

## ИНГИБИРОВАНИЕ ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ КАК МОДЕЛЬ ГИПЕРАКТИВАЦИИ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА КРЫС

© 2020 г. Т.В. Карелина, Ю.Д. Степаненко, Д.А. Сибаров, П.А. Абушик, С.М. Антонов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

E-mail: polinaabushik@gmail.com

Поступила в редакцию 06.08.2019 г.

После доработки 14.10.2019 г.

Принята к публикации 18.11.2019 г.

Патологические изменения в мозжечке зачастую сопряжены с дисфункцией клеток Пуркинье, которая проявляется в чрезмерной спайковой активности. Вопреки классической модели нейродегенерации, когда гиперактивацию нейронов вызывают долговременным действием высоких концентраций возбуждающих агонистов (глутамата или *N*-метил-D-аспартата), в наших экспериментах увеличение частоты спайковой активности клеток Пуркинье было вызвано за счет ингибирования тормозной передачи антагонистом ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов габазином (гидробромидом 6-имино-3-(4-метоксифенил)-1(6*H*)-пиразинобутановой кислоты). У взрослых и молодых животных габазин вызывал достоверное увеличение частоты разрядов клеток Пуркинье через 25 и 45 мин действия соответственно. Таким образом, на взрослых животных данная модель работала более эффективно, чем на молодых, что определяется онтогенетическими особенностями формирования коры мозжечка. Более того, применение NS 309 (6,7-дихлор-1*H*-индол-2,3-дикетон-3-оксима), модулятора Ca<sup>2+</sup>-активируемых K<sup>+</sup>-каналов малой проводимости, в данной модели позволяло компенсировать вызванное антагонистом габазином увеличение частоты простых спайков в разряде клеток Пуркинье до уровня контрольных значений у молодых и взрослых крыс.

**Ключевые слова:** клетки Пуркинье, мозжечок, SK-каналы, ГАМК, спайк.

**DOI:** 10.31857/S0006302920010135

Мозжечок млекопитающих играет ключевую роль в моторной активности, осуществляя мониторинг всех двигательных актов и снижая ошибку между задуманным и совершенным действием [1]. На клетках Пуркинье (КП), которые являются ключевым морфофункциональным элементом коры мозжечка, происходит конвергенция всей сенсорной информации, поступающей в мозжечок. Аксоны этих клеток формируют единственный эфферентный путь из коры мозжечка к его ядрам и вестибулярным центрам продолговатого мозга [2, 3]. Спинномозговая атаксия является нейродегенеративным заболеванием, которое проявляется в нарушении координации и точности движений и сопровождается изменением паттерна активности КП, а затем их дисфункцией и гибелью [4, 5]. Известно, что за счет выброса ГАМК ( $\gamma$ -аминомасляной кислоты) интернейроны молекулярного слоя коры мозжечка регулируют

активность КП [6]. Ранее при создании модели гиперактивации КП, сопровождающей спинномозговую атаксию, было показано, что активация рецепторов глутамата в срезах мозжечка и *in vivo*, вопреки ожиданиям, приводила к ингибированию постсинаптических токов КП и снижала частоту простых спайков. Важно, что аппликация антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 (гидробромид 6-имино-3-(4-метоксифенил)-1(6*H*)-пиразинобутановой кислоты) снимала ингибирующее действие агониста рецептора глутамата *N*-метил-D-аспартата, тем самым увеличивая спонтанную активность КП [7]. Более того, на срезах мозга в гиппокампе [8], тканевых эксплантах неокортекса [9], в первичной моторной и соматосенсорной коре *in vivo* [10] и нейронах коры в первичной культуре ткани [11] было показано, что блокирование тормозной ГАМКергической передачи бикикуллином приводит к возникновению эпилептиформных волн деполяризации нейронов, увеличению частоты спонтанных возбуждающих постсинаптических токов и генерации эпилептоподобной электрической активности. Следует отметить, что отмывка бикикуллина не подавляла генерацию подобных

**Сокращения:** КП – клетки Пуркинье, ГАМК –  $\gamma$ -аминомасляная кислота, SR 95 531 – 6-имино-3-(4-метоксифенил)-1(6*H*)-пиразинобутановой кислоты гидробромид (габазин), SK-каналы – Ca<sup>2+</sup>-активируемые K<sup>+</sup>-каналы малой проводимости, NS 309 – 6,7-дихлор-1*H*-индол-2,3-дикетон-3-оксим.

аномальных форм электрической активности нейронной сети [11].

