

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ 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)

**Функциональные изменения свойств глутаматергической  
синаптической передачи в гиппокампе и энторинальной коре в модели  
судорожных состояний**

Ергина Юлия Леонидовна

30.06.01 Фундаментальная медицина  
03.03.01 Физиология

Научный руководитель  
д.б.н. Зайцев Алексей Васильевич

Санкт-Петербург  
2021

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность темы исследования**

Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе позвоночных, потому не удивительно, что ионотропные глутаматные рецепторы АМПА и НМДА тесно вовлечены в процессы эпилептогенеза. У пациентов, диагностированных с фармакорезистентной формой височной эпилепсии, даже в отсутствие иктальной активности наблюдаются крайне высокие концентрации внеклеточного глутамата в эпилептогенном гиппокампе по сравнению с неэпилептогенным (Cavus et al., 2005). В случае же появления иктальной активности у таких пациентов концентрация внеклеточного глутамата увеличивается в шесть раз по сравнению с уровнем, наблюдаемым до иктальной активности, причем концентрация медиатора остается повышенной, по крайней мере, 20 минут после прекращения иктальной активности (During & Spencer, 1993). Тем не менее, процессы, ведущие к нарушениям как метаболизма глутамата, так и глутаматергической синаптической передачи, требуют дальнейшего изучения.

Многочисленные исследования показали, что замкнутая энторинально-гиппокампальная синаптическая петля играет ключевую роль в генерации и поддержании синхронизированной эпилептической активности у пациентов с эпилепсией височной доли (Scharfman, 2000; Schwarcz et al., 2000; Bartolomei et al., 2005). Поскольку эпилепсия, по-видимому, является прогрессирующим заболеванием, важно понимать, что наилучшей терапевтической стратегией является раннее выявление и своевременное воздействие на области, демонстрирующие молекулярные и клеточные нарушения, характерные для эпилептогенеза (Arzimanoglou et al., 2002; Herman, 2002). Однако вклад отдельных мозговых структур в эпилептогенез, а также конкретные механизмы, лежащие в его основе, неясны.

С функциональной точки зрения принято считать, что энторинальная кора регулирует информационный обмен между неокортексом и гиппокампом (de Curtis and Pare, 2004). Согласно этой точке зрения, когда энторинальная кора перестает оказывать контролирующее воздействие на гиппокамп, эпилептиформная активность распространяется на области неокортекса и другие мозговые структуры. Тем не менее, энторинальная кора не раз была признана источником эпилептиформной иктальной активности в нескольких независимых *in vitro* исследованиях (Avoli et al., 2002; Shi et al. 2014). Что касается гиппокампа, то его часто рассматривают в качестве источника интериктальной активности. Сообщалось, что в переживающих срезах, содержащих только зубчатую извилину и области CA1-CA3 гиппокампа, не наблюдалось иктальных разрядов (Shi et al., 2014). Есть также данные о том, что возникающие в области CA3 интериктальные разряды не способствуют, а подавляют распространение иктальной активности (Barbarosie & Avoli, 1997).

В последние годы особенно подробно были исследованы свойства эпилептиформной активности в 4-аминопиридиновых моделях *in vitro*. В экспериментах с переживающими срезами мозга было показано, что 4-

аминопиридин по-разному воздействует на слои коры (Borbély et al., 2006). Антагонисты ионотропных глутаматных рецепторов эффективно блокируют индуцированную 4-аминопиридином эпилептиформную активность в средних и глубоких, но не поверхностных слоях коры (Yang and Benardo, 2002). Регистрация локальных полевых потенциалов показала, что под действием 4-аминопиридина в переживающих гиппокампальных срезах наблюдались две различные популяции локальных полевых потенциалов. Оба типа эпилептиформной активности возникали преимущественно в области СА3 гиппокампа, но только один из них, наблюдаемый значительно реже, распространялся также и на зубчатую извилину. Применение антагонистов ионотропных глутаматных рецепторов приводило к исчезновению второй популяции локальных полевых потенциалов, регистрируемых только в СА1, СА2 и СА3 областях гиппокампа, тогда как первая популяция локальных полевых потенциалов все еще регистрировалась (Gonzalez-Sulser et al., 2012).

Согласно работе (Codadu et al., 2019), 4-аминопиридин активизирует синаптические связи внутри гиппокампа раньше, чем синаптические связи в областях неокортекса. Кроме того, было отмечено, что эпилептиформная активность в гиппокампальной области СА1, в отличие от эпилептиформной активности в области СА3, демонстрировала тонико-клонические разряды, совпадающие по времени с иктальными разрядами в энторинальной коре. Это исследование подтверждает, что и в 4-аминопиридиновой модели тонико-клонический паттерн разрядов, по-видимому, характерен только для разрядов, возникающих в неокортексе и энторинальной коре; когда такая активность наблюдается в гиппокампе, она, похоже, передается туда из энторинальной коры. В работе (Kajiwara et al, 2019) отмечается, что повышенная активность энторинальной коры сохраняется спустя 50 минут после отмыва 4-аминопиридин-содержащего перфузирующего раствора.

## **Цель и задачи исследования**

### **Цель исследования:**

оценить воздействие кратковременной эпилептиформной активности *in vitro* на глутаматергическую синаптическую передачу в энторинальной коре и гиппокампе

### **Задачи исследования:**

1. Охарактеризовать эпилептиформную активность *in vitro* в энторинальной коре и гиппокампе
2. Установить, как влияет кратковременная эпилептиформная активность *in vitro* на АМПА- и НМДА-рецептор-опосредованную синаптическую передачу в глубоких слоях энторинальной коры
3. Установить, как влияет кратковременная эпилептиформная активность *in vitro* на АМПА- и НМДА-рецептор-опосредованную синаптическую передачу между синапсами СА3-СА1 гиппокампа

## Положения, выносимые на защиту

1. Эпилептиформная активность *in vitro* в энторинальной коре и гиппокампе протекает неодинаково. В энторинальной коре наблюдаются эпилептиформные разряды различной природы.
2. Краткий период эпилептиформной активности приводит к постсинаптическим изменениям глутаматергической передачи в энторинальной коре, проявляющимся в форме длительной потенциации АМПА-рецептор-опосредованного компонента вызванных ответов пирамидных нейронов глубоких слоев энторинальной коры
3. Постсинаптические свойства глутаматергической передачи между синапсами СА3-СА1 гиппокампа меняются спустя 1 час после краткого периода эпилептиформной активности, о чем свидетельствует увеличение соотношения АМПА-рецептор-опосредованных и НМДА-рецептор-опосредованных постсинаптических токов.

## Научная новизна исследования

Впервые для вызова эпилептиформной активности применена комбинированная *in vitro* модель, предполагающая одновременное использование 4-аминопиридина, повышение внеклеточной концентрации ионов  $K^+$  до 8.5 моль/л и понижение внеклеточной концентрации ионов  $Mg^{2+}$  до 0.25 моль/л. Продемонстрирована динамика АМПА- и НМДА-рецептор-опосредованных синаптических проводимостей как в ходе эпилептиформной активности, так и после ее прекращения. Выявлена потенция АМПА-рецептор-опосредованного компонента вызванных ответов пирамидных нейронов глубоких слоев энторинальной коры, сохраняющаяся в течение 30 минут после прекращения эпилептиформной активности. Впервые показано, что спустя 1 час после прекращения эпилептиформной активности соотношение АМПА- и НМДА-рецептор-опосредованных компонентов вызванного ответа увеличено в области СА1 гиппокампа по сравнению с контрольным уровнем.

## Теоретическое и практическое значение работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что в ходе ее выполнения были получены новые данные о протекании эпилептиформной активности *in vitro* в энторинальной коре и гиппокампе. Было показано, что синаптические проводимости основных типов ионотропных рецепторов меняются в ходе эпилептиформной активности. Проведенное изучение изменений глутаматергической синаптической передачи наглядно демонстрирует, что эпилептиформная активность нарушает нормальное функционирование АМПА- и НМДА-рецепторов, приводя к потенциации АМПА рецепторов, сохраняющейся после прекращения эпилептиформной

активности и к увеличению соотношения АМПА- и НМДА-рецептор-опосредованных компонентов вызванного ответа. Практическая значимость работы заключается в том, что данные о изменении АМПА- и НМДА-рецептор-опосредованной синаптической активности могут быть использованы при разработке новых подходов к терапии эпилепсии, в том числе для поиска фармакологических агентов, воздействующих на глутаматергическую передачу.

