

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
ИМ. И.М. СЕЧЕНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



На правах рукописи

ПОПОВ

Василий Анатольевич

ВЗАИМОВЛИЯНИЕ ГАМК- И ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОНОВ
КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Специальность 03.03.01 - Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2016

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Веселкин Николай Петрович

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Официальные оппоненты:

Казначеева Елена Валентиновна

доктор биологических наук,
заведующая лабораторией
ионных каналов клеточных мембран
Института цитологии РАН

Семенов Дмитрий Германович

доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник Института
физиологии им. И.П. Павлова РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт
биохимии и биофизики Казанского
научного центра РАН

Защита состоится «14» июня 2016 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.127.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44, тел. (812)-552-79-01, электронная почта office@iephb.ru, сайт <http://www.iephb.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44), с авторефератом – на сайте ВАК РФ, с авторефератом и диссертацией – на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Р.Г. Парнова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Современные данные свидетельствуют о том, что синаптическая передача в каждом отдельном синапсе центральной нервной системы регулируется множеством факторов, в том числе набором котрансмиттеров и нейромодуляторов (Cesselin, Hamon, 1984; Burnstock, 2013). В целом ряде исследований продемонстрирована совместная локализация в пресинаптических окончаниях ряда медиаторов (Vigh et al., 1995; Seal et al., 2006; Somogyi, 2006). Могут быть колокализованы ГАМК и ацетилхолин (Manolov, Davidoff, 1989; Duarte et al., 1999; Jia et al., 2003), ГАМК и серотонин (Dünker, 1998; Barreiro-Iglesias et al., 2009), ГАМК и АТФ (Jo et al., 1999), ГАМК и дофамин (Nguyen-Legros et al., 1997; Barreiro-Iglesias et al., 2009), ГАМК и глицин (Todd et al., 1996; Legendre, 2001), а также глутамат и ацетилхолин (Li et al., 2004; Nishimaru et al., 2005), глутамат и дофамин (Sulzer, Rayport, 2000; Lapish et al., 2007; Hnasko et al., 2012), дофамин и серотонин (Vanhatalo et al., 1995) и ряд других нейротрансмиттеров.

В литературе имеются достаточно обширные сведения о взаимовлиянии нескольких медиаторов, выделяемых из одного или разных пресинаптических окончаний и широко обсуждается, каково его функциональное значение (Hnasko et al., 2012). При этом при изучении совместного действия нескольких медиаторов на многих объектах продемонстрировано, что трансмембранные ионные токи нейронов, вызываемые активацией постсинаптических рецепторов разной модальности, суммируются нелинейно. По-видимому, данное взаимовлияние представляет собой быстрый адаптивный процесс, участвующий в регуляции эффективности синаптической передачи. Факт нелинейного взаимодействия ответов нейронов установлен для большого числа сочетаний рецепторов: P2X₂ рецепторы АТФ и 5HT₃ рецепторы серотонина (Boue-Grabot et al., 2003), P2X и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (Barajas-Lopez et al., 1998; Searl et al., 1998; Khakh et al., 2000), P2X₂ и ГАМК_A-рецепторы (Sokolova et al., 2001; Boue-Grabot et al., 2003), P2X₃ и ГАМК_A-рецепторы (Toulme et al., 2007), капсаициновые и P2X (Piper et al., 2000), а также для ГАМК_A и глициновых рецепторов (Russier et al., 2002; Li et al., 2002; 2003).

ГАМК и глутамат – основные нейромедиаторы ЦНС млекопитающих, присутствующие практически во всех ее отделах. Многие нейроны могут получать входы, опосредуемые этими обоими сигнальными веществами (Staley et al., 1992). В ряде случаев ГАМК и глутамат могут высвобождаться в синаптическую щель

совместно из одного окончания (Seal et al., 2006; Noh et al., 2010; Beltran et al., 2012), что может приводить к взаимовлиянию их эффектов на постсинаптическом уровне. Возможность совместной локализации ионотропных рецепторов глутамата и ГАМК в синапсе продемонстрирована во многих исследованиях (Shrivastava et al., 2011). Оба этих вещества способны активировать как ионотропные рецепторы (ГАМК_A или глутаматные NMDA-типа, AMPA-типа и каинатные), так и metabotropic (ГАМК_B и множество подтипов metabotropic глутаматных рецепторов), локализованные как pre- так и постсинаптически. Постсинаптические metabotropic глутаматные рецепторы первой и второй групп достаточно широко распространены в префронтальной коре головного мозга крысы (Lopez-Bendito et al., 2002; Ohishi et al., 1993; Petralia et al., 1996). Постсинаптические ГАМК_B-рецепторы также обнаружены в коре головного мозга крысы (Princivalle et al., 2001). Это создает предпосылки для самых разнообразных взаимодействий эффектов рассматриваемых нейромедиаторов и взаимной модуляции их рецепторов в нейронах коры головного мозга (Shrivastava et al., 2011; Амахин и др., 2012).

В настоящий момент имеется информация о том, что нелинейное взаимодействие ответов нейронов в ходе одновременной активации разных рецепторов может протекать по-разному. Так, на примере ГАМК-глицинового взаимодействия сделаны предположения о его молекулярных механизмах (Амахин и др., 2012). Предполагается, что причиной нелинейной суммации ответов может быть межрецепторное взаимодействие, в том числе с участием внутриклеточных посредников (Li et al., 2003) или неселективная активация медиатором не своих рецепторов (Baev et al., 1992; Trombley et al., 1999; Амахин и др., 2009; 2011). Однако отсутствуют достаточные сведения о нелинейном взаимодействии ГАМК- и глутамат-опосредованных токов нейронов коры. Для расширения сведений об этом необходимо исследовать вклад как ионотропных, так и metabotropic рецепторов на постсинаптическом уровне.

Вышеизложенное обосновывает **актуальность** выбранного направления диссертационных исследований. В целом, имеющиеся на сегодняшний день сведения о взаимовлиянии активации ГАМК и глутаматных рецепторов нейронов немногочисленны и разрознены. Малоизученность этих процессов, обуславливает важность проведенных исследований.

Тема диссертационной работы «Взаимовлияние активации ГАМК- и глутаматных рецепторов нейронов коры головного мозга крыс» лежит в русле исследований межнейронной сигнализации и принадлежит к перспективному направлению нейрофизиологических исследований.

Цель работы: выяснить характер взаимодействия процессов, вызываемых активацией ГАМК- и глутаматных рецепторов в нейронах коры головного мозга крыс.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи исследования:**

- исследовать свойства ответов, вызываемых действием ГАМК и глутамата на изолированные нейроны коры головного мозга крысы;
- исследовать особенности суммации ГАМК- и глутамат-опосредованных ионных токов при различных физиологических условиях;
- оценить модуляцию ГАМК- и глутамат-опосредованных ответов нейронов коры метаботропными рецепторами глутамата и ГАМК.

Исследования проводились на изолированных пирамидных нейронах коры головного мозга крысы (Wistar) методом «Пэтч-кламп» в конфигурации «Целая клетка» в режиме фиксации мембранного потенциала.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. В нейронах коры головного мозга крысы взаимодействие между ГАМК_A- и ионотропными рецепторами глутамата (AMPA и каинатными) приводит к нелинейной суммации ответов при одновременной активации рецепторов.

2. При совместной аппликации глутамата и ГАМК активация ГАМК_A-рецепторов в большей мере влияет на глутаматные рецепторы, чем активация глутаматных рецепторов влияет на ГАМК_A-рецепторы.

3. Постсинаптические ГАМК_B-рецепторы осуществляют модуляцию ГАМК_A-рецепторов в исследованных нейронах. Эта модуляция приводит к усилению или ингибированию ГАМК_A-опосредованных ионных токов.

4. Модуляции ГАМК_B-рецепторами ионотропных рецепторов глутамата в нейронах коры головного мозга крыс не выявлено.

5. Модуляции ГАМК-рецепторов и ионотропных рецепторов глутамата метаботропными рецепторами глутамата I группы не выявлено.