В развитии центральной нервной системы ГАМК регулирует морфогенез, а именно миграцию клеток и их синаптогенез, т. е. рост аксонов к мишеням иннервации, образование синапсов, а также и клеточную гибель. Показано, что только к 30-м суткам постнатального развития (P30) формируется полноценная тормозная ГАМКергическая синаптическая передача, присущая зрелой центральной нервной системе [12]. При исследовании функциональной активности КП необходимо также учитывать и возрастные особенности дифференцировки клеточных элементов и их связей в коре мозжечка. Например, звездчатые клетки начинают образовывать синапсы с дендритами КП в P14, что совпадает с началом расширения дендритного дерева КП [13]. Другие авторы указывают на то, что процесс синаптогенеза протекает в коре мозжечка вплоть до P90 [14], а на P21 в белом веществе мозжечка еще присутствуют пролиферирующие КП [15]. Кроме этого, на третьей неделе постнатального развития продолжается формирование электрофизиологических свойств КП, так как в этот период появляются смешанные  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -спайки и тримодальный паттерн разряда КП [16]. Также онтогенетические особенности присущи и экспрессии  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов малой проводимости (СК-каналы), модуляция которых приводит к снижению частоты простых спайков КП, тем самым оказывая терапевтический эффект при лечении спинномозговой атаксии [4, 5, 17, 18]. У старых животных снижение частоты простых спайков КП за счет введения положительных модуляторов СК-каналов происходит быстрее, чем у взрослых животных, что определяется возрастными особенностями динамики внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и снижением экспрессии потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в молекулярном слое мозжечка [19].

Таким образом, ввиду несостоятельности гиперактивирующего действия агонистов рецепторов глутамата на КП [7] и наличием онтогенетических особенностей развития коры мозжечка, цель данной работы заключалась в создании модели гиперактивации КП и сравнении ее эффективности у разных возрастных групп животных. В работе был проведен анализ изменения частоты простых спайков КП при ингибировании тормозной передачи через ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы у молодых (P14–15) и взрослых (P90–150) крыс в модели *in vivo*. В данной модели активации КП проведен анализ изменения частот образования спайков при модуляции СК-каналов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили с помощью метода внеклеточной регистрации активности КП мозжечка на самцах крыс линии Вистар. При проведении экспериментов животные были разделены на две группы: молодые (всего 22 крысы возрастом от 14 до 15 суток или P14–15 соответственно) и взрослые (всего 26 крыс возрастом от 3 до 6 месяцев или P90–150 соответственно). Для наркотизации животных использовали уретан, который вводили внутрибрюшинно из расчета 1200 мг/кг массы животного. При необходимости в ходе эксперимента дозу увеличивали до 1600 мг/кг. Регистрацию и идентификацию КП осуществляли по ранее описанной методике [20]. У наркотизированного животного удаляли скальп, снимали мышечный слой и сверлили отверстие диаметром 2 мм в затылочной кости над червем мозжечка. Затем крысу закрепляли в стереотаксической установке. Для регистрации внеклеточной активности КП использовали стеклянные микроэлектроды из боросиликатного стекла (внешний диаметр 1.5 мм, внутренний — 1.1 мм, Sutter Instrument, США), заполненные раствором 2.5 М NaCl. Погружение микроэлектрода в ткань мозжечка осуществляли с помощью автоматического манипулятора с шагом погружения 5 мкм на глубину до 5 мм. КП идентифицировали по характерному для них паттерну активности: наличию простых и сложных спайков, а также тормозной паузы после сложного спайка перед серией простых. Сигнал от регистрируемой клетки усиливали с помощью дифференциального усилителя (AC/DC Differential Amplifier, model 3000, A-M Systems, Inc, США) и оцифровывали с частотой дискретизации 10000 изм/с с помощью аналого-цифрового преобразователя L-791 (ЗАО «Л-КАРД», Россия) в оригинальной программе Bioactivity Recorder v. 5.3, разработанной Д.А. Сибаровым [<http://sibarov.ru/index.php?slab=software>] для последующего анализа частоты простых спайков в программе Clampfit 10.2 (Molecular Devices Corp, США). Количество зарегистрированных КП соответствует количеству использованных животных, т. е. на одном животном была зарегистрирована одна КП. Подачу действующих веществ осуществляли согласно стандартной методике [21] путем их аппликации микропипеткой на обнаженную (диаметром 2 мм) поверхность мозжечка в области введения микроэлектрода.

