

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

**Изменения экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов
глутамата как фактор эпилептогенеза**

Коваленко Анна Андреевна

1.5.5. Физиология человека и животных
(Биологические науки)

Научный руководитель
к.б.н. Зубарева Ольга Евгеньевна

Санкт-Петербург
2023

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Эпилептогенез является многофакторным процессом, который включает в себя генетические и эпигенетические изменения, молекулярные и структурные перестройки, происходящие в клетках мозга и вызывающие нарушение работы нейронных цепей [1]. Запуск эпилептизации мозга может происходить из-за ряда причин: травмы головного мозга, инфекции, инсульта, осложнения различных неврологических расстройств или отравления ядами. Одним из факторов, приводящих к развитию эпилепсии, могут быть фебрильные судороги. Фебрильные судороги развиваются у детей в возрасте от 6 месяцев до 5 лет при высокой температуре. Они являются наиболее распространенными типами судорог у детей. Длительные судороги могут привести к необратимым изменениям в развивающемся мозге, увеличивающим риск развития височной эпилепсии во взрослом возрасте [2]. Клинические наблюдения показывают, что 30-50% пациентов с височной эпилепсией в детском возрасте перенесли фебрильные судороги [3]. Кроме того, фебрильные судороги могут влиять на формирование личности ребенка, а также становиться причиной развития нервно-психических нарушений и когнитивного дефицита [4]. Причины формирования данного типа судорог в настоящее время изучены недостаточно, а способа предотвратить последующее развитие эпилепсии не существует.

Известно, что одной из причин развития эпилепсии и связанных с ней нейро-психических нарушений лежит изменение баланса между возбуждающими (глутамат) и тормозными (ГАМК) нейромедиаторными системами [5]. Развитие эпилептических судорог может быть вызвано увеличением концентрации глутамата и чрезмерной активацией Ca^{2+} -проницаемых ионотропных глутаматных рецепторов [6]. Аномальное повышение внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+} повлечет за собой повреждение клеток и их гибель [6–8]. Критическую роль при поступлении ионов Ca^{2+} в клетку играют NMDA- и AMPA-рецепторы, функциональная активность которых напрямую зависит от их субъединичного состава [9]. NMDA-рецепторы являются тетрамерами и могут состоять из трех типов субъединиц: GluN1, GluN2(a–d) и GluN3(a–b) [10]. AMPA-рецепторы также являются тетрамерами, в состав которых могут входить субъединицы GluA1–4. Большинство AMPA-рецепторов включают в себя GluA2 субъединицу, которая обеспечивает непроницаемость канала для ионов Ca^{2+} [11].

Метаботропные рецепторы глутамата также могут играть важную роль в поддержании эпилептической активности, так как в норме данные рецепторы модулируют возбуждающую и тормозную синаптическую передачу [12,13]. Различные типы метаботропных рецепторов глутамата разделены на 3 группы: I (mGluR1 и mGluR5), II (mGluR2 и mGluR3) и III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 и mGluR8). Метаботропные рецепторы глутамата I группы обеспечивают положительную модуляцию и могут активировать NMDA-рецепторы [13]. Метаботропные рецепторы глутамата II и III групп оказывают противоположный эффект на синаптическую передачу [14].

У пациентов с эпилепсией, а также на различных моделях эпилепсии показано изменение паттерна продукции мРНК субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов [15–17]. Изменения экспрессии метаботропных рецепторов глутамата изучены в меньшей степени. При эпилепсии происходит повышение продукции представителей I группы метаботропных рецепторов глутамата [18–20]. Влияние неонатальных фебрильных судорог на экспрессию ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс в настоящее время мало изучены.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Провести анализ динамики изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс в модели фебрильных судорог.

Задачи исследования:

1. Исследовать динамику экспрессии генов субъединиц NMDA- (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*) и AMPA- (*Gria1*, *Gria2*) рецепторов в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также височной и медиальной префронтальной коре крыс через 3 (P14), 10 (P21) и 40 (P50-51) дней после фебрильных судорог;

2. Изучить изменения экспрессии метаботропных рецепторов глутамата I (*Grm1*, *Grm5*), II (*Grm2*, *Grm3*) и III (*Grm4*, *Grm7*, *Grm8*) групп в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также височной и медиальной префронтальной коре крыс после фебрильных судорог на 14, 21 и 50-51 день жизни.

Положения, выносимые на защиту

1. После фебрильных судорог отмечается краткосрочное снижение экспрессии генов основных субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в дорзальном и вентральном гиппокампе и височной коре крыс.

2. Фебрильные судороги приводят к нарушению нормальной возрастной динамики соотношения экспрессии *Grin2a/Grin2b* субъединиц NMDA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и медиальной префронтальной коре крыс.

3. Продукция мРНК метаботропных рецепторов глутамата I, II и III групп изменяется разнонаправленно в различных областях мозга крыс после фебрильных судорог. Изменения затрагивают как ранние (P14 и P21), так и поздние (P50-51) сроки анализа.

4. Возрастное снижение экспрессии гена *Grm5* I группы метаботропных рецепторов глутамата характерно для всех экспериментальных групп крыс. Аналогичная возрастная динамика отмечается в вентральном гиппокампе для генов метаботропных рецепторов III группы (*Grm4*, *Grm7*, *Grm8*).

Научная новизна исследования

Впервые проведен комплексный анализ экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс, перенесших фебрильные судороги в раннем возрасте. Показано, что неонатальные фебрильные судороги приводят к снижению продукции мРНК субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в дорзальном и вентральном гиппокампе и височной коре крыс. Впервые выявлено, что фебрильные судороги нарушают нормальную возрастную динамику соотношения экспрессии *Grin2a/Grin2b* субъединиц NMDA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и медиальной префронтальной коре крыс.

Впервые получено описание динамики экспрессии генов метаботропных глутаматных рецепторов в различных областях мозга крыс после фебрильных судорог. Показано, что изменения продукции мРНК метаботропных рецепторов глутамата регионспецифичны.

Теоретическое и практическое значение работы

Впервые в одном исследовании проведен комплексный анализ динамики экспрессии генов основных субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также метаботропных рецепторов глутамата в дорзальном и вентральном гиппокампе, медиальной префронтальной и височной коре мозга крыс, перенесших фебрильные судороги в раннем возрасте. Полученные результаты углубляют представление об экспрессии генов ионотропных и метаботропных глутаматных рецепторов после фебрильных судорог. В дальнейшем результаты проведенного исследования могут быть использованы при разработке новых методов лечения эпилепсии.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на XXIII международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей "Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье" (Санкт-Петербург, 2020), VII молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020), LXXXI научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2020» (Санкт-Петербург, 2020), XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022» (Санкт-Петербург, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Материалы и методы

1. Объект исследования

Исследование проведено на 69 самцах крыс линии Wistar в соответствии с Правилами Комитета по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН и Директивой ЕС 2010/63/EU по проведению экспериментов на животных. Животные содержались в стандартных условиях с неограниченным доступом к воде и корму, при естественной длине светового дня.

2. Моделирование фебрильных судорог

Фебрильные судороги индуцировали в возрасте 10-11 дней (P10-11). Крысят помещали на дно стеклянной камеры. Температура в установке поддерживалась на уровне +46 °С. При этом контролировали ректальную температуру животных, не допуская ее повышение выше +41 °С. [21]. Перед началом эксперимента температура крысят составляла в среднем +31,1±0,1 °С, а в начале судорог — +39,8±0,1 °С. После начала судорог температуру измеряли каждые 2 мин. Если температура поднималась выше +41 °С, крысят вынимали из установки и перемещали на прохладную поверхность до нормализации температуры тела, а затем возвращали в камеру. Гипертермическая температура животных (+39-41 °С) поддерживалась в течение 25 мин. В качестве контроля были набраны интактные крысы из того же помета, а также животные, которые на аналогичное время отлучали от матери, но не нагревали.

3. Определение относительного уровня экспрессии генов ионотропных и метаболитных рецепторов глутамата

Выделение тотальной РНК

Выделение мозга для последующего биохимического анализа проводили на 14, 21 и 50-51 дни жизни крыс. Согласно атласу мозга крыс [22] при помощи микротомы-криостата OTF5000 (Bright Instrument, Великобритания) были получены следующие структуры мозга: дорзальный и вентральный гиппокамп, медиальная префронтальная и височная кора. Затем выделение тотальной РНК проводили с использованием ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Полученный осадок РНК заливали 75 % этиловым спиртом и хранили при -20 °С. Все этапы работы выполнялись с использованием автоклавированного пластика.

