

УДК 612.816;612.014.423

## МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕЙРОНОВ ТАЛАМУСА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ

© 2013 г. А. В. Яковлев<sup>1</sup>, К. С. Королева<sup>1</sup>, Ф. Ф. Валиуллина<sup>1</sup>, Р. Н. Хазипов<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>Казанский федеральный университет, лаборатория нейробиологии, 420008, Казань, ул. Кремлевская 18, Россия

<sup>2</sup>Институт нейробиологии Средиземноморья, INSERM U901, 163 ав. Люмини, 13273 Марсель, Франция;

\*электронная почта: roustem.khazipov@inserm.fr

Поступила в редакцию 22.02.2013 г.

Мембранный потенциал покоя – фундаментальный параметр, определяющий функциональные свойства нейронов. Нейроны таламуса функционируют в режиме вспышечной или тонической активности в зависимости от их мембранныго потенциала, что определяет способ передачи сенсорной информации через таламус от сенсорного органа в кору головного мозга, а также генерацию различных типов активности в таламокортикальных сетях. Считается, что у новорожденных крысят нейроны таламуса деполяризованы (значения мембранныго потенциала около  $-50$  мВ) и, следовательно, находятся в состоянии постоянной тонической активности. Однако эти данные получены при регистрации нейронов таламуса с помощью пэтч-кламп-регистрации в конфигурации “целая клетка” (whole-cell), при которой, как известно, возможна искусственная деполяризация клеток в результате шунтирования мембраны через контакт между электродом и мембраной. В настоящей работе значения мембранныго потенциала были измерены с использованием менее инвазивной методики – регистрации одиночных ионных каналов в конфигурации “на клетке” (cell-attached). Основываясь на потенциале реверсии токов через NMDA-каналы, определили значение мембранныго потенциала в вентропостериомедиальных нейронах 2–7-дневных крысят, который составил около  $-74$  мВ. Эти данные позволили предположить, что в состоянии покоя нейроны таламуса новорожденных крысят не деполяризованы и находятся скорее во вспышечном, нежели в тоническом состоянии активности. Обсуждается значимость этих наблюдений для процессов передачи сенсорных сигналов через таламус и генерации ранних таламокортикальных паттернов активности, в частности, веретенообразных вспышек активности.

**Ключевые слова:** мембранный потенциал, нейрон, пэтч-кламп, одиночные ионные каналы, NMDA, таламус.

**DOI:** 10.7868/S0233475513040087

Электрический потенциал на цитоплазматической мембране является одним из фундаментальных свойств живой клетки. В нейронах и других возбудимых клетках мембранный потенциал играет ключевую роль в электрогенезе. Большинство ионных каналов клеточных мембран регулируется мембранным потенциалом. Мембранный потенциал может непосредственно влиять на вероятность активации, инактивации и возвращения в активируемое состояние ионных каналов. К таким каналам относится большинство натриевых, кальциевых и калиевых каналов, открывающихся при деполяризации, HCN-каналы, активируемые при гиперполяризации и др., а также каналы, управляемые иными факторами (например, нейромедиаторами), но работа которых также регулируется величиной мембранныго потенциала. Таким образом, знание величины мембранныго потенциала покоя критически важно

для понимания того, как функционирует возбуждаяя клетка.

Измерение мембранныго потенциала представляет непростую экспериментальную задачу. Традиционно для этого используют различные микроэлектродные электрофизиологические методики, такие как, например, внутриклеточная регистрация мембранныго потенциала с помощью острых электродов или пэтч-кламп-регистрация в конфигурации “целая клетка” (whole-cell). Однако эти методики вносят погрешность в измерение мембранныго потенциала, поскольку, во-первых, в обоих случаях происходит изменение внутриклеточного ионного состава за счет диализа регистрируемых клеток внутриэлектродным раствором, а во-вторых, в мембране клетки формируется искусственная проводимость (утечка) через место контакта между электродом и клеточной мембраной (около 500 МОм в случае реги-

