

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук

На правах рукописи

Ергина Юлия Леонидовна

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ
СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В ГИППОКАМПЕ И ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЕ
КРЫСЫ В МОДЕЛИ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

Специальность 1.5.5. – Физиология человека и животных

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2023

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Зайцев Алексей Васильевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Ольга Леонардовна Власова, доктор физико-математических наук, доцент, директор Высшей школы биомедицинских систем и технологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Вольнова Анна Борисовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник кафедры общей физиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Ведущая организация:

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», г. Москва

Защита состоится «28» ноября 2023 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.152.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44, тел. (812)552-79-01, электронная почта office@iephb.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44) и на сайте ИЭФБ РАН <https://www.iephb.ru/nauka/dissertacziornyj-sovet/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Р.Г. Парнова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Височная эпилепсия – широко распространенная форма фокальной эпилепсии человека. Среди прочих форм фокальных эпилепсий она наиболее часто является фармакорезистентной (Wieser, 2004), поэтому вопрос разработки новых методов терапии стоит особенно остро. Для успешного ответа на этот вопрос требуется расширить существующие на сегодняшний день представления о механизмах, лежащих в основе височной эпилепсии.

Известно, что анатомические особенности височной доли могут способствовать развитию эпилептической активности в этом регионе мозга: замкнутая энторинально-гиппокампальная петля синаптических связей играет ключевую роль в генерации и поддержании аномальной синхронизированной активности (Behr, Lyson and Mody, 1998; Calcagnotto, Barbarosie and Avoli, 2000; Boido *et al.*, 2014). В нескольких независимых исследованиях было продемонстрировано, что нейроны глубоких слоев энторинальной коры могут выступать в качестве источника эпилептической активности (Bear and Lothman, 1993a; Michaela Barbarosie and Avoli, 1997; Bartolomei *et al.*, 2005). Возникнув в энторинальной коре, эпилептическая активность способна последовательно распространяться в зубчатую извилину, область СА3 и область СА1 гиппокампа; затем по эфферентам нейронов СА1 возбуждение может возвращаться в энторинальную кору (Lu *et al.*, 2016). Также эпилептическая активность может поступать из энторинальной коры в область СА1 напрямую по височно-гиппокампальному пути (Barbarosie *et al.*, 2000). Стоит также отметить, что, как в физиологических, так и в патофизиологических условиях, в гиппокампе наблюдается собственная синхронизированная активность: тета-ритмы, гамма-ритмы, а также высокочастотные осцилляции в диапазоне 80–200 Гц (Engel *et al.*, 2009). В ряде исследований сообщалось, что собственная активность гиппокампа может препятствовать распространению эпилептической активности (M Barbarosie and Avoli, 1997; Caron, Canal-Alonso and Panuccio, 2022).

После прохождения эпилептической активности нейронные сети энторинальной коры и гиппокампа претерпевают существенные перестройки и способны эпилептизироваться, то есть становиться источником эпилептической активности в дальнейшем. Неоднократно отмечалось, что в процессе эпилептогенеза происходит нарушение баланса возбуждения и торможения, в частности, может возрастать вклад процессов возбуждения (Ziburkus, Cressman and Schiff, 2013). Однако, в настоящее время остается неясным, к каким именно изменениям на нейронном и синаптическом уровнях приводит эпилептическая активность в данных структурах, нет и четкого представления о сроках происходящих здесь изменений. Исследовать нейрональные и синаптические последствия эпилептической активности на уровне целого организма затруднительно. В то же время, для проведения таких исследований подходят модели *in vitro*. В частности, широкое распространение получило использование переживающих срезов мозга лабораторных животных. Перфузия переживающих срезов, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, проэпилептическим раствором приводит к генерации двух ключевых форм эпилептической активности, описанных у пациентов: иктальной и интериктальной активности (Cohen *et al.*, 2002; Dulla *et al.*, 2018). Под иктальной активностью понимают продолжительные разряды, содержащие в своем составе глутаматергические компоненты, распространяющиеся в соседние структуры мозга и сопровождающиеся поведенческими нарушениями. Интериктальная активность представляет собой короткие разряды, которые возникают локально, не распространяются в соседние структуры мозга и обычно не сопровождаются поведенческими нарушениями. Использование переживающих срезов, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, позволяет провести электрофизиологическую регистрацию активности отдельных нейронов в указанных структурах в любой момент времени после подачи проэпилептического раствора.

