

Министерство образования и науки Российской Федерации
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт биомедицинских систем и биотехнологий
Высшая школа биомедицинских систем и технологий

Работа допущена к защите
Директор Высшей Школы
_____ О.Л. Власова
« ___ » _____ 2021 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

РОЛЬ ГАМК_B РЕЦЕПТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ В 4-АМИНОПИРИДИНОВОЙ МОДЕЛИ НА ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗАХ МОЗГА КРЫСЫ

по направлению 16.03.01 «Техническая физика»
по образовательной программе
16.03.01_06 «Медицинская и биоинженерная физика»

Выполнила:

студентка гр. 4731601/70602

А.П. Полякова

Руководитель:

доц. ВШБСиТ ИБСиБ, к.б.н., доц.

Т.Ю. Постникова

Консультант:

н.с. ФГБУН ИЭФБ РАН, к.б.н.

С.Л. Малкин

Консультант по нормоконтролю:

доц. ВШБСиТ ИБСиБ, к. ф.-м. н.

В.П. Октябрьский

Санкт-Петербург

2021

РЕФЕРАТ

На 42 с., 7 рисунков

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВИСОЧНАЯ ЭПИЛЕПСИЯ; 4-АМИНОПИРИДИНОВАЯ МОДЕЛЬ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ; ЭПИЛЕПТИФОРМНАЯ АКТИВНОСТЬ; ПРЕ- И ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЕ ГАМК_B РЕЦЕПТОРЫ; ЭНТОРИНАЛЬНАЯ КОРА; ПЕРЕЖИВАЮЩИЕ СРЕЗЫ МОЗГА КРЫСЫ.

Тема выпускной квалификационной работы: «Роль ГАМК_B рецепторов в формировании эпилептиформной активности в 4-аминопиридиновой модели на переживающих срезах мозга крысы».

В данной работе оценивалось влияние ГАМК_B рецепторов на протекание эпилептиформной активности в 4-аминопиридиновой модели *in vitro*. Для достижения поставленной цели был проведен ряд экспериментов: регистрация эпилептиформной активности, анализ парного отношения вызванных возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ), и миниатюрных событий.

Было обнаружено, что активация ГАМК_B рецепторов (ГАМК_B-Р) оказывает выраженное противоэпилептическое действие в 4-аминопиридиновой модели *in vitro*, снижая длительность и частоту иктальных разрядов. Агонист ГАМК_B-Р SKF97541 вызывал уменьшение амплитуды постсинаптических ответов и увеличение значения коэффициента парных импульсов, что свидетельствует о его значительном влиянии на пресинаптически-локализованные рецепторы. При этом тест с парными импульсами не показал достоверных изменений в амплитуде ответов и парном отношении при аппликации блокатора ГАМК_B-Р CGP55845, что говорит о низкой фоновой активности пресинаптических ГАМК_B рецепторов. При записи миниатюрных событий ни агонист, ни антагонист ГАМК_B-Р не изменяли амплитуду, время нарастания и τ спада миниатюрных возбуждающих

постсинаптических токов (мВПСТ). Однако, CGP55845 увеличивал частоту возникновения мВПСТ, а SKF97541 уменьшал её.

ABSTRACT

42 pages, 7 figures

KEYWORDS: TEMPORAL LOBE EPILEPSY; 4-AMINOPYRIDINE MODEL OF EPILEPSY; EPILEPTIFORM ACTIVITY; PRE- AND POSTSYNAPTIC GABAB RECEPTORS; ENTORHINAL CORTEX; ACUTE RAT'S BRAIN SLICES.

The subject of the graduate qualification work is “The role of GABA_B receptors in formation of epileptiform activity in 4-aminopyridine model on acute rat's brain slices”.

In this work, the influence of GABAB receptors on the epileptiform activity in a 4-aminopyridine model of epilepsy in vitro was evaluated. To achieve this goal, several experiments were carried out: the registration of the epileptiform activity, paired pulse test, and the miniature events analysis.

It was found that the activation of GABA_B-receptors (GABA_B-R) has a pronounced antiepileptic effect in the 4-aminopyridine model in vitro, reducing the duration and frequency of the ictal discharges. The GABA_B-R agonist SKF97541 reduced the amplitude of the postsynaptic responses and increased the paired pulse ratio (PPR), which indicates its significant effect on the presynaptic GABA_B receptors. In contrast, the application of the GABA_B-R blocker CGP55845 did not affect the paired pulse ratio of the postsynaptic current amplitudes, which suggest the low levels of background activity of the presynaptic GABA_B receptors. Miniature event analysis have shown that neither the GABA_B-R agonist, nor the antagonist, changed the amplitude, rise time, or decay τ of the miniature excitatory postsynaptic

currents (mEPSC). However, CGP55845 increased the mEPSC frequency, while SKF97541 decreased it.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Височная эпилепсия.....	12
1.1.1. Механизмы и причины возникновения эпилепсии	12
1.2. <i>In vitro</i> модели эпилептиформной активности	13
1.2.1. 4-аминопиридиновая модель эпилептиформной активности	14
1.3. Энторинальная кора. Строение и роль в эпилептогенезе.....	15
1.4. ГАМК _B рецепторы. Строение и роль в развитии эпилепсии	16
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
2.1. Приготовление переживающих срезов мозга крыс.....	19
2.2. 4-аминопиридиновая модель эпилептиформной активности	20
2.3. Электрофизиологические методы исследования	20
2.3.1. Метод локальной фиксации потенциала.....	20
2.3.2. Парная стимуляция.....	23
2.3.3. Миниатюрные ответы	25
2.4. Статистическая обработка данных	26
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	27
3.1. Влияние агониста и антагониста ГАМК _B рецепторов на параметры эпилептиформной активности	27
3.2. Влияние антагониста и агониста ГАМК _B рецепторов на парное отношение	29

3.3. Влияние антагониста и агониста ГАМК _B рецепторов на миниатюрные события	32
ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭ – височная эпилепсия

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГАМК_А – рецептор гамма-аминомасляной кислоты типа А

ГАМК_В – рецептор гамма-аминомасляной кислоты типа В

ГАМК_В-Р – рецепторы гамма-аминомасляной кислоты типа В

ИПСП – ингибирующий постсинаптический потенциал

ИР – иктальные разряды

ИИР – интериктальные разряды

ИСМЖ – искусственная спинномозговая жидкость

мВПСТ – миниатюрные возбуждающие постсинаптические токи

ЦНС – центральная нервная система

AMPA – рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

GIRK - G-белок-связанные калиевые каналы внутреннего выпрямления (от G protein-activated inwardly-rectifying K⁺ channels)

NMDAR – N-метил-D-аспаратные рецепторы

TTX – тетродотоксин (от tetrodotoxin)

4-AP – 4-аминопиридин (от 4-aminopyridine)

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных заболеваний центральной нервной системы, от которого страдают более 70 миллионов людей всех возрастных групп [12, 14, 17, 37]. Более того, в Европе около 30% случаев эпилепсии остаются резистентны к доступным на данный момент фармакологическим противосудорожным препаратам [12, 18, 42]. В связи с этим, проблема лечения эпилепсии и поиск новых фармакологических мишеней являются актуальными задачами для науки и медицины, поэтому исследование данного заболевания, его механизмов развития и возникновения на молекулярном уровне было выбрано для выпускной квалификационной работы бакалавра.

Удобными для исследования эпилепсии на молекулярном уровне являются *in vitro* модели эпилепсии [4, 12], благодаря которым с помощью электрофизиологических методов можно получать записи эпилептиформной активности. Такая активность характеризуется наличием коротких интериктальных и длительных (более 30 с) иктальных разрядов.

Патогенез эпилепсии характеризуется дисбалансом между возбуждением и торможением в головном мозге [8, 13, 14, 16, 18, 34, 37, 42]. Главным возбуждающим медиатором в ЦНС является глутамат, тогда как за распространение торможения в головном мозге ответственна преимущественно гамма-аминомасляная кислота (ГАМК).

ГАМК распространяет тормозные сигналы в головном мозге, воздействуя на ионотропные ГАМК_A и метаботропные ГАМК_B рецепторы [8, 13, 14, 18]. Ионотропные рецепторы ответственны за быстрый ингибирующий постсинаптический потенциал (ИПСП) [13, 14, 20, 23, 27, 36] и расположены в основном на постсинаптической мембране, тогда как ГАМК_B рецепторы регулируют высвобождение нейротрансмиттера, опосредуют более медленный ИПСП, и находятся как на пре-, так и на постсинаптической мембране

нейронов соответственно [8, 13, 14, 20, 24, 25, 36]. Традиционно считается, что снижение функции ГАМК_A рецепторов способствует нарушению тормозной нейротрансмиссии [14, 18, 27]. Таким образом, антагонисты ГАМК_A рецепторов использовались для имитации некоторых характеристик эпилептической активности, а их агонисты являются антиконвульсантами [14, 23]. Однако, нарушение ионного гомеостаза нейронов при эпилепсии может снижать эффективность торможения при активации ГАМК_A рецепторов [8], поэтому избирательное воздействие на ГАМК_B рецепторы может стать новой фармакологической стратегией для противосудорожной терапии. Кроме того, большое количество работ посвящено связи эпилепсии и ГАМК_A рецепторов, тогда как роль ГАМК_B рецепторов в процесс эпилептогенеза изучена в меньшей степени.

Таким образом, была поставлена следующая цель: оценить, как активность ГАМК_B рецепторов влияет на протекание эпилептиформной активности в 4-аминопиридиновой модели *in vitro*.

Задачи, которые были поставлены для достижения цели:

- 1) Оценить эффект блокады ГАМК_B рецепторов на длительность и частоту возникновения иктальных разрядов.
- 2) Оценить эффект активации ГАМК_B рецепторов их агонистом на длительность и частоту возникновения иктальных разрядов.
- 3) Оценить эффект блокады и активации ГАМК_B рецепторов на вероятность выброса глутамата из пресинаптических окончаний в энторинальной коре.

Материалы и методы.