стации острыми электродами и несколько ГОм при пэтч-кламп-регистрации) [1–5]. Внесение дополнительной ион-неспецифической проводимости неизбежно должно приводить к деполяризации клеточной мембранны. Теоретически этот артефакт должен быть максимальным в клетках с высоким электрическим сопротивлением клеточной мембранны [1, 6]. Чтобы избежать этого, были разработаны альтернативные неинвазивные способы измерения мембранного потенциала, основанные на регистрации интегральных токов или одиночных ионных каналов с помощью методики пэтч-кламп в конфигурации “на клетке” (cell-attached). В этом случае сохраняется целостность клеточной мембранны, не происходит ни диализа клетки, ни формирования дополнительной проводимости. Методика основана на том, что мембранный потенциал должен быть равен разности потенциала реверсии токов через ионные каналы известного типа, измеренной в конфигурации “на клетке”, и равновесным потенциалом токов через эти каналы. В этом качестве использовали потенциал-активируемые калиевые каналы [7, 8] и NMDA-каналы [6, 9–13]. Полученные значения мембранного потенциала оказывались существенно больше по абсолютной величине, чем при регистрации от целой клетки или при использовании перфорированного пэтча. Эта разница была особенно выражена у клеток с большим сопротивлением мембранны (лимфоциты [14], незрелые нейроны гиппокампа новорожденных крысят [6]), что вполне согласуется с теоретическими предсказаниями.

Таламус является главным интерфейсом между внешним миром и корой головного мозга млекопитающих животных [15, 16]. Так, нейроны релейного вентропостериомедиального (ВПМ) ядра таламуса получают информацию от мордочки крысы, в частности от вибрисс, и пересылают ее в соматосенсорную кору. Значения мембранного потенциала нейронов релейного таламуса определяют способ их функционирования, т.е. способ передачи информации от сенсорной периферии в кору, – вспышечный либо тонический [17–20]. В состоянии бодрствования нейроны ВПМ деполяризованы (в результате воздействия на них нейромедиаторов и гормонов бодрствования, например, норадреналина и ацетилхолина) и находятся в “тоническом” состоянии активности, при котором происходит высокоэффективная, быстрая и стабильная передача потенциалов действия, приходящих от сенсорных органов в кору. В состоянии сна нейроны ВПМ гиперполяризованы в результате снятия деполяризующего тонического воздействия медиаторов бодрствования, и нейроны переходят во “вспышечное” состояние, при котором сенсорные входы запускают вспышку активности, состоящую из множества потенциалов действия. Такие вспышки активности не в со-

стоянии обеспечить эффективную передачу сенсорной информации в кору головного мозга. Зависимые от мембранных потенциала тоническая и вспышечная формы активности нейронов таламуса обусловлены главным образом инактивацией HCN- и низкопороговых кальциевых каналов, а также торможением активности интернейронов ретикулярного ядра (в результате их гиперполяризации под действием ацетилхолина) [20, 21]. Форма активности таламических нейронов также играет важную роль в генерации таламокортикальных ритмов, например таких, как веретенообразные осцилляции в фазах 1 и 2 сна [18, 22–25]. Таким образом, уровень мембранного потенциала является важным параметром, который определяет функциональные свойства и форму активности таламических нейронов – тоническую или вспышечную.

В период раннего развития информация от сенсорной периферии (вибрисс), поступающая через нейроны ВПМ таламуса в соматосенсорную кору, играет важную роль в формировании топографических синаптических связей между ВПМ-нейронами и нейронами коры, составляющими основу для так называемых кортикальных карт [26, 27]. У крыс формирование этих карт происходит в течение первой недели после рождения. Этот же период характеризуется уникальными осцилляторными паттернами активности в таламокортикальных нейронных сетях, причем таламическим нейронам принадлежит роль водителей ритма ранних осцилляций [28–33]. Анализ ответов, вызываемых в сенсорной коре сенсорными стимулами, предполагает вспышечный характер активности таламических нейронов. Вместе с тем регистрация ВПМ-нейронов у новорожденных крысят, проведенная во время первой недели после рождения с помощью метода пэтч-кламп в конфигурации “целая клетка”, выявила деполяризацию этих нейронов (значения мембранного потенциала покоя около  $-50$  мВ) и неспособность генерировать низкопороговые спайки (НПС) и вспышечную активность в ответ на стимуляцию внутренней капсулы или на ступеньки искусственной деполяризации [34]. Сходные данные получены и на нейронах зрительного релейного таламуса [35]. Это позволило предположить, что незрелые таламические нейроны деполяризованы и поэтому не в состоянии поддерживать вспышечную форму активности, необходимую для генерации определенных осцилляторных ритмов, в частности, сонных веретен. С другой стороны, ВПМ-нейроны новорожденных крысят характеризуются высоким сопротивлением клеточной мембранны. Поэтому возникает вопрос: является ли деполяризованное состояние незрелых ВПМ-нейронов истинным возрастным феноменом или же значения мембранного потенциала, измеренные путем регистрации в конфигурации “целая клетка”, недо-