ДНКазная обработка образцов РНК

ДНКазную обработку проводили с помощью RQ1 ДНКазы (Promega, США). Перед этим пробирки с осадками тотальной РНК центрифугировали 30 минут при 0 °С и 14 000 g. Спирт удаляли и открытые пробирки помещали в твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Латвия) на 5 мин при +50°С. Осадок РНК растворяли в 7,5 мкл воды для инъекций и инкубировали при +50°С в течение 5 мин. Затем добавляли 2X реакционную смесь, содержащую 1 единицу активности RQ1 ДНКазы свободной от рибонуклеаз и 20 единиц активности ингибитора рибонуклеаз РНазина (Силекс, Россия). Полученную смесь инкубировали 15 мин при +37 °С в термостате. Для остановки работы фермента добавляли 1,5 мкл стоп-реагента (20 мМ ЭГТА) и инкубировали в твердотельном термостате 10 мин при +65 °С.

После проведения ДНКазной обработки РНК переосаждали 8 М раствором LiCl в течение ночи при -20 °С. Затем пробирки с образцами центрифугировали и осадок РНК дважды промывали 75% этиловым спиртом.

Обратная транскрипция

Образцы РНК были высушены аналогично методике, описанной выше (см. пункт ДНКазная обработка образцов РНК). Полученные осадки растворяли в 15 мкл воды для инъекций. Концентрацию РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США).

кДНК была синтезирована из 1 мкг тотальной РНК с использованием 0,5 мкг олиго-dT праймеров (ДНК-Синтез, Россия), 0,25 мкг 9-мерных случайных праймеров и 100 единиц обратной транскриптазы М-MLV (Promega, США) согласно протоколу производителя. Полученный раствор кДНК разводили в 10 раз и хранили при -20°С до проведения ПЦР в реальном времени.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

В исследовании использовалась технология TaqMan. Для проведения ПЦР были оптимизированы следующие мультиплексы: *Grin1 + Grin2a*, *Grin2b + Gria1 + Gria2*, *Grm1 + Grm3 + Grm5*, *Grm2 + Grm7 + Grm8*, *Actb + Gapdh + B2m*, *Rpl13a + Ppia + Sdha* и *Hprt1 + Pgk1 + Ywhaz*. *Grm4* анализировался отдельно. Реакции выполняли в общем объеме 6 мкл, содержащем 0,8 мкл кДНК, 0,5 единиц TaqM-полимеразы (Алкор Био, Россия) и 3,5 mM Mg²⁺. Использованные праймеры и зонды (ДНК-Синтез, Россия) представлены в таблице 1. Контролями ПЦР были отрицательный контроль ПЦР (0,8 мкл воды вместо кДНК) и отрицательный контроль обратной транскрипции (образцы, к которым при проведении обратной транскрипции не добавляли ревертазу). ПЦР проводили на амплификаторе CFX384 Real-Time System (Bio-Rad, США) по следующей программе: «горячий старт» – +95°С 15 мин для активации

полимеразы; далее 45-50 циклов: 5 с при +95°C (денатурация ДНК-матрицы) 10 с при +60-62 °C (отжиг праймеров и элонгация) с регистрацией флуоресценции.

Определение относительной экспрессии генов интереса проводили с использованием $2^{\Delta\Delta Ct}$ метода [23]. Данные были нормированы относительно среднего геометрического Ct трех стабильно экспрессирующихся генов домашнего хозяйства. Стабильность экспрессии референсных генов определялась с помощью онлайн-инструмента RefFinder [https://www.heartcure.com.au/reffinder]. Были выбраны следующие гены домашнего хозяйства: *Actb*, *Rpl13a*, *Ppia* в дорзальной области гиппокампа, *Gapdh*, *Pgk1*, *Ppia* в вентральной области гиппокампа, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ppia* в медиальной префронтальной коре и *Gapdh*, *Rpl13a*, *Hprt1* в височной коре.

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность праймеров и зондов	Финальные концентрации, нМ	Ссылка
<i>Actb</i> NM_031144	TGTCACCAACTGGGACGATA GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA FAM-CGTGTGGCCCCTGAGGAGCAC-BHQ1	200 200	[24] (праймеры) [25] (зонд)
<i>Gapdh</i> NM_017008	TGCACCACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTTC R6G-ATCACGCCACAGCTTCCAGAGGG-BHQ2	200 100	[26]
<i>B2m</i> NM_012512	TGCCATTCAGAAAACCTCCCC GAGGAAGTTGGGCTTCCCATT ROX-ATTCAAGTGTACTCTCGCCATCCACCG- BHQ1	200 100	[27]
<i>Rpl13a</i> NM_173340	GGATCCCTCCACCCTATGACA CTGGTACTTCCACCCGACCTC FAM-CTGCCCTCAAGGTTGTGCGGT-BHQ1	200 100	[28] (праймеры) [25] (зонд)
<i>Sdha</i> NM_130428	AGACGTTTGACAGGGGAATG TCATCAATCCGCACCTTGTA R6G-ACCTGGTGGAGACGCTGGAGCT-BHQ2	200 100	[29] (праймеры) [25] (зонд)
<i>Ppia</i> NM_017101	AGGATTCATGTGCCAGGGTG CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA ROX-CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA-BHQ1	200 100	[30]
<i>Hprt1</i> NM_012583	TCCTCAGACCGCTTTTCCC GC TCATCATCACTAATCACGACGCTGG FAM-CCGACCGTTCTGTTCATGTTCGACCCT-BHQ1	200 100	[31] (праймеры) [25] (зонд)
<i>Pgk1</i> NM_053291	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTC R6G-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGG-BHQ2	200 100	[32] (праймеры) [25] (зонд)
<i>Ywhaz</i> NM_013011	GATGAAGCCATTGCTGAACTTG GTCTCCTGGGTATCCGATGTC ROX-TGAAGAGTCGTACAAGACAGCACGC- BHQ1	200 100	[32] (праймеры) [25] (зонд)
<i>Grm1</i> NM_001114330.1	GGGAATGCCAAGAAGAGGCAG CTGCAGTGTGGGGTTTTC AA FAM-GCCCAGCAGCCAGTGTCCGTCGGC-BHQ1	400 200	[33]
<i>Grm2</i> NM_001105711.1	TCCAGTGATTATCGGGTGCAG AACTTGGGTGCAAAGAGGCA FAM-TGCGTGTCCGTCAGCCTCAGTGGCT-BHQ1	200 100	[33]
<i>Grm3</i> NM_001105712.1	CAGGAGTTGACGGTGCAG GCCTGTCCTCAGATAAGGGAG	200 200	[33]

	ROX-TCGGTGACGGGCTCTTTCAGCCCAA-BHQ2		
<i>Grm4</i> NM_022666.1	GGCAGTGCAGCAGCTAAGG CCGGTCACTCTACCAACCG FAM-CTCCCTGAGCTCCCCCGGAGCAGC-BHQ1	200 150	[33]
<i>Grm5</i> NM_017012.1	ATGCATGTAGGAGACGGCAA TTTCCGTTGGAGCTTAGGGTTT HEX-CGTCCGCTGCCAGCAGATCCAGCA-BHQ2	400 200	[34] (праймеры) [33] (зонд)
<i>Grm7</i> NM_031040.1	CCAGACAACAAACACAACCAACC GCGTTCCTTCTGTGTCTTCTTC HEX-TGCAGTGGGGCAAAGGAGTCCGAG-BHQ2	200 100	[35] (праймеры) [33] (зонд)
<i>Grm8</i> NM_022202.1	TCATCGGGCACTGGACAAAT CACGGTTTTCTTCCTCTCCCC ROX-TGTCTGCAGCCTGCCGTGCAAGCCS-BHQ2	300 100	[33]
<i>Grin1</i> NM_017010	GTTCTCCGCTCAGGCTTTG AGGGAACGTTCTGCTTCCA FAM-CGGCATGCGCAAGGACAGCC-BHQ1	200 100	[36]
<i>Grin2a</i> NM_012573	GCTACACACCCTGCACCAATT CACCTGGTAACCTTCTCAGTGA FAM-TGGTCAATGTGACTTGGGATGGCAA-BHQ1	200 100	[37]
<i>Grin2b</i> NM_012574	CCCAACATGCTCTCTCCCTTAA CAGCTAGTCGGCTCTCTGGTT FAM-GACGCCAACCTCTAGGCGGACAG-BHQ1	200 100	[37]
<i>Gria1</i> NM_031608	TCAGAACGCCTCAACGCC TGTAGTGGTACCCGATGCCA ROX-TCCTGGGCCAGATCGTGAAGCTAGAAAA- BHQ1	200 100	[38]
<i>Gria2</i> NM_017261	CAGTGCATTTCCGGGTAGGGA TGCGAAACTGTTGGCTACCT FAM-TCGGAGTTCAGACTGACACCCCA-BHQ1	200 100	[38]

4. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка производилась в программах IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США), и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения определялась тестом Шапиро-Уилка, а равенство дисперсий — тест Ливиня. Полученные данные анализировали с помощью двухфакторного ANOVA. В качестве апостериорного теста был использован тест Сидака. Результаты считались значимыми при $p < 0,05$. Все данные представлены в виде средних \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

1. Изменение экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в мозге крыс, перенесших фебрильные судороги

На рисунках 1-3 представлены изменения продукции мРНК генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в различных областях мозга крыс, перенесших фебрильные судороги в раннем возрасте. Оценка экспрессии проводилась на 14, 21 и 50-51 дни жизни крыс.

