигдалы хорошо согласуется с данными более ранних исследований (Huang and

Kandel, 1998; Mahanty and Sah, 1998; Weisskopf and LeDoux, 1999; LeDoux, 2000).

Следующий этап работы был посвящен исследованию дисинаптического ГАМКергического компонента сложного двухкомпонентного ответа проекционного нейрона в ответ на стимуляцию кортико-амигдалярных волокон, который регистрировали в контрольных условиях при фиксации мембранного потенциала на уровне  $-50$  —  $-30$  мВ. Следует отметить, что в данных условиях использование антагонистов глутаматных рецепторов для изоляции дисинаптического ГАМКергического ответа не представлялось возможным, поскольку первый из синапсов, участвующих в инициации этого ответа (синапс между аксоном кортико-амигдалярного волокна и тормозным интернейроном), является глутаматергическим и его блокада приведет к тому, что тормозный интернейрон и его ГАМКергические терминалы на проекционные нейроны не будут активированы (Szinyei et al., 2000). В связи с этим дисинаптический компонент анализировали в условиях регистрации сложного двухкомпонентного постсинаптического ответа проекционного нейрона на стимуляцию кортико-амигдалярных волокон. Показано, что потенциал реверсии ГАМКергического компонента сильно расходится с расчетным теоретическим значением. Этот феномен может быть обусловлен возникновением дополнительной проводимости мембраны за счет активации АМПА и НМДА рецепторов. Для определения истинного потенциала реверсии хлорного ГАМКергического тока его вольт-амперную характеристику снимали в условиях прямой стимуляции интернейронов дорсолатерального ядра амигдалы при блокаде АМПА и НМДА рецепторов с помощью CNQX и D-APV. В этом случае значение потенциала реверсии хлорного тока составило  $V_{rev} = 73.4 \pm 3.0$  мВ, что практически совпало с расчетным  $V_{rev} = -73$  мВ.

Полученные на первом этапе исследования данные позволили

охарактеризовать синаптическую активность проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы крысы. Из результатов видно, что ГАМКергические интернейроны ДЛА играют большую роль в организации потоков сенсорной информации, проходящих через амигдалу, осуществляя постсинаптическое торможение проекционных нейронов. Помимо тормозного ГАМКергического контроля над сенсорными потоками существуют более тонкие механизмы их регуляции, а именно механизмы модуляции синаптической активности проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы. Они связаны с функционированием различных нейромодуляторных систем: холинергической, допаминергической, серотонинергической. Вышеуказанные нейромодуляторы, высвобождаясь в дорсолатеральном ядре амигдалы, могут изменять активность как возбуждающих, так и тормозных пре- и постсинаптических рецепторов, осуществляя тем самым тонкую регуляцию синаптической активности нервных клеток. Серотонинергическая нейромедиаторная система принимает активное участие в формировании эмоциональных состояний и поведенческих реакций организма, за формирование которых ответственны лимбическая система и, в частности, амигдала (LeDoux, 2000). В связи с этим изучение серотонинергической модуляции синаптических процессов, протекающих в дорсолатеральном ядре амигдалы представляет собой особый интерес.

### **Исследование воздействия серотонина на спонтанные постсинаптические токи проекционных нейронов дорсолатеральной амигдалы.**

Следующие этапы исследования были посвящены изучению роли серотонина в модуляции синаптической активности проекционных



нейронов дорсолатерального ядра амигдалы крысы. Необходимо отметить, что во всех тестах, приведенных в данной работе, использовалась одна и та же концентрация серотонина – 30 мкМ. Такой выбор был обоснован тем, что в большинстве работ, посвященных исследованию эффектов серотонина и проводимых на срезах мозга, используют концентрации, близкие к этому значению. Кроме того для обоснования выбранной концентрации мы проводили дополнительные тесты, в которых строились кривые доза-эффект для ГАМК- и глутаматного АМПА-компонента. Действие серотонина на амплитуды этих ответов достигало своего максимального значения при концентрации 30 мкМ и далее при повышении концентрации не увеличивалось, выходя на плато.

Первая серия экспериментов посвящена изучению влияния серотонина на общую спонтанную активность. Опыты проводились при использовании пипеточного и наружного раствора №3 и №1, соответственно; мембранный потенциал клеток фиксировали на уровне -70 мВ. В этих условиях аппликация серотонина в концентрации 30 мкМ не оказывала заметного влияния ни на амплитуду, ни на частоту, регистрируемых спонтанных постсинаптических токов. Так, на 5-ой минуте действия серотонина частота спонтанных ПСТ составила  $91.7 \pm 20.9\%$  от контрольного значения (100%), а их амплитуда составила  $104.9 \pm 7.9\%$  от контрольного значения (100%). После отмыва эти показатели составили:  $116.3 \pm 2.58\%$  для частоты и  $102.3 \pm 5.3\%$  для амплитуды.