Научная новизна полученных результатов диссертационных исследований заключается в следующем:

- впервые при исследовании взаимовлияния активации ГАМК- и глутаматных рецепторов нейронов коры головного мозга крыс учитывался вклад как ионотропных, так и метаботропных рецепторов;
- впервые показано значение нелинейной суммации ионных токов в регуляции синаптической передачи при совместном воздействии медиаторов;
- впервые выявлено, что снижение амплитуды ответов, которое наблюдается при нелинейном взаимодействии ГАМК- и глутамат-опосредованных ответов происходит за счет снижения глутаматного компонента тока;
- впервые показано, что модуляция ГАМК_Б-рецепторами ГАМК_А-опосредованных токов может проявляться по-разному. Модулирующее влияние ГАМК_Б-рецепторов на данные токи может быть ингибирующим или активирующим. Это проливает свет на роль метаботропных рецепторов в регуляции возбудимости нейрона, а также помогает разрешить противоречивые результаты ранее выполненных исследований.

Теоретическая значимость. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание механизмов межнейронной сигнализации в нервной системе.

В работе проанализированы пути межмедиаторной регуляции синаптической передачи на постсинаптическом уровне. Важное теоретическое значение имеют полученные в нашей работе данные о взаимодействии эффектов ГАМК и глутамата как нейромедиаторов, взаимной модуляции сигналов, в частности нелинейной суммации и окклюзии ответов нейронов.

Практическая значимость. Результаты работы могут быть использованы при целенаправленной разработке специфических нейроактивных препаратов, а также могут быть включены в курсы лекций для студентов биологических и медицинских факультетов. Полученные автором данные проведенных исследований уже использовались в учебном процессе по нормальной физиологии для студентов Медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные, приведенные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку полученных данных, осуществлял

их анализ и обобщение. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация работы. Результаты данной работы были представлены и обсуждены на XVI Всероссийской медико-биологической научной конференции молодых учёных «Фундаментальная наука и клиническая медицина» и конференции молодых исследователей, посвященной памяти академика В.Л. Свидерского, Санкт-Петербург, 2013 г., на XXII съезде физиологического общества имени И.П. Павлова, Волгоград, 2013 г., на конференции «Биология – наука XXI века», Москва, 2012 г. Были также представлены и обсуждены на коллоквиумах и семинарах лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикаций основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней. Одна статья находится в печати в перечне журналов ВАК.

Финансовая поддержка. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований №11-04-00868 «Внутри- и внеклеточные механизмы регуляции синаптической передачи» и программы Президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций».

Структура и объем диссертации: диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 350 источника. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 42 рисунка, 3 таблицы.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1. Методика исследований

Исследования выполнены на крысах линии Вистар, выращенных в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова, в условиях отвечающих экспериментальным задачам. Использовано 100 животных 21-дневного возраста. Все экспериментальные процедуры с использованием лабораторных

животных проведены в соответствии с регламентом использования лабораторных животных в ИЭФБ РАН, принятым и утвержденным комиссией по биоэтике.

Для проведения эксперимента животное предварительно наркотизировали этиловым эфиром (Нева-Реактив), после чего осуществлялась декапитация. Затем проводилось вскрытие черепной коробки с последующим извлечением головного мозга. Извлеченный мозг помещался в аэрируемую газовую смесью 98% O₂ + 2% CO₂ искусственную спинномозговую жидкость (ИСЖ), температура которой была постоянной и была близкой к 0° С. Состав ИЖС: NaH₂PO₄ – 1.25 мМ, MgSO₄ – 2 мМ, CaCl₂ – 2.5 мМ, KCl – 5 мМ, глюкоза – 10 мМ, NaHCO₃ – 26 мМ, NaCl – 126 мМ; pH ≈ 7.4, температура около 0° С. Фронтальные срезы лобных долей больших полушарий толщиной 300 мкм получали с помощью вибратора. Полученные срезы помещали для адаптации на 90 минут в емкости с аэрируемой ИСЖ при комнатной температуре.

Процедура изоляции нейронов включает ферментативный этап обработки срезов головного мозга и последующую их механическую диссоциацию. Эффективность подобной методики изоляции нейронов многократно описывалась в литературе для различных типов нейронов, таких как нейроны мыши, крысы, лягушки и др. (Akaike et al., 1989). По завершении 90 минут, срезы переводились в предварительно проаэрированный физиологический раствор той же температуры, содержащий протеазу (Sigma, тип XIV, 1,5 мг/мл). Состав физиологического раствора: MgCl₂ – 1.6 мМ, CaCl₂ – 2 мМ, KCl – 5 мМ, HEPES – 10 мМ, глюкоза – 10 мМ, NaCl – 150 мМ; pH = 7.4, комнатная температура. Процесс ферментативной обработки проводили в термостате при температуре (35° С) и постоянной аэрации в течении 30 минут. После ферментативной обработки фрагменты срезов подвергались пипетированию с целью механической изоляции нейронов. Пипетки применялись последовательно от большего диаметра к меньшему, внутренний диаметр кончика пипеток составлял от 1 мм до 150 мкм.

Изолированные нейроны помещались в физиологическую камеру, установленную на инвертированном микроскопе при постоянной перфузии аэрированным физиологическим раствором, скорость которой составляла 2 мл/мин.

При изучении особенностей суммации ГАМК- и глутамат-опосредованных ионных токов для заполнения микропипеток использовались два разных пипеточных раствора: раствор на основе хлорида цезия (раствор №1) и раствор на основе фторида цезия (раствор №2). В другой части работы, при исследовании влияния метаболитных

рецепторов на ионные токи в нейронах коры головного мозга крысы использовался другой пипеточный раствор (раствор №3). Составы данных растворов приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Состав пипеточных растворов на основе хлорида цезия, фторида цезия и раствора, применяемого в экспериментах по установлению влияния метаботропных рецепторов на ионные токи в нейронах коры головного мозга крысы, мМ

Вещество	Раствор на основе хлорида цезия (пипеточный раствор №1)	Раствор на основе фторида цезия (пипеточный раствор №2)	Раствор в опытах по изучению влияния метаботропных рецепторов на ионные токи в нейронах (пипеточный раствор №3)
MgCl ₂	2	-	2
NaCl	5	5	2
KCl	5	5	5
HEPES	5	5	5
TEA-Cl	6	6	6
EGTA	10	10	10
Cs ⁺ CH ₃ O ₃ S	20	20	125
CsCl	110	20	4
CsF	-	93	-
Mg-АТФ	5	-	4
Na-ГТФ	0.1	0.1	0.1
Na-АТФ	-	5	-
pH	7.2	7.2	7.2

Выбор значения фиксированного мембранного потенциала происходил с учетом поставленных задач. Для обеспечения однонаправленности трансмембранных токов применялся разный фиксированный мембранный потенциал при использовании разных внутрипипеточных растворов. Измерения проводились при мембранном потенциале -10 мВ для пипеточного раствора №1; -80 мВ для пипеточного раствора №2; -20 мВ для пипеточного раствора №3. Выбор иных значений дополнительно оговорен в тексте. Все использованные значения потенциалов обеспечивали хорошую сохранность клеток в процессе эксперимента.

При использовании внутрипипеточных растворов №1 и №2 сопротивление заполненной микропипетки, погруженной в раствор до образования контакта с нейроном, было в диапазоне от 2 до 4 МОм; сопротивление доступа (access resistance)

не превышало 20 МОм. При использовании внутривиточного раствора №3 эти значения были 3-5 МОм; не более 12 МОм, соответственно. В работе применялась 60 - 70% компенсация последовательного сопротивления.

Для аппликации веществ применялась система быстрой смены растворов ALA High Speed Solution Exchange HSSE-2/3 по методу концентрационного скачка (Vorobjev et al, 1996). Все реактивы, использованные в работе, были получены от фирм Sigma и Tocris.

Полученные результаты физиологического эксперимента статистически обоснованы с использованием критериев Стьюдента и Вилкоксона и приводятся в работе следующем формате:

[среднее значение] ± [стандартная ошибка] (n=число измерений).