Снижение продукции мРНК гена *Grin1*, кодирующего GluN1 субъединицу NMDA-рецепторов, отмечалось у крыс, перенесших фебрильные судороги, в дорзальной области гиппокампа и височной коре только на P14

(Рис. 1). Данное изменение может свидетельствовать об изменении общего числа NMDA-рецепторов, так как данная субъединица обязательно присутствует в тетрамерном комплексе этого рецептора [39]. Схожее изменение отмечается в гиппокампе пациентов с височной эпилепсией [40]. В дальнейшем экспрессия гена *Grin1* возвращается к контрольным значениям.

Экспрессия гена *Grin2a* также снижалась в дорзальном гиппокампе и височной коре крыс после фебрильных судорог, при чем эти изменения наблюдались как на P14, так и на P21. В вентральной области гиппокампа на P14 показано снижение продукции мРНК *Grin2a* у крыс, перенесших фебрильные судороги, и контрольных крыс, которых отсаживали от матери. В проведенном ранее исследовании было выявлено, что у крыс с пониженной продукцией мРНК *GluN2a* субъединицы увеличена восприимчивость к судорогам и ухудшена память [41]. Предполагается, что такое изменение экспрессии данной субъединицы может вносить вклад в эпилептизацию мозга при развитии эпилепсии.

Изменения экспрессии *Grin2b* были менее выражены: снижение отмечалось в дорзальной области гиппокампа на P14 и в височной коре на P21. Для развития эпилепсии характерно повышение экспрессии данной субъединицы [42], вероятно, выявленные нами изменения являются компенсаторными.

Из литературы известно, что после рождения в мозге крыс преобладают *GluN2b*-содержащие NMDA-рецепторы. В норме к 21 дню жизни происходит смена паттерна экспрессии субъединиц и *GluN2a* становится преобладающей [10]. Изучение изменения соотношения уровня мРНК *Grin2a/Grin2b* может помочь охарактеризовать перестройки, происходящие с NMDA-рецепторами в онтогенезе и при развитии судорожной патологии. В дорзальной области гиппокампа и медиальной префронтальной коре соотношение *Grin2a/Grin2b* снижено на P21 у крыс после фебрильных судорог (Рис. 2). В вентральном же гиппокампе аналогичное снижение отмечается и в контрольной группе.

К 50 дню жизни все изменения экспрессии генов субъединиц NMDA-рецепторов нивелировались.

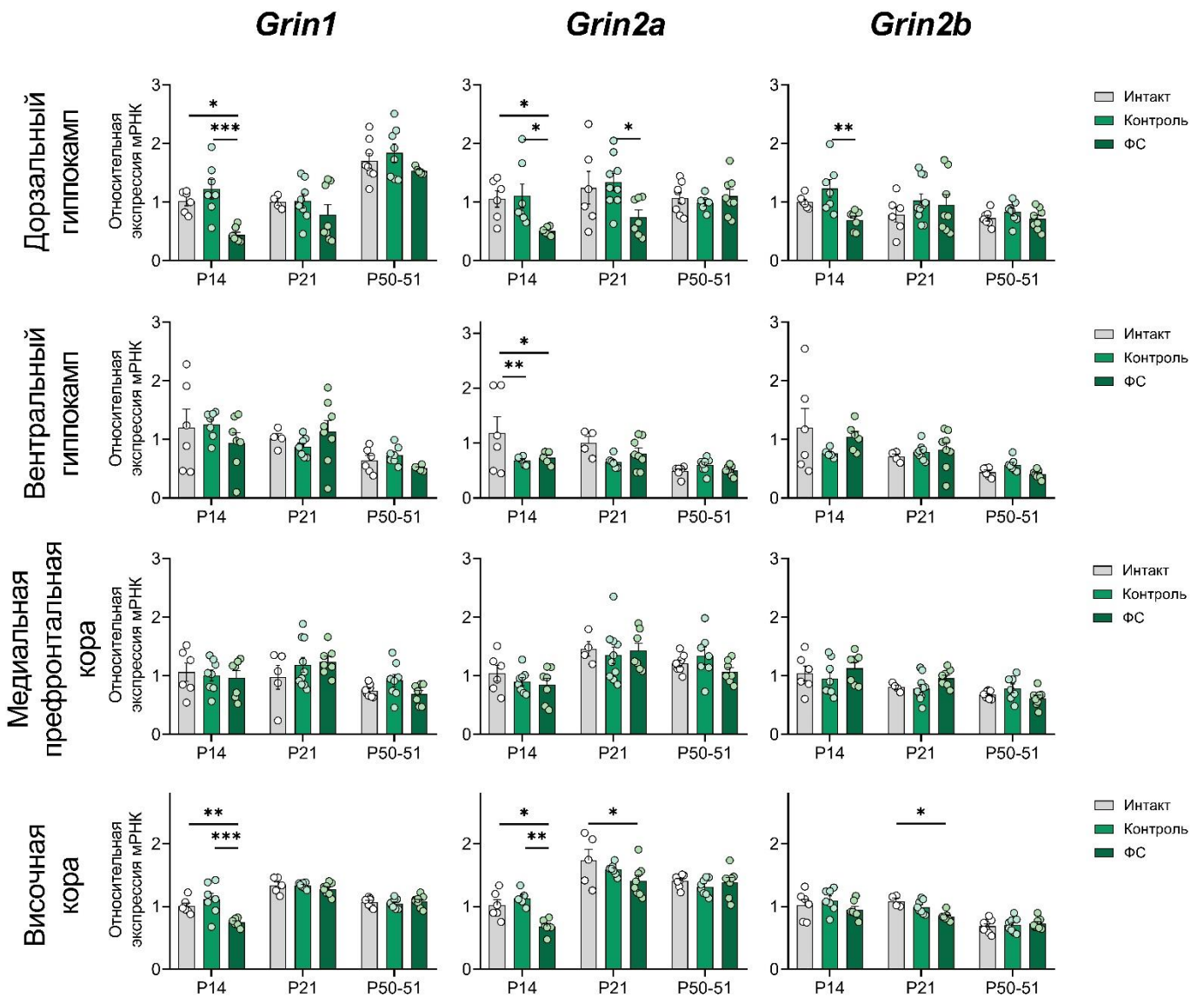


Рисунок 1. Относительная экспрессия генов субъединиц NMDA-рецепторов (*Grin1*, *Grin2a* и *Grin2b*) в дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе, а также медиальной префронтальной и височной (ТС) коре крыс после фебрильных судорог. Исследования проводились на 14, 21 и 50-51 дни жизни. Интакт – интактная группа, Контроль - контрольная группа крысят, которых на время эксперимента отсаживали от матери, но не нагревали, ФС - экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA: F_{time} – фактор времени, F_{group} – фактор судорог, $F_{interaction}$ – взаимодействие обоих факторов. *Grin1*: DH – $F_{group}(2, 52) = 9,2$, $p = 0,0004$; ТС – $F_{interaction}(4, 54) = 5,8$, $p = 0,001$, $F_{group}(2, 54) = 6,9$, $p = 0,002$; *Grin2a*: DH – $F_{group}(2, 55) = 5,9$, $p = 0,005$; VH – $F_{group}(2, 48) = 3,9$, $p = 0,03$; ТС – $F_{interaction}(4, 52) = 3,3$, $p = 0,02$, $F_{group}(2, 52) = 7,8$, $p = 0,001$; *Grin2b*: DH – $F_{group}(2, 58) = 4,2$, $p = 0,02$; ТС – $F_{group}(2; 54) = 3,5$, $p = 0,04$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