оценены вследствие описанного выше феномена утечки. Для ответа на этот вопрос мы измерили мембранный потенциал покоя ВПМ-нейронов у новорожденных крысят с помощью регистрации активности NMDA-каналов в конфигурации “на клетке”.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на срезах ВПМ ядра таламуса крысят во время первой недели после рождения (постнатальные дни (Р) 2–7). Все экспериментальные протоколы соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными, принятым в Казанском федеральном университете и в Академии медицинских наук Франции. Перед экспериментом животным проводили анестезию изофлюраном (4%) либо криоанестезию. После выделения головной мозг крысят помещали в охлажденный оксигенированный искусственный цереброспинальный раствор (ИЦСР) следующего состава (в мМ): NaCl 126, KCl 3.5, CaCl<sub>2</sub> 2.0, MgCl<sub>2</sub> 1.3, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 и глюкоза 11 (рН 7.4). Горизонтальные срезы мозга толщиной 400 мкм нарезали с использованием выброслайсера HM 650 V (Microm International, ФРГ). Срезы, содержащие ВПМ, перемещали в оксигенированный ИЦСР и перед регистрацией выдерживали не менее 1 ч при комнатной температуре. Для регистрации срезы ВПМ размещали в стандартной камере с полным погружением и непрерывно перфузировали ИЦСР (30–32°C) со скоростью 2–3 мл/мин.

Пэтч-кламп-регистрацию нейронов ВПМ проводили под визуальным контролем с использованием микроскопа Axio Examiner A1 (400×, Carl Zeiss, ФРГ). Нейроны визуализировали с помощью дифференциального интерференционного контраста. Для регистрации использовали усилитель пэтч-кламп Axopatch 200B (Axon Instruments, США) с усиливанием сигнала 50 мВ/пА в диапазоне 0–2 кГц. Пэтч-электроды изготавливали из боросиликатных капилляров с наружным диаметром 1.5 мм и внутренним диаметром 0.86 мм (GC150F-15, Clark Electromedical Instruments, Великобритания). Для регистрации одиночных NMDA-каналов пипетки заполняли раствором с номинально нулевой концентрацией ионов магния с добавлением NMDA (10 мКМ) и глицина (10 мКМ). В каждом опыте активность NMDA-каналов регистрировали при разных потенциалах на пэтч-электроде в диапазоне от 20 до –120 мВ с шагом 10–20 мВ. Электрофизиологические сигналы записывали в оцифрованном виде с частотой дискретизации 10 кГц с использованием АЦП Digidata 1440 (Axon Instruments, США) и анализировали с помощью программ Axon Software Package и Origin 7.5 (Microcal Software, США). Открытие одиночных NMDA-каналов и анализ амплитуд то-

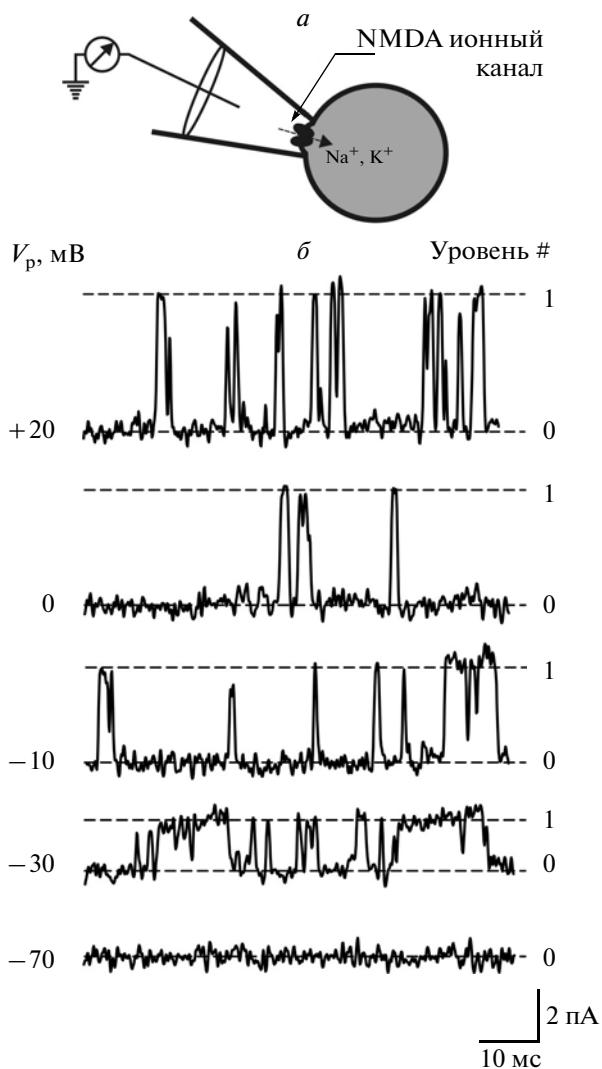
ков через NMDA-каналы детектировали с использованием программы Axon Software Package после дополнительного цифрового фильтрования сигналов (1 кГц), как описано ранее [36].