2.2. Результаты и их обсуждение

Описание нейронов, использованных в эксперименте. Крупные клетки несли большое количество мелких и обычно 1 - 2 крупных отростков. Сомы нейронов имели треугольную форму. Микрофотография изолированных нейронов приведена на рисунке 1.

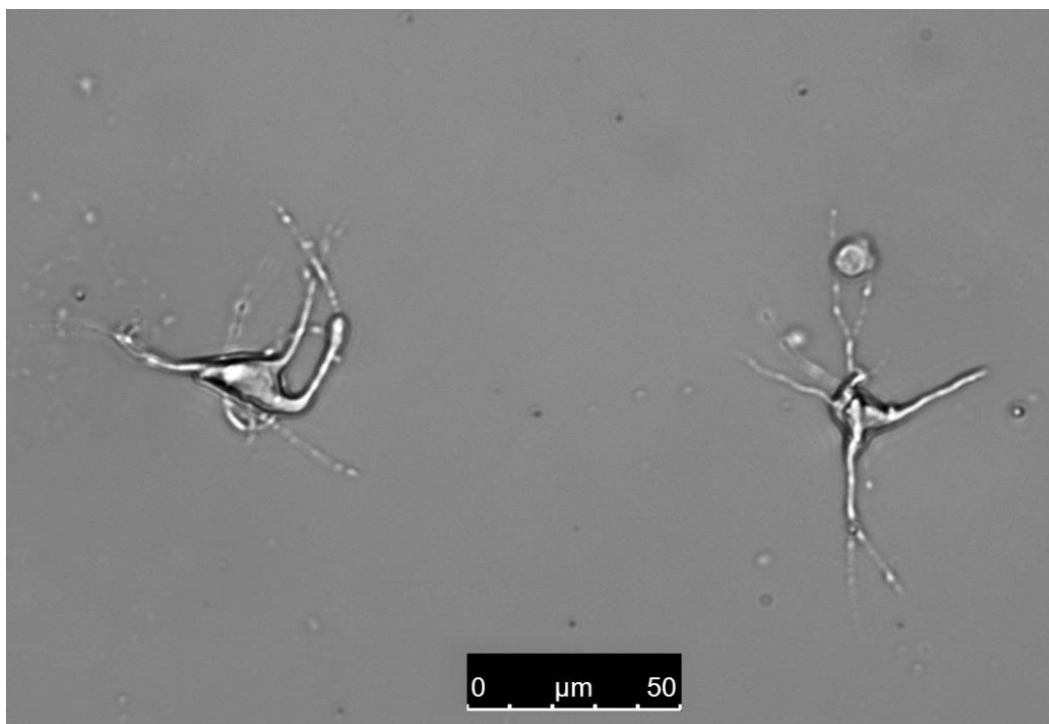
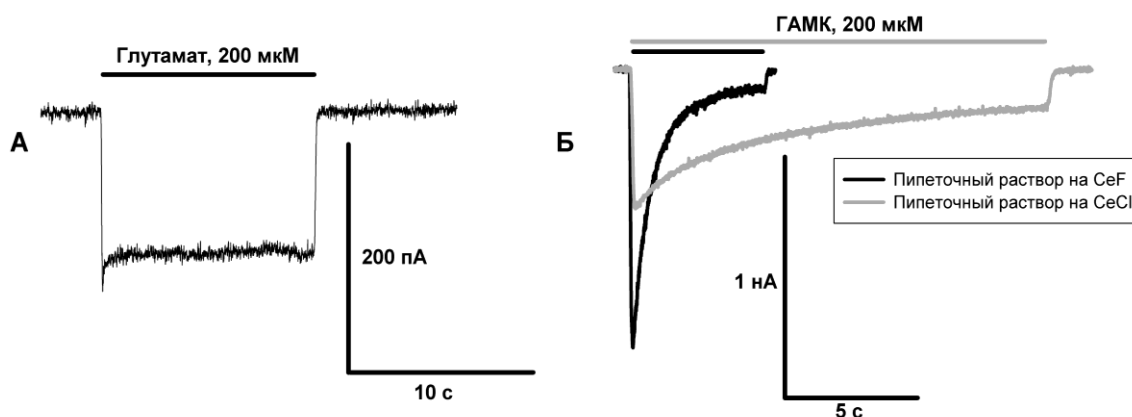


Рис. 1 - Микрофотография изолированных нейронов префронтальной коры головного мозга крысы

По своим морфологическим характеристикам нейроны соответствовали пирамидным клеткам, описанным ранее в работах, посвященных исследованию префронтальной коры головного мозга крысы (Kay, Wong, 1986). Изолированные нейроны достаточно однородны по своим электрическим свойствам. Среднее сопротивление мембраны в конфигурации «Whole-cell» составляло $R=230\pm 20$ МОм ($n=8$) для пипеточных растворов, не содержащих ионы фтора, и $R=550\pm 50$ МОм ($n=12$) для фтор-содержащих растворов.

Свойства ГАМК- и глутамат-опосредованных ответов изолированных нейронов. Все изолированные нейроны префронтальной коры головного мозга крысы отвечают на аппликацию глутамата и 95 - 99% из них отвечают на аппликацию ГАМК. Примеры ответов нейрона на аппликации глутамата и ГАМК в умеренных концентрациях приведены на рисунке 2.



А - ответ на аппликацию глутамата; Б - ответ на аппликацию ГАМК. На обеих частях этого рисунка периоды времени, в ходе которых производились аппликации нейромедиаторов, отмечены сплошной горизонтальной линией над токовым ответом.

Рис. 2 - Ответ на аппликацию глутамата и ГАМК в концентрации 200 мкМ

Показано, что ответ на аппликацию глутамата представляет собой ток, протекающий через AMPA и каинатные рецепторы, при том, что необходимые и достаточные условия для активации NMDA рецепторов соблюдены. По-видимому, глутаматные рецепторы NMDA-типа либо имеют преимущественно дендритную локализацию и поэтому теряются в процессе изоляции нейронов, либо повреждаются используемой для изоляции протеазой. Известно, что NMDA-рецепторы наиболее подвержены воздействию со стороны протеолитических ферментов в процессе ферментативной изоляции (Akaike et al., 1989).

Кинетика ответа на аппликацию глутамата практически совпадает при регистрации с использованием двух разных пипеточных растворов (на основе хлорида

цезия и фторида цезия) – в обоих случаях регистрировался ответ, имеющий незначительный быстро десенситизирующийся компонент и длительный недесенситизирующийся компонент, амплитуда которого оставалась постоянной в течение всего времени аппликации глутамата. Схожая кинетика ответов нейронов на аппликации глутамата при использовании пипеточных растворов №1 и №2 объясняется тем, что все три типа глутаматных рецепторов обладают неселективной катионной проводимостью. Это подтверждается совпадением вольт-амперных характеристик для глутамат опосредованных токов при регистрации ответов с использованием разных растворов.