Сначала была проведена контрольная серия экспериментов, в которой осуществляли аппликацию физиологического раствора (0.9% NaCl) на обнаженную поверхность мозжечка в зоне введения микроэлектрода. Затем в следующих двух сериях экспериментов для ослабления тормозного влияния интернейронов на КП и, как следствие, создания условия для повышенного возбуждения КП

был использован избирательный антагонист ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 (габазин, Tocris, США). Для снятия гипервозбуждения КП использовали позитивный модулятор SK- и IK-каналов — NS 309 (6,7-дихлор-1Н-индол-2,3-дикетон-3-оксим) (Tocris, США). При аппликации веществ и физиологического раствора осуществляли визуальный контроль уровня жидкости в краниальном окне и для поддержания его на одном уровне повторно апплицировали раствор микропипеткой. За час регистрации общий объем апплицируемого вещества составлял 500 мкл и соответственно за 30 мин регистрации — 250 мкл. Действующие вещества использовали в концентрации 200 мкМ как для SR 95 531, так и для NS 309. Растворы действующих веществ готовили на 0.9%-м NaCl. Внеклеточную регистрацию активности идентифицированной КП осуществляли 30-секундными интервалами в течение 15 мин до аппликации вещества (исходная частота) и 60 мин после аппликации, через каждые 5 мин.

В первой серии экспериментов после регистрации исходной активности КП (рис. 1а) было исследовано влияние SR 95 531 на паттерн разряда КП мозжечка (рис. 1б). Во второй серии экспериментов помимо регистрации исходной активности КП и после 60 мин действия антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 осуществляли аппликацию NS 309 и продолжали регистрацию активности КП в течение еще 40–60 мин.

При сравнении данных из контрольной серии экспериментов с экспериментальными для каждой клетки определяли среднее значение частоты простых спайков в течение 30 с по всем указанным временным отметкам. После этого высчитывали среднее значение по всем зарегистрированным клеткам и стандартную ошибку среднего для всех временных отметок. Затем высчитывали относительные частоты, приняв за единицу исходную частоту спайков до аппликации. В дальнейшем для выявления достоверности отличий между контрольной серией экспериментов и сериями с аппликацией антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 и активаторов SK-каналов NS 309 для каждой временной отметки использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением поправки Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

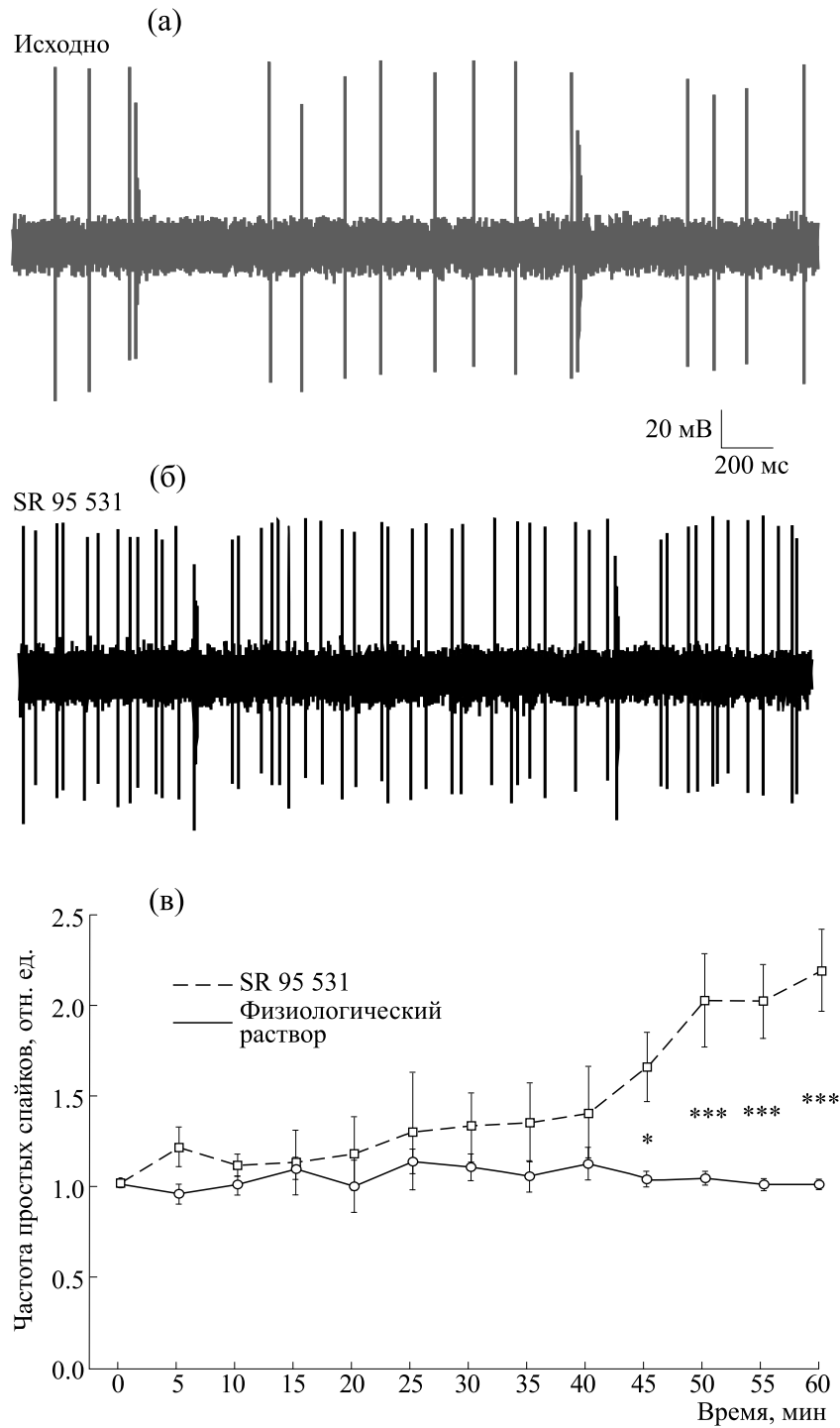
**Влияние антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 на частоту простых спайков клеток Пуркинье у молодых и взрослых крыс.** В контрольной серии экспериментов как у молодых животных, так и у взрослых крыс при аппликации физиологического раствора в течение 60 мин не было выявлено достоверного изменения частоты простых спайков в разряде КП относительно исходного