Групповые данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка. Статистический анализ параметрических данных проводили с использованием теста Стьюдента с уровнем достоверности  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы измерили значения мембранныго потенциала покоя в ВПМ-нейронах крысят в течение первой недели после рождения с использованием регистрации NMDA-каналов в конфигурации “на клетке”. Этот подход основан на том, что потенциал реверсии токов через катион-неспецифические NMDA-каналы близок к 0 мВ [36], поэтому при регистрации “на клетке” токи через NMDA-каналы реверсируют при потенциале на пипетке, равном потенциалу покоя. Ранее эту методику успешно применяли при оценке мембранныго потенциала в нейронах гиппокампа и неокортекса крыс, а также в нейронах коры головного мозга человека из образцов, полученных после хирургического вмешательства [6, 9–13].

Примеры регистрации активности одиночных NMDA-каналов, записанных от ВПМ-нейрона двухдневного крысенка, представлены на рис. 1. При потенциале на пипетке, равном 0 мВ, открывание одиночных NMDA-каналов характеризовалось кратковременными, длительностью около 2–5 мс, ступенькообразными входящими токами с амплитудой  $4.9 \pm 0.3$  пА ( $n = 17$  клеток; возраста животных от 2 до 7 дней после рождения). Следует отметить, что в конфигурации “на клетке” токи направлены противоположно тем, которые регистрируются внутриклеточно, поэтому входящие в клетку токи находятся в области положительных значений. При сдвиге потенциала на электроде в положительную сторону (что приводит к гиперполяризации регистрируемого участка мембраны) амплитуда токов через NMDA-каналы увеличивалась, а при сдвиге в негативную – уменьшалась. При этом с уменьшением потенциала на электроде наблюдалось увеличение времени открытия NMDA-каналов и уменьшение закрытых времен в пачке, что, по всей видимости, связано с уменьшением магниевого блока NMDA-каналов остаточными ионами магния, которые присутствуют в микромолярных концентрациях даже в номинально свободном от магния растворе. При значительной деполяризации регистрируемого участка мембранны токи через NMDA-каналы не отличались от базовой линии, а при еще большей деполяризации происходила их реверсия, и выявлялись токи выходящего направления. Следует отметить, что в большинстве регистраций



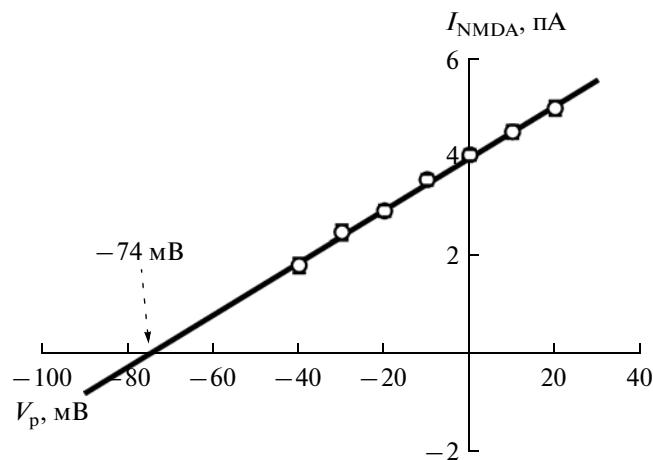
**Рис. 1.** Измерение мембранных потенциалов покоя клеток таламуса с использованием NMDA-каналов, регистрируемых в конфигурации “на клетке”, в качестве сенсоров мембранных потенциалов. *а* – Схема эксперимента. Регистрация токов через одиночные NMDA-каналы на мембране ВПМ-нейрона производится пэтч-электродом, заполненным раствором с NMDA и глицином, в конфигурации “на клетке”. *б* – Примеры регистрации электрических токов через одиночные NMDA-каналы при различных значениях потенциала на пэтч-электроде ( $V_p$ ). Уровни закрытого (0) и открытого (1) состояний обозначены пунктирными линиями.