Данный факт может быть объяснен тем, что серотонин может оказывать действие не только на процесс спонтанного выделения медиатора из пресинаптических терминалей, но и изменять возбудимость тормозных интернейронов амигдалы (Stutzmann and LeDoux, 1999). В этом случае воздействие серотонина на амплитудно-частотные характеристики спонтанной синаптической активности проекционных нейронов может

быть нивелировано эффектом серотонина на тормозные интернейроны, участвующие в организации спонтанной активности проекционных нейронов.

Для проверки данного предположения была проведена серия экспериментов, в которой исследовалось действие серотонина на фракцию миниатюрных постсинаптических токов в условиях блокирования спайк-обусловленной фракции ПСТ тетродотоксином (ТТХ, 1 мкМ). Полученные результаты показали, что серотонин (30 мкМ) статистически достоверно ( $p < 0.05$ ) снижал средние частоты регистрируемых миниатюрных ПСТ, но не оказал влияния на их амплитуды. На 5-й минуте действия серотонина частота глутаматергических мПСТ снижалась на  $42.2 \pm 12.8\%$  ( $n=5$ ), а частота изолированных ГАМКергических мПСТ – на  $37.6 \pm 8.2\%$  ( $n=5$ ). В классической работе Каца и Миледи (Katz and Miledi, 1963) было показано, что изменение частоты постсинаптических событий говорит о пресинаптической модуляции синаптической передачи, то есть о модуляции процесса выделения нейромедиатора, а изменение амплитуды свидетельствует о воздействии на постсинаптическом уровне, то есть об изменении возбудимости мембраны нейрона. Таким образом, отсутствие достоверного воздействия серотонина на амплитуду миниатюрных глутамат- и ГАМКергических ПСТ свидетельствует о том, что серотонин модулирует синаптическую активность проекционных нейронов исключительно на пресинаптическом уровне, подавляя процесс высвобождения нейромедиатора из пресинаптической терминали.

Полученные результаты позволяют объяснить различие эффектов серотонина на общую спонтанную и миниатюрную активности проекционных нейронов. Отсутствие эффекта серотонина на амплитудно-частотные характеристики общей спонтанной активности проекционных нейронов может быть объяснено тем, что увеличение частоты спонтанных разрядов интернейронов, которое обусловлено изменением возбудимости

их мембран, компенсируется за счет уменьшения вероятности высвобождения нейромедиаторов из пресинаптических терминалей на проекционные нейроны ДЛА.

В пользу этого предположения говорят данные литературы. В частности, показано, что серотонин увеличивает возбудимость мембран тормозных интернейронов дорсолатерального ядра амигдалы и, соответственно, повышает частоту генерации спонтанных потенциалов действия (Koyama et al., 2000; 2002). В работе Рэйни и соавт. (Rainnie, 1999) было показано, что аппликация серотонина в концентрации более 30 мкМ на фронтальные срезы мозга крысы приводит к уменьшению частоты тормозных постсинаптических токов, регистрируемых на проекционных нейронах дорсолатерального ядра амигдалы. Кроме этого известно, что серотонин оказывает ингибирующее воздействие на тормозную синаптическую передачу за счет активации пресинаптических 5-НТ<sub>1</sub> рецепторов, локализованных на нейронах голубого пятна (Bobker and Williams, 1989) и черной субстанции головного мозга крысы (Stanford and Lacey, 1996). В исследовании, проведенном на фронтальных срезах головного мозга крысы, содержащих амигдалу, Ченг и соавт. (Cheng et al., 1998) обнаружили ингибирующее воздействие серотонина на частоту возбуждающих миниатюрных постсинаптических потенциалов, регистрируемых на нейронах базолатеральной амигдалы и гиппокампа.

Таким образом, видно, что серотонин, высвобождаясь в дорсолатеральном ядре амигдалы может увеличивать возбудимость тормозных интернейронов за счет активации возбуждающих соматических 5-НТ рецепторов и, в то же время, уменьшать вероятность спонтанного высвобождения ГАМК за счет активации тормозных 5-НТ рецепторов, локализованных на пресинаптических терминалях тормозных интернейронов амигдалы.