### **Апробация результатов исследования**

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2018» (Санкт-Петербург, 2018), the 11th FENS forum of neuroscience (Берлин, 2018), XVI Всероссийской конференции с международным участием «Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели» (Санкт-Петербург, 2020), XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2021» (Санкт-Петербург, 2021).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 печатные работы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

### **Материалы и методы**

#### **1. Объект исследования.**

Работа выполнена на крысах линии Вистар (20-22 дней) в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными, действующими в ИФЭБ РАН и соответствующими Российскому и международному законодательству. Крыс декапитировали, мозг быстро извлекали и помещали в охлажденную (0° С) искусственную спинномозговую жидкость (ACSF) следующего состава (в моль/л): 1.0 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 2.5 KCl, 13,3 глюкозы, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 126 NaCl; pH 7.3–7.4. Раствор аэрировался газовой смесью, содержащей 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Горизонтальные срезы головного мозга крысы, содержащие энторинальную кору и зоны гиппокампа (зубчатая извилина, области CA1, CA2 и CA3), толщиной 300-350 мкм были сделаны на вибротоме (Microm HM 650V; Microm; Germany) и инкубировались в ACSF в течение 1 часа до начала электрофизиологического эксперимента.

#### **2. Вызов эпилептиформной активности в переживающем срезе**

Для вызова эпилептиформной активности в энторинальной коре и гиппокампе применялся эпилептогенный раствор с повышенной внеклеточной

концентрацией калия и пониженной внеклеточной концентрацией магния, содержащий 4-аминопиридин – блокатор калиевых каналов типа Kv1 (120 NaCl, 8.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 10 глюкозы и 0.05 4-AP (в моль/л)). Спустя 20 минут эпилептогенный раствор заменялся контрольным (ACSF).

### **3. Электрофизиология**

Для регистрации синаптической активности использовались две электрофизиологические установки:

#### Электрофизиологическая установка 1

Для визуализации пирамидных нейронов применялись видеокамера WAT-127LH (Watec Inc.; США), видеокамера Grasshopper GS3-U3-23S6M (FLIR Systems, США) и микроскоп Zeiss Axioscop 2 (Zeiss; Германия), работа которого основана на использовании дифференциальной интерференционно-контрастной оптической системы. Регистрация синаптической активности осуществлялась при помощи пэтч-кламп усилителя AM-Systems 2400 (AM-Systems; США), пэтч-кламп усилителя MultiClamp™ 700B (Molecular devices, США), аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments; США) и программного обеспечения WinWCP (SIPBS; Великобритания). Частота фильтрации данных составляла 10 кГц, частота дискретизации равнялась 20 кГц. Для подведения пэтч-электродов к клетке использовались микроманипуляторы MP-255 (Sutter Instruments, USA). Для подачи перфузионного раствора в камеру использовались 2 перистальтических насоса Miniature Peristaltic Pump BQ50-1J (Longer Precision Pump, Китай). Температура подаваемого перфузионного раствора регулировалась при помощи термоконтроллера Thermoclamp1 (AM-Systems, США). Электрическая стимуляция осуществлялась при помощи Isostim A320 (World Precision Instruments, США).

#### Электрофизиологическая установка 2

Для визуализации пирамидных нейронов применялись видеокамера Sanyo VCB-3512P (Sanyo Electric, Япония) и микроскоп Zeiss Axioscop 2 FS Plus (Zeiss; Германия), работа которого основана на использовании дифференциальной интерференционно-контрастной оптической системы. Регистрация синаптической активности осуществлялась при помощи пэтч-кламп усилителя НЕКА ЕРС-8 (НЕКА, Германия); аналого-цифрового преобразователя LН 8 + 8 (НЕКА, Германия) и программного обеспечения Patch Master v2x90.1 software (НЕКА, Germany). Частота фильтрации данных составляла 5 кГц, частота дискретизации равнялась 20 кГц. В случае регистрации миниатюрных событий данные фильтровались при 3 кГц. Для подведения пэтч-электродов к клетке использовались микроманипуляторы MP-255 (Sutter Instruments, USA). Для подачи перфузионного раствора в камеру использовался перистальтический насос Longer Pump BT100-2J (Longer Precision Pump, Китай). Температура подаваемого перфузионного раствора регулировалась при помощи термоконтроллера Thermoclamp1 (AM-

Systems, США). Электрическая стимуляция осуществлялась при помощи Isostim A365 (World Precision Instruments, США).

#### Пэтч-кламп регистрация синаптической активности

Регистрация синаптической активности пирамидных нейронов осуществлялась в перфузируемой камере при температуре 30°C. Скорость перфузии равнялась 5-7 мл/мин. Пэтч-электроды с входным сопротивлением 2–5 МОм изготавливались из боросиликатного стекла (WPI; UK) на пуллере для изготовления микропипеток P-1000 (Sutter Instrument; Novato, CA, USA). Для регистрации синаптической активности методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» использовались внутриклеточный раствор, содержащий калий-глюконат (114 глюконата калия, 6 KCl, 0,2 EGTA, 10 HEPES, 4 АТР-Mg и 0,3 GTP (в мМ); pH доводился до 7.25 при помощи KOH) и внутриклеточный раствор на основе метансульфоната цезия (127 CsMeSO<sub>3</sub>, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 6 QX314, 4 АТР-Mg и 0,3 GTP (в мМ); pH доводился до 7.25 при помощи CsOH). Во всех включенных в анализ клетках сопротивление доступа после получения конфигурации «целая клетка» составляло менее 20 МОм и оставалось стабильным (увеличение  $\leq 30\%$ ) на протяжении всего эксперимента. Биполярный стимулирующий электрод устанавливался на расстоянии 100-200 мкМ от регистрируемого нейрона в том же слое, если стимуляция выполнялась в энторинальной коре, или же помещался на коллатерали Шаффера, если стимуляция осуществлялась в гиппокампе.

В экспериментах по регистрации вызванных постсинаптических токов (вызванных ПСТ) в энторинальной коре для оценки относительного вклада АМПА-, НМДА и ГАМКа рецепторов в вызванный ответ использовался математический подход, основанный на аппроксимации вольт-амперных характеристик синаптических токов, опосредованных НМДА-, АМПА- и ГАМКа-рецепторами. Для этого вызванные ПСТ были зарегистрированы при различных значениях потенциала фиксации в диапазоне от -97 мВ до +43 мВ. Все эксперименты по регистрации возбуждающих постсинаптических токов в синапсах СА3-СА1 гиппокампа выполнялись в присутствии одного из блокаторов ГАМКа рецепторов – бикикуллина (20 мкМ), пикротоксина (50 мкМ), габазина (10 мкМ), либо же их комбинации.

#### Ответы на парный стимул

Ответы пирамидных нейронов области СА1 на парный стимул регистрировались в условиях фиксации потенциала на уровне -80 мВ, интервал между парными стимулами составлял 50 мс, а парное отношение рассчитывалось как отношение амплитуды второго ответа к первому.

#### Миниатюрные возбуждающие постсинаптические токи

Регистрация миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (миниатюрных ВПСТ) в области СА1 гиппокампа проводилась в присутствии тетродотоксина – селективного блокатора потенциал-управляемых Na<sup>+</sup> каналов. Для поиска миниатюрных ВПСТ использовался встроенный алгоритм Clampfit, позволяющий отбирать события, соответствующие заранее заданному шаблону. Сохраненные алгоритмом события затем вручную

просматривались на предмет ошибочно отобранных шумов, чтобы исключить их из дальнейшего анализа. Для каждого нейрона были измерены амплитуда и частота миниатюрных ВПСТ.

#### АМПА/НМДА соотношение

В экспериментах по оценке АМПА/НМДА соотношения в синапсах CA3-CA1 гиппокампа АМПА-рецептор-опосредованные ВПСТ регистрировались при потенциале фиксации равном  $-80$  мВ – значении, при котором пора НМДА рецептора преимущественно заблокирована ионами  $Mg^{2+}$ . НМДА-рецептор-опосредованные ВПСТ в этой серии экспериментов регистрировались при потенциале фиксации равном  $+40$  мВ и в присутствии блокатора АМПА рецепторов DNQX ( $10$  мкМ). Соотношение АМПА- и НМДА-рецепторов на постсинаптической мембране оценивалось через отношение пиковых амплитуд АМПА- и НМДА-рецептор-опосредованных ответов.

#### Биофизические свойства нейронов

Для оценки влияния кратковременной эпилептиформной активности на пассивные свойства пирамидных нейронов CA1 были зарегистрированы ответы пирамидных нейронов области CA1 на подаваемые ступеньки тока (от  $-50$  до  $+25$  пА с шагом  $25$  пА). Для анализа частотно-токовых свойств на нейрон подавались деполяризующие ступеньки тока, приводящие к генерации потенциалов действия. После построения частотно-токовой кривой ( $f/I$ ) ее восходящая часть аппроксимировалась функцией Гомперца, после чего оценивались максимальный наклон кривой, ток в точке перегиба кривой и максимальная частота генерации потенциалов действия.

### **4. Статистическая обработка**

Статистический анализ и построение графиков выполнялись с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (SYSTAT Software; США). Проверка нормальности распределения данных производилась расчетом критерия Колмогорова-Смирнова либо критерия Шапиро-Уилка. Для сопоставления данных двух независимых выборок использовался t-критерий Стьюдента, в случае последовательных измерений – парный t-критерий Стьюдента. Оценка изменений синаптических проводимостей на трех временных интервалах осуществлялась при помощи ANOVA и апостериорного теста Даннета. Для сравнения кумулятивных распределений нормированных амплитуд миниатюрных ВПСТ использовался критерий Колмогорова-Смирнова. Данные приведены в виде  $M \pm SE$  (средняя арифметическая  $\pm$  стандартная ошибка средней). Достоверным уровнем отличий признавалась вероятность не менее  $95\%$  ( $p < 0,05$ ).