при деполяризации мембранны до промежуточного уровня, не превышающего порог реверсии токов через NMDA-каналы (около  $-50$  мВ), а также при их реверсии, наблюдалась активность другой популяции каналов, проводящих токи выходящей направленности, амплитуда которых увеличивалась по мере деполяризации. По всей видимости, это были потенциал-активируемые калиевые каналы, и их не принимали в расчет при анализе ак-

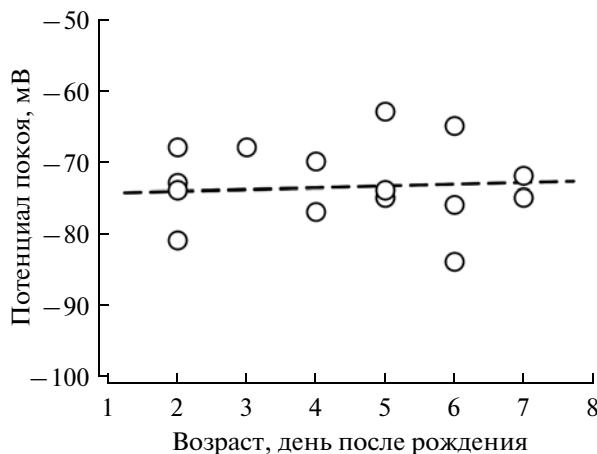
тивности NMDA-каналов. При значительной деполяризации и открывании этих предположительно калиевых каналов сильно увеличивалась базовая линия шума, что затрудняло детекцию NMDA-каналов. Принимая также в расчет блокирование NMDA-каналов внутриклеточными ионами магния, которое приводит к отклонению вольт-амперной характеристики от линейной в области выходящих токов, мы ограничили анализ вольт-амперных характеристик токов через NMDA-каналы диапазоном потенциалов на электроде от 20 до  $-50$  мВ.

На основании измерений амплитуд токов через одиночные NMDA-каналы, зарегистрированных при различных потенциалах на электроде, определили вольт-амперные характеристики NMDA-токов в каждой клетке (рис. 2). Во всех экспериментах вольт-амперная зависимость NMDA-токов удовлетворительно описывалась линейной функцией ( $R = 0.998 \pm 0.006$ ;  $n = 17$ ;  $P = 0.001$ ). Проводимость NMDA-каналов варьировала от 46 до 81 пС (среднее значение проводимости  $63 \pm 3$  пС). Наконец, реверсия токов происходила при потенциале на электроде  $-74 \pm 1$  мВ (17 клеток, диапазон разброса значений от  $-63$  до  $-84$  мВ). Как обсуждалось выше, эти значения соответствуют значению мембранных потенциала покоя у ВПМ-нейронов. На рис. 3 значения мембранных потенциала ВПМ-нейронов представлены как функция возраста животных во время первой недели после рождения (2–7 день). При анализе возрастной зависимости этого параметра мы не обнаружили статистически значимых изменений мембранных потенциала в этот период ( $n = 17$  клеток;  $P = 0.36$ ).

Таким образом, с помощью неинвазивной методики измерения мембранных потенциалов, использующей в качестве сенсора мембранных потенциала NMDA-каналы в условиях регистрации их активности “на клетке”, мы получили значения, значительно более отрицательные, чем измеренные ранее в ВПМ-нейронах и нейронах зрительного таламуса с использованием стандартной методики измерения мембранных потенциала при регистрации в конфигурации “целая клетка” [34, 37]. Причины различий в значениях мембранных потенциала, полученных с использованием этих двух методик, по всей видимости, связаны с феноменом утечки, который значительно влияет на оценку этого параметра особенно в нейронах, имеющих высокое сопротивление мембранны. Этот феномен был описан ранее в нейронах гиппокампа новорожденных крысят. В частности, показали, что значения мембранных потенциала, полученные при измерении в конфигурации “целая клетка”, четко коррелируют с сопротивлением контакта между электродом и мембранный клетки (чем ниже эти значения, тем более деполяризована мембрана) и



**Рис. 2.** Вольт-амперная характеристика токов через одиночные NMDA-каналы. Амплитуда токов через NMDA-каналы построена как функция значений потенциала на пэтч-электроде ( $V_p$ ), и зависимость аппроксимирована линейной функцией. Поскольку токи через NMDA-каналы реверсируют при нулевом значении потенциала на мембране, то потенциал реверсии токов через NMDA-каналы в конфигурации “на клетке” (обозначен стрелкой) соответствует значению мембранных потенциала покоя. График построен по результатам регистрации NMDA-каналов в четырех ВПМ-нейронах семидневных крыс.