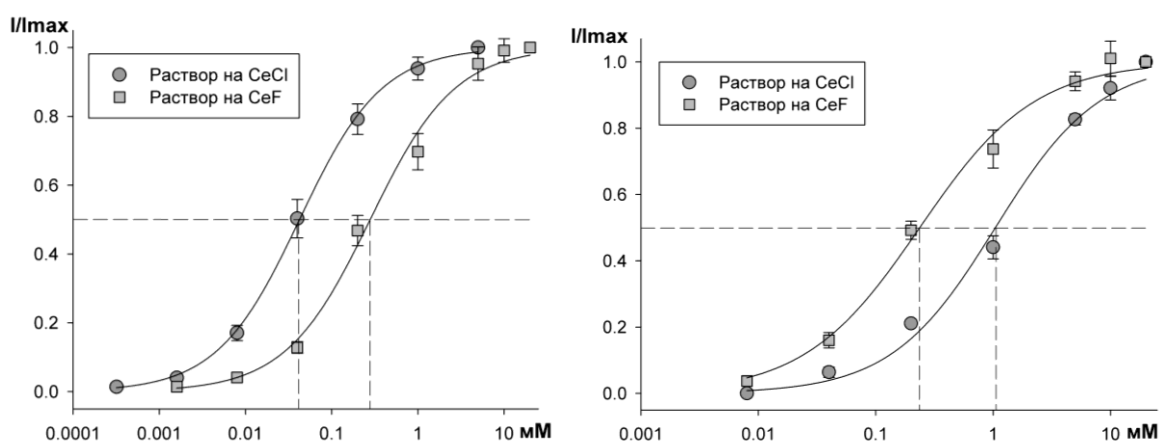
При аппликации ГАМК ответ состоял из быстро нарастающего тока, достигавшего максимума (пика), затем постепенно убывающего и устанавливающегося на постоянной величине (стадия плато). Спад ответов зарегистрированных методом «Пэтч-кламп» в конфигурации «Целая клетка» в ходе продолжительного воздействия ГАМК является характерной особенностью нейронов из практически всех отделов ЦНС (Barnes et al., 1996; Frosch et al., 1992). Рассматриваются два механизма, обуславливающие данный спад ответа. Во-первых, в ходе длительного воздействия ГАМК может происходить десенситизация ГАМК_A-рецепторов, то есть переход их в состояние, при котором молекула лиганда все еще связана с рецептором, но ионный канал рецептора закрыт. Второй механизм – изменение внутриклеточной концентрации ионов хлора, которое может происходить в ходе длительной активации ГАМК_A-рецепторов, и входом большого количества ионов хлора через открытый ионный канал, в следствие чего равновесный потенциал для ионов хлора может смещаться в ходе проведения аппликации, что приводит к наблюдаемому спаду ответа (Akaike et al., 1987; Le Foll et al., 2000; Karlsson et al., 2011; Амахин и др., 2013).

Для полного восстановления амплитуды повторного ГАМК-ответа после его десенситизации требовалось время. Если перед повторной аппликацией ГАМК прошло недостаточно времени, то пиковая амплитуда повторного ответа могла не восстановиться полностью. В то же время амплитуда длительного, недесенситизирующегося компонента (стадия плато) от интервала времени между аппликациями не зависит и остается постоянной в течение всего времени воздействия.

Кинетика десенситизации ГАМК-опосредованных ионных токов существенно отличалась при регистрации с применением внутripипеточных растворов на основе хлорида цезия и фторида цезия (см. рисунок 4.3, часть «Б»). При использовании

внутриклеточного раствора №1 ГАМК-опосредованный ответ имел меньшую скорость десенситизации.

Влияние концентрации агонистов на пиковую амплитуду ответов. Чувствительность нейронов к ГАМК и глутамату оценивалась по зависимости амплитуды ответов нейронов от концентрации агонистов. Чувствительность различается при регистрации с использованием разных пипеточных растворов. Для ГАМК-опосредованных токов, концентрация половинного эффекта (EC50) ниже при регистрации с пипеточным раствором на основе хлорида цезия – раствором №1. Для глутамат-опосредованных токов, наоборот, концентрации половинного эффекта EC50 ниже при регистрации с раствором на основе фторида цезия – раствора №2. Таким образом, при регистрации ГАМК-опосредованных токов с использованием раствора на основе фторида цезия чувствительность нейронов к ГАМК достоверно ниже, чем при регистрации с раствором на основе хлора. Чувствительность нейронов к глутамату достоверно выше при использовании раствора на основе фторида цезия, чем при регистрации с раствором на основе хлора. Зависимости амплитуды ответов от концентраций сигнальных веществ, иллюстрирующие данный эффект, приведены на рисунке 3.

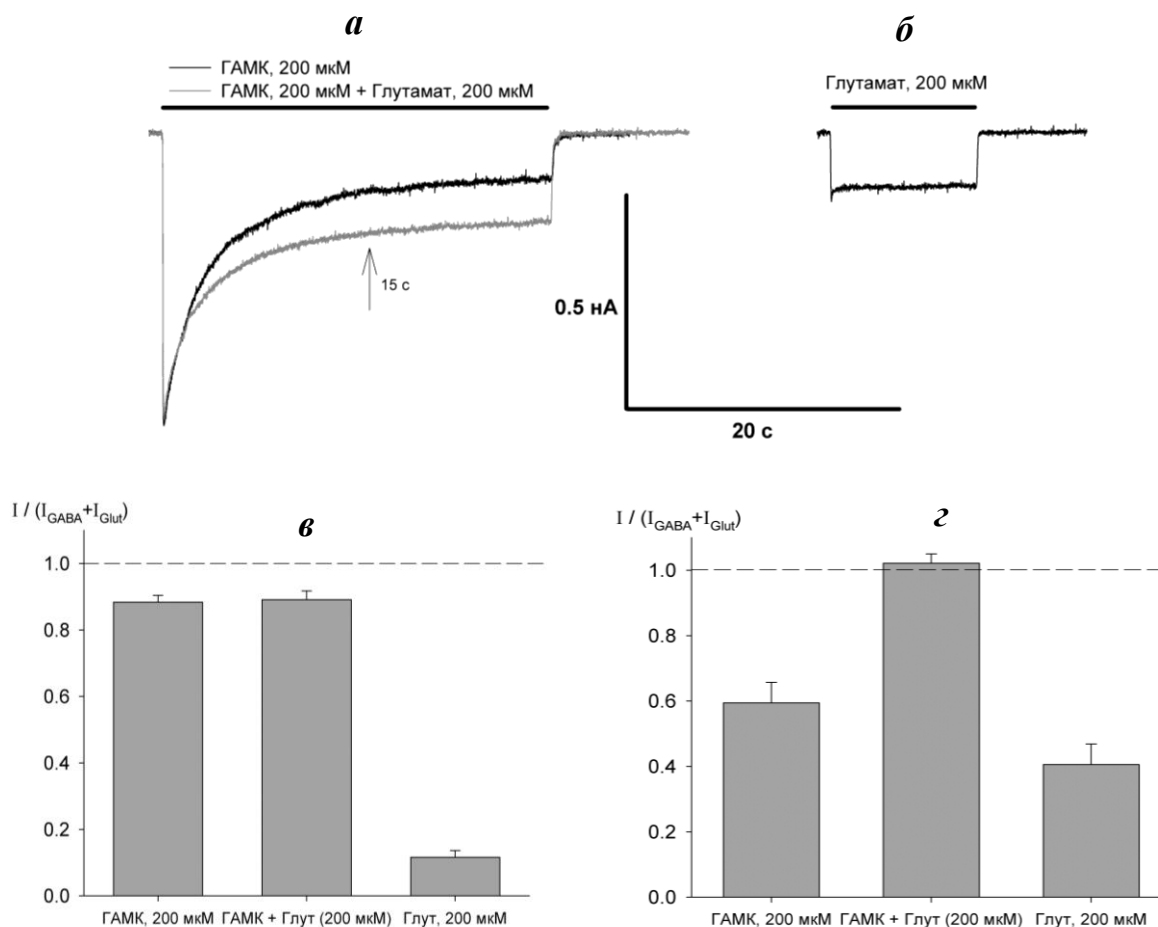


По оси ординат обозначено нормированное значение пиковой амплитуды тока ответов на аппликацию агониста. По оси абсцисс обозначена концентрация апплицируемого вещества.

Рис. 3 - Зависимости амплитуды ответов изолированных нейронов коры головного мозга крысы от концентрации ГАМК (слева) и глутамата (справа). В обоих случаях n=5.

Особенности суммации ионных токов. При регистрации ионных токов методом «Пэтч-кламп» в конфигурации «Целая клетка» с применением пипеточного раствора №1, при самых разных соотношениях концентраций апплицируемых веществ

суммация ответов была нелинейной: пиковая амплитуда ответа на совместную аппликацию глутамата и ГАМК была меньше, чем арифметическая сумма пиковых амплитуд индивидуальных ответов, что указывает на окклюзию ответов. При аппликациях глутамата и ГАМК в концентрациях больше нескольких десятков микромолей наблюдалась полная окклюзия ответов: пиковая амплитуда ответов на совместную аппликацию глутамата и ГАМК совпадала с пиковой амплитудой ответа на аппликацию только ГАМК (рис. 4, *а-в*).