Цель исследования: оценить эффекты периода эпилептиформной активности *in vitro* на биофизические свойства нейронов и глутаматергическую синаптическую передачу в энторинальной коре и гиппокампе крыс.

Задачи исследования:

1. Сравнить протекание эпилептиформной активности в энторинальной коре и гиппокампе в модели эпилептиформной активности *in vitro*
2. Оценить влияние эпилептиформной активности на биофизические свойства нейронов гиппокампа в модели эпилептиформной активности *in vitro*
3. Оценить изменения вероятности выброса глутамата в синапсах области CA1 гиппокампа и энторинальной коры после эпилептиформной активности в модели эпилептиформной активности *in vitro*.
4. Исследовать изменения свойств глутаматергических рецепторов пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа и нейронов энторинальной коры в ответ на эпилептиформную активность *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эпилептиформная активность *in vitro* в энторинальной коре и гиппокампе протекает неодинаково: в энторинальной коре наблюдается более интенсивная икctalная активность, превышающая по своей суммарной длительности икctalную активность, регистрируемую в гиппокампе
2. Краткий период эпилептиформной активности приводит к быстро развивающимся постсинаптическим изменениям глутаматергической передачи в энторинальной коре и гиппокампе, проявляющимся в форме потенциации AMPA-рецептор-опосредованного компонента вызванных ответов.
3. Эпилептиформная активность *in vitro* не приводит к ранним изменениям пресинаптических свойств нейронов коры и гиппокампа, биофизических мембранных свойств нейронов гиппокампа.

Научная новизна исследования. Впервые проведено комплексное сравнение развития и последствий эпилептиформной активности *in vitro* одновременно в двух структурах височной доли – энторинальной коре и гиппокампе. Показано, что в обеих структурах наблюдаются как икctalная, так и интерикctalная активность. В энторинальной коре наблюдалась более длительная икctalная активность по сравнению с гиппокампом. Впервые продемонстрировано, что в ходе эпилептиформной активности *in vitro* меняется вклад синаптических проводимостей трех основных ионотропных рецепторов: AMPA-, NMDA- и ГАМКа-рецепторов. Эпилептиформные разряды 1 типа были опосредованы сугубо проводимостью ГАМКа-рецепторов. В случае эпилептиформных разрядов 2 типа ГАМКа-рецепторы опосредовали ранний компонент ответа, тогда как AMPA- и NMDA-рецепторы – поздний компонент. Установлено, что в изучаемый период эпилептиформная активность *in vitro* не влияет на биофизические свойства нейронов области CA1 гиппокампа, на вероятность выброса глутамата как в синапсах энторинальной коры, так и синапсах области CA1 гиппокампа. Впервые показано, что эпилептиформная активность *in vitro* приводит к увеличению AMPA/NMDA соотношения в изучаемый период и в энторинальной коре, и в области CA1 гиппокампа. Полученные данные указывают на то, что AMPA-рецепторы играют важную роль в процессах синаптической пластичности, запускаемых эпилептиформной активностью.