**Воздействие серотонина на постсинаптические токи (ПСТ) проекционных нейронов, вызванные стимуляцией кортико-амигдалярных афферентных волокон и тормозных интернейронов дорсолатерального ядра амигдалы.**

Следующий этап исследования был посвящен серотонинергической модуляции постсинаптических токов, регистрируемых на проекционных нейронах дорсолатерального ядра амигдалы при стимуляции возбуждающих афферентных волокон, входящих в латеральную амигдалу в составе наружной капсулы. Стимуляция этих волокон вызывала сложный постсинаптический ответ, который, как было показано ранее (Цветков et al., 2009), состоит из двух компонентов. Первый, моносинаптический компонент, является глутаматергическим и опосредуется активацией АМПА и/или при определенных условиях (Nowak et al., 1984; Цветков и др., 2009) НМДАрецепторов, второй, дисинаптический компонент, является ГАМКергическим и опосредуется активацией ГАМК<sub>A</sub> рецепторов. При использовании пипеточного раствора №2, приготовленного на основе глюконата калия, компоненты суммарного постсинаптического ответа, вызываемого стимуляцией кортико-амигдалярных волокон, были разнонаправленны. Данное обстоятельство, позволило нам исследовать действие серотонина на оба компонента вызванного постсинаптического тока проекционного нейрона одновременно.

В данных тестах серотонин (30 мкМ) не оказывал статистически достоверного воздействия на амплитуды глутамат- и ГАМК-опосредованных компонентов вызванного постсинаптического ответа. Средние значения нормированных амплитуд глутамат- и ГАМК-опосредованных компонентов, измеренные на 5-й минуте воздействия

серотонина, составили  $92.95 \pm 7.68\%$  ( $n=7$ ;  $p=0.43$ ) и  $95.78 \pm 6.38\%$  ( $n=7$ ;  $p=0.79$ ), соответственно, что не отличалось от значений амплитуд этих компонентов, регистрируемых в контроле. Это может быть объяснено тем, что серотонин либо не оказывает воздействия ни на один из компонентов вызванного постсинаптического ответа проекционного нейрона, либо оказывает воздействие одновременно на оба компонента ответа, и при суммации на постсинаптической мембране проекционных нейронов эти эффекты нивелируются, поскольку глутамат- и ГАМКергические компоненты разнонаправленны.

Для того, чтобы определить какое из указанных выше предположений является верным, мы изучали действие серотонина на изолированные ГАМКергические и глутаматергические вызванные постсинаптические ответы. Проведена серия экспериментов, в которой исследовали действие серотонина на ГАМКергические постсинаптические токи проекционных нейронов, вызываемые раздражением тормозных интернейронов дорсолатерального ядра амигдалы в условиях блокирования глутаматных рецепторов. Было показано, что ГАМКергические постсинаптические токи, регистрируемые в этих условиях, проявляли чувствительность к серотонину, поскольку их амплитуда в среднем снижалась примерно на  $35 \pm 8.85\%$  ( $n=9$ ;  $p < 0.001$ ) от контрольного значения (100%).

Регистрацию глутаматергических постсинаптических токов проекционных нейронов, вызванных стимуляцией кортико-амигдалярных волокон, проводили при блокировании ГАМК-компонента пикротоксином. НМДА-ответ регистрировали при фиксации МП на уровне +30 мВ в присутствии CNQX (25 мкМ). АМПА-ответ регистрировали при фиксации мембранного потенциала на уровне -70 мВ в присутствии D-APV (50 мкМ). Исследование действия серотонина на изолированный НМДА-ток показало, что данный модулятор уменьшает его амплитуду. В среднем

снижение амплитуды НМДА-тока составило  $56.89 \pm 1.00$  % ( $n=3$ ) и оказалось статистически достоверным ( $p < 0.001$ ). Эффект был полностью обратим и «отмывался» за 20-30 минут при смене раствора с серотонином на контрольный. Исследование действия серотонина на изолированный АМПА-ток показало, что АМПА-компонент уменьшается при действии серотонина (50 мкМ) в среднем на  $58.92 \pm 6.43$  % ( $n=9$ ;  $p < 0.001$ ). Полное восстановление амплитуды наблюдалось через 15-20 минут отмыва от серотонина.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными в нашем исследовании действия серотонина на миниатюрную синаптическую активность проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы. Очевидно, что серотонин модулирует и возбуждающую глутаматергическую, и тормозную ГАМКергическую синаптическую передачу в латеральной амигдале, однако эти эффекты могут нивелироваться в процессе интеграции на постсинаптической мембране проекционных нейронов ДЛА.