Для всех экспериментов использовались переживающие гиппокамп-энторинальные горизонтальные срезы головного мозга крыс линии Вистар возраста 3-х недель. Для выполнения первых двух задач использовалась 4-

аминопиридиновая модель эпилепсии, заключающаяся в увеличении внеклеточной концентрации ионов K^+ до 3,5 мМ, снижении концентрации ионов Mg^{2+} до 0,25 мМ, и добавлении конвульсанта 4-аминопиридина (200 мкМ). Такой раствор приводит к снижению порога возбуждения нейронов в срезе, и короткие интериктальные и длительные (более 30с) иктальные разряды (ИР) начинают генерироваться в нервной ткани [2, 4, 22]. Для регистрации эпилептиформной активности на одиночных нейронах энторинальной коры использовался метод локальной фиксации потенциала при -20 мВ. Для блокады ГАМК_B рецепторов использовался их селективный антагонист CGP55845 (5 мкМ), а для их активации - специфический агонист SKF-97541 (5 мкМ). Контрольные записи в эпилептическом растворе длились от 60 минут. Перед добавлением в раствор блокатора или агониста, регистрировалась эпилептиформная активность клетки в контроле в течение 20–30 минут, затем после аппликации SKF-97541 или CGP55845 та же клетка регистрировалась ещё 30–45 минут. Оценивались частота и длительность иктальных разрядов в контроле и после добавления препаратов.

Для достижения третьей задачи были использованы два экспериментальных подхода: метод парной стимуляции и анализ миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (мВПСТ). Для выполнения парной стимуляции биполярный вольфрамовый электрод помещался в глубокие слои энторинальной коры, и через него подавались импульсы тока, длящиеся 0,1 мс, с интервалом 50 мс между ними. При этом на расстоянии 20–30 мкм от стимулирующего электрода производилась регистрация ответов с помощью метода локальной фиксации потенциала при -80 мВ в течение 5 минут. Зарегистрированные ответы представляли собой постсинаптические возбуждающие токи, опосредованные AMPA рецепторами глутамата. В экспериментах сравнивались коэффициенты парных импульсов и амплитуда ответов в контроле и при добавлении агониста или антагониста ГАМК_B-Р. Для регистрации мВПСТ, в циркулирующий раствор добавлялся блокатор

потенциалзависимых Na^+ каналов тетродотоксин (0,5 мкМ), который подавлял генерацию потенциалов действия в нейронах. В результате, с помощью метода локальной фиксации потенциала при -80 мВ регистрировались миниатюрные события клетки на протяжении 5 минут. В экспериментах сравнивались изменения в частоте возникновения, амплитуде, времени нарастания, и τ спада мВПСТ в контроле и при аппликации блокатора или агониста ГАМК_B рецепторов.

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета SciPy (<https://scipy.org/>) для языка программирования Python.

Научная новизна.

Был проведен ряд экспериментов, чтобы не только оценить эффект блокады и активации ГАМК_B-R на генерацию эпилептиформной активности, но и понять какова локализация рецепторов, опосредующих наблюдаемые эффекты.

Практическая значимость работы.

Полученные результаты могут быть учтены при разработке новых противосудорожных препаратов.

Работа выполнена на базе Института Эволюционной Физиологии и Биохимии им. И.М. Сеченова Российской Академии Наук (ИЭФБ РАН), в лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий. Заведующий лабораторией А.В. Зайцев.

Апробация результатов

По теме работы были опубликованы тезисы в XXIV Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2021).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Височная эпилепсия

Эпилепсия – это патология центральной нервной системы (ЦНС), которая оказывает существенное влияние на жизнедеятельность больных, так как наличие судорог, сопутствующие психические расстройства и когнитивные нарушения, побочные эффекты лекарств, могут снижать качество жизни людей, страдающих данным заболеванием [9, 10, 15, 17, 39, 41]. При этом, височная эпилепсия (ВЭ) является наиболее распространенной формой рефрактерной фокальной эпилепсии (40% пациентов имеют данную форму заболевания) [15, 30, 35]. Эпилептическая активность при ВЭ возникает в структурах лобной доли: гиппокампе, миндалинах, энторинальной коре, субикулуме [41].

1.1.1. Механизмы и причины возникновения эпилепсии

Эпилепсия характеризуется возникновением повторяющихся спонтанных эпилептических припадков, при которых развивается чрезмерная, синхронная нейрональная активность в головном мозге [5, 37]. При формировании такой активности в одной или нескольких локализованных областях, начало эпилептического приступа называется очаговым. Если же аномальная нейрональная активность развивается, имея широкое распространения в обоих полушариях, то в таком случае начало приступа является генерализованным [37].

Конкретные механизмы возникновения патологической синхронизированной нейрональной активности на данный момент изучены не полностью. Однако, одной из популярных и очевидных гипотез на данный момент является нарушение баланса между возбуждением и торможением в головном мозге [8, 14, 16, 18, 34, 37, 42]. Главным возбуждающим медиатором в ЦНС является глутамат, тогда как за распространение торможения в головном мозге ответственна преимущественно гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). Таким образом, к сверхактивации нервных клеток могут привести: 1)

чрезмерная активация глутаматергической передачи и/или 2) ослабление ГАМКергической нейротрансмиссии [18]. В первом случае могут наблюдаться следующие явления: повышенная продукция глутамата, избыточное его выделение в синаптическую щель, повышение внеклеточной концентрации возбуждающего медиатора, и повышение чувствительности глутаматных рецепторов. Во втором случае имеет место противоположная ситуация: сниженный синтез тормозных медиаторов, недостаточное поступление ГАМК в синаптическую щель, чрезмерно быстрое её удаление, снижение эффективности работы ГАМК-рецепторов [5, 8, 34, 42]. Причины вышеперечисленных нарушений обусловлены в большей степени генетически (65,5%), также большое влияние оказывают поражения сосудистой системы в головном мозге (10,9%), черепно-мозговые травмы, нейроинфекции, опухоли мозга, и т. д. [3].

1.2. *In vitro* модели эпилептиформной активности

В настоящее время для изучения механизмов аномальной синхронизации нейрональных сетей при судорогах часто применяются *in vitro* модели эпилептиформной активности, т. к. при их использовании удобно вызывать эпилептические разряды и следить за их развитием, влияя на патологическую активность фармакологически. *In vitro* модели судорожной активности имеют следующие преимущества: у исследователя имеется контроль над внеклеточным раствором, также при данной модели возможно получать стабильные электрофизиологические записи, что позволяет исследовать эпилепсию на молекулярном уровне, для исследования становятся доступными зоны головного мозга, расположенные вблизи основания черепа [4, 12].

Для того, чтобы вызвать эпилептическую активность в *in vitro* модели можно использовать различные методы [4], например:

- 1 вещества, вызывающие эпилепсию (бикукуллин – блокатор ГАМК_A рецепторов, 4-аминопиридин – блокатор K⁺ каналов);

- 2 нарушенный ионный состав внеклеточного раствора (пониженная или нулевая концентрация ионов магния, повышенная концентрация ионов калия);
- 3 электрическая стимуляция
- 4 гипоксический эффект.

1.2.1. 4-аминопиридиновая модель эпилептиформной активности

4-аминопиридин (4-AP) является хемоконвульсантом, ускоряющим развитие эпилептоподобного состояния [2]. Данное вещество является блокатором калиевых каналов и может вызывать интериктальную активность в гиппокампе и иктальную активность в энторинальной коре [31]. До конца механизм эпилептогенного действия 4-AP не изучен, однако можно предположить, что при блокаде тока ионов калия через потенциалзависимые каналы происходит продление потенциала действия в окончании аксона, что приводит к усилению поступления ионов Ca^{2+} в пресинаптический бутон, и, следовательно, к более интенсивному выбросу нейромедиатора в синаптическую щель [4, 31].

Однако, для получения более стабильных и длительных электрофизиологических записей с регулярно генерирующимися иктальными разрядами, а также для исследования перехода между интериктальной и иктальной активностью, помимо аппликации 4-AP, изменяют ионный состав внеклеточного раствора [4]. Например, используют повышенное содержание ионов калия и пониженную концентрацию ионов магния [4]. Эффект, наблюдаемый при снижении $[\text{Mg}^{2+}]$, связан с наличием магниевых блока NMDA-рецепторов, который предотвращает их спонтанную активацию. При дефиците ионов магния риск спонтанного открытия ионных каналов NMDA-рецепторов повышается даже в отсутствии глутамата [4, 12]. При повышенной концентрации ионов K^+ во внеклеточном растворе происходит сдвиг равновесного потенциала, и, как следствие, так же активация NMDA-рецепторов [4].

При использовании такой модели можно регистрировать следующие виды синхронизированной нейрональной активности [4, 22]:

- интериктальные разряды, опосредованные ГАМК (тормозные разряды),
- интериктальные разряды, опосредованные глутаматными рецепторами (возбуждающие разряды),
- иктальные разряды.

В *in vitro* моделях интериктальные разряды – это короткие события, длящиеся до 10 секунд. Подобные разряды обычно не вызывают поведенческих нарушений при их возникновении *in vivo*. С другой стороны, иктальная активность вследствие своей длительности (десятки секунд) в целом организме обычно способна вызвать судорожный припадок [30, 31]. Иктальная активность возникает в энторинальной коре и распространяется в гиппокамп, поэтому для её возникновения в срезах мозга необходимо сохранение непрерывной связи между энторинальной корой и гиппокампом [22].

1.3. Энторинальная кора. Строение и роль в эпилептогенезе

Чаще всего в исследованиях эпилептиформной активности *in vitro* используют переживающие срезы мозга грызунов, содержащие гиппокамп и энторинальную кору (ЭК), так как именно эти зоны головного мозга зачастую являются источниками паталогической нейрональной активности при височной эпилепсии [1, 30, 33, 40]. Это объясняется тем, что эти части гиппокампальной формации, которая включает в себя гиппокамп, зубчатую извилину, субикулум, и энторинальную кору, связаны между собой, и взаимодействуют друг с другом через двусторонние связи [11, 32, 33], что способствует синхронизации активности.

Энторинальная кора располагается в парагиппокампальной извилине [6]. Энторинальная кора представляет собой связующие звено между неокортексом и гиппокампом, обеспечивая передачу информации, процессы консолидации

памяти [6, 7]. Информация из неокортекса поступает во II и III слои ЭК, далее импульсы могут по аксонам, образующим перфорантный путь (перфорирует субикулум), распространиться в зубчатую извилину на зернистые нейроны, аксоны которых формируют мшистые волокна, идущие к нейронам поля СА3 гиппокампа. От нейронов поля СА3 информация по коллатералям Шаффера поступает в поля СА2 и СА1. Аксоны нейронов поля СА1 напрямую или через субикулум передают информацию обратно в энторинальную кору, откуда она возвращается в неокортекс [6, 7]. Также, из энторинальной коры импульсы, минуя зубчатую извилину и поле СА3, могут напрямую передаваться нейронам поля СА1 гиппокампа [6].