**Рис. 3.** Зависимость мембранных потенциала покоя ВПМ-нейронов от возраста. Каждое значение на графике соответствует среднему значению мембранных потенциала покоя в одной клетке. Пунктирной линией обозначена линейная регрессия зависимости значения мембранных потенциала от возраста ( $R = 0.072 \pm 5.18$ ;  $P = 0.36$ ).

с сопротивлением клеточной мембраны (чем выше сопротивление, тем более сдвинуты значения измеренного мембранных потенциала в сторону деполяризации) [6]. Более того, одновременное измерение обоими методами в одних и тех же нейронах показало, что мембранный потенциал имеет более отрицательные значения при измерении NMDA-каналами в конфигурации “на клетке”. Однако после подведения второго электрода к той же клетке и формирования конфигурации “целая клетка” происходит значительная деполяризация мембраны, при этом значения мембранных потенциала, измеряемые электродом в “целой клетке” в точности соответствуют значениям, получаемым по вольт-амперным характеристикам NMDA-каналов [12]. Следовательно, сни-

женные по абсолютной величине значения мембранных потенциала в ВПМ-нейронах во время первой недели после рождения, полученные ранее при регистрации нейронов в конфигурации “целая клетка”, обусловлены, вероятно, ошибкой измерения, неизбежно возникающей при этом виде регистрации от нейронов малого размера и с высоким сопротивлением, а не связаны с физиологическим феноменом развития, как предположили ранее.

Полученные нами данные позволяют пересмотреть представления о функциональных свойствах нейронов ВМП в раннем онтогенезе, а также их роль в процессинге сенсорных сигналов и в генерации ранних паттернов активности в развивающихся таламокортикальных нейронных се-

тях. Ранее предполагалось, что поскольку ВПМ-нейроны деполяризованы (потенциал покоя около  $-50/-55$  мВ), то в состоянии покоя кальциевые каналы, участвующие в генерации низкопороговых (с порогом активации около  $-70$  мВ) кальциевых спайков (НПС) и связанных с ними вспышек натриевых спайков, инактивированы, и при деполяризации клетки от этого потенциала покоя ВПМ-клетки способны поддерживать лишь тоническую активность, причем со значительной задержкой после начала деполяризации [34]. Способность ВПМ-нейронов генерировать НПС деполяризующими импульсами тока становилась возможной лишь от негативных потенциалов, искусственно поддерживаемых инъекцией отрицательного тока. Поскольку полученные нами данные свидетельствуют о том, что истинный мембранный потенциал ВПМ-нейронов новорожденных крысят составляет около  $-74$  мВ, то можно предположить, что в состоянии покоя низкопороговые кальциевые каналы находятся в активируемом состоянии. Следовательно, деполяризация нейронов должна приводить к активации НПС и поддерживать вспышечную активность ВПМ-нейронов. Это предположение согласуется со вспышечной активностью, которая запускается в нейронах ВПМ ядра таламуса при стимуляции сенсорных входов в интактных животных *in vivo*, а также со вспышечным типом сенсорных ответов, регистрируемых в соматосенсорной и зрительной коре на ранних этапах развития [28–31, 33, 38]. Потенциал покоя также может способствовать активации Н-токов, которые активируются при гиперполяризации (например, в результате активации ГАМКергических синапсов из ретикулярного ядра) и участвуют в активации НПС и вспышечной активности на спаде тормозных потенциалов [39, 40]. Эти процессы являются ключевыми в генерации сетевых паттернов активности, например, сонных веретен [41, 42]. Длительное время считалось, что сонные веретена появляются довольно поздно — лишь в конце второй постнатальной недели [43]. Однако недавно показали, что уже на первой неделе после рождения в коре крысят регистрируются веретенообразные вспышки, которые имеют много общих характеристик с сонными веретенами у взрослых животных (хотя есть и ряд отличий) [28]. Это также согласуется с нашими данными о гиперполяризованном состоянии нейронов таламуса. Таким образом, полученные данные позволяют пересмотреть многие свойства ВПМ-нейронов, которые определяют способ передачи информации от сенсорной периферии в кору и их участие в генерации сетевых событий. ВПМ-нейроны ранее считались незрелыми во многом из-за искусственной деполяризации мембранны и недооценки величины потенциала покоя.