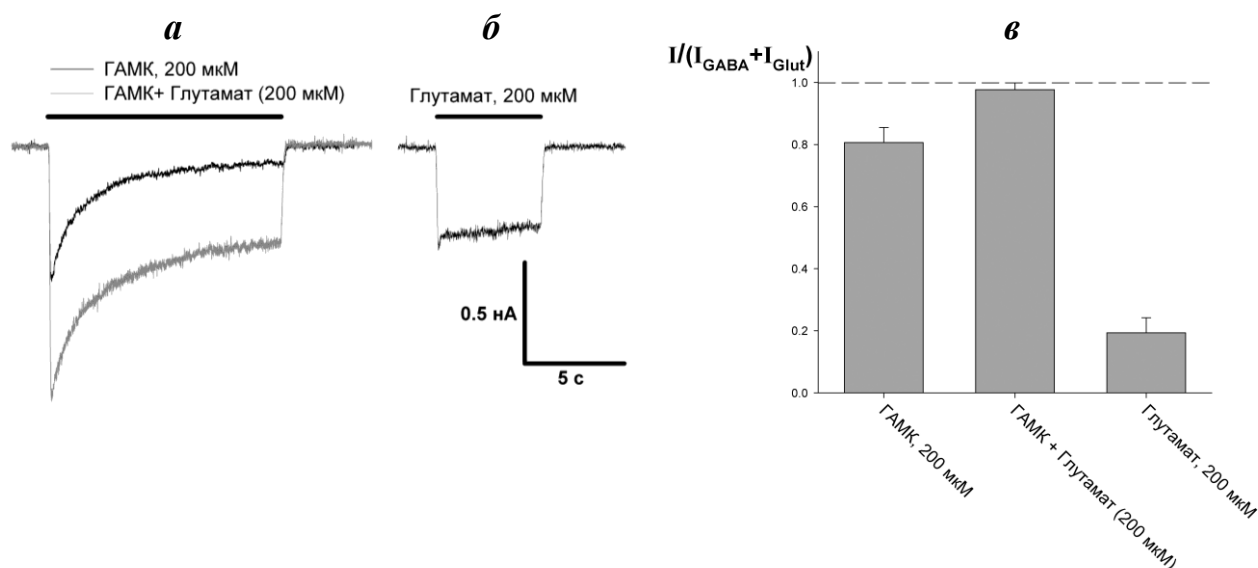
а - ответы на аппликацию ГАМК (200 мкМ, черная линия) и совместную аппликацию глутамата и ГАМК (200 мкМ + 200 мкМ, серая линия), *б* - на аппликацию глутамата (200 мкМ), *в, з* - диаграмма, отражающая соотношение нормированных значений амплитуды пика ответов (*в*) и величины ответов на 15-й сек аппликации (*з*) ГАМК (слева), глутамата (справа) и совместную аппликацию этих веществ (по центру) ($n=5$). Ответы регистрировались с применением пипеточного раствора №1 на основе хлорида цезия при мембранном потенциале -10 мВ.

Рис. 4 - Ответы нейронов на аппликацию ГАМК, совместную аппликацию глутамата и ГАМК и на аппликацию глутамата

С течением времени при совместной аппликации характеристики суммации ионных токов изменяются: на 15-й секунде аппликации окклюзия ответов практически полностью исчезала (проиллюстрировано на рисунке 4, *а, з*).

Окклюзия проявлялась концентрационно-зависимым образом, то есть проявление эффекта нелинейной суммации зависело от концентрации медиаторов. Степень окклюзии ответов при совместной аппликации медиаторов зависела от концентрации ГАМК: окклюзия увеличивается от частичной до полной при увеличении концентрации ГАМК в смеси апплицируемых медиаторов. Максимальная окклюзия проявляется при достаточно высоких концентрациях ГАМК (40 мкМ).

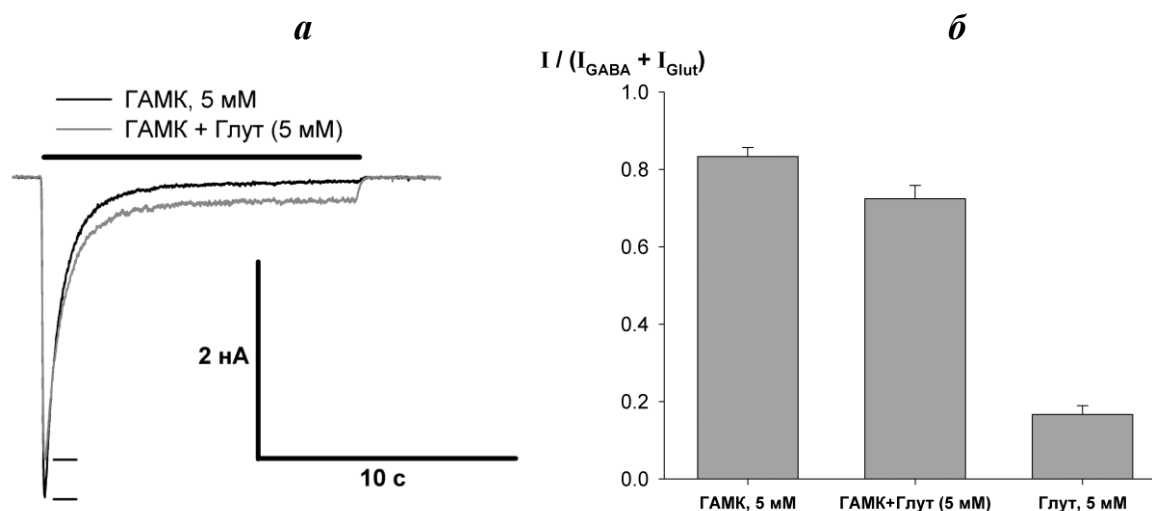
При регистрации с использованием пипеточного раствора №2 существенно изменились особенности суммации ответов. При концентрации апплицируемых веществ до нескольких сотен микромолей окклюзии практически нет, что продемонстрировано на рисунке 5.



a - ответы на аппликацию ГАМК (200 мкМ, черная линия) и совместную аппликацию глутамата и ГАМК (200 мкМ + 200 мкМ, серая линия), *б* - на аппликацию глутамата (200 мкМ), *в* - диаграмма, отражающая соотношение нормированных значений амплитуды пика ответов на аппликации ГАМК (слева), глутамата (справа) и совместную аппликацию этих веществ (по центру) (n=5). Ответы регистрировались с применением пипеточного раствора №2 на основе фторида цезия при мембранном потенциале -80 мВ.

Рис. 5 - Ответы нейронов на аппликацию ГАМК, совместную аппликацию глутамата и ГАМК и на аппликацию глутамата

В то же время при использовании больших концентраций глутамата и ГАМК эффект окклюзии проявлялся значительно сильнее, чем при аппликации аналогичных концентрации с использованием раствора №1. Эффект проиллюстрирован на рисунке 6, где приведены ответы на аппликацию насыщающих концентраций, при которых эффект наиболее нагляден.