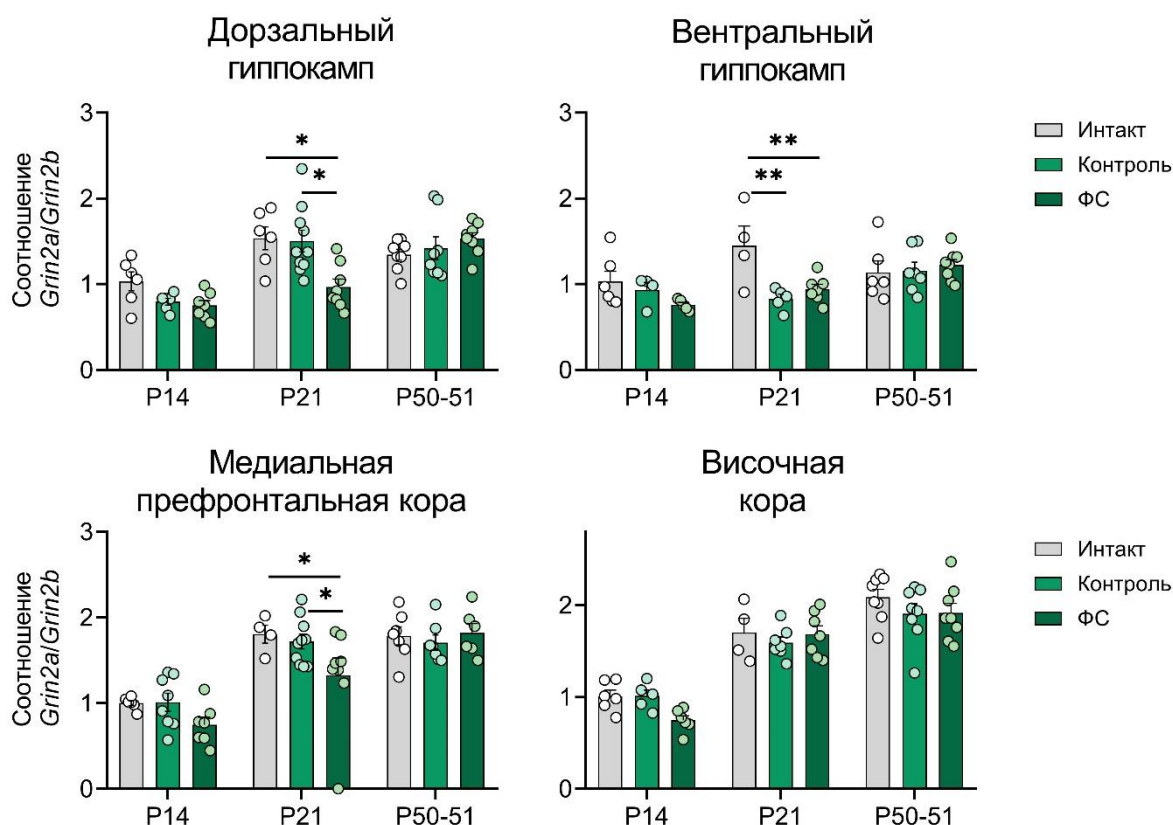


Рисунок 2. Соотношение экспрессии генов субъединиц *Grin2a/Grin2b* NMDA-рецепторов в дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе, а также медиальной префронтальной и височной (ТС) коре крыс после фебрильных судорог. Исследования проводились на 14, 21 и 50-51 дни жизни. Интакт – интактная группа, Контроль - контрольная группа крысят, которых на время эксперимента отсаживали от матери, но не нагревали, ФС - экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA: F_{time} – фактор времени, F_{group} – фактор судорог, $F_{interaction}$ – взаимодействие обоих факторов. DH – $F_{interaction}(4, 58) = 4,9$, $p = 0,002$, $F_{time}(2, 58) = 25,0$, $p < 0,0001$, $F_{group}(2, 58) = 3,6$, $p = 0,003$; VH – $F_{interaction}(4, 43) = 3,3$, $p = 0,02$, $F_{time}(2, 43) = 5,1$, $p = 0,01$, $F_{group}(2, 43) = 4,9$, $p = 0,01$; mPFC – $F_{time}(2, 54) = 43,1$, $p < 0,0001$; ТС – $F_{time}(2, 50) = 98,2$, $p < 0,0001$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Изменения экспрессии генов субъединиц AMPA-рецепторов наблюдаются только в дорзальном гиппокампе и медиальной префронтальной коре. Продукция мРНК *Grial* снижена на P14 в дорзальном гиппокампе и на P50-51 в медиальной префронтальной коре в группе крыс с фебрильными судорогами по сравнению с контрольной группой (Рис. 3). Известно, что данная субъединица играет ключевую роль в формировании долговременной потенциации [43], снижение экспрессии гена *Grial* может являться одной из причин нарушений памяти при эпилепсии. Ранее схожее снижение продукции

мРНК *Gria1* было выявлено и в других моделях судорожных состояний [30,44,45].