значения. Изменение среднего значения относительной частоты простых спайков по сравнению с исходной частотой в отдельные периоды регистрации в возрастной группе P14 составило 7–18%, а у взрослых животных — 7–13%. Таким образом, было продемонстрировано, что сама процедура аппликации не влияла на картину разряда КП.

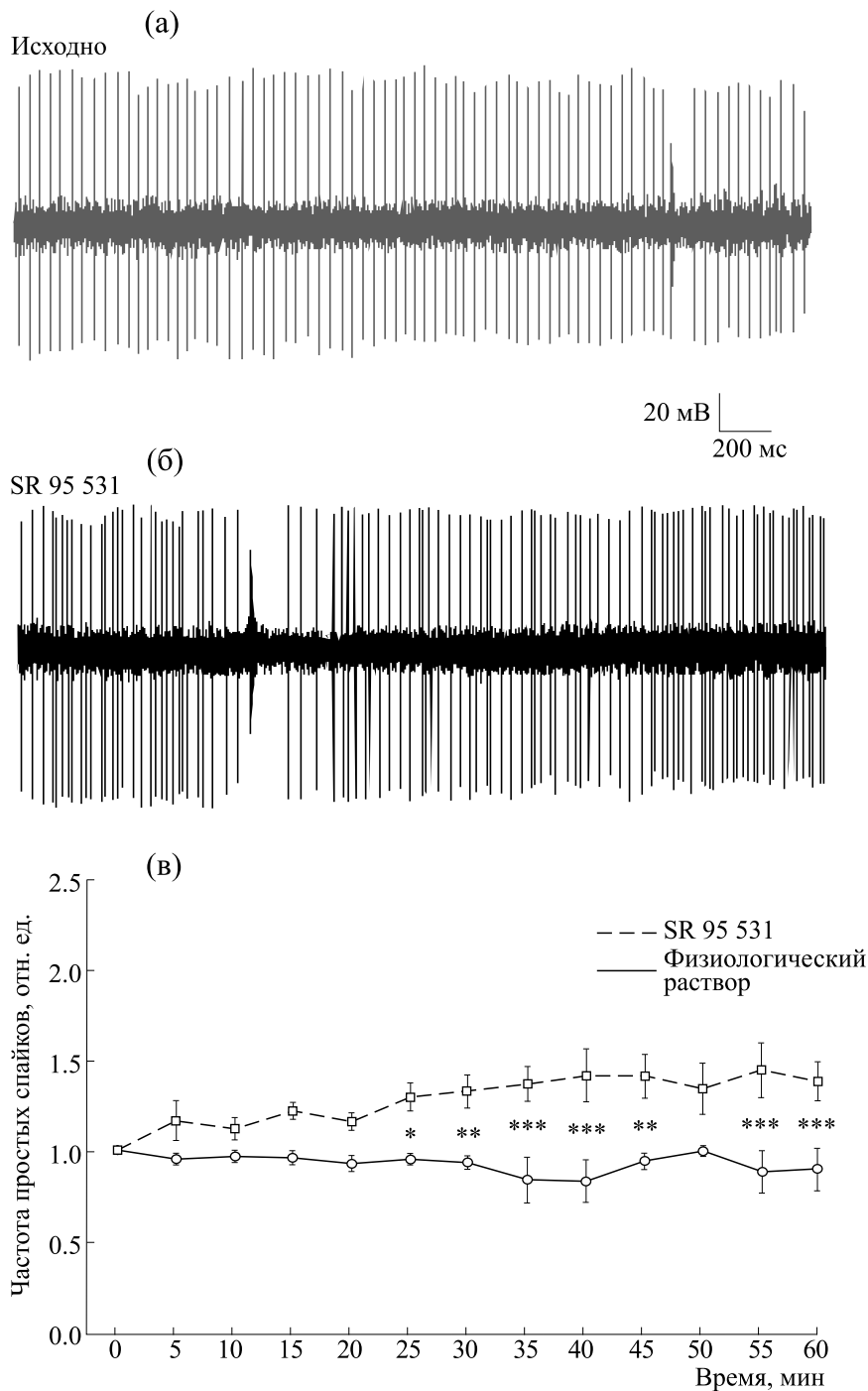
У крысят SR 95 531 вызывал постепенное увеличение частоты простых спайков в разряде КП (верхняя кривая на рис. 1в). Через 45 мин после аппликации были обнаружены достоверные отличия от контроля в соответствующей временной точке ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ , ANOVA, поправка Бонферрони), которые сохранялись до конца периода регистрации. Наибольшее значение частота простых спайков достигала через 60 мин от начала аппликации и была более чем в два раза больше контрольного значения в это же время. У взрослых животных, в отличие от молодых крыс, при аппликации SR 95 531 достоверное увеличение частоты простых спайков в разряде КП (рис. 2а,б) достигалось через 25 мин после начала аппликации ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ , ANOVA, поправка Бонферрони), т. е. раньше, чем у молодых крыс. При этом максимальное увеличение происходило уже к 30 мин регистрации, но в среднем лишь на 30% (рис. 2в).