Во многих исследованиях было показано, что в эпилептическом растворе в срезах гиппокампа с перерезанным перфорантным путём можно наблюдать только интериктальные разряды, тогда как на гиппокампально-энторинальных срезах, или срезах, содержащих только энторинальную кору, чередуются интериктальная и иктальная активность [30, 33]. Таким образом, инициация иктальных разрядов начинается именно в энторинальной коре, и затем она распространяется в гиппокамп [30, 33].

1.4. ГАМК_B рецепторы. Строение и роль в развитии эпилепсии

ГАМК_B-рецепторы являются метаботропными рецепторами гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Они относятся к C классу связанных с G-белками рецепторов [36]. По своему строению ГАМК_B-рецептор является гетеродимером, то есть, состоит из двух субъединиц ГАМК_{B1} и ГАМК_{B2}. Обе субъединицы имеют N-концевой внеклеточный домен, C-концевой внутриклеточный домен – цитоплазматический хвост, которым субъединицы соединяются друг с другом, и семиспиральный трансмембранный домен [8, 20, 36]. Субъединицы ГАМК_B-рецептора выполняют разные функции: ГАМК_{B1} необходима для связывания с ГАМК, а ГАМК_{B2} отвечает за локализацию рецептора на мембране его связь с G-белком [8, 20]. Субъединица ГАМК_{B1}, в свою очередь, может быть представлена в двух видах: ГАМК_{B1a} или ГАМК_{B1b}.

Рецепторы, содержащие ГАМК_{B1a} и ГАМК_{B2}, расположены преимущественно пресинаптически, а постсинаптическую локализацию имеют рецепторы с ГАМК_{B1b} и ГАМК_{B2} субъединицами [20, 36].

ГАМК_B-рецепторы создают ингибирующий эффект через: инактивацию потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов, активацию G-белок-связанных калиевых каналов внутреннего выпрямления (GIRK - G protein-activated inwardly-rectifying K⁺ channels), и ингибирование аденилатциклазы [20, 36]. ГАМК_B-Р — это G-белок-связанные метаботропные рецепторы, относящиеся к семейству G_{i/o}. После активации ГАМК_B-рецептора, субъединицы G_α и G_{βγ} диссоциируют. Субъединицы G_{αi/o} ингибируют аденилатциклазу, уменьшая количество циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), тогда как G_{βγ} субъединицы ингибируют Ca²⁺-каналы и активируют GIRK каналы [36].

Активация пре- и постсинаптических рецепторов имеет различные эффекты. Так, активация пресинаптических рецепторов снижает выброс нейромедиатора в синаптическую щель [8, 26]. Нейромедиатором может быть, как ГАМК в тормозных синапсах, так и глутамат в возбуждающих. Это достигается благодаря тому, что пресинаптические ГАМК_B-рецепторы через G_{βγ} субъединицы ингибируют потенциалзависимые Ca²⁺-каналы на мембране, вследствие чего уменьшается поступление ионов кальция в клетку, и выброс нейромедиатора в синаптическую щель замедляется. Эффект активации постсинаптических рецепторов связан с длительной гиперполяризацией, наступающей после быстрого тормозного компонента, связанного с ГАМК_A-рецепторами. Это происходит из-за инициируемого постсинаптическими ГАМК_B-рецепторами, а конкретнее - G_{βγ} субъединицами, открытия GIRK каналов, вызывающих приток ионов K⁺ в клетку [8, 24, 26, 36]. В результате возникает медленный и длительный ингибирующий постсинаптический потенциал.

Роль ГАМК_B рецепторов в патогенезе эпилепсии ещё не достаточно известна [8, 26, 29]. Показано, что агонисты ГАМК_B рецепторов ингибируют

выброс нейромедиаторов (ГАМК и глутамата), а при модели хронической височной эпилепсии было обнаружено снижение ингибирующего воздействия пресинаптических ГАМК_B-Р на выброс как глутамата, так и ГАМК [38]. Однако, в настоящее время мы не знаем, является ли снижение эффективности пресинаптических ГАМК_B-Р причинным фактором при хронической эпилепсии, или её следствием [38]. Однако, роль ГАМК_B-рецепторов в процессе возбуждения при эпилепсии может быть двойка. Так, активация ГАМК_B-Р может ослаблять возбудимость за счет вовлечения пре- и постсинаптических ГАМК_B гетерорецепторов на глутаматергических нейронах, в то же время активация пресинаптических ГАМК_B ауторецепторов на интернейронах может способствовать возбудимости за счет растормаживания возбуждающих нейронов [21]. Также, была выявлена важная роль работы ГАМК_B-Р при кортико-таламических припадках, особенно в их остановке [28]. В работах, посвященных эпилепсии у молодых крыс возраста 12, 18 и 25 дней, была показана важная роль ГАМК_B-рецепторов в процессе ингибирования нейрональной активности, а аппликация антагонистов ГАМК_B-Р имела проконвульсантный эффект [29]. Также, у молодых крыс агонист ГАМК_B-Р SKF97541 проявляет противосудорожные свойства [19].

Таким образом, можно предположить, что потеря ингибирующего контроля над высвобождением глутамата может привести к усилению передачи возбуждения и повышению возбудимости сети, что приводит к эпилептогенезу [38]. В то время, как использование аллостерических модуляторов ГАМК_B рецепторов на постсинаптических мембранах может быть перспективно в качестве для лечения случаев рефрактерной детской эпилепсии [26].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Приготовление переживающих срезов мозга крыс

Для исследования использовались крысы линии Вистар возраста от 20 до 22 дней, которые содержались при комнатной температуре в нормальных условиях. Эксперименты выполнялись в соответствии с международными нормами и стандартами, регламентирующими правила работы с лабораторными животными. В течение исследования были приложены все усилия для минимизации количества используемых животных и их страданий.

Крыс декапитировали на пластиковом холодном контейнере, содержащем хладагент, после чего делался продольный разрез кожи головы для того, чтобы оголить область черепа. Кости черепа разрезались по саггитальному и венечным швам и раздвигались в стороны, делая доступным мозг для последующих манипуляций. От мозга отрезались мозжечок, часть лобных долей, и часть дорсальной поверхности. В течение всей операции мозг капельно омывался холодной (0 °C) искусственной спинномозговой жидкостью (ИСМЖ).

Затем срезанной дорсальной частью мозг фиксировали с помощью клея на предметном магнитном столике вибратора Microm HM 650 V. С помощью лезвия вибратора изготавливались срезы мозга толщиной 350 мкм, при этом мозг находился в холодной ИСМЖ, аэрируемой карбогеном (95 % O₂ / 5 % CO₂). ИСМЖ изготавливали перед операцией в соответствии с составом (в мМ) 126 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 1 MgSO₄, 2 CaCl₂, 24 NaHCO₃, и 20 D-сахарозы, и затем замораживали до состояния «шуги». Готовые срезы, содержащие гиппокамп и энторинальную кору, помещали в специальные лунки, закрепленные на стакане, в котором также находилась ИСМЖ при комнатной температуре, аэрируемая карбогеном. Стакан со срезами помещали для инкубации на водяную баню при температуре +35 °C на 40–45 минут. По истечении этого времени срезы находились при комнатной температуре.

Обычно от одной крысы использовалось от двух до восьми срезов в разных экспериментах.

2.2. 4-аминопиридиновая модель эпилептиформной активности

В ванночку, расположенную под микроскопом в patch clamp установке, помещался срез, омываемый специальным проэпилептическим раствором, содержащим хемоконвульсант 4-AP (блокатор калиевых каналов). Этот раствор содержал (в mM): 125 NaCl, 3,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄(*2H₂O), 0,25 MgSO₄(*7H₂O), 2 CaCl₂, 24 NaHCO₃, 13,32 D-сахарозы, 0,1 4AP. Модель эпилептиформной активности с таким составом внеклеточного раствора называется 4-аминопиридиновой моделью с повышенной концентрацией ионов K⁺ и пониженной концентрацией ионов Mg²⁺. Эпилептиформная активность в этом растворе развивается в энторинальной коре в течение 5 минут и затем по проводящим путям распространяется в поля гиппокампа. Таким образом, на пирамидных нейронах энторинальной коры и гиппокампа с помощью метода локальной фиксации потенциала можно регистрировать длительные, длящиеся десятки секунд, иктальные разряды, и короткие интериктальные разряды, опосредованные как глутаматом, так и ГАМК.

2.3. Электрофизиологические методы исследования

2.3.1. Метод локальной фиксации потенциала

Для визуализации эпилептиформной активности на пирамидных одиночных нейронах энторинальной коры использовался метод локальной фиксации потенциала (patch clamp) в конфигурации «целая клетка» (рис. 2.1). Напряжение на мембране фиксировалось на -20 мВ, что позволяло наблюдать как ГАМК-, так и глутамат-опосредованные ответы.