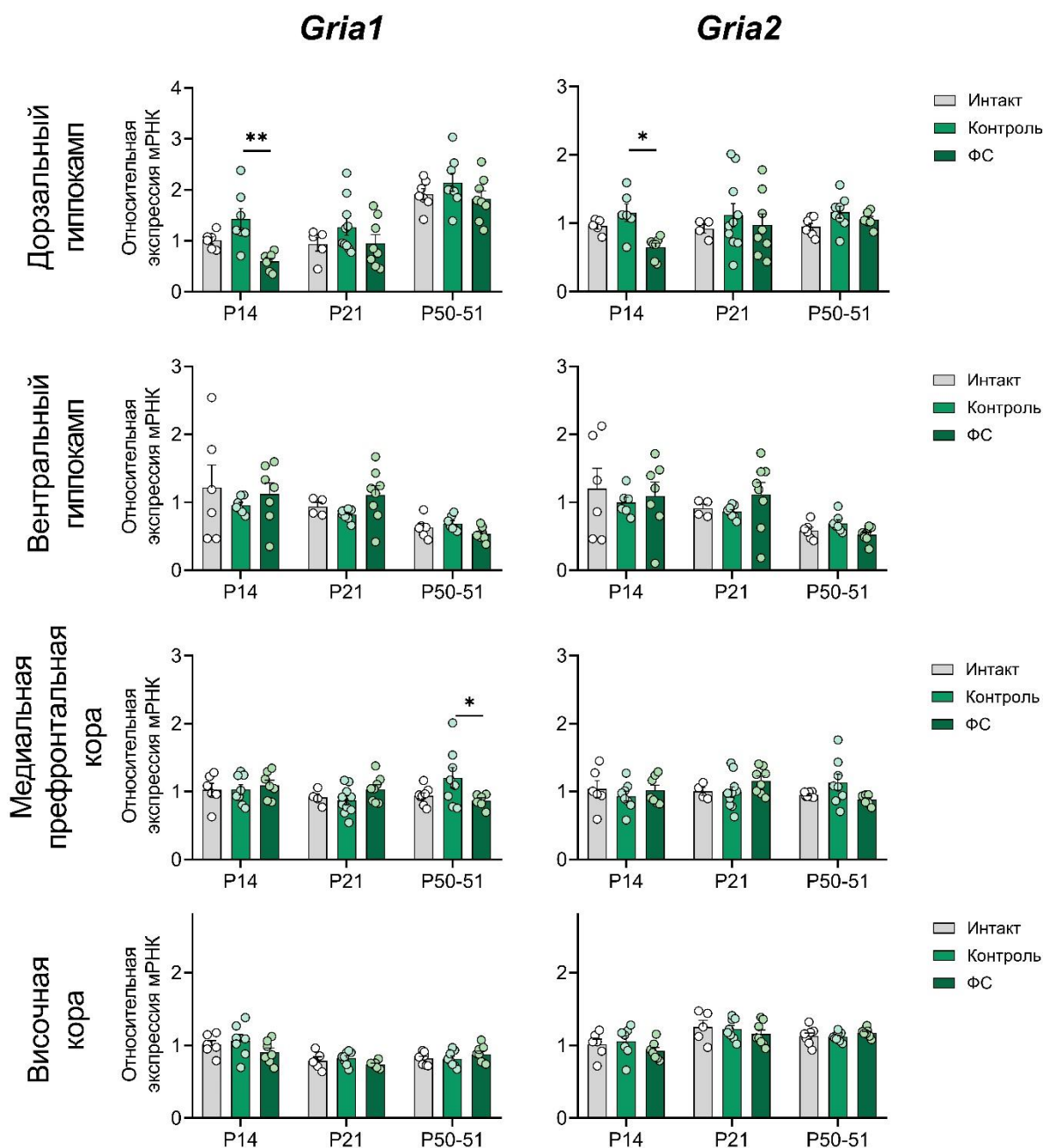


Рисунок 3. Относительная экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов (*Gria1* и *Gria2*) в дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе, а также медиальной префронтальной (mPFC) и височной (TC) коре крыс после фебрильных судорог. Исследования проводились на 14, 21 и 50-51 дни жизни. Интакт – интактная группа, Контроль - контрольная группа крысят, которых на время эксперимента отсаживали от матери, но не нагревали, ФС - экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA: F_{time} – фактор времени, F_{group} – фактор судорог, $F_{interaction}$ – взаимодействие обоих факторов. *Gria1*: DH – $F_{group}(2, 57) = 8,5, p = 0,0006$; mPFC – $F_{interaction}(4, 56) = 2,7, p = 0,04$; *Gria2*: DH – $F_{group}(2, 52) = 3,7, p = 0,03$; VH – $F_{group}(2, 48) = 3,9, p = 0,03$. Звездочки

указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Экспрессия гена *Gria2* также уменьшалась на P14 в дорзальном гиппокампе крыс, перенесших фебрильный судороги. Данная субъединица обеспечивает непроницаемость канала AMPA-рецептора для ионов Ca^{2+} [11]. Выявленное снижение продукции мРНК *Gria2* может свидетельствовать о встраивании Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов, что в свою очередь может приводить к эксайтотоксичности [46,47]. К 21-му дню жизни данное изменение нивелируется. В исследовании, выполненном в нашей лаборатории, снижение продукции мРНК *Gria2* в мозге крыс также наблюдалось в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии [30]. Неонатальные гипоксические судороги также приводят к снижению экспрессии гена субъединицы GluA2 в гиппокампе крыс [48], что совпадает с нашими данными.

Таким образом, фебрильные судороги приводят к краткосрочному снижению экспрессии генов субъединиц как NMDA-, так и AMPA-рецепторов. Большая часть изменений нивелируется к 21-му дню жизни крысят. Изменения продукции мРНК субъединиц NMDA-рецепторов более выражены, кроме того, отмечается нарушение нормального созревания данных рецепторов в гиппокампе и медиальной префронтальной коре крыс.

2. Изменение экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс, перенесших фебрильные судороги

На рисунках 4-6 представлены изменения экспрессии генов метаботропных рецепторов I (*Grm1*, *Grm5*), II (*Grm2*, *Grm3*) и III (*Grm4*, *Grm7* и *Grm8*) групп. Ранее на модели фебрильных судорог экспрессия генов метаботропных рецепторов глутамата не исследовалась.

Продукция мРНК *Grm5* была снижена на P14 в дорзальной области гиппокампа крыс после фебрильных судорог, в то время как экспрессия данного гена была повышена на том же сроке анализа в медиальной префронтальной и височной коре (Рис. 4). Ранее было показано, что повышение экспрессии данного рецептора характерно для больных височной эпилепсией [49,50]. Так как данный рецептор относится к I группе, которая может активировать NMDA-рецепторы, увеличение продукции *Grm5* может приводить к эксайтотоксичности. Однако, выявленные нами изменения экспрессии гена *Grm5* были краткосрочными. Кроме того, в исследованных структурах мозга во всех экспериментальных группах с возрастом снижалась продукция мРНК *Grm5*. Изменений продукции мРНК *Grm1* не выявлено.

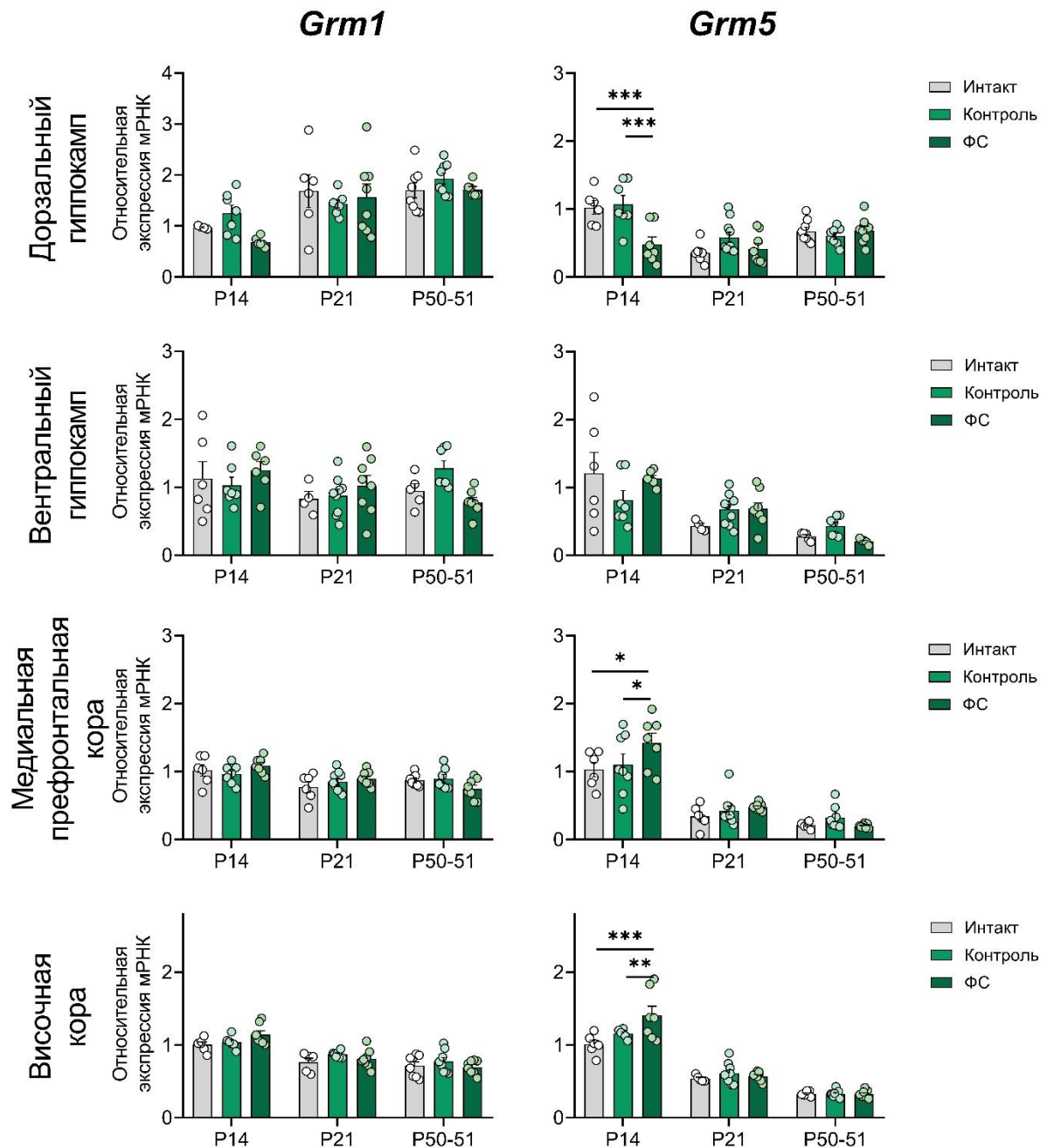


Рисунок 4. Относительная экспрессия генов метаботропных рецепторов глутамата I группы (*Grm1* и *Grm5*) в дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе, а также медиальной префронтальной (mPFC) и височной (TC) коре крыс после фебрильных судорог. Исследования проводились на 14, 21 и 50-51 дни жизни. Интакт – интактная группа, Контроль - контрольная группа крысят, которых на время эксперимента отсаживали от матери, но не нагревали, ФС - экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA: F_{time} – фактор времени, F_{group} – фактор судорог, $F_{\text{interaction}}$ – взаимодействие обоих факторов. *Grm5*: DH – $F_{\text{interaction}}(4, 59) = 5,6$, $p = 0,0007$, $F_{\text{group}}(2, 59) = 6,0$, $p = 0,004$; mPFC – $F_{\text{time}}(2, 59) = 95,4$, $p < 0,0001$; TC – $F_{\text{interaction}}(4, 56) = 4,9$, $p = 0,002$, $F_{\text{group}}(2, 56) = 5,5$, $p = 0,007$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Мы обнаружили повышение экспрессии гена *Grm2* II группы метаботропных рецепторов глутамата в дорзальной области гиппокампа на 21-й день жизни крысят контрольной группы. Аналогичная тенденция характерна и для экспериментальной группы (Рис. 5). Продукция мРНК *Grm3* снижалась на P14 в дорзальном гиппокампе, на P21 в височной коре и на P50-51 в медиальной префронтальной коре крыс после фебрильных судорог. В другом исследовании, выполненном с применением конвульсанта пилокарпина, было показано снижение экспрессии mGluR2 и mGluR3 в гиппокампе и коре головного мозга через сутки после индукции судорог [51]. Снижение экспрессии генов представителей II группы может вносить вклад в эпилептизацию мозга, так как основная функция данной группы заключается в ингибировании выброса нейротрансмиттеров [14] и их недостаток может приводить к смещению баланса возбуждение/торможение в сторону возбуждения.