Теоретическая значимость работы заключена в том, что в результате проведения диссертационного исследования были получены новые данные о протекании и последствиях эпилептиформной активности *in vitro* как в энторинальной коре, так и в гиппокампе. Было показано, что синаптические проводимости основных типов ионотропных рецепторов меняются в ходе эпилептиформной активности *in vitro*. Проведенная оценка изменений глутаматергической синаптической передачи наглядно продемонстрировала, что эпилептиформная активность *in vitro* нарушает нормальное

функционирование AMPA- и NMDA-рецепторов, приводя к увеличению соотношения AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованных компонентов вызванного ответа. **Практическая значимость работы** заключается в том, что данные о временной динамике изменений AMPA- и NMDA-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 представлены в виде устных и стендовых докладов на VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (СПб, 2016), XIX Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (СПб, 2016), XXIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017» (СПб, 2017), XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2018» (СПб, 2018), the 11th FENS forum of neuroscience (Берлин, 2018), VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019), Третьей международной конференции со школой молодых ученых «Физика – наукам о жизни» (СПб, 2019), XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2020» (СПб, 2020), XVI Всероссийской конференции с международным участием «Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели» (СПб, 2020), XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (СПб, 2021).

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка использованных источников. Диссертация содержит 29 рисунков, список литературы включает 353 литературных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приведены актуальные данные о височной эпилепсии и механизмах генерации эпилептической активности. Рассмотрены *in vitro* модели эпилептиформной активности, наиболее часто используемые в исследованиях. Проанализированы изменения глутаматергической синаптической передачи, как на пресинаптическом, так и на постсинаптическом уровне, ассоциированные с эпилептической активностью. Приведены современные данные о влиянии эпилептической активности на состав и свойства ионотропных глутаматных рецепторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 помещали в охлажденную (0° С) искусственную спинномозговую жидкость (ACSF), после чего при помощи вибратора изготавливали горизонтальные срезы, содержащие энторинальную кору и гиппокамп. Полученные срезы инкубировались в ACSF

в течение 1 часа до начала электрофизиологического эксперимента. Для аэрации ACSF использовалась газовая смесь, содержащая 95% O₂ и 5% CO₂.

Модель эпилептиформной активности в переживающем срезе

Эпилептиформная активность в энторинально-гиппокампальных срезах вызывалась с помощью проэпилептического раствора, содержащего 4-аминопиридин (4-АП) – блокатор Kv1 калиевых каналов. Проэпилептический раствор 1 (ПР1) имел концентрацию ионов калия, близкую к физиологической (состав: 125 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 0.25 MgSO₄, 2 CaCl₂, 24 NaHCO₃, 10 глюкозы и 0.1 4-АП (в ммоль/л)), в то время как проэпилептический перфузирующий раствор 2 (ПР2) характеризовался повышенной концентрацией ионов калия (состав: 120 NaCl, 8.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 0.25 MgSO₄, 2 CaCl₂, 24 NaHCO₃, 10 глюкозы и 0.05 4-АП (в ммоль/л)). В экспериментах, целью которых было оценить краткосрочные последствия эпилептиформного состояния, проэпилептический раствор заменялся контрольным (ACSF).

Регистрация полевых постсинаптических потенциалов (полевых ПСП)

Полевые ПСП отводили от радиального слоя области CA1 гиппокампа при помощи заполненного ACSF стеклянного микроэлектрода (0,2-1,0 МОм). Для вызова синаптических ответов осуществлялась локальная внеклеточная электрическая стимуляция коллатералей Шаффера, при этом стимулирующий электрод помещался в радиальный слой на границе CA1-CA2 областей на расстоянии 1 мм от регистрирующего электрода. Зависимость амплитуды полевых ПСП и амплитуды пресинаптического спайка (fiber volley – FV) от силы стимуляции определяли путем увеличения силы тока от 25 до 300 мкА с шагом 25 мкА. Чтобы оценить эффективность базовой синаптической передачи, для каждого среза определялось отношение амплитуд полевых ПСП и FV, полученная кривая аппроксимировалась сигмоидальной функцией Гомперца:

$$f[I; a, k, I_{infl}] = ae^{-e^{(-k(I-I_{infl}))}} \quad (1),$$

где $e = 2,71828\dots$, a – асимптота максимальной амплитуды ответа, I_{infl} – ток перегиба (пА), представляющий собой величину стимулирующего тока, при которой наблюдается максимальный наклон кривой, k – положительное число, определяющее наклон кривой. Максимальный наклон кривой (Гц/пА) был рассчитан как $a \times k / e$ и считался коэффициентом синаптической передачи (input/output отношение).