Дальнейшее исследование было посвящено выяснению того, какие из основных групп рецепторов серотонина могут быть задействованы в обеспечении механизмов описанных выше эффектов [см. раздел 3.3]. С этой целью мы использовали два антагониста серотониновых рецепторов. Первый из них малеат метилсергида является антагонистом для рецепторов 1 и 2 типов, второй SDZ202-557 – блокирует рецепторы 3 и 4 типов.

**Исследование роли различных типов 5-НТ рецепторов в серотонинергической модуляции синаптической передачи в синапсах образованных афферентными кортикальными волокнами на нейронах дорсолатерального ядра амигдалы.**

На данном этапе мы изучали влияние 5-HT<sub>1</sub>/5-HT<sub>2</sub> рецепторов на синаптическую передачу в дорсолатеральной амигдале. Перед началом эксперимента срезы преинкубировались в растворе №1., в который был добавлен малеат метилсергида (30 мкМ), являющийся смешанным антагонистом серотониновых рецепторов 1 и 2 типа (5-HT<sub>1,2</sub> рецепторы). В ходе проведенных экспериментов было установлено, что этот антагонист предотвращает действие серотонина на амплитуду фармакологически изолированных глутаматергических АМПА-ответов, регистрируемых на проекционных нейронах в ответ на стимуляцию кортико-амигдалярных афферентных волокон. Нормированная амплитуда этого ПСТ не изменялась в течение 5 минут действия серотонина (30 мкМ), и на 5-ой минуте она составила 100.0±7.0% (n=5). Малеат метилсергида также предотвращал действие серотонина на амплитуду фармакологически изолированных ГАМКергических постсинаптических токов проекционных нейронов, регистрируемых в ответ на стимуляцию интернейронов дорсолатерального ядра амигдалы.

Известно, что 5-HT<sub>1</sub> рецепторы присутствуют во многих областях лимбической системы, в том числе и в амигдале (Ito et al., 1999). Использование селективного агониста 5-HT<sub>1A</sub> рецептора 8-OH-DPAT позволило показать, что активация этого типа рецепторов приводит к подавлению долговременной потенциации, регистрируемой на проекционных нейронах латеральной амигдалы крысы при стимуляции возбуждающих афферентных входов (Pollandt et al., 2003). Также было установлено, что данный тип 5-HT рецепторов ответственен за модуляцию тормозной ГАМКергической синаптической передачи в латеральной амигдале, а именно аппликация 8-OH-DPAT приводила к снижению частоты миниатюрных ТПСТ, регистрируемых на проекционных нейронах амигдалы (Koyama et al., 2002). Также широкое распространение в ЦНС (Fink and Gothert, 2007) и в частности в амигдале (Radja et al., 1991; Varnas

et al., 2004) имеют рецепторы второго типа 5-HT<sub>2</sub>. Штуцман и Леду (Stutzmann and LeDoux, 1999) предположили, что эти рецепторы, локализованные на телах тормозных интернейронов латеральной амигдалы, способствуют повышению их возбудимости, что в конечном итоге приводит к увеличению высвобождения ГАМК в синапсах, образуемых интернейронами на проекционных нейронах амигдалы. Высвобожденная гамма-аминомасляная кислота связывается с постсинаптическими ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>B</sub> рецепторами и снижает возбудимость проекционных нейронов, подавляя тем самым эффективность афферентного возбуждения амигдалы (Stutzmann and LeDoux, 1999). Согласно данному предположению Леду и Штуцмана суперфузия срезов мозга раствором с серотонином должна приводить к увеличению амплитуд ГАМКергических ПСТ проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы, регистрируемых в ответ на электрическую стимуляцию интернейронов. Однако в наших экспериментальных условиях данный эффект не наблюдался. Наоборот, было отмечено, что действие серотонина приводит к снижению амплитуд вызванных ГАМКергических ответов. Полученный результат, тем не менее, не является противоречием данным Леду и Штуцмана, поскольку ранее при изучении действия серотонина на параметры спонтанной активности проекционных нейронов нами было показано, что в условиях суперфузии срезов серотонин способен не только повышать возбудимость интернейронов, что выражается в повышении частоты спайк-обусловленной спонтанной активности, но и снижать вероятность спонтанного выброса везикул медиатора в синапсе, что выражается в снижении частоты спонтанных миниатюрных ПСТ. Оба этих эффекта могут компенсировать друг друга, поскольку в конечном итоге они регулируют один и тот же процесс, но оказывают на него противоположные эффекты. Таким образом, снижение амплитуды