Экспрессия гена *Grm4* (III группа метаботропных рецепторов глутамата) снижалась в обеих областях гиппокампа крыс после фебрильных судорог на 14-й день жизни (Рис. 6). Ранее аналогичное снижение уровня мРНК *Grm4* в гиппокампе крыс было выявлено на пилокарпиновой модели [52].

Продукция мРНК *Grm7* также была снижена на P14, но данное изменение наблюдалось только в дорзальной области гиппокампа. Кроме того, экспрессия гена *Grm7* повышена на P50-51 в височной коре крыс, перенесших фебрильные судороги. Снижение экспрессии гена *Grm8* выявлено в дорзальной и вентральной областях гиппокампа крыс после фебрильных судорог на P14. В дорзальном гиппокампе продукция мРНК *Grm8* остается сниженной на 21-й и 50-51-е дни жизни в экспериментальной группе и также понижена в контрольной группе, что, вероятно, связано с влиянием стресса, вызванного отлучением от матери в раннем возрасте.

В вентральной области гиппокампа отмечается снижение продукции мРНК всех представителей III группы метаботропных рецепторов глутамата с возрастом (Рис. 6), что по-видимому отражает нормальную возрастную динамику экспрессии данных генов. В других структурах мозга подобных изменений не наблюдается.

Таким образом, разнонаправленные изменения экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата были выявлены как на ранние, так и на поздние сроки анализа и были наиболее выражены в дорзальном гиппокампе и височной коре. Изменений экспрессии гена *Grm1* не обнаружено.

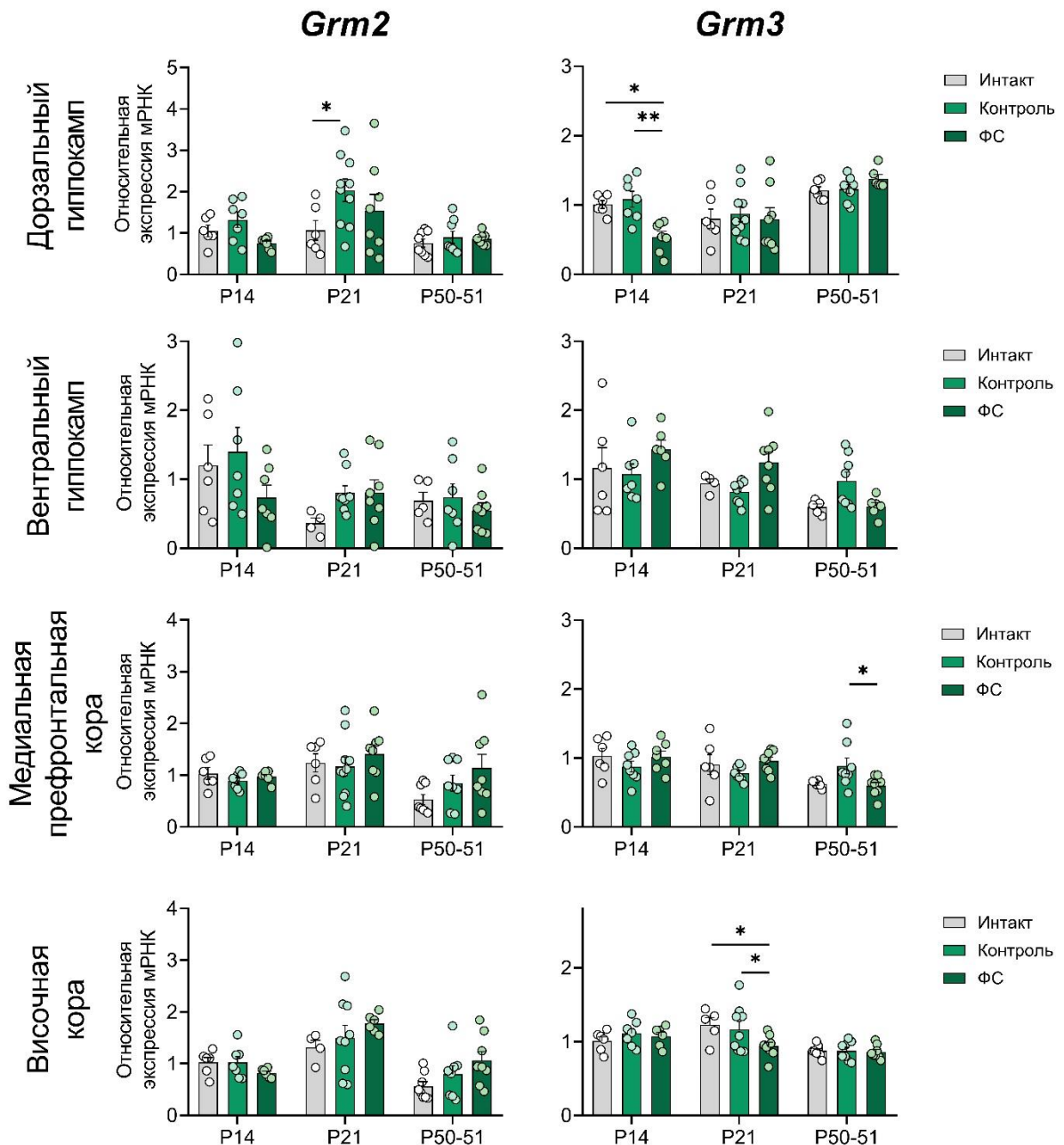


Рисунок 5. Относительная экспрессия генов метаботропных рецепторов глутамата II группы (*Grm2* и *Grm3*) в дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе, а также медиальной префронтальной (mPFC) и височной (TC) коре крыс после фебрильных судорог. Исследования проводились на 14, 21 и 50-51 дни жизни. Интакт – интактная группа, Контроль - контрольная группа крысят, которых на время эксперимента отсаживали от матери, но не нагревали, ФС - экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA: F_{time} – фактор времени, F_{group} – фактор судорог, $F_{\text{interaction}}$ – взаимодействие обоих факторов. *Grm2*: DH – $F_{\text{group}}(2, 59) = 3,8, p = 0,03$; *Grm3*: DH – $F_{\text{interaction}}(2, 55) = 3,2, p = 0,02$; mPFC – $F_{\text{interaction}}(4, 56) = 3,3, p = 0,02$; TC – $F_{\text{time}}(2, 56) = 11,8, p < 0,0001$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