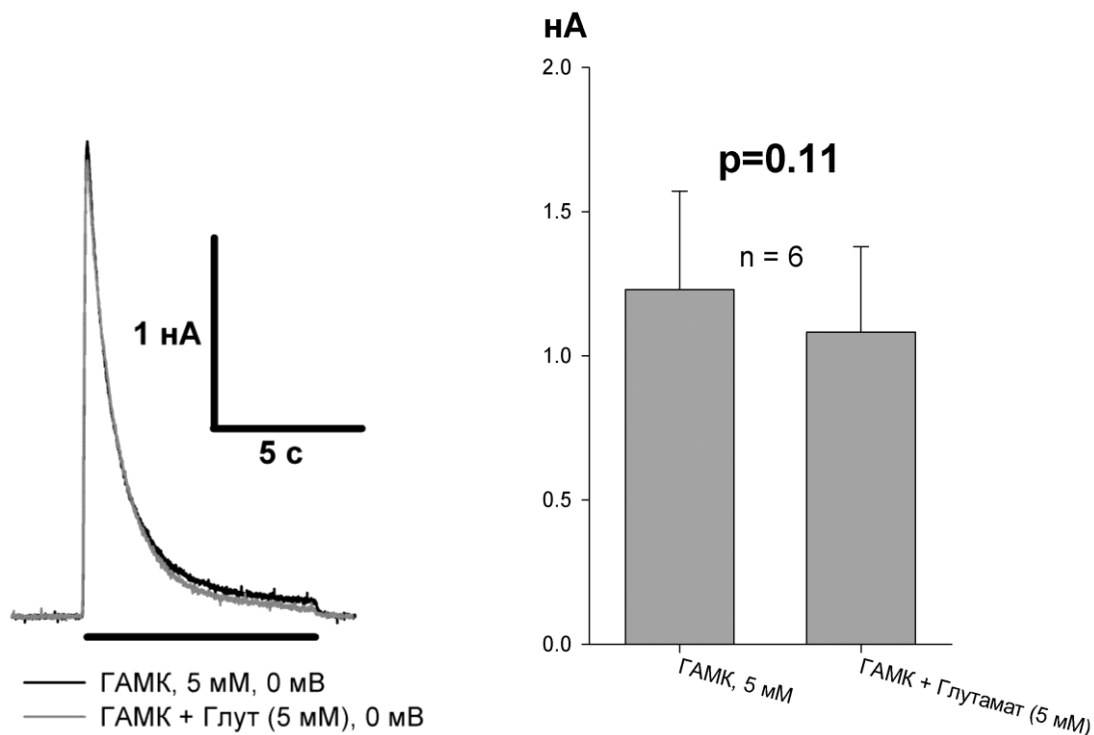
a - ответы на аппликацию ГАМК (5 мМ, черная линия) и совместную аппликацию глутамата и ГАМК (5 мМ + 5 мМ, серая линия), *б* - диаграмма, отражающая соотношение нормированных значений амплитуды пика ответов на аппликации ГАМК (слева), глутамата (справа) и совместную аппликацию этих веществ (по центру) ($n=5$). Ответы регистрировались с применением пипеточного раствора №2 на основе фторида цезия при мембранном потенциале -80 мВ.

Рис. 6 - Ответы нейронов на аппликацию ГАМК, совместную аппликацию глутамата и ГАМК и на аппликацию глутамата

То есть при использовании пипеточного раствора №2, для того, чтобы окклюзия проявила себя требуется гораздо большие концентрации ГАМК (несколько мМ), чем при использовании раствора №1, когда окклюзия проявлялась уже при концентрациях ГАМК менее 10 мкМ.

Причины наблюдаемого различия в проявлении эффектов нелинейной суммации при использовании различных внутрипипеточных растворов могут быть разными. Например, отличие в межрецепторном взаимодействии, которое проявляется при использовании разных растворов.

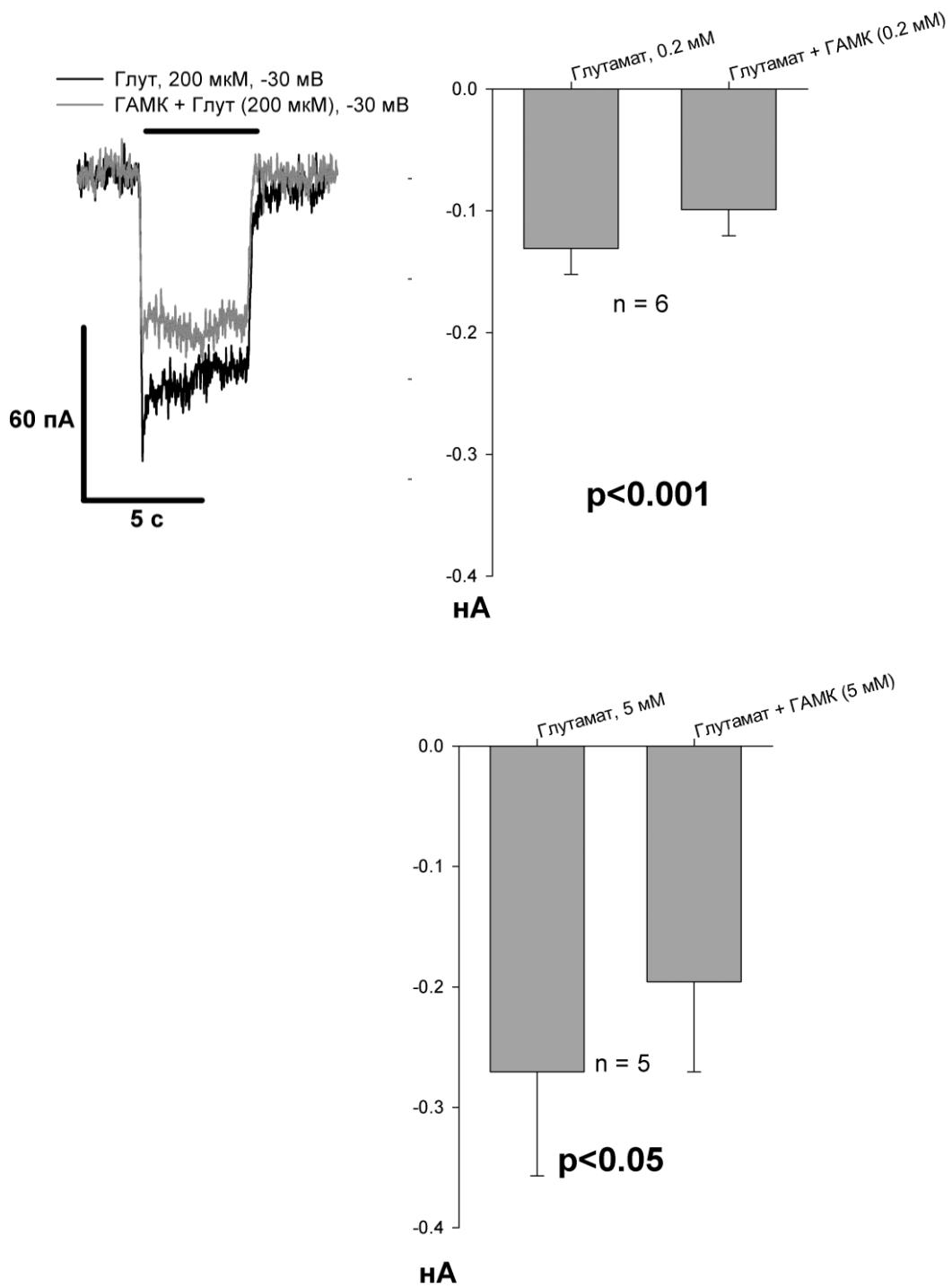
Влияние активации рецепторов глутамата на ГАМК-опосредованные токи. Использовался экспериментальный протокол, при котором аппликации ГАМК и смеси нейромедиаторов осуществлялись при фиксированном мембранном потенциале, равном потенциалу реверсии глутамат-опосредованных токов (около 0 мВ), позволивший оценить влияние активации рецепторов глутамата (без возникновения ионного компонента) на ГАМК-опосредованные токи. Показано, что активация данных рецепторов не влияет на формирование ГАМК-опосредованных токов при аппликации смеси медиаторов. Результаты представлены на рисунке 7.



Зарегистрировано при мембранном потенциале около 0 мВ. Слева – оригинальная запись, справа - соотношение пиковых амплитуд ответов на аппликацию ГАМК и смеси глутамата и ГАМК (n=6). (различие не достоверно).

Рис. 7 - Ответы нейрона на аппликацию ГАМК и смеси глутамата и ГАМК

Использование аналогичного экспериментального протокола, при котором мембранный потенциал фиксировался на значении потенциала реверсии ГАМК-опосредованного ответа (от -32 до -27 мВ), показало, что амплитуда глутамат-опосредованных ответов была достоверно больше амплитуды ответов на аппликацию смеси глутамата и ГАМК при различных соотношениях концентраций медиаторов (рис. 8).