Регистрация синаптической активности методом патч-кламп

При сборе данных осуществлялась фильтрация высоких частот (на частоте 5-10 кГц при регистрации эпилептиформных разрядов и вызванных ответов, и на частоте 3 кГц при регистрации миниатюрных событий), частота дискретизации составляла 20-40 кГц.

Регистрация синаптической активности пирамидных нейронов осуществлялась в перфузируемой камере при температуре 30° С. Скорость перфузии равнялась 5-7 мл/мин. Патч-электроды имели входного сопротивление 2-5 МОм. Патч-кламп регистрация выполнялась в конфигурации «целая клетка». Применялись три типа пипеточных растворов. Раствор 1 на основе глюконата калия имел следующий состав: 136 глюконата калия, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 4 АТФ-Mg и 0,3 GTP (в ммоль/л). Раствор 2 на основе метансульфоната цезия имел следующий состав: 127 CsMeSO₃, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 6 QX314, 4 АТФ-Mg и 0,3 GTP (в ммоль/л). Раствор 3 на основе фторида цезия имел следующий состав: 131 CsF, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 6 QX314 и 3 МК-801 (в ммоль/л). Раствор 1 применялся для регистрации мембранного потенциала в режиме фиксации тока, и для регистрации спонтанных и миниатюрных событий в режиме фиксации напряжения. Раствор 2 применялся для регистрации как вызванных, так и спонтанных синаптических событий в режиме фиксации напряжения. Раствор 3 применялся для регистрации в режиме фиксации напряжения с целью осуществления частичной внутриклеточной блокады ГАМК_A- и NMDA-рецепторов. Сопротивление доступа контролировалось во время

эксперимента и составляло 10-20 МОм. В анализ включались записи, для которых увеличение сопротивления доступа за время регистрации не превышало 30%.

Синаптические ответы вызывались при помощи внеклеточной электрической стимуляции, биполярный стимулирующий электрод располагался 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.

Оценка AMPA-, ГАМКа- и NMDA-рецептор-опосредованных проводимостей

Для получения вольт-амперных характеристик (ВАХ) AMPA-, NMDA-, ГАМКа-рецептор-опосредованных синаптических токов были зарегистрированы ответы на внеклеточную стимуляцию при разных значениях потенциала фиксации (от -100 до $+40$ мВ) с шагом 5 мВ. Синаптические токи изолировались фармакологически. AMPA-рецептор-опосредованные синаптические токи регистрировались в присутствии блокаторов NMDA-рецепторов AP-5 (50 мкмоль/л), МК-801 (18 мкмоль/л), блокатора ГАМКб-рецепторов CGP-55845 (5 мкмоль/л) и блокатора ГАМКа-рецепторов бикикуллина (20 мкмоль/л). ГАМКа-рецептор-опосредованные синаптические токи регистрировались в присутствии CGP-55845 (5 мкмоль/л), AP-5 (50 мкмоль/л), МК-801 (18 мкмоль/л) и антагониста AMPA-рецепторов DNQX (20 мкмоль/л). NMDA-рецептор-опосредованные синаптические токи регистрировались в присутствии DNQX (20 мкмоль/л), CGP-55845 (5 мкмоль/л) и бикикуллина (20 мкмоль/л). Пиковые величины этих моносинаптических токов были использованы для построения графиков ВАХ. Полученные кривые были аппроксимированы разными функциями с использованием Wolfram Mathematica 10 (Champaign, USA).