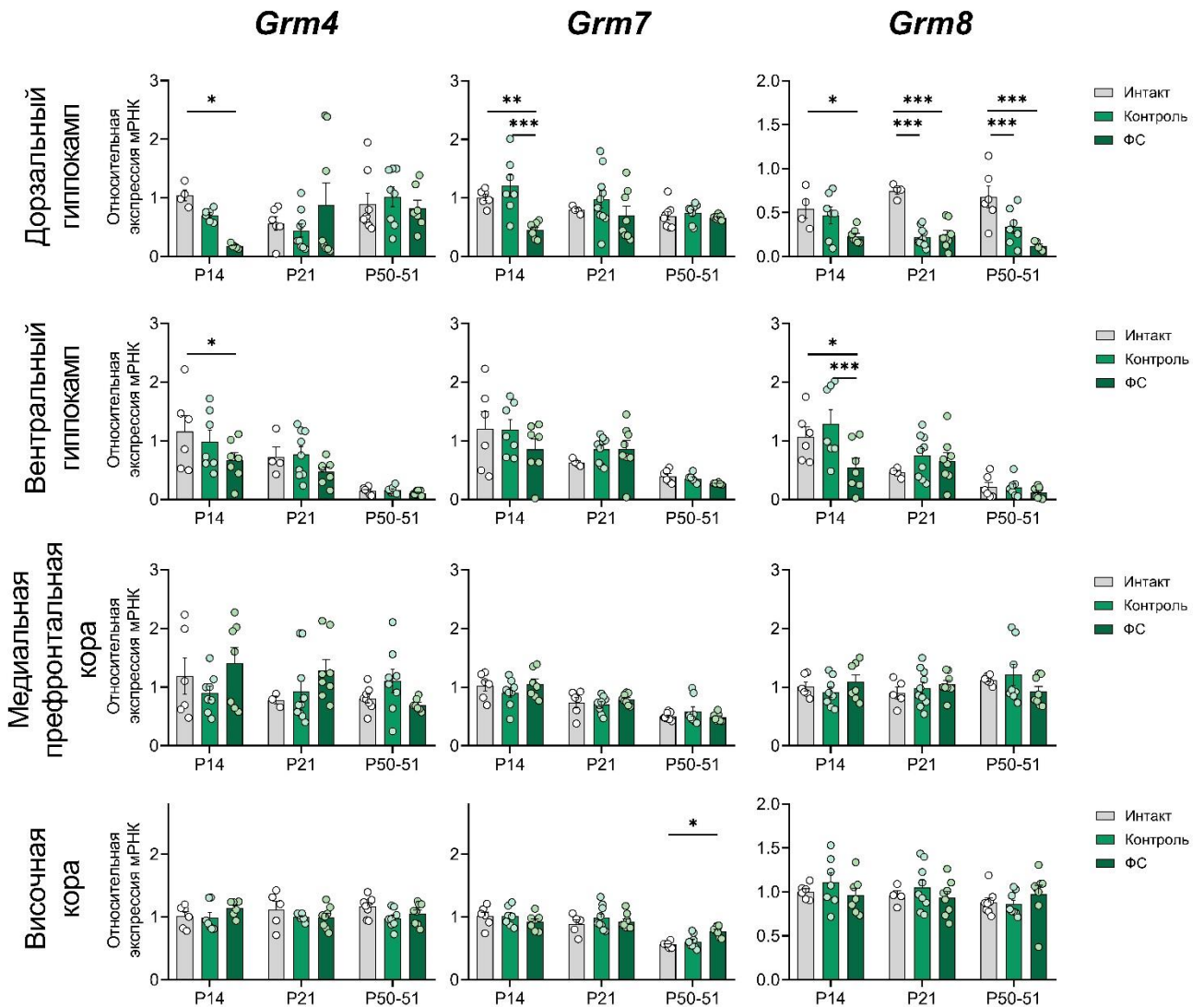


Рисунок 6. Относительная экспрессия генов метаботропных рецепторов глутамата III группы (*Grm4*, *Grm7* и *Grm8*) в дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе, а также медиальной префронтальной (mPFC) и височной (TC) коре крыс после фебрильных судорог. Исследования проводились на 14, 21 и 50-51 дни жизни. Интакт – интактная группа, Контроль - контрольная группа крысят, которых на время эксперимента отсаживали от матери, но не нагревали, ФС - экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA: F_{time} – фактор времени, F_{group} – фактор судорог, $F_{\text{interaction}}$ – взаимодействие обоих факторов. *Grm4*: DH – $F_{\text{interaction}}(4, 52) = 2,6$, $p = 0,04$; VH – $F_{\text{group}}(2, 52) = 3,3$, $p = 0,04$; *Grm7*: DH – $F_{\text{interaction}}(4, 57) = 2,6$, $p = 0,04$, $F_{\text{group}}(2, 57) = 8,5$, $p = 0,0006$; TC – $F_{\text{interaction}}(4, 55) = 2,8$, $p = 0,04$; *Grm8*: DH – $F_{\text{interaction}}(4, 49) = 2,7$, $p = 0,04$, $F_{\text{group}}(2, 49) = 26,2$, $p < 0,0001$; VH – $F_{\text{group}}(2, 53) = 4,1$, $p = 0,02$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

В ходе проведенного исследования впервые проведен анализ динамики экспрессии генов основных субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также

метаботропных рецепторов глутамата в дорзальном и вентральном гиппокампе, медиальной префронтальной и височной коре мозга крыс после фебрильных судорог. Характер выявленных изменений позволяет предполагать, что изменения экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата могут являться одним из факторов эпилептогенеза. В дальнейшем результаты проведенного исследования могут быть использованы при разработке новых подходов к лечению и предотвращению развития эпилепсии.

Выводы

- 1) Фебрильные судороги приводят к снижению экспрессии генов, кодирующих субъединицы NMDA- и AMPA-рецепторов в различных областях мозга крыс. Наиболее выраженные изменения отмечаются в отношении NMDA-рецепторов. Большинство выявленных изменений экспрессии генов ионотропных рецепторов глутамата затрагивает ранние сроки анализа.
- 2) На P21 было выявлено нарушение нормальной возрастной динамики соотношения экспрессии *Grin2a/Grin2b* субъединиц NMDA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и медиальной префронтальной коре крыс, перенесших фебрильные судороги.
- 3) После фебрильных судорог разнонаправленно изменялась экспрессия представителей всех групп метаботропных рецепторов глутамата за исключением гена *Grm1*. Изменения экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата наблюдались как на ранних (P14 и P21), так и на поздних (P50-51) сроках анализа и были наиболее выражены в дорзальном гиппокампе и височной коре. Для височной и медиальной префронтальной коры на P14 и P50-51 было характерно повышение экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата.
- 4) В дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также в височной и медиальной префронтальной коре отмечалось возрастное снижение экспрессии гена *Grm5*, характерное для всех экспериментальных групп крыс. Аналогичная возрастная динамика выявлена в вентральном гиппокампе для генов метаботропных рецепторов III группы (*Grm4*, *Grm7*, *Grm8*).

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Ергина Ю.Л., Коваленко А.А., Зайцев А.В. Роль NMDA-рецепторов в эпилептогенезе // Рос Физиол Журн. 2020. Т. 106 (12). С. 1455-1478. (перевод: J. L. Ergina J.L., Kovalenko A.A., Zaitsev A.V. The role of NMDA receptors in epileptogenesis // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2021. V. 51. P. 793-806. DOI: 10.1007/s11055-021-01136-9).

2. Schwarz A.P., Malygina D.A., Kovalenko A.A., Trofimov A.N., Zaitsev A.V. Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples // *Molecular and Cellular Probes*. 2020. 101611. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101611.

3. Postnikova T.Yu., Griflyuk A.V., Amakhin D.V., Kovalenko A.A., Soboleva E.B., Zubareva O.E., Zaitsev A.V. Early life febrile seizures impair hippocampal synaptic plasticity in young rats // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22(15): 8218. DOI: 10.3390/ijms22158218.

Тезисы

1. Коваленко А.А., Захарова М.В., Шварц А.П. Изменения экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс после фебрильных судорог // Сборник тезисов LXXXI научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2020». 2020. С. 28.
2. Коваленко А.А., Захарова М.В., Шварц А.П., Зубарева О.Е., Зайцев А.В. Анализ изменений экспрессии генов глутаматных метаботропных рецепторов в мозге крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии и модели фебрильных судорог // *Гены и Клетки*. 2020. XV (3). С. 96.
3. Коваленко А.А., Захарова М.В., Шварц А.П. Влияние фебрильных судорог на экспрессию генов метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс // Сборник тезисов "Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье". 2020. С. 171-172.
4. Коваленко А.А., Захарова М.В., Колегова П.И., Шварц А.П. Фебрильные судороги приводят к изменениям экспрессии генов глутаматных рецепторов в мозге и нарушению исследовательского поведения крыс // Сборник тезисов АПБ 2022. С. 78-79.