## Результаты и обсуждение

### 1.1. Эпилептиформная активность в энторинальной коре и гиппокампе

Для вызова эпилептиформной активности применялся проэпилептический раствор с повышенной внеклеточной концентрацией калия и пониженной внеклеточной концентрацией магния, содержащий 4-аминопиридин – блокатор калиевых каналов типа Kv1. Спустя 20 минут проэпилептический раствор заменялся контрольным (ACSF). Регистрируемая в области CA1 гиппокампа (Рис. 1) синхронизированная спонтанная активность отличалась по своим свойствам от спонтанной активности в энторинальной коре (Рис. 2). В энторинальной коре проэпилептический раствор приводил к возникновению множественных иктальных разрядов, стереотипных по своей форме, которые перемежались интериктальными разрядами. В режиме фиксации тока хорошо виден деполяризационный сдвиг в ходе отдельно взятого иктального разряда (Рис. 3). В области CA1 гиппокампа после подачи проэпилептического раствора регистрировалась частая регулярная интериктальная активность, отличная по своим свойствам от активности в энторинальной коре, в то время как иктальных разрядов не наблюдалось (Рис. 4).

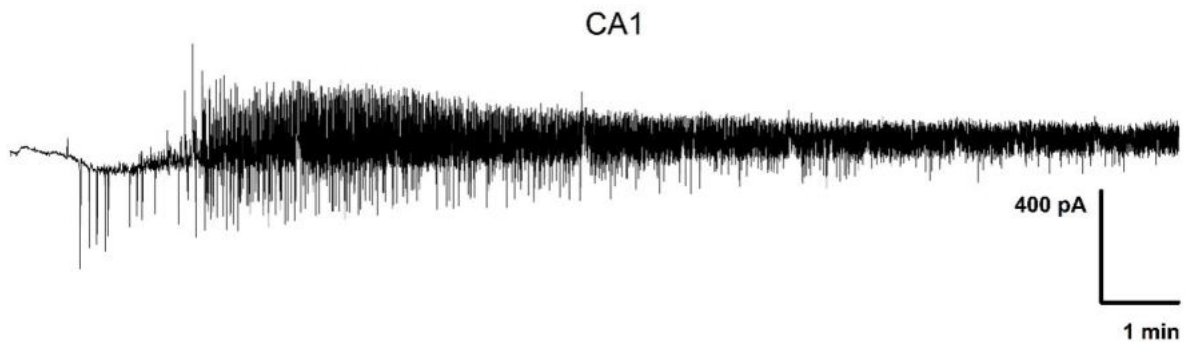


Рис. 1. Эпилептиформная активность в области CA1 гиппокампа непосредственно после подачи эпилептогенного раствора. Синаптическая активность регистрировалась при потенциале фиксации, равном -27 мВ.

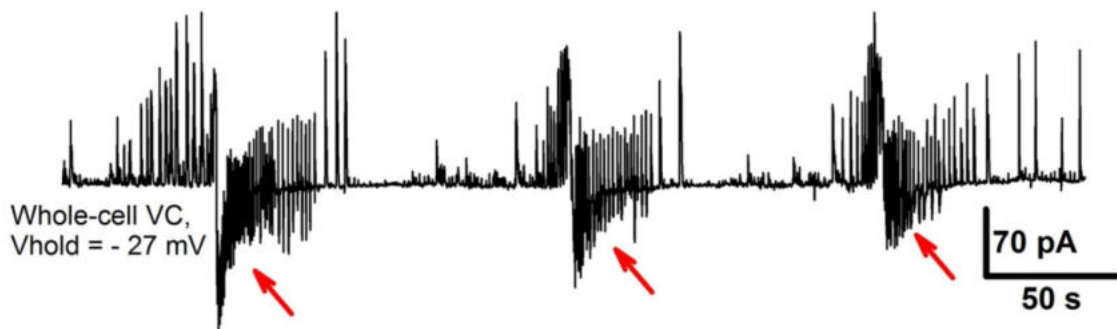


Рис. 2. Эпилептиформная активность в энторинальной коре. Синаптическая активность регистрировалась при потенциале фиксации, равном -27 мВ. Красные стрелки указывают на иктальные разряды

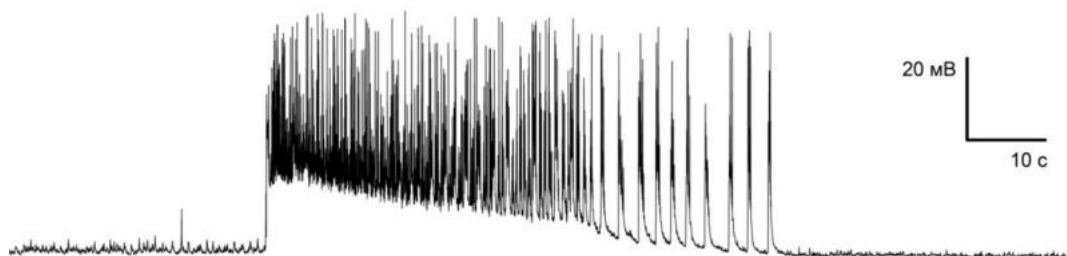


Рис. 3. Эпилептиформная активность в энторинальной коре. Синаптическая активность регистрировалась в режиме фиксации тока. Видны потенциалы действия и деполяризационный сдвиг, возникающие в ходе иктального разряда.

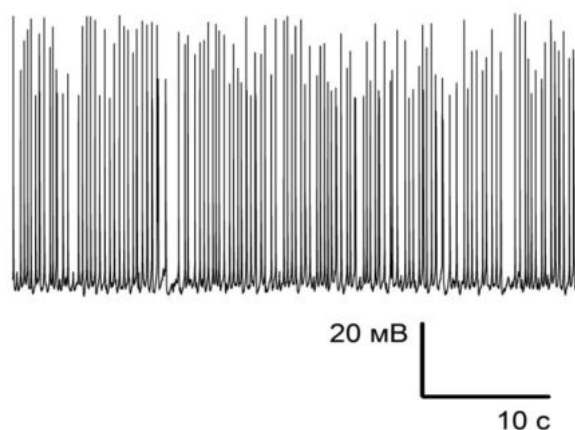


Рис. 4. Эпилептиформная активность в области CA1 гиппокампа. Синаптическая активность, зарегистрированная в режиме фиксации тока, представляет собой регулярные интериктальные разряды.

Таким образом, в обеих структурах присутствовала интериктальная активность, но в области CA1 гиппокампа не наблюдалось иктальных разрядов.

## 1.2. Типы эпилептиформных разрядов в энторинальной коре

Для того чтобы охарактеризовать наблюдаемую эпилептиформную активность, была выполнена одновременная регистрация двух пирамидных нейронов глубоких слоев энторинальной коры методом пЭТЧ-кламп в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока и/или напряжения. Чтобы различить между собой тормозные и возбуждающие синаптические события, при регистрации в режиме фиксации напряжения было выбрано

значение командного потенциала, равное  $-27$  мВ (находящиеся между значениями потенциалов реверсии для глутамат- и ГАМК-опосредованных ионных токов).

После начала перфузии эпилептогенным раствором наблюдалось увеличение мембранного потенциала в пирамидных нейронах от  $-69 \pm 3$  мВ до  $-51 \pm 3$  мВ. В этих нейронах наблюдались спонтанные деполяризующие потенциалы, частота которых начинала увеличиваться спустя несколько минут. Эти спонтанные деполяризующие потенциалы иногда приводили к возникновению одиночных потенциалов действия. Первые синхронизированные синаптические события наблюдались через 4-6 мин с момента перфузии. I тип синхронизированной синаптической активности (I Тип) присутствовал во всех срезах (Рис. 5). В ходе него наблюдались исключительно залпы тормозных токов – эпилептиформные разряды I типа, продолжительность каждого из которых составляла приблизительно 1 с.