Работа выполнена при поддержке грантов Правительства РФ ведущим ученым (11.G34.31.0075), ANR (ANR-09-MNPS-006) и FRM (DEQ20110421301).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barry P.H., Lynch J.W. 1991. Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J. Membr. Biol.* **121**, 101–117.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch.* **391**, 85–100.
- Spruston N., Johnston D. 1992. Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **67**, 508–529.
- Staley K.J., Otis T.S., Mody I. 1992. Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J. Neurophysiol.* **67**, 1346–1358.
- Velumian A.A., Zhang L., Pennefather P., Carlen P.L. 1997. Reversible inhibition of  $I_K$ ,  $I_{AHP}$ ,  $I_h$  and  $I_{Ca}$  currents by internally applied gluconate in rat hippocampal pyramidal neurones. *Pflüg. Arch.* **433**, 343–350.
- Tyizio R., Ivanov A., Bernard C., Holmes G.L., Ben Ari Y., Khazipov R. 2003. Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J. Neurophysiol.* **90**, 2964–2972.
- Fricker D., Verheugen J.A., Miles R. 1999. Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* **517**, 791–804.
- Verheugen J.A., Fricker D., Miles R. 1999. Noninvasive measurements of the membrane potential and GABAergic action in hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **19**, 2546–2555.
- Khazipov R., Leinekugel X., Khalilov I., Gaïarsa J.-L., Ben-Ari Y. 1997. Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices. *J. Physiol. (Lond.)* **498**, 763–772.
- Leinekugel X., Medina I., Khalilov I., Ben-Ari Y., Khazipov R. 1997.  $Ca^{2+}$  oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA<sub>A</sub> and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron.* **18**, 243–255.
- Tyizio R., Cossart R., Khalilov I., Minlebaev M., Hubner C.A., Represa A., Ben Ari Y., Khazipov R. 2006. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science.* **314**, 1788–1792.
- Tyizio R., Minlebaev M., Rheims S., Ivanov A., Jorquera I., Holmes G.L., Zilberter Y., Ben Ari Y., Khazipov R. 2008. Postnatal changes in somatic gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 2515–2528.
- Tyizio R., Khalilov I., Represa A., Crepel V., Zilberter Y., Rheims S., Aniksztajn L., Cossart R., Nardou R., Mukhtarov M., Minlebaev M., Epsztein J., Milh M., Becq H., Jorquera I., Bulteau C., Fohlen M., Oliver V., Dulac O., Dorfmuller G., Delalande O., Ben-Ari Y.,