Как видно из рис. 1 и 2, характер изменений частоты простых спайков в разряде КП у животных разных возрастных групп отличается друг от друга. Если у двухнедельных крысят наблюдался неуклонный рост частоты простых спайков на протяжении всего периода аппликации SR 95 931, то у взрослых животных, начиная с 25 мин от начала аппликации, значение частоты простых спайков практически не менялось до конца периода аппликации. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данный подход — использование селективного антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 931 как блокатора тормозной активности в нейронной сети [7] — применим для получения модели гипервозбуждения КП мозжечка.

**Влияние положительного модулятора SK/IK-каналов на частоту простых спайков клеток Пуркинье, вызванных действием антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531.** Во второй серии экспериментов мы проверяли гипотезу о том, что гиперактивацию КП мозжечка, полученную при ослаблении тормозного влияния, оказываемого на нее интернейронами молекулярного слоя, можно нивелировать за счет активации Ca<sup>2+</sup>-активируемых калиевых каналов. Для этой цели мы применяли агонист SK/IK-подтипов Ca<sup>2+</sup>-активируемых калиевых каналов NS 309. Как в группе молодых крыс (P14–15), так и в группе взрослых животных (P90–150) нам удалось получить снижение частоты простых спайков в паттерне разряда КП. Од-



**Рис. 1.** Активность клеток Пуркинье мозжечка молодых крыс (14-е–15-е сутки постнатального развития, P14–15) в контроле и под влиянием антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531. Представлены фрагменты записи активности КП исходно, до аппликации SR 95 531 (200 мкМ) (а), и во время аппликации антагониста (б). (в) – Изменение средней частоты простых спайков КП мозжечка в течение 1 ч при аппликации физиологического раствора (серая линия) и антагониста SR 95 531 (черная пунктирная линия). Звездочками показано статистически достоверное отличие от контрольных значений частоты в соответствующие моменты времени (ANOVA, поправка Бонферрони; \* –  $p < 0.05$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ ).