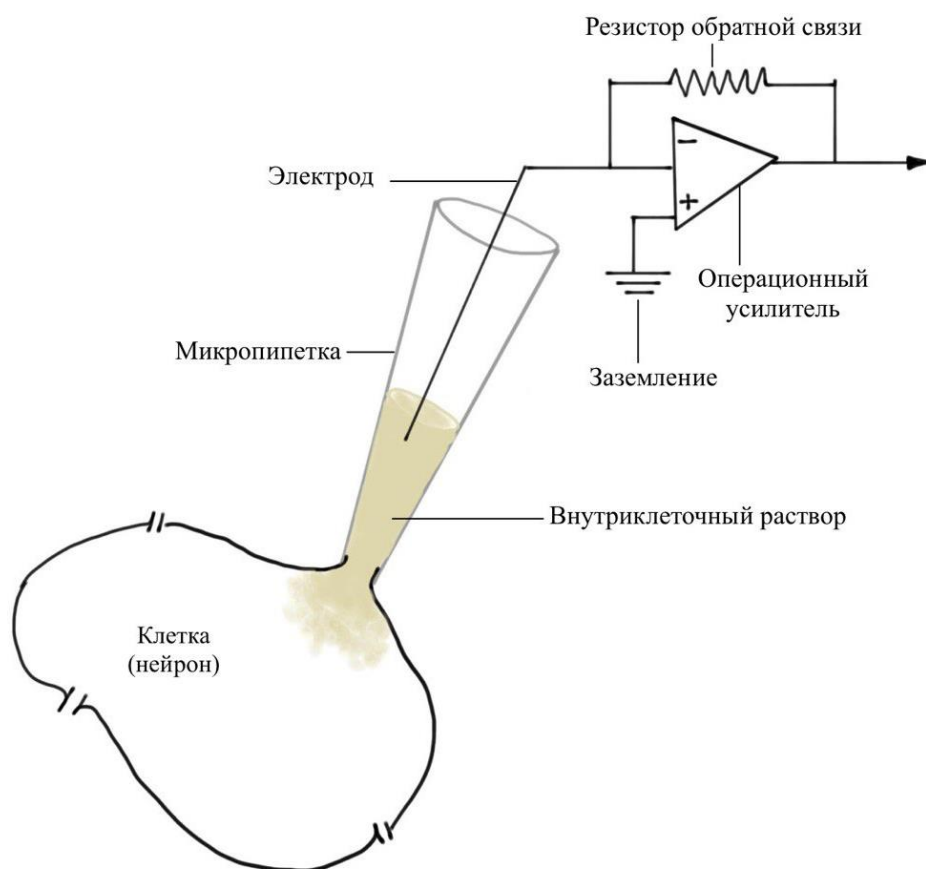


Рис. 2.1. Схема метода локальной фиксации потенциала в режиме «целая клетка»

Для изготовления стеклянных patch-пипеток использовался пуллер, SUTTER INSTRUMENT MODEL P-1000, и трубочки из боросиликатного стекла с наружным диаметром 1,5 мм и внутренним диаметром 0,86 мм, диаметр кончика patch-пипеток подбирался таким образом, чтобы сопротивление микроэлектрода было от 2 до 3 МОм. В эти patch-пипетки перед началом работы помещался внутриклеточный раствор, содержащий (в мМ) цезий-метансульфонат (CsMeSO_4) 127, NaCl 10, EGTA 5, HEPES 10, QX314,6, АТФ-Mg 4, ГТФ 0,3. На внутренний объём электрода подавалось положительное давление. С помощью микроскопа можно было визуализировать клетки и микроэлектрод на экране, а благодаря

микроманипулятору Sutter MP-225 можно было перемещать стеклянный микроэлектрод. После введения микроэлектрода в раствор, необходимо было потенциал на электроде скомпенсировать до 0.

У клеток, с которых производилась регистрация, ядро не должно было наблюдаться, а их форма должна была быть не расплывчатой. После выбора нужной клетки в энторинальной коре, электрод аккуратно подводился к поверхности её мембраны (рис. 2.2). В момент, когда около кончика стеклянного микроэлектрода можно было наблюдать появляющееся тёмное пятно, открытием клапана сбрасывалось положительное давление на микроэлектроде, и усилитель переводился в режим Voltage clamp. С помощью отрицательного давления облегчалось присоединение к мембране. При достижении сопротивления выше 1 ГОм, можно было прорывать мембрану резким подтягиванием воздуха. По достижении конфигурации «целая клетка», начинали регистрацию активности на нейроне.

Регистрация эпилептиформной активности пирамидных, одиночных клеток энторинальной коры производилась по-разному:

- 1 В обычном эпилептическом растворе клетки регистрировались от 60 минут (контроль);
- 2 Сначала регистрация производилась в эпилептическом растворе в течение 20–30 минут (контроль), после чего запись прекращалась. Затем в наружный раствор добавлялся блокатор ГАМК_B-Р CGP55845 (5 мкМ), и снова включалась запись той же клетки, длящаяся от 30 до 50 минут.
- 3 Сначала регистрация производилась в эпилептическом растворе в течение 20–30 минут (контроль), после чего запись прекращалась. Затем в наружный раствор добавлялся агонист ГАМК_B-Р SKF-97541 (5 мкМ), и снова включалась запись той же клетки, длящаяся от 30 до 50 минут.

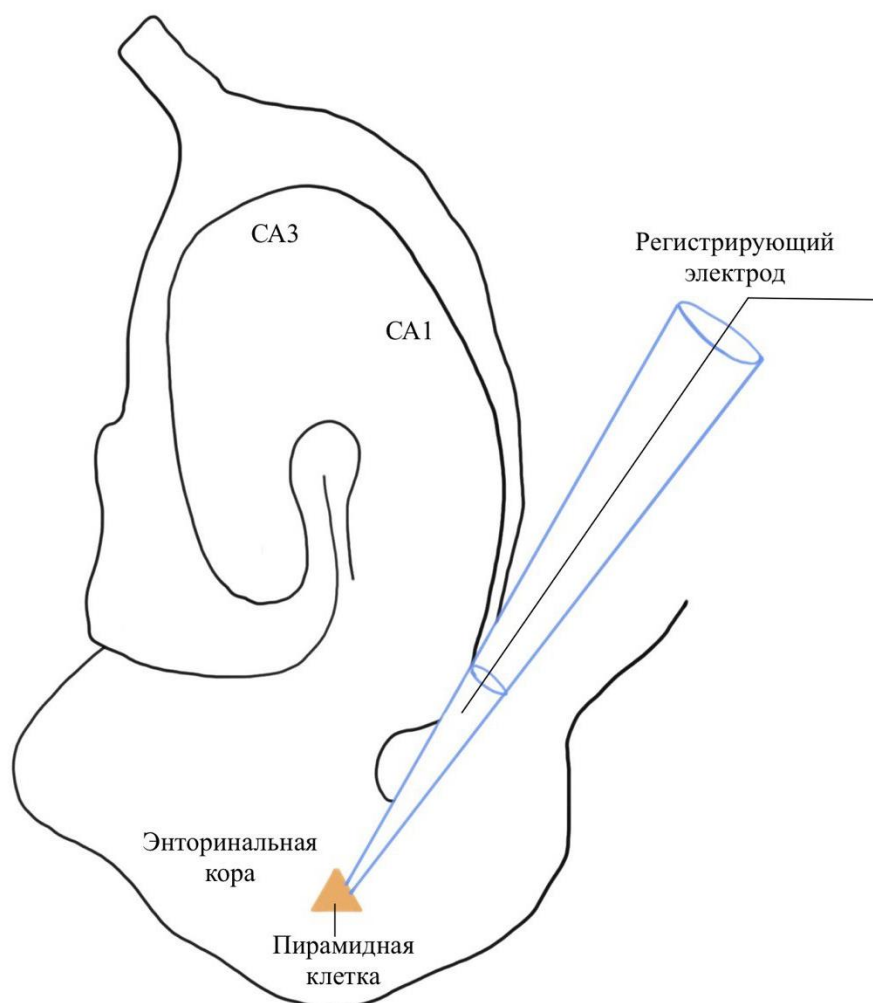


Рис. 2.2. Схема расположения регистрирующего микроэлектрода

2.3.2. Парная стимуляция

Для теста с парной стимуляцией необходимо было использовать два электрода – стимулирующий и регистрирующий (рис. 2.3). Стимулирующий электрод изготовлен из двух скрученных нихромовых проволок, а регистрирующий электрод аналогичен тому, который описывался в пункте 2.3.1, и представляет собой стеклянный микроэлектрод, только заполненный раствором отличного от описанного ранее состава (в мМ: 135 K-Glu, 10 NaCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 4 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, pH 7,25). Оба электрода

управляются микроманипуляторами для их помещения в гиппокампально-энторинальный срез мозга крысы.

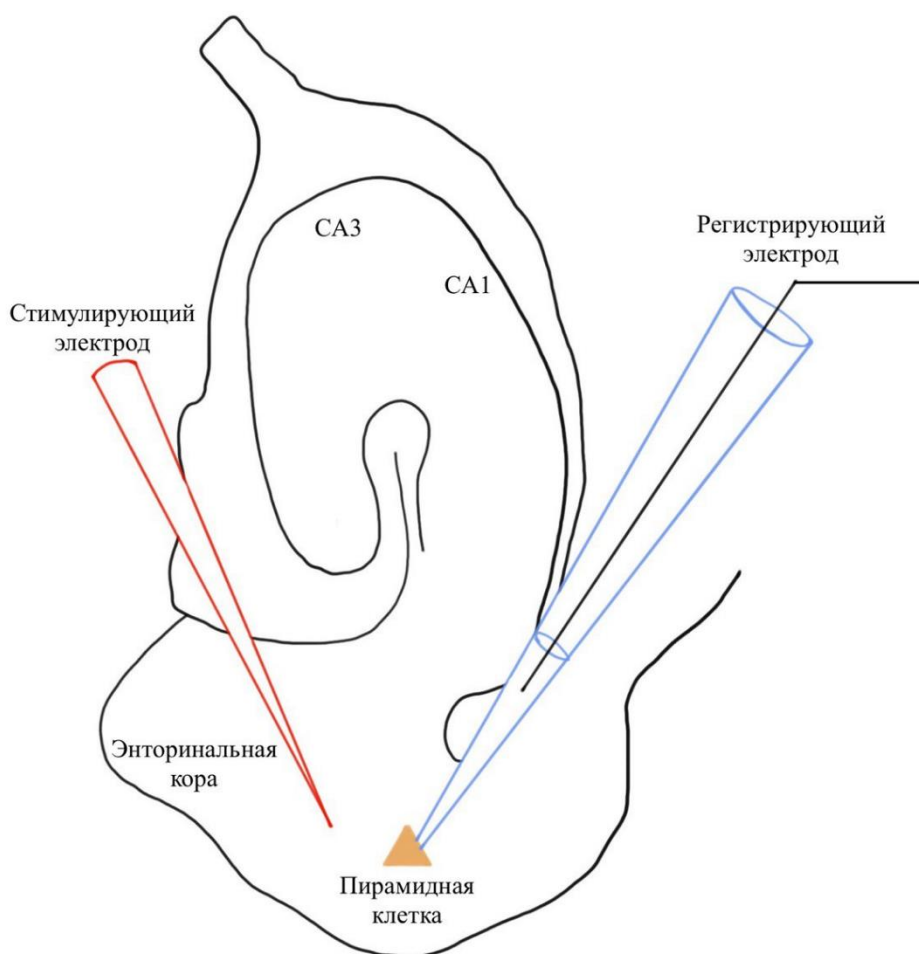


Рис. 2.3. Схема расположения стимулирующего и регистрирующего электродов

Стимуляция и регистрация ответов также производилась в энторинальной коре. Стимулирующий биполярный электрод помещался в глубокие слои энторинальной коры, на расстоянии 20–30 мкм от него выбиралась клетка для подведения к ней регистрирующего стеклянного микроэлектрода и осуществления на ней метода локальной фиксации потенциала при -80 мВ. Через стимулирующий электрод подавался ток двумя импульсами, длительностью 0,1 мс каждый, интервал между импульсами был 20 мс, амплитуда тока подстраивалась в зависимости от величины получаемого ответа

на выбранной пирамидной клетке, и находилась в интервале от 50 до 470 мкА. Ответы, получаемые при стимуляции – это возбуждающие токи, опосредованные глутаматом, а именно работой AMPA-рецепторов.