ВАХ AMPA-рецептор-опосредованного тока была аппроксимирована линейной функцией:

$$I_{AMPA}(U) = g_{AMPA}(U - V_{AMPA}) \quad (1),$$

где V_{AMPA} — потенциал реверсии AMPA-рецептор-опосредованного тока; g_{AMPA} — проводимость постсинаптических AMPA рецепторов; U — потенциал фиксации.

ВАХ ГАМКа-опосредованных токов, зарегистрированных с применением пипеточного раствора 2, были аппроксимированы с помощью модифицированного уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца (Barker, Harrison, 1988):

$$I_{GABA}(U) = \frac{(zF)^2}{RT} PS U \frac{[C_{out}] \left(\exp\left(\frac{-zF}{RT}(U - V_{GABA})\right) - 1 \right)}{\exp\left(\frac{zFU}{RT}\right) - 1} \quad (2)$$

В случае применения пипеточного раствора 3 использовалась экспоненциальная функция:

$$I_{GABA}(U) = A \left(\exp\left(\frac{(U - V_{GABA})}{k}\right) - 1 \right) \quad (3),$$

где z — валентность (-1 для хлорида), F — константа Фарадея (96485 С/моль); R — газовая константа (8,314 Дж/(К·моль)), T — температура (303 К); C_{out} — внеклеточная концентрация хлорида (135 моль/м³), V_{GABA} — потенциал реверсии ГАМКа-рецептор-опосредованного тока, PS (м³/с) — произведение проницаемости мембраны для хлорида (мс) и площади поверхности мембраны (м²). Для уравнения (2), варьируемыми параметрами были PS и V_{GABA} , а для уравнения (3) — A , k и V_{GABA} . Чтобы выразить проводимость каналов ГАМКа-рецепторов, уравнения (2) и (3) были переписаны следующим образом:

$$I_{GABA}(U) = g_{GABA} f_{GABA}(U) \quad (4),$$

где $g_{GABA} = \frac{dI_{GABA}}{dU} \Big|_{U=-20mV}$ — проводимость, измеренная при значении мембранного потенциала, равном -20 мВ; $f_{GABA}(U)$ — потенциал-зависимый множитель уравнений (2) или (3).

ВАХ NMDA-рецептор-опосредованных токов была аппроксимирована следующей функцией (Jahr and Stevens, 1990):

$$I_{NMDA}(U) = \frac{g_{inf}}{1 + \exp\left(\frac{V_{12} - U}{k}\right)} (U - V_{NMDA}) \quad (5),$$

где g_{inf} – проводимость рецепторов в отсутствии Mg^{2+} блока при условии, что U стремится к бесконечности; V_{12} и k характеризуют зависимость Mg^{2+} блока NMDA рецепторов от напряжения; V_{AMPA} – потенциал реверсии; g_{inf} , V_{NMDA} , V_{12} и k могли изменяться во время аппроксимации.

Чтобы выразить проводимость каналов NMDA-рецепторов, уравнение (5) было переписано следующим образом:

$$I_{NMDA}(U) = g_{NMDA} f_{NMDA}(U) \quad (6),$$

где $g_{NMDA} = \left. \frac{dI_{NMDA}}{dU} \right|_{U=-20mV}$ – проводимость NMDA рецепторов, измеренная при значении мембранного потенциала, равном -20 мВ; $f_{NMDA}(U)$ – потенциал-зависимый множитель уравнения (5).

Синаптические проводимости в ходе спонтанных эпилептиформных разрядов или вызванных ответов оценивались на основе записей ионных токов при разных значениях потенциала фиксации от -107 до +43 мВ с шагом 5-10 мВ. От 5 до 25 эпилептиформных разрядов усреднялись после вычитания базовой линии для каждого значения потенциала фиксации. Полученные усредненные записи использовались для построения ВАХ. Для этого при каждом значении потенциала фиксации каждые 1.2 мс определялась величина силы тока. Таким образом, полученные записи ответов преобразовывались в совокупность ВАХ, на основании которых оценивался вклад AMPA-, ГАМКа- и NMDA-рецептор-опосредованных проводимостей. Для этого каждая из полученных ВАХ аппроксимировалась следующей функцией:

$$I_{total}(U; g_{AMPA}, g_{GABA}, g_{NMDA}) = g_{GABA} f_{GABA}(U) + g_{NMDA} f_{NMDA}(U) + g_{AMPA}(U - V_{AMPA}) \quad (7),$$