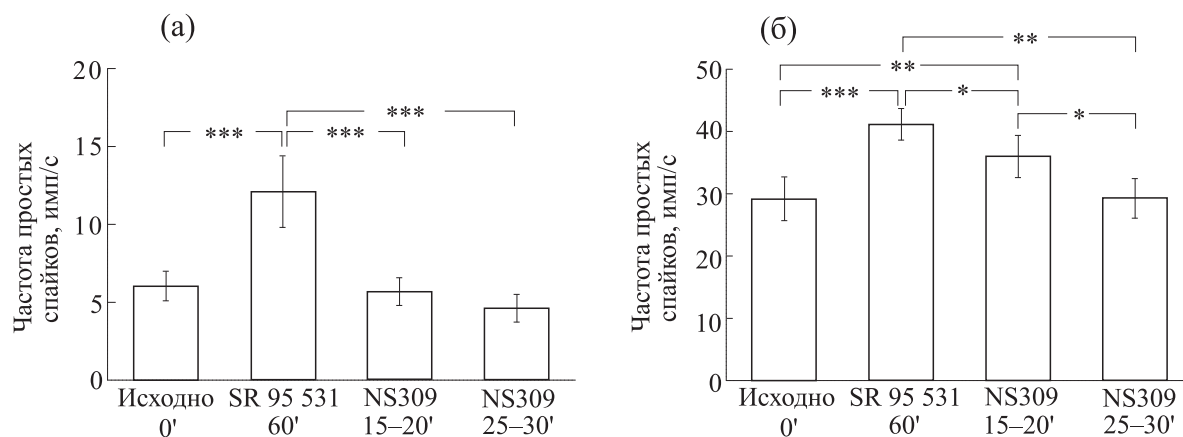


**Рис. 2.** Активность клеток Пуркинье мозжечка взрослых крыс (90-е–150-е сутки постнатального развития, P90–150) исходно и под влиянием антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 (200 мкМ). Представлены фрагменты записи активности КП исходно, до аппликации SR 95 531 (а), и во время аппликации антагониста (б). (в) – Изменение средней частоты простых спайков КП мозжечка в течение 1 ч при аппликации физиологического раствора (серая линия) и антагониста SR 95 531 (черная пунктирная линия). Звездочками показано статистически достоверное отличие от контрольных значений частоты в соответствующие моменты времени (ANOVA, пост-тест Бонферрони; \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ ).

нако было зафиксировано возрастное отличие (рис. 3). В контрольных условиях к 60-й минуте измерений частота простых спайков у молодых

крыс достигала  $6.0 \pm 0.9$  имп/с, а при действии антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 в этой же временной точке наблюдалось достоверное





**Рис. 3.** Частота простых спайков (ПС) клеток Пуркинье исходно (0 мин), после 60 мин действия антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 (200 мкМ) и последующей аппликации положительного модулятора SK-каналов NS 309 (200 мкМ) в течение 15–20 мин и 25–30 мин. Представлена средняя частота простых спайков КП мозжечка: (а) – молодых крыс (14-е–15-е сутки постнатального развития, P14–15); (б) – взрослых крыс (90-е–150-е сутки постнатального развития, P90–150). Звездочками и линиями показано статистически достоверное отличие от исходных значений частоты или частоты после воздействия (ANOVA, пост-тест Бонферрони; \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ ).

увеличение их частоты по сравнению с контролем до  $12.1 \pm 2.3$  имп/с ( $p < 0,001$ ,  $n = 9$ , ANOVA, пост-тест Бонферрони, рис. 3а). При последующей аппликации агониста SK/IK-каналов NS 309 частота простых спайков достоверно снижалась через 15–20 мин и достигала  $5.6 \pm 0.9$  имп/с, что достоверно не отличалось от контрольных значений ( $p > 0.5$ ,  $n = 9$ , ANOVA, поправка Бонферрони). У взрослых (P90–150) крыс, в отличие от молодых (P14–15) животных, уровень частоты простых спайков в контрольных условиях был существенно выше и достигал в среднем  $29.1 \pm 3.5$  имп/с ( $n = 10$ ), тем не менее SR 95 531 вызывал достоверное по сравнению с контролем увеличение частоты простых спайков до  $41.1 \pm 2.5$  имп/с ( $p < 0,001$ ,  $n = 10$ , ANOVA, пост-тест Бонферрони). Важно, что, в отличие от молодых крыс, аппликация NS 309 приводила к достоверному снижению частоты простых спайков до уровня контроля лишь через 25–30 мин ( $p > 0.05$ ,  $n = 10$  ANOVA, поправка Бонферрони). Таким образом, можно сделать вывод, что как у молодых животных, так и у взрослых активация SK/IK-подтипов Ca<sup>2+</sup>-активируемых K<sup>+</sup>-каналов способна снять гиперактивацию КП мозжечка в условиях снижения тормозного влияния, оказываемого на КП интернейронами молекулярного слоя. При этом исходное значение частоты простых спайков у крысят восстанавливалось раньше, чем у взрослых животных.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Нейродегенеративные изменения в мозжечке зачастую сопряжены с дисфункцией КП [22], которая может проявляться в чрезмерной спайко-