Проводилось два независимых эксперимента. В одном, протокол парной стимуляции, длящийся 5 минут, регистрировал ответы клетки в контроле, то есть когда внеклеточный раствор представлял собой просто ИСМЖ, по окончании записи циркулирующий раствор заменялся на тот, в который был добавлен блокатор ГАМК_B-Р CGP55845 (5 мкМ), и протокол включался вновь два раза подряд, при этом в течение этих манипуляций одна и та же пирамидная клетка оставалась зафиксированной с помощью метода локальной фиксации потенциала. Другой эксперимент проводился аналогично, за исключением того, что второй используемый раствор содержал агонист ГАМК_B-Р SKF-97541 (5 мкМ).

В эксперименте анализировали изменения коэффициента парных импульсов и амплитуды ответов, возникающих после парной стимуляции. Коэффициент парных импульсов рассчитывался как отношение амплитуд ответов (второй / первый), зарегистрированных при удерживающем потенциале -80 мВ в контроле и при аппликации агониста или антагониста ГАМК_B-Р.

2.3.3. Миниатюрные ответы

Для регистрации миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (мВПСТ), опосредованных глутаматом, с помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» (см. п. 2.3.1) в раствор ИСМЖ, циркулирующий по камере со срезом, добавлялся тетродотоксин (ТТХ) в концентрации 0,5 мкМ. ТТХ – яд нервно-паралитического действия, механизм действия которого – блокада потенциалзависимых Na⁺ каналов.

Перед тем, как приступить к записи миниатюрных событий, клетка регистрировалась в режиме фиксации тока, чтобы оценить эффект действия тетродотоксина и подтвердить отсутствие возникновения спайков при подаче

ступенек тока разной амплитуды. После этого выставлялся вновь режим фиксации потенциала на -80 мВ, и записывалась спонтанная активность клетки, а именно миниатюрные возбуждающие постсинаптические токи. Сначала регистрировалась активность клетки в контроле, то есть внеклеточная жидкость представляла собой ИСМЖ и ТТХ, в течение 5 минут. Затем трубочки, через которые циркулирует внеклеточный раствор, переключались в емкость, куда помимо ТТХ был добавлен блокатор ГАМК_B-Р CGP55845 (5 мкМ), и в таком растворе активность той же клетки записывалась два раза по 5 минут. Аналогичный эксперимент так же проводился и с агонистом ГАМК_B-Р SKF-97541 (5 мкМ).

Целью эксперимента являлось отслеживание изменений кинетики мВПСТ, поэтому в данном эксперименте сравнивалась частота генерации мВПСТ и их амплитуда в контроле и при добавлении в наружный раствор блокатора ГАМК_B-Р (CGP55845 5 мкМ) или агониста этих рецепторов (SKF-97541 5 мкМ).

2.4. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета SciPy (<https://scipy.org/>) для языка программирования Python. Для сравнения зависимых выборок использовался парный t-тест Стьюдента. Различия считались статистически значимыми в случае, если значение p было меньше 0.05. Все данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние агониста и антагониста ГАМК_B рецепторов на параметры эпилептиформной активности

В данном эксперименте мы хотели оценить влияние блокады и активации ГАМК_B-Р на эпилептиформную активность, а именно на частоту возникновения и длительность иктальных разрядов. Для этого использовались гиппокампадно-энториальные горизонтальные переживающие срезы мозга крыс возраста трёх недель. Эпилептиформная активность вызывалась в срезах проэпилептическим раствором с повышенным содержанием ионов калия, пониженным содержанием ионов магния, и добавлением 4-аминопиридина. Регистрация активности производилась на пирамидных нейронах энторинальной коры методом локальной фиксации потенциала.

В течение этого эксперимента были получены записи трёх типов. Во-первых, была записана эпилептиформная активность нейронов энторинальной коры в контроле, то есть, в проэпилептическом растворе без аппликации агонистов или антагонистов ГАМК_B-рецепторов. Контрольные записи длились от 50 минут. Во-вторых, регистрировалась активность клеток при добавлении в проэпилептический раствор антагониста ГАМК_B-Р CGP55845, причём сначала клетка регистрировалась 15–30 минут (время в течение которого развивалось 5 иктальных разрядов) в контроле, и лишь затем добавлялся препарат, и запись следующих 5-ти иктальных разрядов запускалась вновь (ещё 20–40 минут) (рис. 3.1 Б). И, наконец, третья группа записей создавалась аналогично вышеописанным, только вместо антагониста апплицировался агонист ГАМК_B-Р SKF97541 (рис. 3.1 А).

В записях с блокатором и агонистом наблюдали за изменением длительности и частоты возникновения ИР. Между собой сравнивались записи до и после добавления CGP55845 или SKF97541 для каждой клетки.

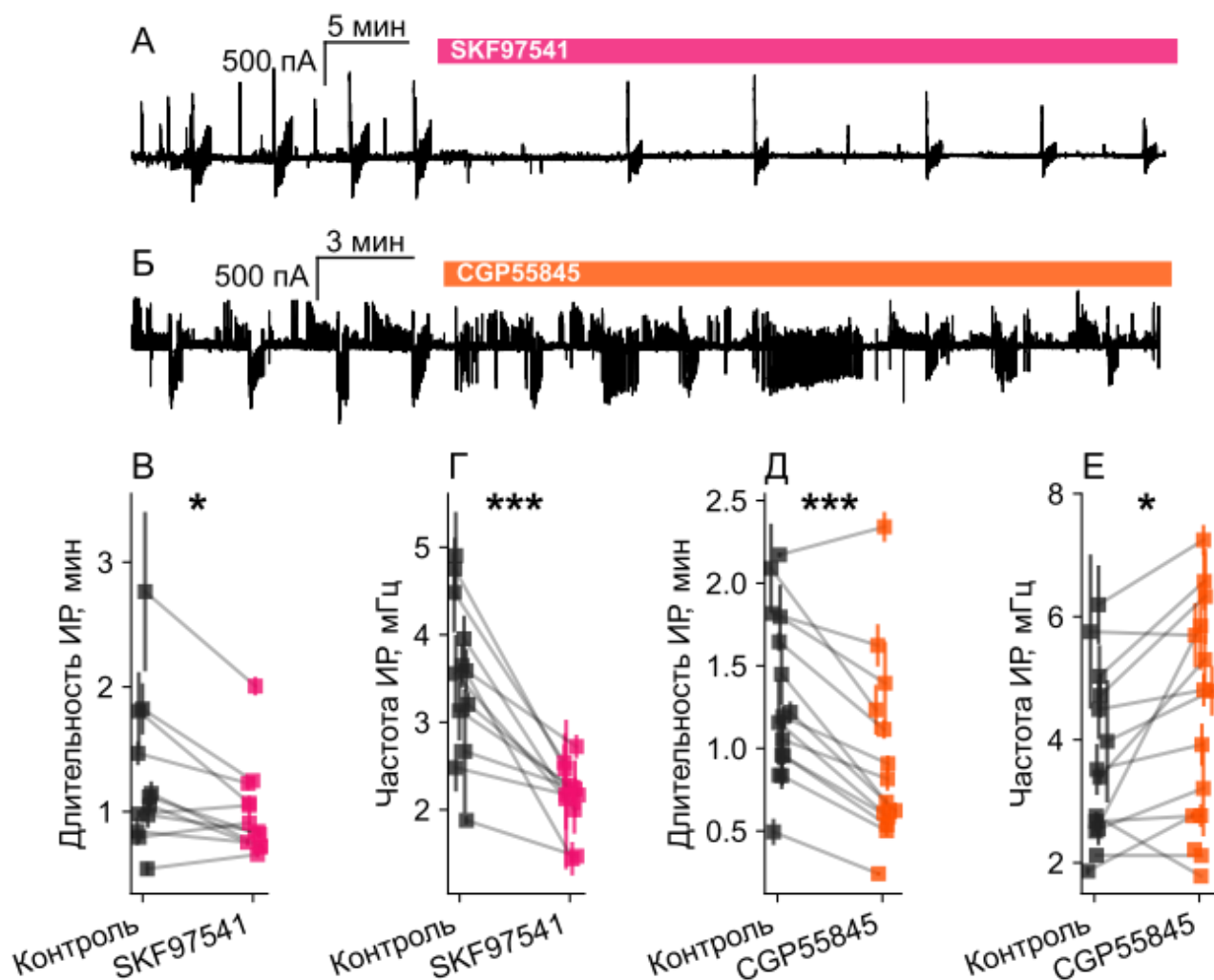


Рис. 3.1. А – пример записи эпилептиформной активности в контроле и после аппликации SKF97541; Б – пример записи эпилептиформной активности в контроле и после аппликации CGP55845; В – изменение длительности икталных разрядов после аппликации SKF97541; Г – изменение частоты икталных разрядов после аппликации SKF97541; Д – изменение длительности икталных разрядов после аппликации CGP55845; Е – изменение частоты икталных разрядов после аппликации CGP55845.

* - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$

Контрольные записи, сделанные целиком без аппликации агонистов и антагонистов ГАМК_B рецепторов, показали, что ИР в данной модели генерируются стабильно, и их частота и длительность не меняются в течение времени эксперимента. Блокада ГАМК_B рецепторов приводила к снижению продолжительности ИР (Контроль: $1,3 \pm 0,13$ с; CGP55845: $0,9 \pm 0,15$ с;

$p < 0.001$; $n=16$; рис. 3.1 Д) и увеличению их частоты (Контроль: $3,7 \pm 0,37$ мГц; CGP55845: $4,4 \pm 0,46$ мГц; $p=0,01$; $n=16$; рис. 3.1 Е). При добавлении во внеклеточный раствор агониста ГАМК_B рецепторов также наблюдалось снижение длительности ИР (Контроль: $1,3 \pm 0,18$ с; SKF975414: $1,0 \pm 0,11$ с; $p=0,01$; $n=12$; рис. 3.1 В), однако в этом случае их частота тоже снижалась (Контроль: $3,5 \pm 0,27$ мГц; SKF975414: $2,1 \pm 0,12$ мГц; $p < 0,001$; $n=12$; рис. 3.1 Г), и дополнительно наблюдалось практически полное исчезновение интериктальных разрядов.

Таким образом, можно наблюдать, что активация ГАМК_B рецепторов оказывает выраженное противоэпилептическое действие в 4-аминопиридиновой модели *in vitro*. В то время, как блокада ГАМК_B рецепторов снижает длительность иктальных разрядов, но увеличивает их частоту.

3.2. Влияние антагониста и агониста ГАМК_B рецепторов на парное отношение

Известно, что ГАМК_B-Р могут быть как пре-, так и постсинаптическими, поэтому, чтобы понять, где локализованы рецепторы, опосредующие изменения параметров иктальной активности, описанные в пункте 3.1, был проведён тест с парной стимуляцией.

Суть данного метода состоит в том, что синаптическая передача стимулируется быстрой последовательностью двух коротких импульсов. В результате регистрируются два постсинаптических ответа, а отношение амплитуды второго ответа к амплитуде первого называется парным отношением (PPR – paired pulse ratio). PPR зависит от вероятности высвобождения везикул в синапсе и его изменение свидетельствует об изменении вероятности высвобождения нейротрансмиттера из пресинаптического окончания.

Если блокатор ГАМК_B-Р CGP55845 действует на пресинаптические рецепторы, то ослабнет ингибирование потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов, и

соответственно, везикулы будут высвобождаться интенсивнее. Если же агонист ГАМК_B-Р SKF97541 действует на пресинаптические рецепторы, то можно ожидать, что выброс нейромедиатора, напротив, будет ингибирован.

Итак, проведенный на гиппокампадно-энторинальных срезах тест с парными импульсами показал, что антагонист ГАМК_B-Р CGP55845 не вызывал достоверных изменений амплитуды постсинаптических ответов (Контроль: 356 ± 37 пА (первый ответ) и 497 ± 46 пА (второй ответ); CGP55845: 328 ± 49 пА (первый ответ) и 455 ± 53 пА (второй ответ); p (первый ответ) = 0,4 и p (второй ответ) = 0,27; $n=11$; рис. 3.2 Б) и коэффициента парных импульсов (Контроль: $1,44 \pm 0,08$; CGP55845: $1,49 \pm 0,11$; $p = 0,4$; $n = 11$; рис. 3.2 В).

С другой стороны, при аппликации агониста ГАМК_B-Р SKF97541 мы получили значительное уменьшение в амплитуде постсинаптических ответов (Контроль: 374 ± 46 пА (первый ответ) и 557 ± 47 пА (второй ответ); SKF97541: 49 ± 7 пА (первый ответ) и 113 ± 16 пА (второй ответ); p (первый ответ) < 0,001 и p (второй ответ) < 0,001; $n=12$; рис. 3.2 Д), и увеличение в значении PPR (Контроль: $1,49 \pm 0,10$; SKF97541: $2,28 \pm 0,15$; $p < 0,001$; $n = 12$; рис. 3.2 Е).

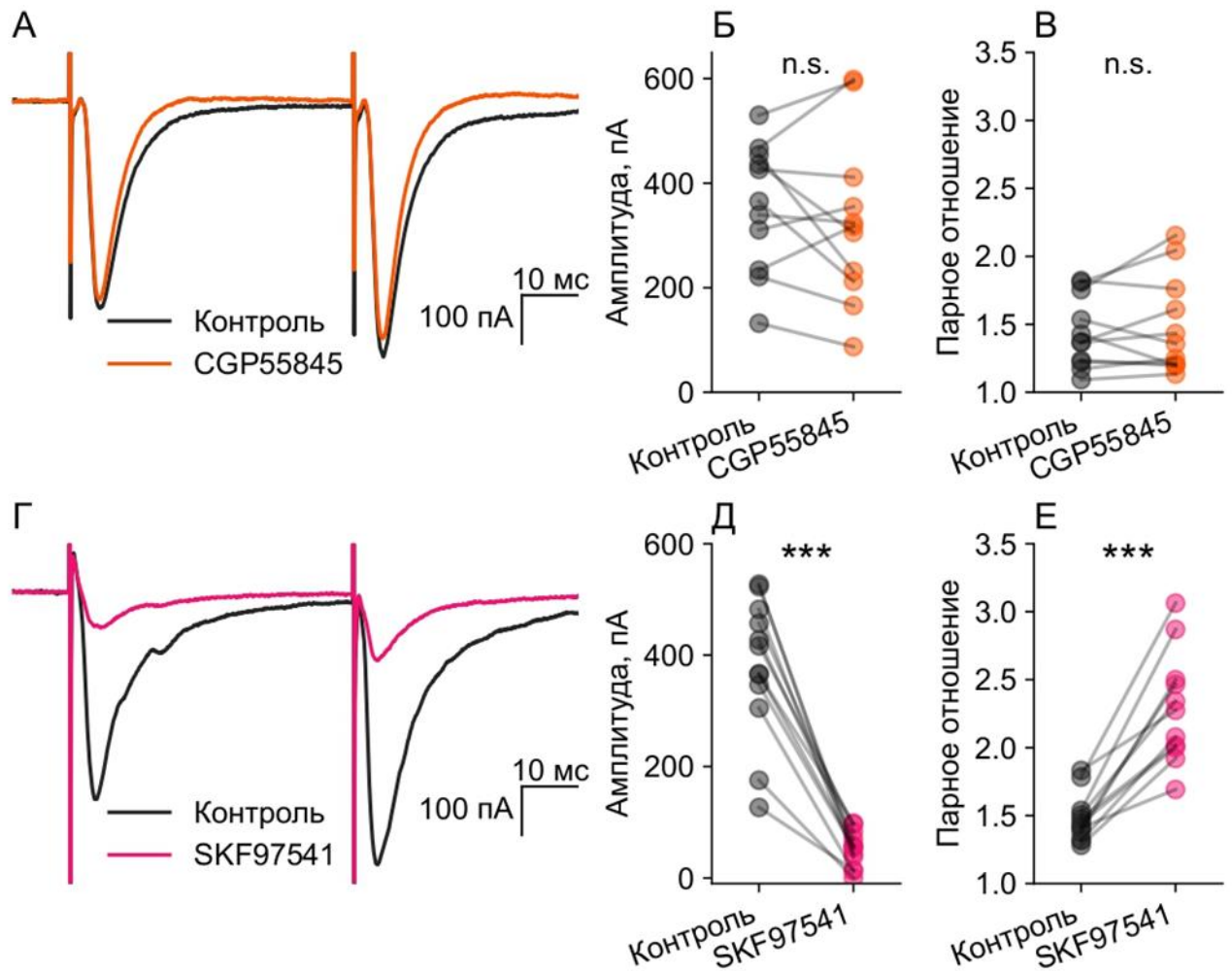


Рис. 3.2. А – постсинаптические ответы, вызванные парной стимуляцией в контроле (черный) и в присутствии CGP55845 (оранжевый); Б – изменение амплитуды постсинаптических ответов после аппликации CGP55845; В – изменение значения коэффициента парных импульсов после аппликации CGP55845; Г – постсинаптические ответы, вызванные парной стимуляцией в контроле (черный) и в присутствии SKF97541 (розовый); Д – изменение амплитуды постсинаптических ответов после аппликации SKF97541; Е – изменение значения коэффициента парных импульсов после аппликации SKF97541.

*** - $p < 0,001$

Таким образом, на основании полученных в эксперименте данных можно сделать вывод о том, фоновая активность пресинаптических ГАМК_B-Р в глутаматергических синапсах невысока, поэтому их блокатор CGP55845 не оказывает заметного действия на вероятность выброса глутамата. Напротив, агонист ГАМК_B-Р SKF97541 вызывает значительную активацию пресинаптических ГАМК_B-рецепторов, что приводит к снижению вероятности выброса глутамата, и соответствующему уменьшению амплитуды вызванных синаптических ответов почти в восемь раз для первого ответа и примерно в пять раз для второго (рис. 3.2 Г, Д). Также, при добавлении SKF97541 значительно увеличилось парное отношение, т. е. увеличилась разница между амплитудой первых и вторых ответов. Это объясняется так же действием агониста на пресинаптические ГАМК_B-Р: вероятность высвобождения везикул во время первого ответа сильно снижена из-за ингибирования потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов, поэтому его амплитуда значительно снижается. Во время второго импульса происходит накопление ионов Ca²⁺ в пресинаптическом окончании, и вероятность высвобождения везикул становится выше, при этом амплитуда синаптического ответа всё же снижена по сравнению с контролем.

3.3. Влияние антагониста и агониста ГАМК_B рецепторов на миниатюрные события

Тест с парными импульсами показал, что SKF97541 оказывает сильное воздействие на вероятность выброса глутамата, тогда как аппликация CGP55845 не вызвала достоверных изменений в этом эксперименте. Поэтому следующим шагом стала оценка влияния блокады и активации ГАМК_B-Р на характеристики миниатюрных событий. Чтобы регистрировать миниатюрные возбуждающие постсинаптические токи (мВПСТ) на пирамидных нейронах энторинальной коры, необходимо заблокировать ток ионов через Na⁺-каналы с помощью тетродотоксина. В таких условиях происходит спонтанное высвобождение одиночных везикул с глутаматом из пресинаптических

окончаний, и по частоте подобных событий можно судить о вероятности выброса нейромедиатора во всей популяции активных синапсов нейрона. Также, амплитуда и кинетика мВПСТ являются важными показателями, определяющими параметры синаптической передачи.