Зарегистрировано при мембранном потенциале около -30 мВ. Слева – оригинальная запись, справа - соотношение пиковых амплитуд ответов на аппликацию глутамата и смеси глутамата и ГАМК в различных концентрациях (n=6)

Рис. 8 - Ответы нейрона на аппликацию глутамата и смеси глутамата и ГАМК

Таким образом, при аппликации смеси нейромедиаторов наблюдается явление окклюзии ответов, это говорит о том, что **активация рецепторов ГАМК влияет на глутамат-опосредованные токи.**

Модуляция ответов нейронов метаботропными рецепторами глутамата и ГАМК. При исследовании влияния активации ГАМК_Б-рецепторов на ГАМК_А-опосредованные токи обнаружено, что модулирующее влияние может проявляться по-разному. Модулирующее влияние может быть ингибирующим или активирующим. Для анализа характера влияния **метаботропных рецепторов ГАМК на ГАМК_А-активируемые ионные токи** была проведена серия экспериментов с использованием селективного антагониста (CGP-55845) и агониста (баклофен) ГАМК_Б-рецепторов. В условиях применения блокатора амплитуда пика ГАМК_А-опосредованного ионного тока обратимо возрастала на $26 \pm 13\%$ (рис. 9).

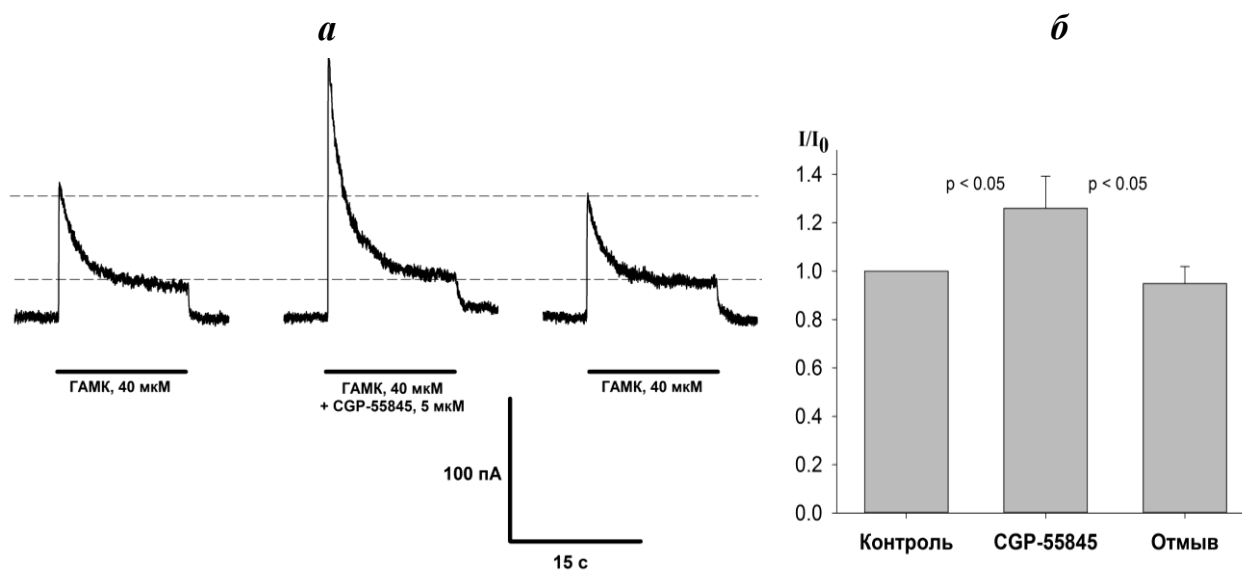


Рис. 9: а - Ответы нейрона на аппликацию ГАМК до-, во время и через 120 сек после добавления в раствор 5 мкМ CGP-55845, антагониста ГАМК_Б-рецепторов; б - Диаграмма, отражающая соотношение нормированных значений амплитуды пика ответов на аппликации (n=6).

Наблюдаемый эффект объясняется устранением ингибирующего влияния со стороны соответствующих метаботропных рецепторов. В случае предварительной активации ГАМК_Б-рецепторов с помощью баклофена выявляется долговременное активирующее влияние на ГАМК_А-опосредованные токи: их амплитуда достоверно увеличилась на $9 \pm 2\%$ (рис. 10).

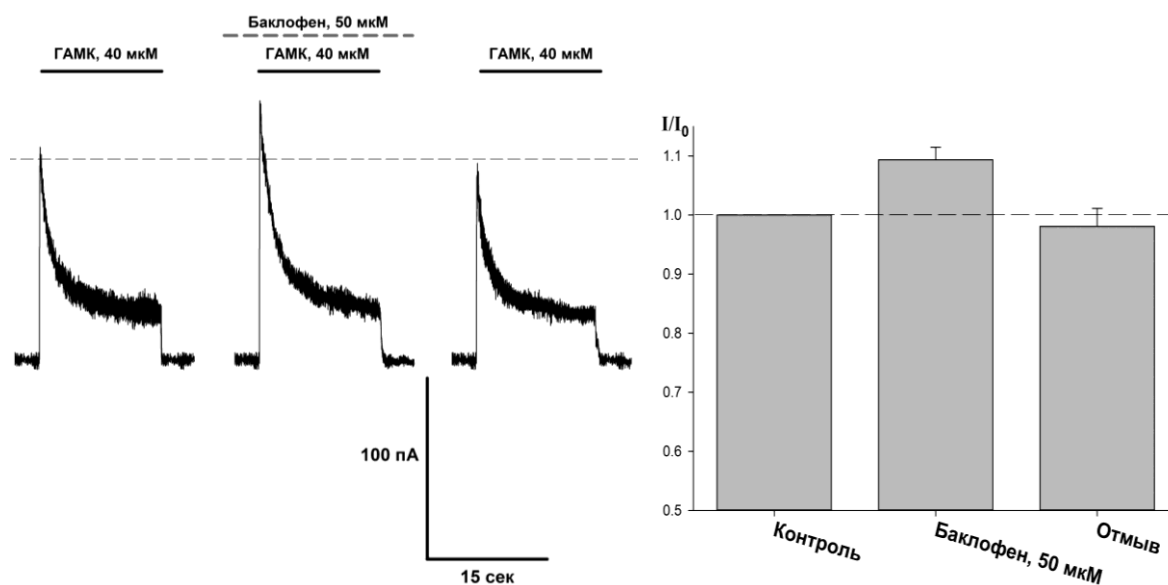


Рис. 10. Ответы нейрона на аппликацию ГАМК до-, во время и через 180 сек после добавления в раствор баклофена (50 мкМ), агониста ГАМК_B-рецепторов (слева). Диаграмма, отражающая соотношение нормированных значений амплитуды пика ответов на аппликации (справа) (n=6).

Таким образом, активация ГАМК_B-рецепторов влияет на токи, опосредованные ионотропными рецепторами ГАМК.

Модуляции посредством **ГАМК_B-рецепторов ионотропных рецепторов глутамата не выявлено**. Достоверных отличий характеристик ответов, указывающих на эффект влияния активации ГАМК_B-рецепторов на глутамат-опосредованные токи, не обнаружено: амплитуда ответов на аппликации глутамата, АМРА, и каината не изменялась при добавлении баклофена в перфузирующий раствор (рис. 11).