вой активности. Вопреки классической нейродегенеративной модели, когда гиперактивацию нейронов вызывают долговременным действием высоких концентраций возбуждающих агонистов [23, 24], в наших экспериментах гиперактивация КП была вызвана за счет ингибирования тормозной передачи, опосредованной ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, что согласуется с данными о применении антагонистов и блокаторов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов как инициаторов эпилептиформных волн деполяризации нейронов и временному увеличению частоты спонтанных возбуждающих постсинаптических токов [11]. Активность КП напрямую зависит от зрелости остальных клеточных элементов коры мозжечка и формирования полноценной ГАМКергической передачи [12, 16]. У крысят процесс морфо- и гистогенеза коры мозжечка продолжается весь первый месяц постнатальной жизни [13, 25]. При этом происходят функциональные изменения КП, а именно увеличение активности за счет усиления ГАМКергического влияния тормозных интернейронов молекулярного слоя на КП в результате созревания их связей с КП [26]. В наших экспериментах у молодых и взрослых крыс ингибирование ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов SR 95 531 достигало насыщающих концентраций вблизи КП постепенно по мере диффузии, поэтому скорость наступления эффекта могла зависеть от возрастных особенностей созревания коры мозжечка. Так, у молодых крыс увеличение спайковой активности наступало в два раза медленнее, чем у взрослых крыс (рис. 1в и 2в). Это, по-видимому, объясняется различиями в степени зрелости морфологических и функциональных свойств КП и незаконченным процессом формирования ГАМКергических синап-

сов в этом возрасте. Следует отметить, что частота простых спайков в контроле (исходно) у молодых крыс ниже, чем у взрослых. Это соответствует нормальному постнатальному физиологическому развитию, когда в онтогенезе происходит увеличение спайковой активности [19], и может объясняться уменьшением длительности рефрактерного периода, следующего за возникновением спайка [27]. Таким образом, примененная нами модель гиперактивации КП через ингибирование ГАМКергической передачи *in vivo* может эффективно применяться при исследовании нейродегенеративных состояний в мозжечке крыс. Более того, использование модулятора SK-каналов NS 309 в данной модели позволило предотвратить развитие гиперактивации КП, тем самым продемонстрировав терапевтический эффект — снижение частоты простых спайков КП. Это согласуется с данными о восстановлении нарушенного паттерна активности КП и снижении симптомов спинномозговой атаксии у мутантных животных [4, 5, 17, 18]. В работе, выполненной *in vivo* на взрослых и старых крысах, показано, что частота простых спайков КП при аппликации NS 309 снижается быстрее у старых крыс, что опосредовано онтогенетическим изменением экспрессии потенциал-зависимых кальциевых каналов P/Q-типа и исчезновением потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа в молекулярном слое мозжечка [19, 28].

Таким образом, результаты, представленные в данной работе, показывают различие в скорости снижения активности КП: у молодых крыс снижение частоты простых спайков происходило быстрее, чем у взрослых, что может быть опосредовано различиями в экспрессии потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  каналов и  $Ca^{2+}$ -проницаемых рецепторов N-метил-D-аспартата [29]. Причины возрастных отличий в эффекте модуляции SK-каналов требуют дальнейшего изучения, поскольку могут быть связаны с дефицитом функций КП, связанных с особенностями онтогенетического развития.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290427-7.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и ис-