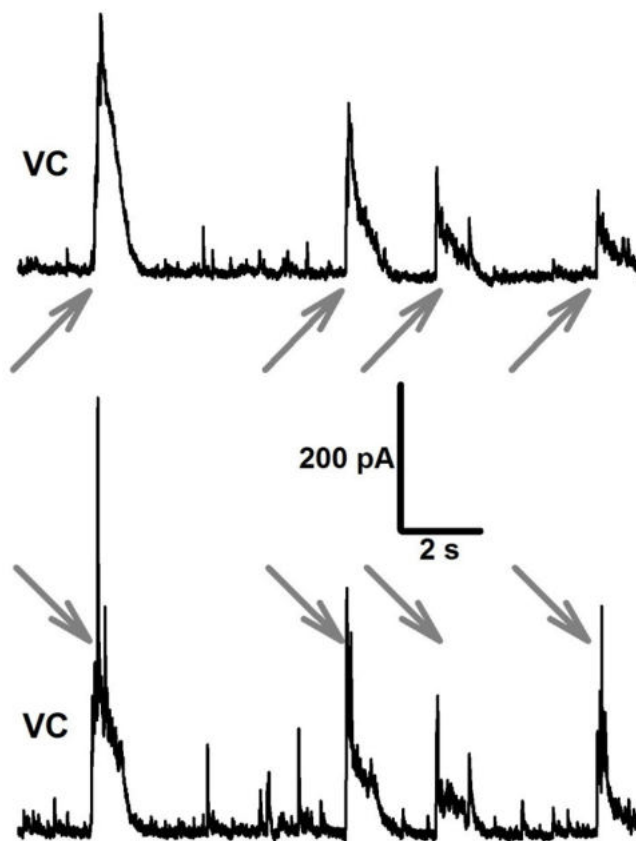


Рис. 5. Эпилептиформные разряды I типа (ЭР1), наблюдаемые в ходе эпилептиформной активности. Одновременная регистрация активности двух соседних пирамидных нейронов энторинальной коры осуществлялась методом пэтч кламп в режиме фиксации напряжения. Потенциал фиксации ( $V_{\text{hold}}$ ) =  $-27$  мВ. Стрелки указывают на ЭР1. Наблюдается высокая корреляция между ЭР1 двух случайно выбранных соседних пирамидных клеток.

Спустя некоторое время после начала эпилептиформной активности появлялись эпилептиформные разряды 2 типа, имеющие сложную кинетику (Рис. 6). Длительность таких токов составляла приблизительно 1 с, а среди их компонент можно выделить 1-2 быстрых ТПСТ и сменяющих их 3-5

перекрывающихся возбуждающих постсинаптических тока (ВПСТ). Эпилептиформные разряды 2 типа генерировались с низкой частотой ( $0.24 \pm 0.02$  Hz,  $n = 22$ ) и характеризовались низкой вариабельностью формы. Такой тип активности можно было наблюдать в течение нескольких часов. Одновременная регистрация в режиме фиксации тока и в режиме фиксации потенциала показала, что каждому ЭР2 соответствовал залп потенциалов действия в пирамидных клетках.

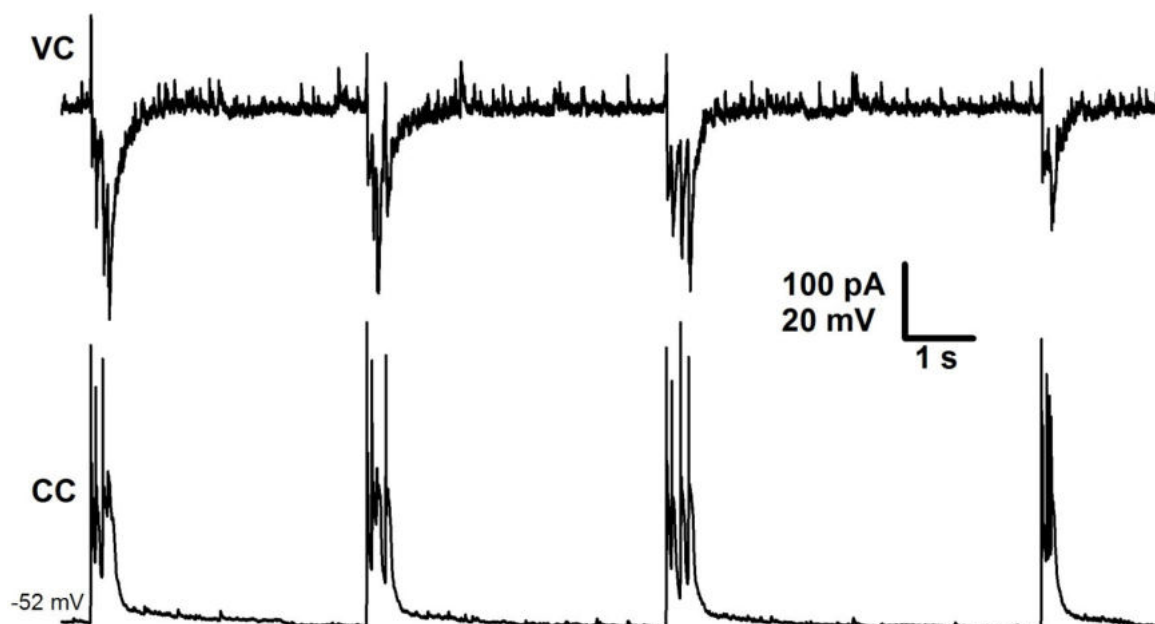


Рис. 6. Эпилептиформные разряды II типа (ЭР2). Одновременная регистрация синаптической активности двух соседних клеток: в режиме фиксации напряжения (сверху,  $V_{\text{hold}} = -27$  мВ) и в режиме фиксации тока (снизу).

## 2. Глутаматергическая передача в энторинальной коре. 2.1 Увеличение АМПА-рецептор-опосредованных ответов.

Чтобы оценить эффект эпилептиформной активности на вызванные ответы пирамидных нейронов, в энторинальной коре были зарегистрированы вызванные постсинаптические токи (вызванные ПСТ) в ACSF (контрольные условия) и спустя 10-15 минут после начала эпилептиформной активности (Рис. 7). Было обнаружено, что амплитуда моносинаптического пика и площадь под графиком АМПА-рецептор-опосредованной проводимости, изменились после индукции эпилептиформной активности (средние значения пиковой проводимости и площади под графиком увеличились на 130% и 427%, т.е. соответственно).

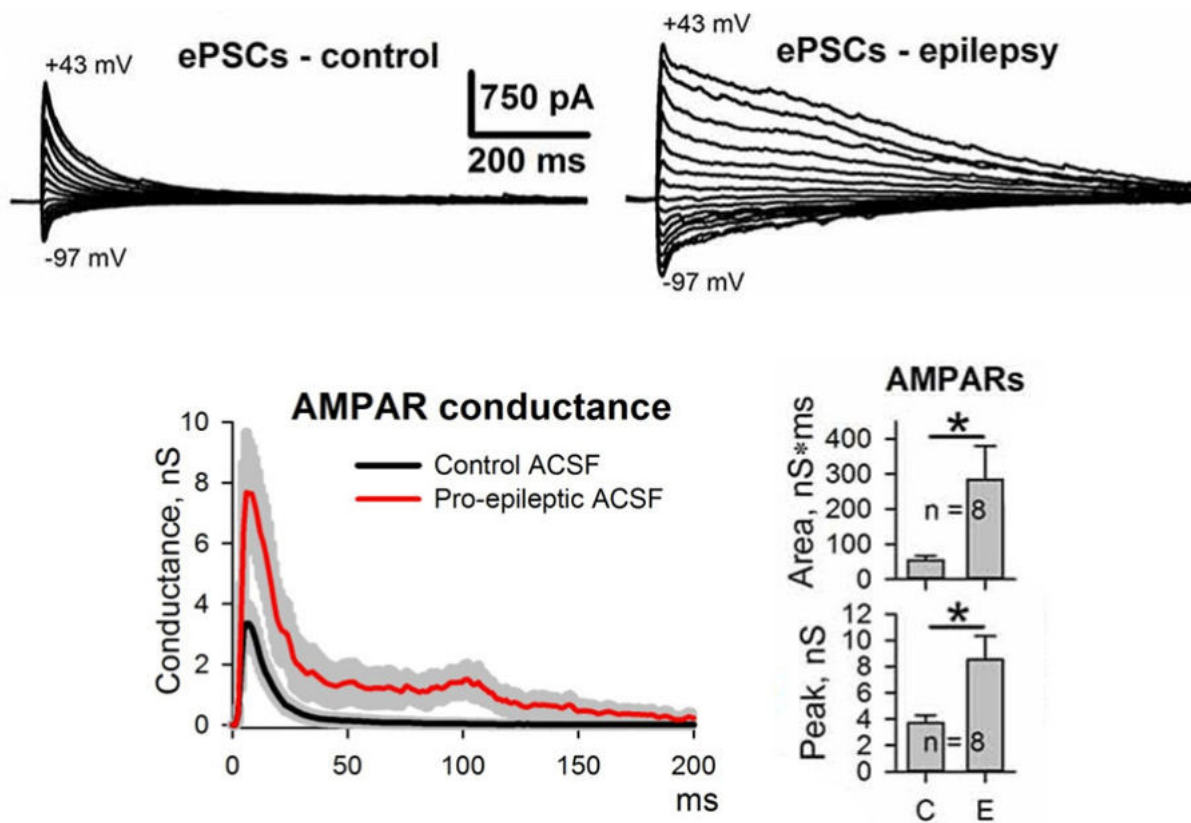


Рисунок 7. Изменения свойств вызванных постсинаптических токов (вызванных ПСТ) во время эпилептиформной активности в энторинальной коре. Сверху - репрезентативный пример двух наборов вызванных ПСТ, записанных от одного и того же нейрона при разных значениях потенциала фиксации в контрольных условиях (слева) и во время эпилептиформной активности (справа). Снизу - оценка АМПА-рецептор-опосредованных компонентов ответа на внеклеточный стимул в контрольных условиях (черные линии) и во время эпилептиформной активности (красные линии). Эпилептиформная активность привела к значительному увеличению площади под кривой и пика АМПА-рецептор-опосредованной проводимости (парный t-критерий Стьюдента,  $P = 0,04$  и  $0,019$  для пика и площади, соответственно).