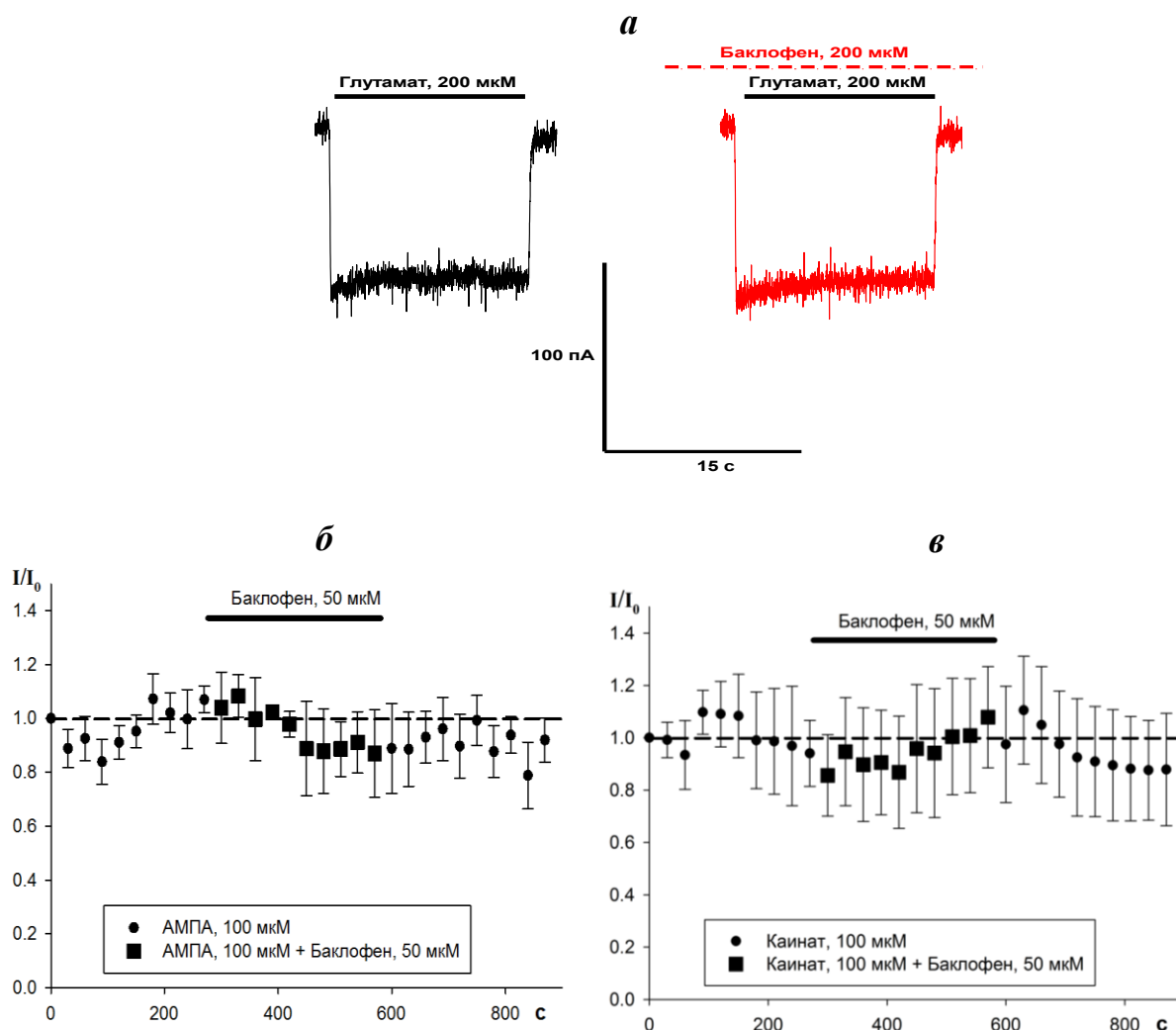


Рис. 11: *a* - Глутамат-опосредованные ответы нейрона в присутствии баклофена (*справа*) и без него (*слева*), *б*, *в* - влияние баклофена на амплитуду АМРА-опосредованных ответов (*б*) и каинат-опосредованных ответов (*в*) (n=5)

Исследование влияния активации **метаботропных глутаматных рецепторов I группы** на ГАМК- и глутамат-опосредованные токи с использованием селективного агониста данных рецепторов транс-ACPD эффектов модуляции этих токов не выявило. Полученные результаты могут указывать на отсутствие влияния постсинаптических мГлуР I на ионотропные рецепторы глутамата и ГАМК в нейронах коры головного мозга крысы.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог всему сказанному выше, можно заключить, что между разными типами рецепторов нейронов префронтальной коры крысы, исследованных в настоящей работе, существуют определенные типы взаимодействия, которые могут регулировать эффективность синаптической передачи. Мы показали, что один из возможных механизмов взаимодействия основан на нелинейной суммации ответов, вызываемых активацией постсинаптических тормозных (ГАМК_A) и возбуждающих глутаматных (AMPA и каинатных) рецепторов. При этом активация тормозных ГАМК_A-рецепторов в большей степени влияет на ионотропные глутаматные рецепторы, чем наоборот.

Мы показали также, что активация метаботропных ГАМК-рецепторов (ГАМК_B-рецепторов) может модулировать ГАМК_A-опосредованные ионные токи, но мы не выявили модуляции ГАМК_B-рецепторами ионотропных рецепторов глутамата, а также модуляции метаботропными рецепторами глутамата I группы ГАМК-рецепторов и ионотропных рецепторов глутамата.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено взаимодействие между постсинаптическими ГАМК_A- и ионотропными глутаматными рецепторами (AMPA и каинатными) нейронов префронтальной коры головного мозга крыс. Активация ионотропных ГАМК_A и глутаматных (AMPA и каинатных) рецепторов сопровождается нелинейной суммацией ответов.

2. При совместной аппликации глутамата и ГАМК активация ГАМК_A-рецепторов в большей мере влияет на глутаматные рецепторы, чем активация глутаматных рецепторов влияет на ГАМК_A-рецепторы изолированных нейронов коры крысы.

3. Активация ГАМК_B-рецепторов может модулировать активность ГАМК_A-рецепторов. В условиях блокады ГАМК_B-рецепторов, амплитуда ответа нейронов коры крысы, опосредованного активацией ГАМК_A-рецепторов была достоверно выше, чем амплитуда ответа при одновременной активации ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов.

4. В случае длительной предварительной активации ГАМК_B-рецепторов наблюдалось увеличение амплитуды регистрируемых ответов нейронов коры на аппликацию ГАМК.

5. Влияния ГАМК_B-рецепторов на ответы ионотропных рецепторов глутамата, а также влияния мГлуР I на ответы ионотропных рецепторов глутамата и ГАМК в нейронах коры крысы выявлено не было.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Амахин Д.В., **Попов В.А.**, Веселкин Н.П. Модуляция ГАМК- и каинат-опосредованных ионных токов изолированных нейронов коры головного мозга крысы метаботропными рецепторами // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2014. - Т. 100 (10). - С. 1169-1179.
2. Амахин Д.В., **Попов В.А.**, Малкиель А.И., Веселкин Н.П. Особенности суммации ГАМК- и глутамат-опосредованных ионных токов изолированных нейронов коры головного мозга крысы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2012. - Т. 98 (12). - С. 1490-1506.
3. **Попов В.А.**, Семенов В.А., Амахин Д.В., Веселкин Н.П. Взаимовлияние рецепторов глутамата и ГАМК нейронов центральной нервной системы. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2016. - Т. 102 (5), в печати.

Тезисы докладов:

1. Амахин Д.В., **Попов В.А.** Влияние метаботропных ГАМК_B-рецепторов на ГАМК-опосредованные ионные токи в нейронах коры головного мозга крысы // Материалы XVI Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье». - СПб. - 2013. - С. 14-15.
2. Амахин Д.В., **Попов В.А.** Механизмы десенситизации ГАМК-опосредованных ионных токов в нейронах коры головного мозга крысы // Материалы конференции молодых исследователей, посвященной памяти академика В.Л. Свидерского. - СПб. - 2013. - С. 37-38.
4. Амахин Д.В., **Попов В.А.**, Веселкин Н.П. Механизмы десенситизации ГАМК-опосредованных ионных токов в нейронах коры головного мозга крысы //

Тезисы докладов XXII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. - Волгоград. - 2013. - С. 24.

5. Амахин Д.В., **Попов В.А.**, Веселкин Н.П. Особенности суммации ГАМК- и глутамат-опосредованных мембранных ионных токов в нейронах коры головного мозга крысы // Биология – наука XXI века: Материалы Международной конференции. - М. - 2012. – С. 34-35.