вызванных ГАМКергических постсинаптических токов проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы может быть связано с тем, что в условиях суперфузии срезов эффект серотонина на механизм высвобождения везикул выражен сильнее, чем на возбудимость интернейронов. Кроме того, в работах Рэйни (Rainnie, 1999) было показано, что при малых концентрациях (до 30 мкМ) серотонина проявлялось его возбуждающее действие на интернейроны, в то время как при больших концентрациях (более 30 мкМ) - наблюдался противоположный эффект – возбудимость интернейронов снижалась. В нашем случае использовалась концентрация серотонина 30 мкМ, что вероятно и определило тормозное его воздействие на ГАМКергическую передачу в амигдале.

Сходные с нашими данные были получены на других объектах при использовании агонистов/антагонистов 5-НТ<sub>1</sub>/5-НТ<sub>2</sub> рецепторов. В частности, исследования, проведенные на срезах мозжечка крысы с использованием метиотепина (антагонист 5-НТ<sub>1</sub>/5-НТ<sub>2</sub>) показали, что эти рецепторы ответственны за уменьшение высвобождения глутамата из пресинаптических терминалей в мозжечке крысы (Maura et al., 1988). Снижение выделения глутамата было продемонстрировано также и на первичной культуре кортикальных нейронов крысы (Sandyk, 2006). В этой работе было показано, что активация 5-НТ<sub>1</sub>/5-НТ<sub>2</sub> рецепторов с помощью специфического агониста предотвращает глутамат-индуцированную нейротоксичность.

Следующие серии экспериментов были посвящены изучению влияния антагониста 5-НТ<sub>3</sub>/5-НТ<sub>4</sub> рецепторов SDZ202-557 (30 мкМ) на серотонинергическую модуляцию ГАМК- и глутаматергических постсинаптических токов. В наших экспериментальных условиях данный антагонист не оказывал достоверного воздействия на эффект серотонина на синаптическую активность проекционных нейронов амигдалы. В

присутствии этого антагониста серотонин не терял способности снижать амплитуду как ГАМК- так и глутаматергических вызванных ПСТ.

Известно, что на мембране тормозных интернейронов наряду с 5-HT<sub>1</sub> рецепторами имеются возбуждающие 5-HT<sub>3</sub> рецепторы (Koyama et al., 2002). В наших условиях преинкубация срезов головного мозга крысы в растворе №1, в который был добавлен SDZ202-557 (30 мкМ), не оказывала существенного влияния на действие серотонина. Это может быть объяснено тем, что возбуждающие 5-HT<sub>3</sub> рецепторы, локализованные на мембране интернейронов дорсолатеральной амигдалы, вносят значительно меньший вклад в модуляцию тормозной синаптической передачи по сравнению с рецепторами первой группы (Koyama et al., 2000; 2002). Что касается 5-HT<sub>4</sub> рецепторов, то на сегодняшний день существует мало данных об их функциях в амигдале. В исследовании, проведенном Хуангом и Кэнделом (Huang and Kandel, 2007) было выявлено, что антагонисты данного типа серотониновых рецепторов блокируют индукцию долговременной потенциации, регистрируемую на проекционных нейронах амигдалы при низкочастотной (1 Гц) стимуляции возбуждающих кортикальных афферентных входов в амигдалу. Однако этих данных явно недостаточно для того, чтобы сделать вывод о роли 5-HT<sub>4</sub> рецепторов в модуляции синаптических входов в латеральном ядре амигдалы.

Полученные в работе результаты свидетельствуют о том, что 5-HT<sub>1</sub> и 5-HT<sub>2</sub> рецепторы играют значительную роль в серотонинергической модуляции как возбуждающей, так и тормозной синаптической передачи в латеральной амигдале. Блокирование 5-HT<sub>3</sub> и 5-HT<sub>4</sub> рецепторов не оказывало влияния на серотонинергические эффекты в амигдале. Хотя 5-HT<sub>3</sub> и 5-HT<sub>4</sub> рецепторы были обнаружены в латеральном ядре амигдалы, их вклад в модуляцию синаптической передачи может быть относительно малым и не выявляться с помощью экспериментального метода данного исследования.