пользования животных при выполнении работы были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Ito, *Brain Res.* **886** (1–2), 237 (2000).
2. J. M. Bower, *Front. Cell. Neurosci.* **4**, pii:27 (2010).
3. J. C. Eccles, M. Ito, and J. Szentagothai, *The cerebellum as a neuronal machine* (Springer-Verlag, Berlin, 1967).
4. V. G. Shakkottai, M. do Carmo Costa, J. M. Dell'Orco, et al., *J. Neurosci.* **31** (36), 13002 (2011).
5. J. T. Walter, K. Alvina, M. D. Womack, et al., *Nat. Neurosci.* **9** (3), 389 (2006).
6. W. Pan, W.-Y. Wu, Y.-H. Bing, et al., *Pharmacology* **103**, 82 (2019).
7. H. Liu, S.-N. Zhao, G.-Y. Zhao, et al., *Brain Res.* **1560**, 1 (2014).
8. H. S. Swatzwelder, W. W. Anderson., and W. A. Wilson, *Epilepsy Res.* **2** (4), 239 (1988).
9. M. J. Gutnick, B. Wolfson, and F. Baldino, *Exp. Brain Res.* **76** (1), 131 (1989).
10. M. Sáeza, M. Ketzefb, J. Alegre-Cortésa, et al., *Neuroscience* **381**, 115 (2018).
11. Д. А. Сибаров, П. А. Абушик, А. Е. Большаков и др., *Биол. мембраны* **31** (1), 33 (2014).
12. C. Takayama and Y. Inoue, *Anat. Sci. Int.* **79**, 124 (2004).
13. J. Altman, *J. Comp. Neurol.* **145**, 399 (1972b)
14. J. Takács and J. Hámori, *J. Neurosci. Res.* **38** (5), 515, (1994).
15. H. Yamanaka, Y. Yanagawa, and K. Obata, *Neurosci. Res.* **50**, 1 (2004).
16. B. E. McKay and R. W. Turner, *J. Physiol.* **567** (3), 829 (2005).
17. M. Gymnopoulos, L. A. Cingolani, P. Pedarzani, et al., *J. Comp. Neurol.* **522** (5), 1072 (2014).
18. M. D. Womack and K. Khodakhah, *J. Neurosci.* **23** (7), 2600 (2003).
19. Т. В. Карелина, Ю. Д. Степаненко, П. А. Абушик и др., *Acta Naturae* **8**, 4(31), 53 (2016).
20. П. А. Егорова, Т. В. Карелина, О. Л. Власова и др., *Журн. эвол. биохим. физиол.* **50** (2), 102 (2014).
21. Z. Gao, B. Todorov, C. F. Barrett, et al., *J. Neurosci.* **32** (44), 15533 (2012).
22. M. Samson, D. O. Claassen, *Neurodegener Dis.* **17** (4–5), 155 (2017).
23. E. V. Mironova, A. A. Evstratova, and S. M. Antonov, *J. Neurosci. Methods* **163**, 1 (2007).
24. A. Lau, M. Tymianski, *Pflugers Arch.* **460** (2), 525 (2010).
25. M. B. Pisu, E. Roda, D. Avella, et al., *Neuroscience* **129**, 655 (2004).
26. M. Hausser and B. A. Clark, *Neuron* **19**, 665 (1997).
27. S. Guan, S. Ma, Y. Zhu, et al., *Brain Res.* **1097** (1), 59 (2006).
28. Y. H. Chung, C. M. Shin, M. J. Kim, et al., *Brain Res.* **903** (1–2), 247 (2001).
29. D.A. Sibarov, J. D. Stepanenko, I.V. Silantiev, et al., *J. Mol. Neurosci.* **64** (2), 300 (2018).

## Inhibition of GABAergic Transmission as a Model of Purkinje Cell Hyperactivation in the Rat Cerebellum

T.V. Karelina, J.D. Stepanenko, D.A. Sibarov, P.A. Abushik, and S.M. Antonov

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
prosp. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

Pathological changes in the cerebellum are commonly associated with Purkinje cell dysfunction manifesting with excessive spike activity. Despite a classical model of neurodegeneration according to which neuronal hyperactivity is induced by long-lasting effects of high concentrations of excitatory agonists (glutamate or *N*-methyl-D-aspartate), in our experiments the frequency of Purkinje cell spike activity increased with suppression of inhibitory transmission by gabazine (6-imino-3-(4-methoxyphenyl)-1(6*H*)-pyridazinebutanoic acid hydrobromide), a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist. Gabazine induced a significant increase in the frequency of Purkinje cell spike output after 25 min and 45 min in adult rats and young rats, respectively. Thus, this model was considered to be more appropriate for adult animals than for young animals; it can be explained by ontogenetic aspects of the cerebellar cortex maturation. Moreover, the use of NS 309 (6,7-dichloro-1*H*-indole-2,3-dione-3-oxime), a modulator of small conductance calcium-activated potassium channels, in this model made it possible to compensate for an increase in the frequency of Purkinje cell simple spike output induced by gabazine, that decreased Purkinje cells spiking frequency to control values typical for young and adult animals.

*Keywords: Purkinje cells, cerebellum, SK-channels, GABA, spike*