В данном эксперименте сравнивались записи в контроле (в ИСМЖ + ТТХ) и при добавлении агониста / блокатора ГАМК_B-Р по следующим параметрам: амплитуда, время нарастания, τ спада мВПСТ, и частота их генерации.

Было обнаружено, что при добавлении в наружный раствор CGP55845 (рис. 3.3) амплитуда (Контроль: $12,5 \pm 0,57$ пА; CGP55845: $11,4 \pm 1,12$ пА; $p = 0,26$; $n = 7$; рис. 3.3 Б), время нарастания (Контроль: $1,3 \pm 0,14$ мс; CGP55845: $1,5 \pm 0,25$ мс; $p = 0,45$; $n = 7$; рис. 3.3 В) и τ спада мВПСТ (Контроль: $5,0 \pm 0,55$ мс; CGP55845: $4,5 \pm 0,42$ мс; $p = 0,28$; $n = 7$; рис. 3.3 Г) не изменялись. При этом, частота возникновения мВПСТ после аппликации блокатора ГАМК_B-Р увеличилась (Контроль: $2,1 \pm 0,40$ Гц; CGP55845: $3,0 \pm 0,73$ Гц; $p < 0,05$; $n = 7$; рис. 3.3 Д).

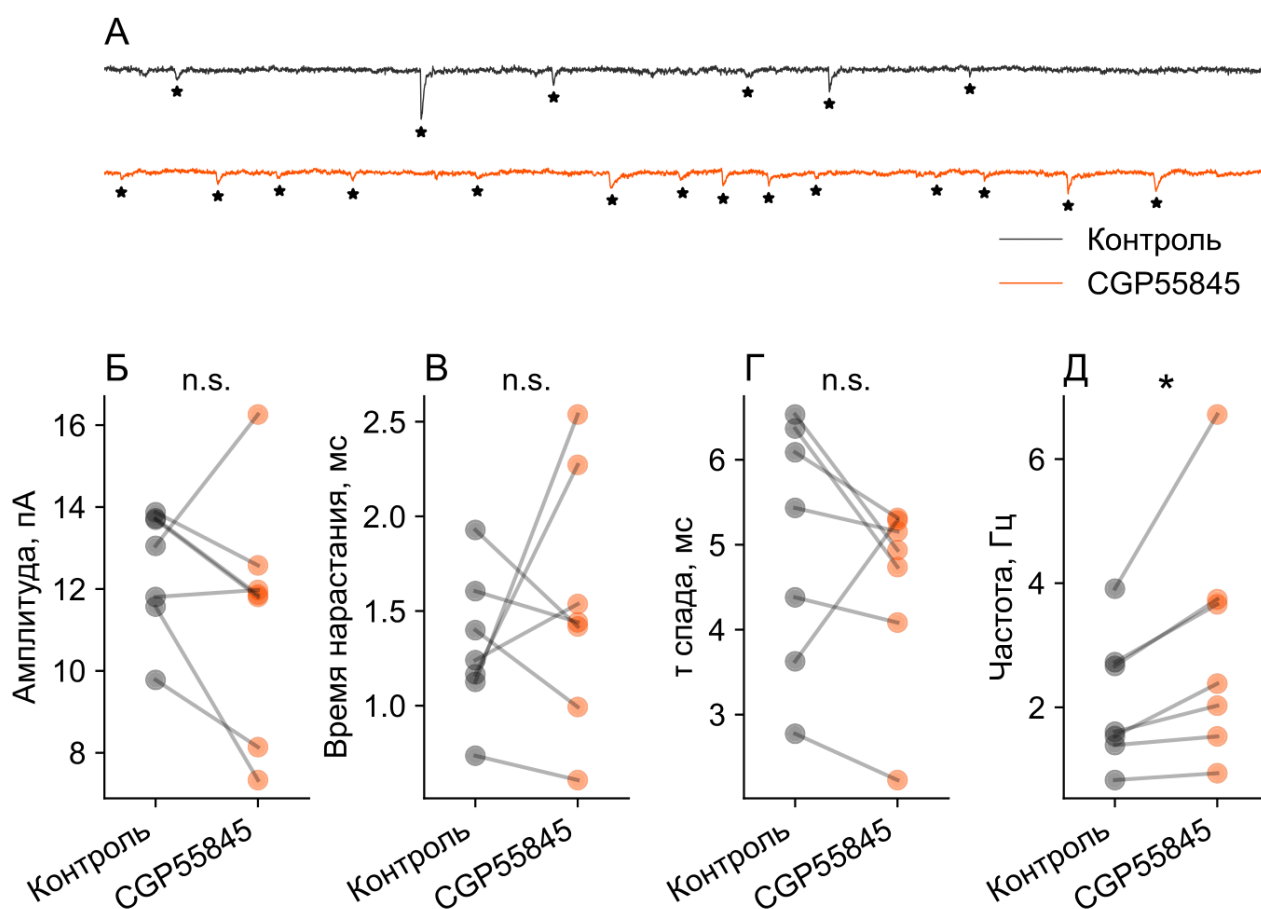


Рис. 3.3. А – запись мВПСТ (звёздочки) в контроле (чёрный) и с CGP55845 (оранжевый); Б – изменение амплитуды мВПСТ после аппликации CGP55845; В – изменение времени нарастания мВПСТ после аппликации CGP55845; Г – изменение τ спада мВПСТ после аппликации CGP55845; Д – изменение частоты мВПСТ после аппликации CGP55845.

* - $p < 0,05$.

В эксперименте с агонистом ГАМК_B-Р SKF97541 (рис. 3.4) также не наблюдалось изменений амплитуды (Контроль: $14,1 \pm 1,3$ пА; SKF97541: $13,3 \pm 1,6$ пА; $p = 0,34$; $n = 13$; рис. 3.4 Б), время нарастания (Контроль: $1,2 \pm 0,18$ мс; SKF97541: $1,5 \pm 0,24$ мс; $p = 0,08$; $n = 13$; рис. 3.4 В), и τ спада мВПСТ (Контроль: $4,5 \pm 0,52$ мс; SKF97541: $4,8 \pm 0,62$ мс; $p = 0,36$; $n = 13$; рис. 3.4 Г). Однако, частота генерации мВПСТ значительно уменьшилась под действием

агониста (Контроль: $2,4 \pm 0,25$ Гц; SKF97541: $1,7 \pm 0,19$ Гц; $p < 0,01$; $n = 13$; рис. 3.4 Д).

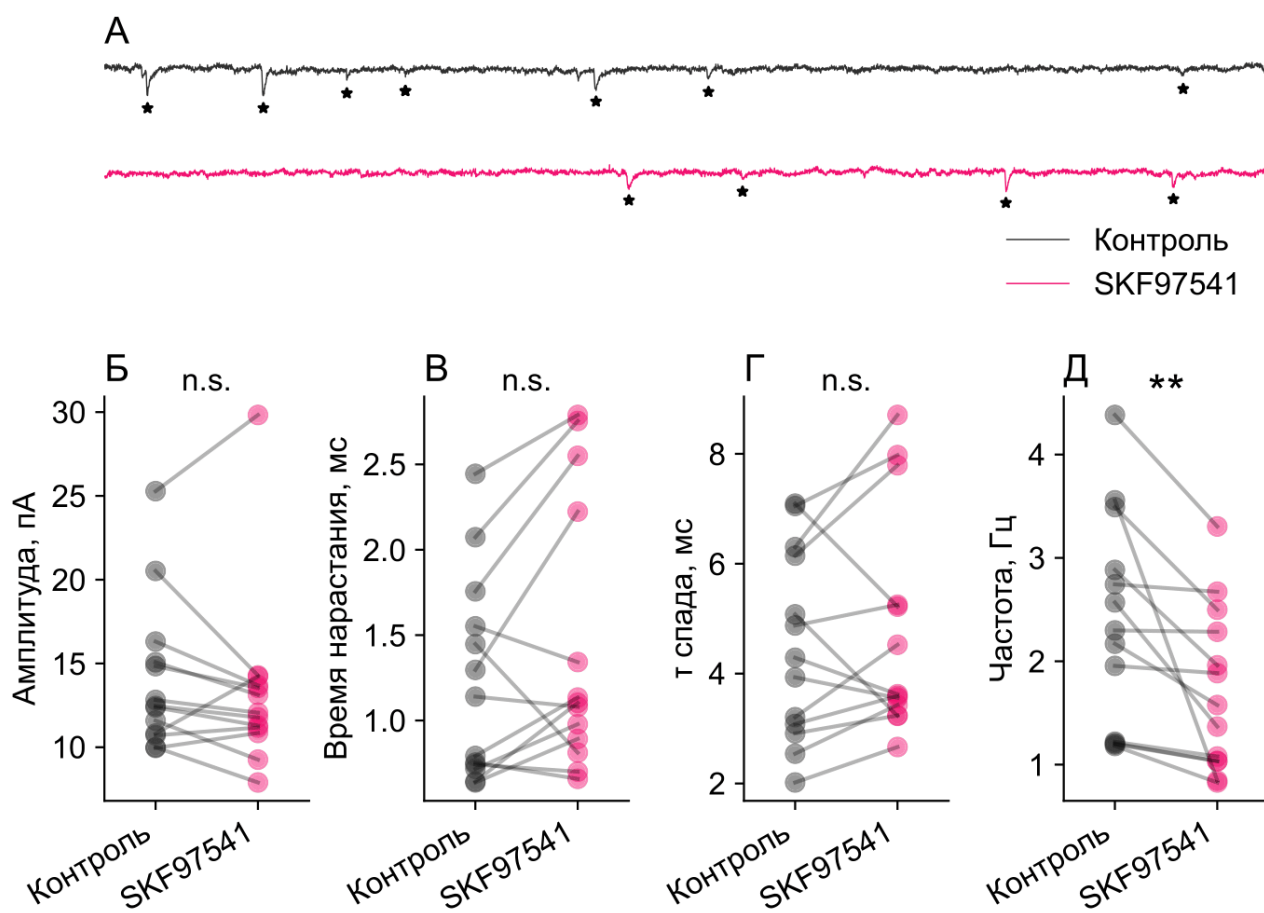


Рис. 3.4. А – запись мВПСТ (звёздочки) в контроле (чёрный) и с SKF97541 (розовый); Б – изменение амплитуды мВПСТ после аппликации SKF97541; В – изменение времени нарастания мВПСТ после аппликации SKF97541; Г – изменение τ спада мВПСТ после аппликации SKF97541; Д – изменение частоты мВПСТ после аппликации SKF97541.