Таким образом, данные, полученные в проведенном исследовании, позволяют более детально определить роль серотонина в модуляции синаптической передачи в латеральной амигдале. Установлено, что серотонин оказывает ингибирующее действие на возбуждающую и тормозную синаптическую активность проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы. Это свидетельствует о наличии сложных механизмов, с помощью которых серотонин осуществляет модуляцию потоков сенсорной информации, проходящих через дорсолатеральное ядро амигдалы. Следует отметить, что до сих пор отсутствовали данные о серотонинергическом влиянии на возбуждающую синаптическую передачу в дорсолатеральном ядре амигдалы крысы. В связи с этим представляют собой большой интерес наши результаты, свидетельствующие об ингибирующем действии серотонина на возбуждающие синаптические входы на проекционные нейроны дорсолатерального ядра амигдалы. В итоге можно подчеркнуть, что изучение данных модуляторных механизмов серотонина актуально, поскольку оно способствует более детальному осознанию процессов, связанных с функционированием амигдалы и ее регуляцией.

## ВЫВОДЫ

- 1) Общая спонтанная синаптическая активность проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы крысы амигдалы подразделяется на возбуждающую глутаматергическую и тормозную ГАМКергическую фракции. При фармакологической блокаде проведения возбуждения регистрируется миниатюрная фракция, опосредованная спонтанным высвобождением медиатора из пресинаптической терминали.
- 2) Серотонин снижает частоту фармакологически постсинаптических токов проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы крысы, но не оказывает воздействия на их амплитуду. Это свидетельствует о серотонинергической модуляции синаптической активности проекционных нейронов на пресинаптическом уровне.
- 3) Постсинаптические токи проекционных нейронов, регистрируемые при стимуляции кортикальных афферентных входов в амигдалу, состоят из моносинаптического глутаматергического и дисинаптического ГАМКергического компонентов.
- 4) Серотонин снижает амплитуду моносинаптических глутаматергических постсинаптических токов проекционных нейронов, вызванных стимуляцией кортико-амигдалярных волокон и моносинаптических ГАМКергических постсинаптических токов проекционных нейронов, вызванных стимуляцией тормозных интернейронов дорсолатерального ядра амигдалы. Данные эффекты связаны с уменьшением высвобождения глутамата и ГАМК в синапсах, образованных на проекционные нейроны дорсолатерального ядра амигдалы.
- 5) Отсутствие воздействия антагониста 5-НТ<sub>3,4</sub> рецепторов SDZ202-557 на эффект серотонина на вызванные ПСТ свидетельствует о том, что серотониновые рецепторы 3 и 4 типа не принимают участие в модуляции синаптической активности проекционных нейронов.
- 6) Подавление влияния серотонина на амплитуду вызванных глутаматергических и ГАМКергических постсинаптических токов избирательным антагонистом 5-НТ<sub>1,2</sub> рецепторов малеатом метилсергида указывает на то, что модулирующее действие серотонина на синаптические входы проекционных нейронов опосредуется серотониновыми рецепторами 1 и 2 типов.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1) Исследование роли тормозных интернейронов в механизмах регуляции сенсорных синапсов, образованных таламическими и кортикальными входами на пирамидальных клетках дорсолатерального ядра амигдалы // Цветков Е.А., Масалов И.С., Веселкин Н.П., Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2009 г., т. 45, № 4, с.403-411

2) Серотонинергическая модуляция синаптической передачи в дорсолатеральном ядре амигдалы крысы // Цветков Е.А., Масалов И.С., Веселкин Н.П. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2011 г., т. 47,

3) Серотонинергическая модуляция спонтанной синаптической активности проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы // Масалов И.С., Цветков Е.А., Веселкин Н.П. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2011 г., т. 47,

4) Тезисы: Исследование регуляции сенсорных синапсов на пирамидальных клетках дорсолатерального ядра амигдалы крысы // Материалы XII Всероссийской медико-биологической конференции молодых ученых «Человек и его здоровье». С-Петербург 2009. с.240-241

5) Тезисы: Влияние серотонина (5-НТ) на частоту и амплитуду ГАМК<sub>A</sub> и НМДА-опосредованных ионных токов, регистрируемых на принципиальных нейронах дорсолатерального ядра амигдалы крыс // XXI съезд Физиологического общества им. И.Павлова. Тезисы докладов. Калуга 2010. с.385-386

**Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Россия, РФФИ, грант № 08-04-00098) и программы ОБН РАН «Физиологические механизмы регуляции внутренней среды и организации поведения живых систем».**