## 2.2 Потенциация АМПА-рецептор-опосредованных ответов после прекращения эпилептиформной активности.

В следующей серии экспериментов было проверено, как изменяется наблюдаемая в энторинальной коре потенциация АМПА-рецептор-опосредованных компонентов ответа на внеклеточный стимул с течением времени. Для этого вызванные ответы регистрировались в ACSF (контрольный раствор), затем срезы перфузировали эпилептогенным раствором, после чего начинали отмывать в ACSF. Во всех срезах эпилептиформная активность исчезала менее чем через 5 мин после отмывки. Вызванные ответы регистрировались три раза после отмывки: 5 мин (W1), 17 мин (W2) и 30 мин (W3; Рис. 8). После отмывки все три постсинаптические проводимости постепенно возвращались к контрольным значениям. Пик

АМПА-рецептор-опосредованного компонента ответа оставался увеличенным через 5 и 17 мин после прекращения эпилептиформной активности по сравнению с контролем (средние значения по сравнению с контролем были увеличены на 107% и 68% для W1 и W2 соответственно; повторные измерения ANOVA,  $P = 0,002$ , с последующим апостериорным тестом Даннета).

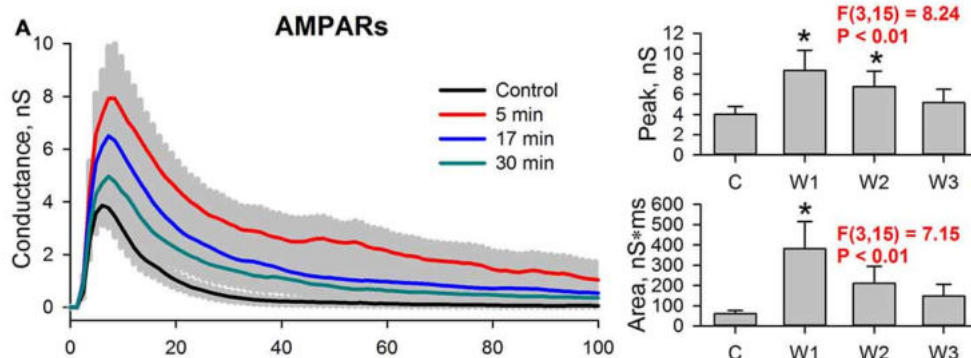


Рисунок 8. Потенциация АМПА-рецептор-опосредованной компоненты вызванного ответа сохранялась после прекращения эпилептиформной активности. Слева – АМПА-рецептор-опосредованная компонента постсинаптического ответа в контрольных условиях и после прекращения эпилептиформной активности. Оценка проводилась через три временных интервала: 5, 17 и 30 мин после прекращения эпилептиформной активности. «С», «W1», «W2» и «W3» обозначают контрольные оценки и оценки через 5, 17 и 30 минут, соответственно. Справа – площадь под кривой и пиковые значения АМПА-рецептор-опосредованной проводимости. Звездочки указывают на существенное отличие от контрольного уровня (апостериорный тест Даннета).

### 3. Глутаматергическая передача между синапсами CA3-CA1 гиппокампа.

#### 3.1. Парное отношение амплитуд

Сначала было проверено, не происходит ли выраженных изменений свойств глутаматергической передачи спустя всего 15 минут после прекращения кратковременной эпилептиформной активности. В условиях фиксации потенциала на уровне  $-80$  мВ в присутствии блокаторов ГАМК<sub>A</sub> рецепторов были получены ответы пирамидных нейронов области CA1 на парный стимул (Рис. 9). Биполярный стимулирующий электрод помещался на коллатерали Шаффера, интервал между парными стимулами составлял 50 мс. Парное отношение рассчитывалось как отношение амплитуды второго ответа к первому. При оценке парного отношения не выявлено различий между контрольными ответами и ответами, зарегистрированными спустя 15 минут после прекращения кратковременной эпилептиформной активности (контроль =  $1,17 \pm 0,26$ ;  $n = 5$ ; после эпилептиформной активности =  $1,14 \pm 0,26$ ;  $n = 5$ ;  $t$ -тест для зависимых выборок =  $0,452$ ,  $p = 0,675$ ). Полученные данные

свидетельствуют о том, что вероятность выброса медиатора в синапсах CA3-CA1 гиппокампа не изменилась через 15 минут после периода кратковременной эпилептиформной активности.

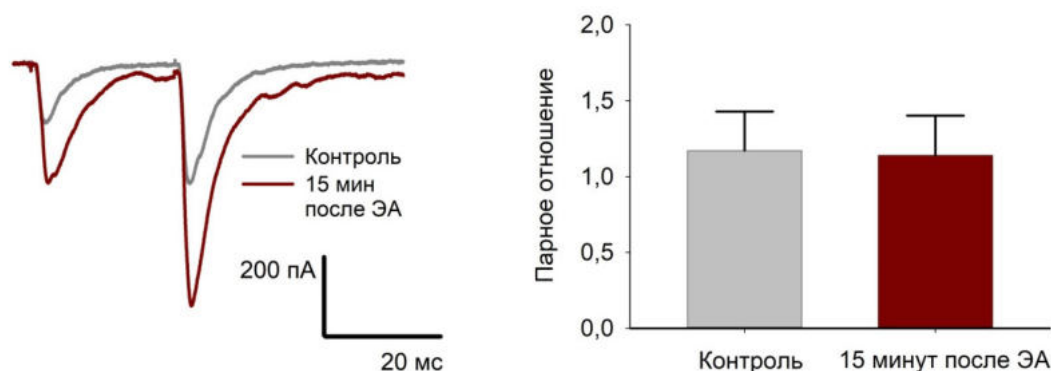


Рис. 9. Ответы пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа на парную стимуляцию спустя 15 минут после прекращения кратковременной вызванной эпилептиформной активности

В дальнейшем мы сосредоточились на изучении пресинаптических и постсинаптических изменений глутаматергической передачи в синапсах CA3-CA1 гиппокампа спустя 1 час после прекращения кратковременной эпилептиформной активности – время, достаточное для запуска внутриклеточных сигнальных каскадов и формирования синаптической пластичности. Методом, описанным выше, были получены ответы пирамидных нейронов области CA1 на парный стимул (Рис. 10). При оценке парного отношения не выявлено различий между контрольными ответами и ответами, зарегистрированными спустя 1 час после прекращения кратковременной эпилептиформной активности (CTRL =  $1.72 \pm 0.09$ ; n = 11; 4-AP =  $1.73 \pm 0.11$ ; n = 9). Полученные данные свидетельствуют о том, что вероятность выброса медиатора в синапсах CA3-CA1 гиппокампа сохранялась на уровне контрольных значений.

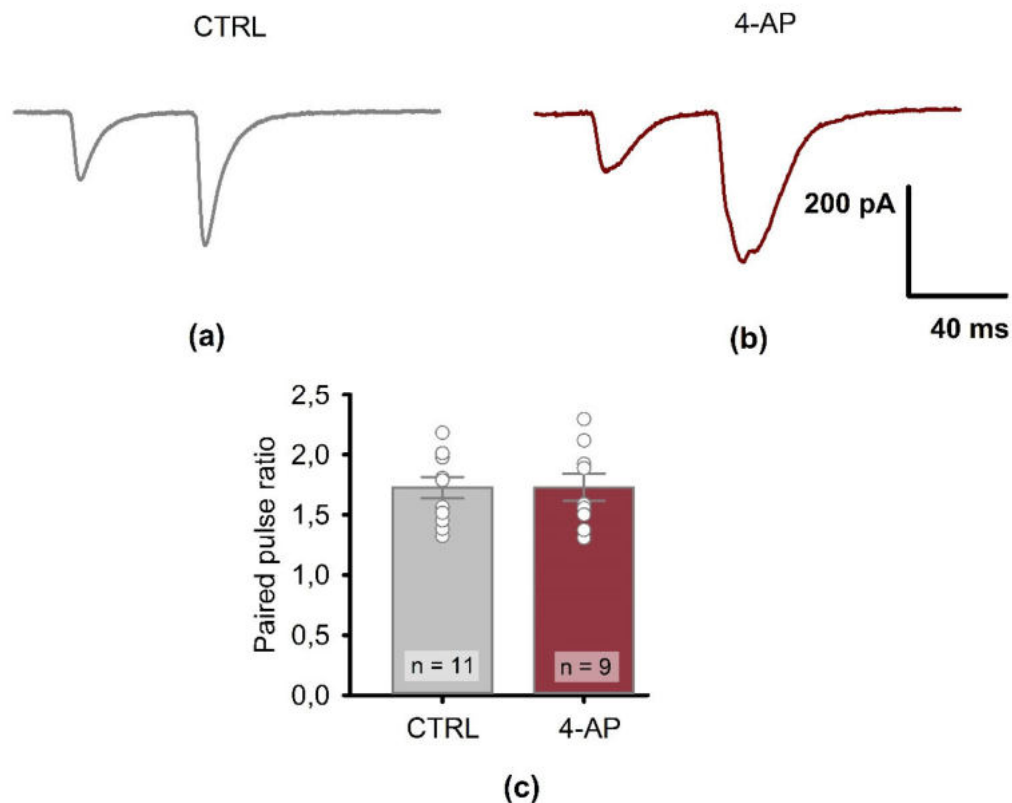


Рис. 10. Ответы пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа на парную стимуляцию спустя 1 час после прекращения кратковременной вызванной эпилептиформной активности.