** - $p < 0,01$

Итак, в ходе данного эксперимента мы обнаружили, что амплитуда и кинетика мВПСТ не меняются при воздействии на ГАМК_B-рецепторы, что хорошо соотносится с литературными данными. При этом оба вещества противоположно воздействуют на частоту возникновения мВПСТ.

CGP55845 увеличивает частоту возникновения миниатюрных событий. При этом, в пункте 3.2 мы не обнаружили эффектов данного антагониста на парное отношение, поэтому можно предположить, что изменение вероятности выброса глутамата наблюдается не во всех синапсах, поэтому надёжно выявляется только при анализе миниатюрных событий, но не парного отношения в отдельных синаптических входах. SKF97541, как было показано ранее в пункте 3.2, активирует пресинаптические ГАМК_B-Р, и снижает вероятность высвобождения везикул из пресинаптического окончания, что проявляется и в снижении частоты миниатюрных ответов.

ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1 Блокада ГАМК_B рецепторов приводила к снижению продолжительности иктальных разрядов и увеличению их частоты.
- 2 Активация ГАМК_B рецепторов снижала как длительность, так и частоту иктальных разрядов.
- 3 Антагонист ГАМК_B рецепторов CGP55845 не вызывал достоверных изменений амплитуды постсинаптических ответов и парного отношения.
- 4 Агонист ГАМК_B-Р SKF97541 вызывал уменьшение амплитуды постсинаптических ответов и увеличение парного отношения.
- 5 Аппликация CGP55845 не влияла на амплитуду, время нарастания и τ спада мВПСТ, но увеличивала их частоту.
- 6 Аппликация SKF97541 также не изменяла амплитуду, время нарастания и τ спада мВПСТ, но приводила к снижению частоты их генерации.

На основании проделанных экспериментов и полученных результатов, можно отметить, что активация ГАМК_B рецепторов оказывает выраженное противозепилептическое действие в 4-аминопиридиновой модели *in vitro*. При этом, агонист ГАМК_B рецепторов SKF97541 оказывает значительное влияние на пресинаптические рецепторы, через которые он и осуществляет свою противозепилептическую функцию, ингибируя выброс медиаторов в синаптическую щель и дальнейшее распространение активности. Блокатор ГАМК_B-Р CGP55845 не оказывает антиконвульсантного действия, а, наоборот, увеличивает частоту генерации иктальных разрядов, однако его действие, по-видимому, изменяет вероятность выброса глутамата лишь в определённой доле синапсов в энторинальной коре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амахин Д. В., Соболева Е. Б., Ергина Ю. Л. Синаптические и ионные механизмы генерации эпилептоподобной активности в энторинальной коре // Актуальные проблемы биомедицины. 2020. С. 218–219.
2. Амахин Д. В., Соболева Е. Б., Зайцев А. В. Методика Оценки Вклада Различных Типов Ионотропных Рецепторов В Постсинаптический Ответ В Ходe Эпилептоподобных Разрядов in Vitro // Российский Физиологический Журнал Им. И.М. Сеченова. 2019. № 7 (105). С. 812–831.
3. Евстигнеев В. В., Кистень О. В. Базовые механизмы эпилептогенеза и эпилепсии 2011. С. 106–114.
4. Ергина Ю. Л., Смирнова Е. Ю. In vitro модели эпилептиформной активности // Российский Физиологический Журнал Им. И.М. Сеченова. 2019. № 8 (105). С. 954–965.
5. Зайцев А. В. Роль гамкергических интернейронов коры и гиппокампа при развитии эпилепсии // Российский Физиологический Журнал Им. И.М. Сеченова. 2016. № 5 (102). С. 513–528.
6. Зиматкин С. М., Бонь Е. И. Строение и развитие коры головного мозга крысы / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь, 2019.
7. Зосимовский В. А., Коршунов В. А. Волна возбуждения, возвращающаяся в гиппокамп через энторинальную кору, может реактивировать популяции «обученных» нейронов поля СА1 в периоды глубокого сна // Журнал высшей нервной деятельности. 2010. № 5 (60). С. 568–581.
8. Карпова М. Н., Кузнецова Л. В., Клишина Н. Ю. ГАМК и её рецепторы в патогенезе эпилепсии // Успехи физиологических наук. 2015. № 3 (46). С. 46–59.

9. Киссин М. Я. [и др.]. Особенности нейроморфологии тревожных и депрессивных расстройств при височной эпилепсии // *Обозрение психиатрии и медицинской психологии*. 2012. (2).

10. Кистень О. В., Евстигнеев В. В., Сакович Р. А. Психоэмоциональные нарушения у пациентов с височной эпилепсией и их морфологическое обоснование // *Международный неврологический журнал*. 2014. № 7 (69). С. 9–13.

11. Мальков А. Е. [и др.]. Ритмическая активность гиппокампа и энторинальной коры нарушается на модели каинатной нейротоксичности у крыс в свободном поведении // *Журнал высшей нервной деятельности*. 2020. № 3 (70). С. 394–410.

12. Мелик-Касумов Т. Б. Исследование эпилептиформной активности пирамидальных нейронов гиппокампа *in vitro* и её зависимости от паттерна импульсации нейрона // *Новости медико-биологических наук*. 2017. № 1 (15). С. 25–31.

13. Семьянов А. В. ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия // *Нейрофизиология*. 2002. № 1 (34). С. 82–92.

14. Akyuz E. [и др.]. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review // *Life Sciences*. 2021. (265). С. 118826.

15. Allone C. [и др.]. Neuroimaging and cognitive functions in temporal lobe epilepsy: A review of the literature // *Journal of the Neurological Sciences*. 2017. (381). С. 7–15.

16. Codadu N. K. [и др.]. Divergent paths to seizure-like events // *Physiol Rep*. 2019. № 19 (7).

17. Devinsky O. [и др.]. Epilepsy // *Nature reviews Disease Primers*. 2018. (3).

18. Dinuzzo M. [и др.]. Physiological bases of the K⁺ and the

glutamate/GABA hypotheses of epilepsy // *Epilepsy Research*. 2016. № 6 (108). С. 995–1012.

19. Fábera P., Mareš P. Effect of GABAB receptor agonist SKF97541 on cortical and hippocampal epileptic afterdischarges // *Physiological Research*. 2014. № 4 (63). С. 529–534.

20. Frangaj A., Fan Q. R. Structural biology of GABAB receptor // *Neuropharmacology*. 2018. С. 68–79.

21. Gerrard L. B., Tantirigama M. L. S., Bekkers J. M. Pre- and postsynaptic activation of GABAB receptors modulates principal cell excitation in the piriform cortex // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018. (12).

22. Gonzalez-Sulser A. [и др.]. The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array // *Neuropharmacology*. 2011. № 7–8 (60). С. 1142–1153.

23. Hales T. G. [и др.]. The epilepsy mutation, $\gamma 2$ (R43Q) disrupts a highly conserved inter-subunit contact site, perturbing the biogenesis of GABA_A receptors // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2005. № 1 (29). С. 120–127.

24. Kantamneni S. Cross-talk and regulation between glutamate and GABAB receptors // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015. (9).

25. Khazipov R. GABAergic Synchronization in Epilepsy // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016.

26. Levinson S. [и др.]. Paroxysmal Discharges in Tissue Slices From Pediatric Epilepsy Surgery Patients: Critical Role of GABAB Receptors in the Generation of Ictal Activity // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2020. (14).

27. Macdonald R. L., Kang J.-Q., Gallagher M. J. Mutations in GABA_A receptor subunits associated with genetic epilepsies // *The Journal of Physiology*. 2010. № 11 (588). С. 1861–1869.

28. Mareš P. [и др.]. An Antagonist of GABA-B Receptors Potentiates Activity of Cortical Epileptic Foci // *Physiological Research*. 2012. (61). С. 325–329.
29. Mareš P. Proconvulsant Action Of Two GABAB Receptor Antagonists Is Age-Dependent // *Physiological Research*. 2013. (62). С. 109–114.
30. Ren H. [и др.]. The role of the entorhinal cortex in epileptiform activities of the hippocampus. 2014.
31. Salah A., Perkins K. L. Persistent ictal-like activity in rat entorhinal/perirhinal cortex following washout of 4-aminopyridine // *Epilepsy Research*. 2011. № 3 (94). С. 163–176.
32. Schultz C., Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation // *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. 2014. (34). С. 6–17.
33. Shi Y.-J. [и др.]. Effect of the Entorhinal Cortex on Ictal Discharges in Low-Mg²⁺-Induced Epileptic Hippocampal Slice Models // *neural plasticity*. 2014.
34. Staley K. Molecular mechanisms of epilepsy // *Nature Neuroscience*. 2015. № 3 (18). С. 367–372.
35. Tatum W. O. Mesial temporal lobe epilepsy // *Journal of Clinical Neurophysiology*. 2012. № 5 (29). С. 356–365.
36. Terunuma M. Diversity of structure and function of GABA B receptors: a complexity of GABA B-mediated signaling // *The Japan Academy*. 2018. № 10 (94). С. 390–411.
37. Thijs R. D. [и др.]. Epilepsy in adults // *The Lancet*. 2019. № 10172 (393). С. 689–701.
38. Thompson S. E. [и др.]. Depression of glutamate and GABA release by presynaptic GABA B receptors in the entorhinal cortex in normal and chronically epileptic rats // *Neurosignals*. 2007. (15). С. 202–215.
39. Tramoni-Negre E. [и др.]. Long-term memory deficits in temporal lobe

epilepsy // *Revue Neurologique*. 2017. № 7–8 (173). С. 490–497.

40. Vismar M. S. [и др.]. The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation // *Frontiers in Neural Circuits*. 2015. Т. 9. № May.

41. Vrinda M. [и др.]. Temporal lobe epilepsy-induced neurodegeneration and cognitive deficits: Implications for aging // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2019. (95). С. 146–153.

42. Zabrodskaya Y. M., Bazhanova E. D. Functional Imbalance of Glutamate- and GABAergic Neuronal Systems in the Pathogenesis of Focal Drug-Resistant Epilepsy in Humans Pathogenesis of structural epilepsy View project Photodynamic therapy of glioma View project // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020. № 4 (168). С. 529–532.