Список цитируемой литературы

1. Devinsky O. et al. Epilepsy // *Nat. Rev. Dis. Prim. Nat Rev Dis Primers*, 2018. Vol. 4.
2. Dubé C.M. et al. Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers. // *J. Neurosci*. 2010. Vol. 30, № 22. P. 7484–7494.
3. Feng B., Chen Z. Generation of Febrile Seizures and Subsequent Epileptogenesis // *Neurosci. Bull*. 2016. Vol. 32, № 5. P. 481–492.
4. Notenboom R.G.E. et al. Long-lasting modulation of synaptic plasticity in rat hippocampus after early-life complex febrile seizures // *Eur. J. Neurosci*. 2010. Vol. 32, № 5.
5. Lasoń W., Chlebicka M., Rejda K. Research advances in basic mechanisms

- of seizures and antiepileptic drug action. // *Pharmacol. Rep.* 2013. Vol. 65, № 4. P. 787–801.
6. Walker M.C. Pathophysiology of status epilepticus // *Neurosci. Lett.* 2018. Vol. 667. P. 84–91.
 7. Jakaria M. et al. Neurotoxic Agent-Induced Injury in Neurodegenerative Disease Model: Focus on Involvement of Glutamate Receptors. // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. Vol. 11. P. 307.
 8. Reiner A., Levitz J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. // *Neuron.* 2018. Vol. 98, № 6. P. 1080–1098.
 9. Traynelis S.F. et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function // *Pharmacol. Rev.* 2010. Vol. 62, № 3. P. 405–496.
 10. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14, № 6. P. 383–400.
 11. Henley J.M., Wilkinson K.A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease // *Nat. Rev. Neurosci.* 2016. Vol. 17, № 6. P. 337–350.
 12. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. // *Neuropharmacology.* Pergamon, 2009. Vol. 56, № 4. P. 735–740.
 13. Celli R. et al. Targeting metabotropic glutamate receptors in the treatment of epilepsy: rationale and current status // *Expert Opin. Ther. Targets.* Taylor and Francis Ltd, 2019. Vol. 23, № 4.
 14. Nicoletti F. et al. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside // *Neuropharmacology.* Elsevier Ltd, 2011. Vol. 60, № 7–8. P. 1017–1041.
 15. Loddenkemper T. et al. Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus // *Epilepsy Res.* Elsevier B.V., 2014. Vol. 108, № 4. P. 605–615.
 16. Naylor D.E. et al. Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. // *Neurobiol. Dis.* 2013. Vol. 54. P. 225–238.
 17. Zhou C. et al. Neonatal seizures alter NMDA glutamate receptor GluN2A and 3A subunit expression and function in hippocampal CA1 neurons. // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. Vol. 9. P. 362.
 18. Blümcke I. et al. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and

- protein expression in experimental animals and human patients. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. Vol. 59, № 1. P. 1–10.
19. Aronica E. et al. Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. // Eur. J. Neurosci. Eur J Neurosci, 2000. Vol. 12, № 7. P. 2333–2344.
 20. Tang F.-R., Lee W.-L., Yeo T.T. Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy // J. Neurocytol. 2002. Vol. 30, № 5. P. 403–411.
 21. Dubé C. et al. Endogenous neuropeptide Y prevents recurrence of experimental febrile seizures by increasing seizure threshold. // J. Mol. Neurosci. 2005. Vol. 25, № 3. P. 275–284.
 22. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier, 2006.
 23. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method // Methods. Academic Press, 2001. Vol. 25, № 4. P. 402–408.
 24. Bonefeld B.E., Elfving B., Wegener G. Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue // Synapse. 2008. Vol. 62, № 4. P. 302–309.
 25. Schwarz A.P. et al. Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples // Mol. Cell. Probes. Academic Press, 2020. Vol. 53.
 26. Lin W. et al. Taste receptor cells express pH-sensitive leak K^+ channels. // J. Neurophysiol. 2004. Vol. 92, № 5. P. 2909–2919.
 27. Yamaguchi M. et al. Soybean Oil Fat Emulsion Prevents Cytochrome P450 mRNA Down-Regulation Induced by Fat-Free Overdose Total Parenteral Nutrition in Infant Rats // Biol. Pharm. Bull. 2005. Vol. 28, № 1. P. 143–147.
 28. Swijsen A. et al. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. // BMC Res. Notes. 2012. Vol. 5, № 1. P. 685.
 29. Pohjanvirta R. et al. Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats // Chem. Biol. Interact. Chem Biol Interact, 2006. Vol. 160, № 2. P. 134–149.
 30. Malkin S.L. et al. Changes of AMPA receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. // Neuroscience. 2016. Vol. 327. P. 146–155.
 31. Cook N.L. et al. Validation of reference genes for normalization of real-time

- quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury // *J. Neurosci. Res.* 2009. Vol. 87, № 1. P. 34–41.
32. Langnaese K. et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model // *BMC Mol. Biol.* 2008. Vol. 9, № 1. P. 53.
 33. Kovalenko A.A. et al. Changes in Metabotropic Glutamate Receptor Gene Expression in Rat Brain in a Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy // *Int. J. Mol. Sci. Int J Mol Sci*, 2022. Vol. 23, № 5.
 34. Dulman R.S. et al. Acute Ethanol Produces Ataxia and Induces Fmr1 Expression via Histone Modifications in the Rat Cerebellum. // *Alcohol. Clin. Exp. Res. Alcohol Clin Exp Res*, 2019. Vol. 43, № 6. P. 1191–1198.
 35. Xu J. et al. Developmental lead exposure alters gene expression of metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal neurons. // *Neurosci. Lett. Neurosci Lett*, 2007. Vol. 413, № 3. P. 222–226.
 36. Giza C.C., Maria N.S.S., Hovda D.A. N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. // *J. Neurotrauma.* 2006. Vol. 23, № 6. P. 950–961.
 37. Floyd D.W., Jung K.-Y., McCool B.A. Chronic ethanol ingestion facilitates N-methyl-D-aspartate receptor function and expression in rat lateral/basolateral amygdala neurons. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. Vol. 307, № 3. P. 1020–1029.
 38. Proudnikov D. et al. Optimizing primer--probe design for fluorescent PCR. // *J. Neurosci. Methods.* 2003. Vol. 123, № 1. P. 31–45.
 39. Traynelis S.F. et al. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function // *Pharmacological Reviews.* 2010.
 40. Neder L. et al. Glutamate NMDA receptor subunit R1 and GAD mRNA expression in human temporal lobe epilepsy. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2002. Vol. 22, № 5–6. P. 689–698.
 41. Acutain M.F. et al. Reduced Expression of Hippocampal GluN2A-NMDAR Increases Seizure Susceptibility and Causes Deficits in Contextual Memory // *Front. Neurosci. Frontiers Media SA*, 2021. Vol. 15.
 42. Loddenkemper T. et al. Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus // *Epilepsy Res.* 2014. Vol. 108, № 4. P. 605–615.
 43. Herring B.E., Nicoll R.A. Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking // *Annu. Rev. Physiol.* 2016. Vol. 78, № 1. P. 351–365.
 44. Sears S.M.S., Hewett J.A., Hewett S.J. Decreased epileptogenesis in mice lacking the System x_c⁻ transporter occurs in association with a reduction in

- AMPA receptor subunit GluA1 // *Epilepsia Open*. 2019. Vol. 4, № 1. P. 133–143.
45. Russo I. et al. AMPA receptor properties are modulated in the early stages following pilocarpine-induced status epilepticus. // *Neuromolecular Med*. 2013. Vol. 15, № 2. P. 324–338.
 46. Jaskova K., Pavlovicova M., Jurkovicova D. Calcium transporters and their role in the development of neuronal disease and neuronal damage. // *General physiology and biophysics*. *Gen Physiol Biophys*, 2012. Vol. 31, № 4. P. 375–382.
 47. TANG X.-J., XING F. Calcium-permeable AMPA receptors in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (Review) // *Biomed. Reports*. Spandidos Publications, 2013. Vol. 1, № 6. P. 828–832.
 48. Lippman-Bell J.J. et al. Early-life seizures alter synaptic calcium-permeable AMPA receptor function and plasticity // *Mol. Cell. Neurosci*. NIH Public Access, 2016. Vol. 76. P. 11–20.
 49. Tang F.R., Lee W.L., Yeo T.T. Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. // *J. Neurocytol. J Neurocytol*, 2001. Vol. 30, № 5. P. 403–411.
 50. Das A. et al. Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors // *Neuroscience*. *Neuroscience*, 2012. Vol. 220. P. 237–246.
 51. Garrido-Sanabria E.R. et al. Impaired expression and function of group II metabotropic glutamate receptors in pilocarpine-treated chronically epileptic rats. // *Brain Res*. *Brain Res*, 2008. Vol. 1240. P. 165–176.
 52. Dammann F. et al. Bidirectional shift of group III metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic depression in the epileptic hippocampus // *Epilepsy Res*. *Epilepsy Res*, 2018. Vol. 139. P. 157–163.