(a), (b) – Примеры ответов в контроле и спустя 1 час после прекращения кратковременной вызванной эпилептиформной активности, соответственно.  $V_{\text{hold}} = -80$  мВ. (c) – Парное соотношение.

### 3.2 Миниатюрные ВПСТ после периода эпилептиформной активности

Регистрация миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (миниатюрных ВПСТ) в области CA1 гиппокампа проводилась в присутствии тетродотоксина, необходимого для предотвращения генерации потенциалов действия, а также в присутствии блокаторов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов (Рис. 11 а). Ни частота (CTRL =  $0.21 \pm 0.05$  Гц; n = 7; 4-AP =  $0.18 \pm 0.03$  Гц; n = 7), ни амплитуда (CTRL =  $20.29 \pm 0.97$  пА; n = 7; 4-AP =  $22.57 \pm 1.69$  пА; n = 7) миниатюрных ВПСТ, зарегистрированных после кратковременного периода вызванной эпилептиформной активности, значимо не отличались от контрольных значений (Рис. 11 с, d). Оценка изменений частоты миниатюрных ВПСТ служит дополнительным критерием оценки пресинаптических изменений и подтверждает отсутствие изменений вероятности высвобождения медиатора. В то же время отсутствие изменений амплитуды миниатюрных ВПСТ свидетельствует о том, что число ионотропных глутаматных рецепторов на постсинаптической мембране осталось неизменным.



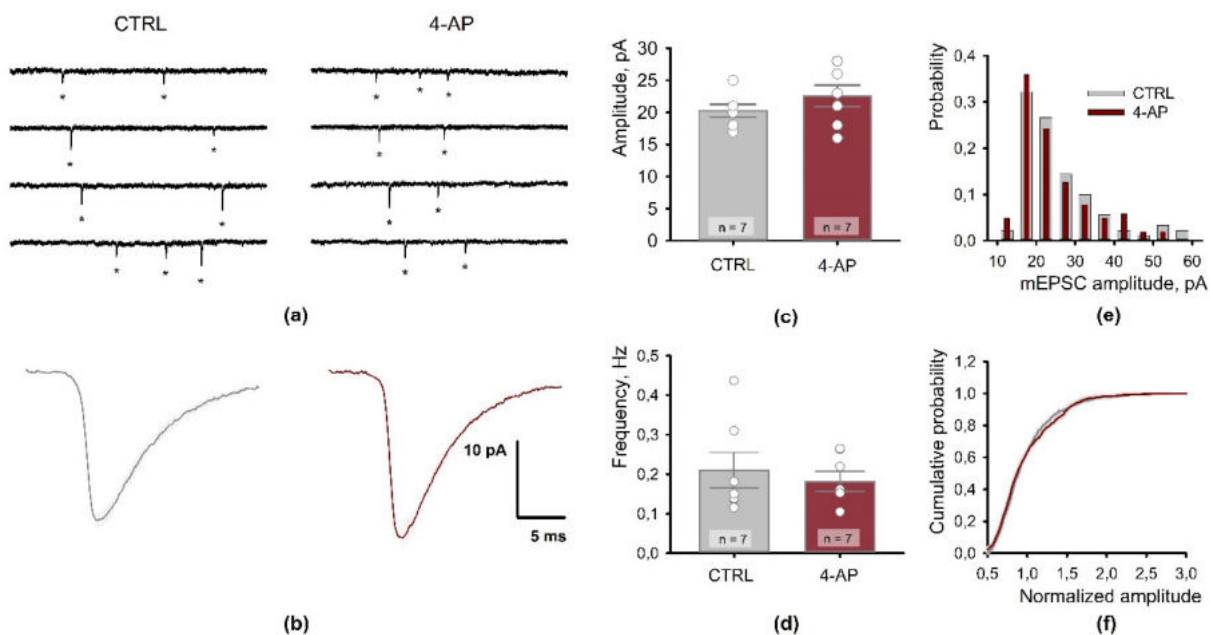


Рис. 11. Свойства миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (миниатюрных ВПСТ) через 1 час после периода кратковременной эпилептиформной активности, вызванной 4-амилопиридин-содержащим раствором (4-АР).

(а) – Пример миниатюрных ВПСТ, зарегистрированных в области СА1 гиппокампа крысы в контроле (слева) и спустя 1 час после эпилептиформной активности (справа).  $V_{\text{hold}} = -80$  мВ. (б) – Усредненные миниатюрные ВПСТ в контроле и через 1 час после эпилептиформной активности. (с) – Амплитуда миниатюрных ВПСТ. (д) – Частота миниатюрных ВПСТ. (е) – Репрезентативные примеры распределения амплитуд миниатюрных ВПСТ в двух пирамидных нейронах СА1 из контрольной группы и группы 4-АР. (ф) – Средние кумулятивные распределения нормированных амплитуд миниатюрных ВПСТ.

### 3.3 АМПА/НМДА соотношение после периода эпилептиформной активности

В ответ на период эпилептиформной активности могло измениться число АМПА-рецепторов на постсинаптической мембране или же могли измениться их свойства. Чтобы проверить это, нами были зарегистрированы АМПА-рецептор-опосредованные и НМДА-рецептор-опосредованные ВПСТ (Рис. 12). Соотношение АМПА- и НМДА-рецепторов на постсинаптической мембране оценивалось через соотношение пиковых амплитуд АМПА- и НМДА-рецептор-опосредованных ответов. Было обнаружено, что короткий период эпилептиформной активности приводит к увеличению АМПА /НМДА соотношения. (CTRL =  $2,61 \pm 0,20$ ;  $n = 10$ ; 4-АР =  $3,91 \pm 0,34$ ;  $n = 9$ ; t-тест для независимых выборок =  $-3,39$ ,  $p = 0,003$ ).

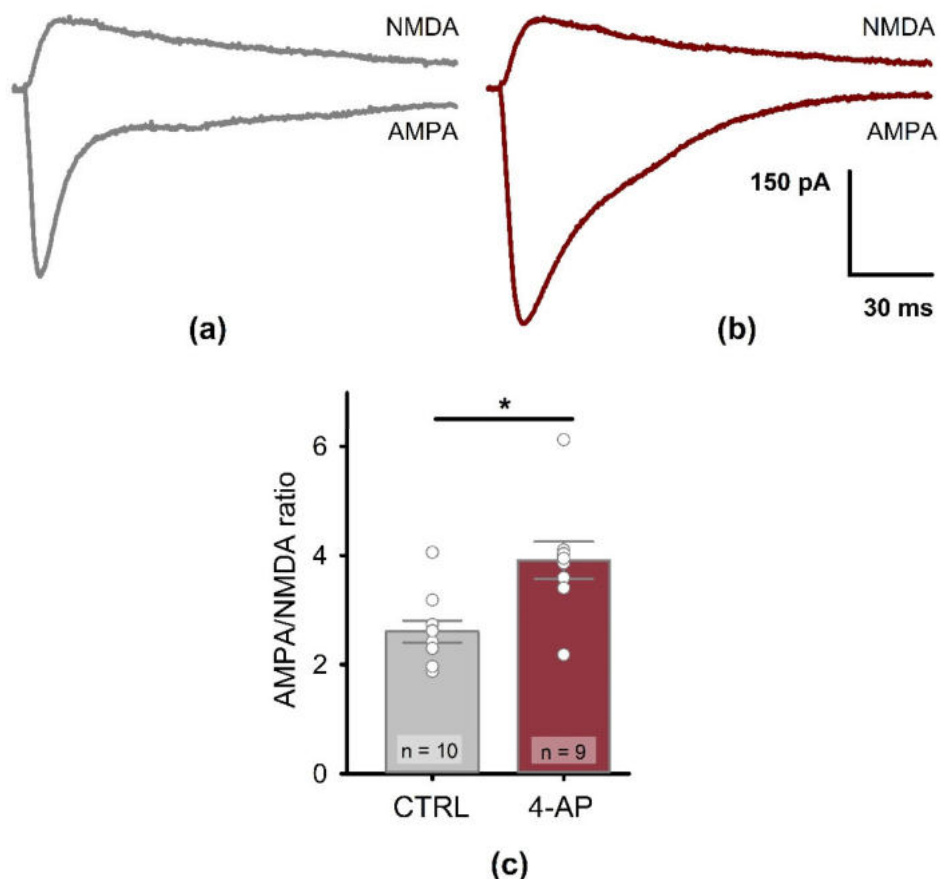


Рис. 12. Соотношение АМПА и НМДА рецепторов на постсинаптической мембране нейронов области СА1 гиппокампа крысы увеличено спустя 1 час после прекращения кратковременной вызванной эпилептиформной активности.