- Khazipov R. 2009. Inhibitory actions of the gamma-aminobutyric acid in pediatric Sturge–Weber syndrome. *Ann. Neurol.* **66**, 209–218.
14. Verheugen J.A., Vijverberg H.P., Oortgiesen M., Cahalan M.D. 1995. Voltage-gated and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential, and intracellular calcium. *J. Gen. Physiol.* **105**, 765–794.
15. Jones E.G. 2009. Synchrony in the interconnected circuitry of the thalamus and cerebral cortex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1157**, 10–23.
16. Castro-Alamancos M.A. 2004. Dynamics of sensory thalamocortical synaptic networks during information processing states. *Prog. Neurobiol.* **74**, 213–247.
17. Deschenes M., Roy J.P., Steriade M. 1982. Thalamic bursting mechanism: an inward slow current revealed by membrane hyperpolarization. *Brain Res.* **239**, 289–293.
18. Llinas R.R., Steriade M. 2006. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J. Neurophysiol.* **95**, 3297–3308.
19. Ramcharan E.J., Gnadt J.W., Sherman S.M. 2000. Burst and tonic firing in thalamic cells of unanesthetized, behaving monkeys. *Vis. Neurosci.* **17**, 55–62.
20. McCormick D.A., Bal T. 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 185–215.
21. McCormick D.A. 1989. Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. *Trends Neurosci.* **12**, 215–221.
22. McCormick D.A. 2002. Cortical and subcortical generators of normal and abnormal rhythmicity. *Int. Rev. Neurobiol.* **49**, 99–114.
23. Huguenard J.R., McCormick D.A. 2007. Thalamic synchrony and dynamic regulation of global forebrain oscillations. *Trends Neurosci.* **30**, 350–356.
24. Steriade M., Llinas R.R. 1988. The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol. Rev.* **68**, 649–742.
25. Steriade M., Contreras D., Amzica F. 1994. Synchronized sleep oscillations and their paroxysmal developments. *Trends Neurosci.* **17**, 199–208.
26. Van der Loos H., Woolsey T.A. 1973. Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science.* **179**, 395–398.
27. Erzurumlu R.S., Gaspar P. 2012. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* **35**, 1540–1553.
28. Khazipov R., Sirota A., Leinekugel X., Holmes G.L., Ben Ari Y., Buzsaki G. 2004. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature.* **432**, 758–761.
29. Khazipov R., Luhmann H.J. 2006. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci.* **29**, 414–418.
30. Colonnese M.T., Kaminska A., Minlebaev M., Milh M., Bloem B., Lescure S., Moriette G., Chiron C., Ben-Ari Y., Khazipov R. 2010. A conserved switch in sensory processing prepares developing neocortex for vision. *Neuron.* **67**, 480–498.
31. Minlebaev M., Ben-Ari Y., Khazipov R. 2007. Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex *in vivo*. *J. Neurophysiol.* **97**, 692–700.
32. Minlebaev M., Ben Ari Y., Khazipov R. 2009. NMDA receptors pattern early activity in the developing barrel cortex *in vivo*. *Cereb. Cortex.* **19**, 688–696.
33. Minlebaev M., Colonnese M., Tsintsadze T., Sirota A., Khazipov R. 2011. Early gamma oscillations synchronize developing thalamus and cortex. *Science.* **334**, 226–229.
34. Warren R.A., Jones E.G. 1997. Maturation of neuronal form and function in a mouse thalamo-cortical circuit. *J. Neurosci.* **17**, 277–295.
35. Ramoa A.S., McCormick D.A. 1994. Developmental changes in electrophysiological properties of LGNd neurons during reorganization of retinogeniculate connections. *J. Neurosci.* **14**, 2089–2097.
36. Khazipov R., Ragazzo D., Bregestovski P. 1995. Kinetics and  $\text{Mg}^{2+}$  block of N-methyl-D-aspartate receptor channels during postnatal development of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Neuroscience.* **69**, 1057–1065.
37. Ramoa A.S., McCormick D.A. 1994. Developmental changes in electrophysiological properties of LGNd neurons during reorganization of retinogeniculate connections. *J. Neurosci.* **14**, 2089–2097.
38. Yang J.W., An S., Sun J.J., Reyes-Puerta V., Kindler J., Berger T., Kilb W., Luhmann H.J. 2012. Thalamic network oscillations synchronize ontogenetic columns in the newborn rat barrel cortex. *Cereb. Cortex.* [Epub ahead of print]
39. McCormick D.A., Pape H.C. 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **431**, 291–318.
40. Evrard A., Ropert N. 2009. Early development of the thalamic inhibitory feedback loop in the primary somatosensory system of the newborn mice. *J. Neurosci.* **29**, 9930–9940.
41. Kandel A., Buzsaki G. 1997. Cellular-synaptic generation of sleep spindles, spike-and-wave discharges, and evoked thalamocortical responses in the neocortex of the rat. *J. Neurosci.* **17**, 6783–6797.
42. Steriade M. 1995. Thalamic origin of sleep spindles: Morison and Bassett (1945). *J. Neurophysiol.* **73**, 921–922.
43. Jouvet-Mounier D., Astic L., Lacote D. 1970. Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Developmental Psychobiology.* **2**, 216–239.

## Resting Membrane Potential of the Rat Ventroposteriomedial Thalamic Neurons during Postnatal Development

A. V. Yakovlev<sup>1</sup>, K. S. Koroleva<sup>1</sup>, F. F. Valiullina<sup>1</sup>, R. N. Khazipov<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>Kazan Federal University, Laboratory of Neurobiology, ul. Kremlevskaya, 18, Kazan, 420008 Russia;

<sup>2</sup>INSERM U901, 163 av. Lumini, Marseille, 13273 France;

\*e-mail: roustem.khazipov@inserm.fr

Resting membrane potential is a critical parameter determining tonic or bursting mode of the thalamic neurons function. Previous developmental studies using whole-cell recordings revealed strongly depolarized values of the resting membrane potential (near  $-50$  mV) in the immature VPM and LGN thalamic neurons. Yet, whole-cell recordings are associated with an introduction of the shunting conductance via the gigaseal that may lead to neuronal depolarization in small neurons with high, in the gigaohm range, membrane resistance. Therefore, we have performed measurements of the resting potential of VPM neurons in slices obtained from neonatal rats of postnatal days P2–P7 using cell-attached recordings of NMDA channels as voltage sensors. Because the currents through NMDA channels reverse near 0 mV, we assumed that the resting membrane potential should equal the reversal potential of currents through NMDA channels in cell-attached recordings. Analysis of the current–voltage relationships of NMDA currents revealed that the resting membrane potential in the immature VPM neurons is around  $-74$  mV and that it does not change during the first postnatal week. This suggests that VPM neurons may operate in the bursting mode during the early postnatal period and support the oscillatory activity (spindle-like bursts) in the developing thalamocortical networks.