(a), (b) – Примеры ответов в контроле и спустя 1 час после прекращения кратковременной вызванной эпилептиформной активности, соответственно. «NMDA» - НМДА-рецептор-опосредованные ВПСТ при потенциале фиксации, равном +40 мВ, в присутствии DNQX (10  $\mu$ M). «АМПА» - АМПА-рецептор-опосредованные ВПСТ при потенциале фиксации, равном -80 мВ. (c) – АМПА /НМДА соотношение.

### 3.4 Биофизические свойства пирамидных нейронов СА1 после периода эпилептиформной активности

4-аминопиридин, как известно, влияет на биофизические характеристики потенциалов действия, увеличивая полуширину спайка. Также есть данные о вызванном 4-аминопиридином увеличении входного сопротивления парвальбуминовых нейронов и снижении порога генерации потенциалов действия (Codadu et al., 2019). В этой связи представлялось разумным проверить, как сказывается 20-и минутный период перфузии переживающих срезов 4-аминопиридином на биофизических свойствах пирамидных нейронов области СА1 гиппокампа.

Для оценки влияния кратковременной эпилептиформной активности на пассивные свойства пирамидных нейронов СА1 были зарегистрированы ответы пирамидных нейронов области СА1 на подаваемые ступеньки тока (от

-50 до +25 пА с шагом 25 пА). Были проанализированы такие показатели, как входное сопротивление, потенциал покоя и временная константа мембраны (Рис. 13). В присутствии блокатора ГАМК<sub>A</sub> рецепторов бичукуллина не было обнаружено значительных изменений любого из трех рассматриваемых параметров (Рис. 13 с). Таким образом, период эпилептиформной активности практически не повлиял на подпороговые свойства нейронов.

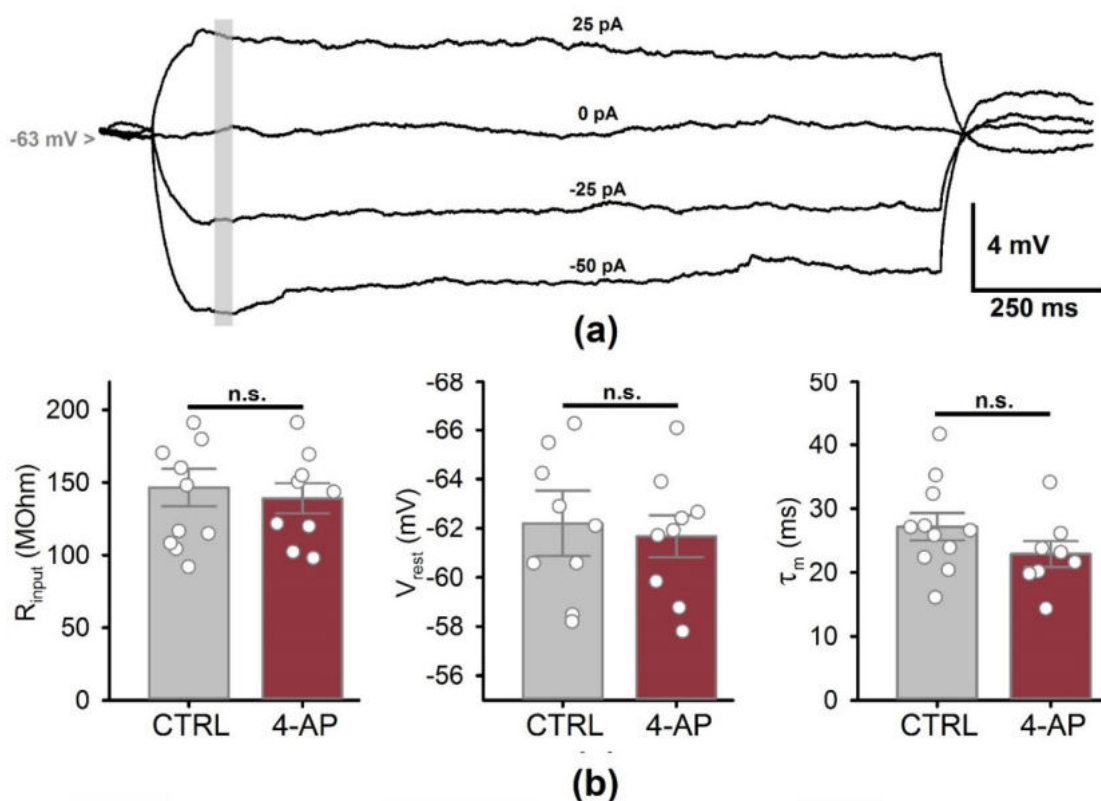


Рис. 13. Подпороговые мембранные свойства пирамидных нейронов после периода эпилептиформной активности *in vitro*.

(а) – Репрезентативная совокупность подпороговых ответов пирамидных нейронов области CA1 на подаваемые ступеньки тока от -50 до +25 мВ. Серым цветом выделен временной интервал, который использовался для получения усредненных значений мембранного потенциала для оценки входного сопротивления. Регистрация выполнялась в присутствии блокатора ГАМК<sub>A</sub> рецепторов бичукуллина. (б) – Мембранные свойства пирамидных нейронов. Значимых различий не обнаружено.

Мы также проверили, не влияет ли краткий период эпилептиформной активности на то, как нейроны гиппокампа преобразуют постоянный деполяризующий ток в потенциалы действия (Рис. 14). Восходящая часть полученной частотно-токовой кривой ( $f/I$ ) была аппроксимирована функцией Гомперца, после чего были проанализированы такие параметры, как максимальный наклон кривой, ток в точке перегиба кривой, максимальная частота генерации потенциалов действия. Значимых различий не было обнаружено (Рис. 14 с).

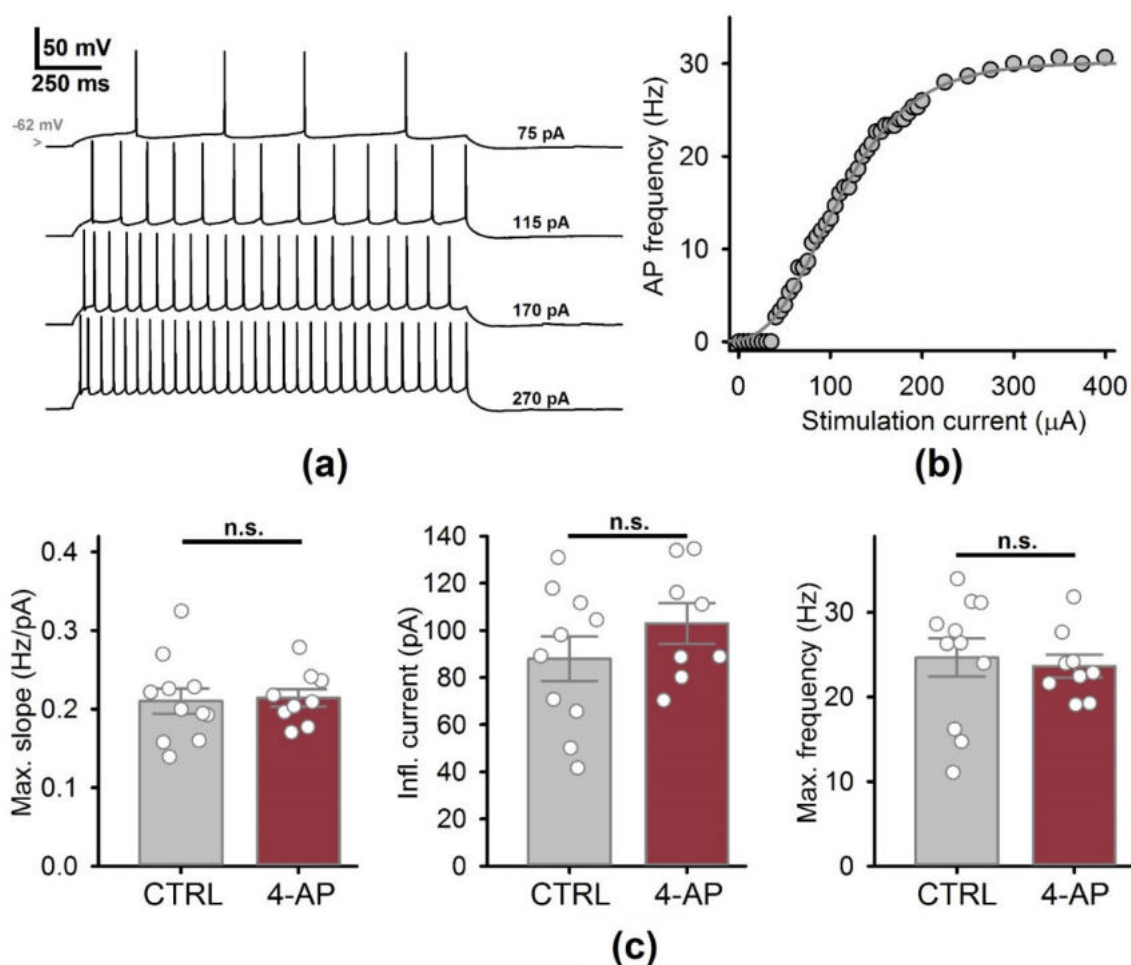


Рис. 14. Свойства частотно-токовой характеристики после периода эпилептиформной активности *in vitro*.

(a) – Репрезентативный пример изменений потенциала нейрона в ответ на подаваемые деполяризующие ступеньки тока, которые затем использовались для построения частотно-токовой характеристики. (b) – Пример частотно-токовой характеристики, аппроксимированной при помощи функции Гомперца. (c) – Параметры частотно-токовой характеристики. Значимых различий не обнаружено.

Таким образом, период эпилептиформной активности не привел к каким-либо изменениям возбудимости нейронов CA1 гиппокампа.

## Выводы

1. Эпилептиформная активность *in vitro* в энторинальной коре и гиппокампе протекает неодинаково.
2. В энторинальной коре было выявлено два типа эпилептиформных разрядов, опосредованных либо сугубо активностью ГАМКа-

- рецепторов, либо же активностью ГАМКа-, АМПА- и НМДА-рецепторов.
3. В энторинальной коре эпилептиформная активность *in vitro* приводит к двукратному увеличению АМПА-рецептор-опосредованного компонента вызванных ответов пирамидных нейронов, которое сохраняется в течение 30 минут после прекращения эпилептиформной активности.
  4. В области Са1 гиппокампа спустя 1 час после прекращения эпилептиформной активности *in vitro* наблюдается увеличение АМПА/НМДА соотношения
  5. Эпилептиформная активность *in vitro* не оказывает влияния на вероятность высвобождения медиатора и биофизические свойства пирамидных нейронов области СА1 гиппокампа.

### Список публикаций по теме диссертации

#### Статьи

1. Amakhin D.V., Ergina J.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. Synaptic conductances during interictal discharges in pyramidal neurons of rat entorhinal cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 2016. 109(10).
2. Amakhin D.V., Soboleva E.B., Ergina J.L., Malkin S.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. Seizure-induced potentiation of AMPA-receptor-mediated synaptic transmission in the entorhinal cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 2018. 12. 486.
3. Ергина Ю.Л., Смирнова Е.Ю. *In vitro* модели эпилептиформной активности. *Рос. Физиол. Журн.* 2019. 105(8). С. 954-965.
4. Ергина Ю.Л., Коваленко А.А., Зайцев А.В. Роль NMDA-рецепторов в эпилептогенезе. *Рос. Физиол. Журн.* 2020.

#### Тезисы

1. Ергина Ю.Л., Амахин Д.В. Возбуждающие и тормозные синаптические проводимости в пирамидных нейронах энторинальной коры в ходе острого судорожного состояния *in vitro*// Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии. 2017.
2. Ергина Ю.Л., Амахин Д.В. Синхронизованная синаптическая активность в пирамидных нейронах энторинальной коры в ходе острых судорожных состояний *in vitro*// Фунд. наука и клин. мед. 2017.
3. Соболева Е.Б., Ергина Ю.Л., Амахин Д.В. Изменения *in vitro* АМПА-рецептор-опосредованных постсинаптических токов пирамидных нейронов энторинальной коры головного мозга крысы в ходе острого эпилептоподобного состояния// Фунд. наука и клин. мед. 2018. Т. XXI. С. 405-406
4. Ергина Ю.Л., Амахин Д.В. Усиление АМПА-рецептор-опосредованной синаптической передачи в энторинальной коре в ходе острого

- судорожного состояния *in vitro*// Актуальные проблемы биомедицины. 2018. С. 94-95
5. Ergina J.L., Amakhin D.V., Soboleva E.B., Chizhov A.V., Malkin S.L., Zaitsev A.V. The properties of AMPAR-mediated excitatory responses in the rat entorhinal cortex after induced epileptiform activity *in vitro*// The 11th FENS Forum of Neuroscience. 2018.
  6. Амахин Д.В., Соболева Е.Б., Ергина Ю.Л., Постникова Т.Ю., Чижов А.В., Зайцев А.В. Изменения свойств глутамат- и гамк-опосредованной синаптической передачи в ходе эпилептоподобного состояния *in vitro*/ 2019. VI Съезд биофизиков России. Т.1. С. 284.
  7. Амахин Д.В., Соболева Е.Б., Ергина Ю.Л., Чижов А.В., Зайцев А.В. Особенности синаптической передачи в энторинальной коре головного мозга в ходе эпилептоподобной активности в моделях *in vitro*/ 2019. Физика – наукам о жизни. С. 80.
  8. Амахин Д.В., Соболева Е.Б., Ергина Ю.Л. Синаптические и ионные механизмы генерации эпилептоподобной активности в энторинальной коре.//Актуальные проблемы биомедицины. 2020. С. 218-219.
  9. Ергина Ю.Л., Зайцев А.В. Воздействие кратковременной эпилептиформной активности на глутаматергическую передачу между синапсами СА3-СА1 гиппокампа.// Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели и IX Школа по эволюционной физиологии. Ж. Эвол. Биохим. и Физиол. 2020. Т. 56(7): С. 582.
  10. Ергина Ю.Л., Вылекжанина Е.Н. Влияние короткого периода эпилептиформной активности на свойства глутаматергической передачи между синапсами СА3-СА1 гиппокампа// Актуальные проблемы биомедицины. 2021. С. 55–56.

#### **Список цитируемой литературы**

1. Arzimanoglou, A. et al. (2002) Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review. *Epileptic disorders: international epilepsy journal with videotape*. France, 4(3), pp. 173–182.
2. Avoli, M. et al. (2002) Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system *in vitro*, *Progress in Neurobiology*, 68(3), pp. 167–201.
3. Barbarosie, M. and Avoli, M. (1997) CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains *in vitro* limbic seizures., *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. United States, 17(23), pp. 9308–9314.
4. Bartolomei, F. et al. (2005) Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study., *Epilepsia*. United States, 46(5), pp. 677–687.
5. Borbély, S. et al. (2006) Laminar analysis of initiation and spread of epileptiform discharges in three *in vitro* models, *Brain Research Bulletin*, 69(2), pp. 161–167.

6. Cavus, I. et al. (2005) Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients., *Annals of neurology*. United States, 57(2), pp. 226–235.
7. Codadu, N. K., Parrish, R. R. and Trevelyan, A. J. (2019) Region-specific differences and areal interactions underlying transitions in epileptiform activity, *Journal of Physiology*, 597(7), pp. 2079–2096.
8. de Curtis, M. and Pare, D. (2004) The rhinal cortices: a wall of inhibition between the neocortex and the hippocampus., *Progress in neurobiology*. England, 74(2), pp. 101–110.
9. Doring, M. J. and Spencer, D. D. (1993) Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain., *Lancet (London, England)*. England, 341(8861), pp. 1607–1610.
10. Gonzalez-Sulser, A. et al. (2012) Hippocampal neuron firing and local field potentials in the in vitro 4-aminopyridine epilepsy model, *Journal of Neurophysiology*, 108(9), pp. 2568–2580.
11. Herman, S. T. (2002) Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis., *Neurology*. United States, 59(9 Suppl 5), pp. S21-6.
12. Kajiwara, R., Tominaga, Y. and Tominaga, T. (2019) Network Plasticity Involved in the Spread of Neural Activity Within the Rhinal Cortices as Revealed by Voltage-Sensitive Dye Imaging in Mouse Brain Slices, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(February), pp. 1–12.
13. Scharfman, H. E. (2000) Epileptogenesis in the Parahippocampal Region. Parallels with the Dentate Gyrus, *New York*, 911(1), pp. 72–74.
14. Schwarcz, R., Eid, T. and Du, F. (2000) Neurons in layer III of the entorhinal cortex. A role in epileptogenesis and epilepsy?, *Annals of the New York Academy of Sciences*. United States, 911, pp. 328–342.
15. Shi, Y.-J. et al. (2014) Effect of the entorhinal cortex on ictal discharges in low-Mg<sup>2+</sup>-induced epileptic hippocampal slice models., *Neural plasticity*. United States, 2014, p. 205912.
16. Yang, L. and Benardo, L. S. (2002) Laminar properties of 4-aminopyridine-induced synchronous network activities in rat neocortex, *Neuroscience*, 111(2), pp. 303–313.