где $f_{GABA}(U)$ и $f_{NMDA}(U)$ – функции из уравнений (4) и (6), соответственно, g_{GABA} , g_{NMDA} и g_{AMPA} – искомые проводимости соответствующих рецепторов. В ходе аппроксимации эти параметры подбирались в положительном диапазоне, при этом использовался метод наименьших квадратов. Алгоритм оценки проводимостей был реализован в Wolfram Mathematica 10.

Ответы на парный стимул

Ответы пирамидных нейронов области CA1 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 CA1 гиппокампа проводилась в присутствии тетродотоксина – селективного блокатора потенциал-управляемых Na^+ 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.

AMPA/NMDA соотношение

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

пиковых амплитуд AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованных ответов. В экспериментах по оценке AMPA/NMDA соотношения в энторинальной коре использовались величины AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованных проводимостей, полученные путем аппроксимации ВАХ, как было описано выше.

Оценка площади под кривой синаптической проводимости

Для оценки кинетики отдельного компонента синаптического ответа в ряде случаев вычислялась площадь под кривой соответствующей синаптической проводимости. Площадь (A , нС * мс) рассчитывалась по формуле:

$$A = 1,198 * \sum_{t=0}^{t_{max}} g(t) \quad (8),$$

где $g(t)$ – синаптическая проводимость, опосредованная AMPA-, NMDA- или ГАМКа-рецепторами. Величина t_{max} составляла 250 мс в случае AMPA-рецепторов и 1800 мс – в случае NMDA- и ГАМКа-рецепторов.

Биофизические свойства нейронов

Для изучения биофизических свойств нейронов оценивалось изменение потенциала в ответ на подаваемые ступеньки тока разной величины (от -50 до $+20$ пА, с шагом $10-20$ пА), продолжительность которых составляла 1500 мс. В анализ включались только нейроны с типичным для пирамидных клеток паттерном спайкования. Оценка биофизических свойств производилась с использованием собственных скриптов, написанных в Wolfram Mathematica 10 Д.В. Амахиным (Wolfram Research, USA). Были проанализированы следующие пассивные мембранные свойства:

1. Потенциал покоя мембраны (V_{rest} , мВ). Использовалось усредненное значение потенциала, регистрируемого до подачи ступеньки тока;
2. Входное сопротивление (R_{in} , МОм). Рассчитывалось как коэффициент наклона кривой вольт-амперной характеристики;
3. Временная константа мембраны (τ_m , мс). Кратковременное изменение потенциала в ходе фазы спада, регистрируемое в ответ на ступеньку тока величиной -25 пА, аппроксимировалось одноэкспоненциальной функцией с соответствующим временным коэффициентом.
4. Емкость мембраны (C , пФ). Для расчета C использовалась формула: $\tau = C \times R_a$, где τ – временная константа мембраны, R_a – сопротивление доступа.

Для анализа активных мембранных свойств на нейрон подавались деполяризующие ступеньки тока, приводящие к генерации потенциалов действия, после чего строилась кривая зависимости частоты генерации потенциалов действия от величины подаваемого тока (частотно-токовая кривая). Частота генерации потенциалов действия определялась как количество потенциалов действия, приходящихся на одну ступеньку тока. Восходящая часть полученной частотно-токовой кривой была аппроксимирована функцией Гомперца (ур. 1), используя Wolfram Mathematica 10, где a – асимптота максимальной частоты генерации потенциалов действия (Гц); $a*k/e$ – максимальный наклон кривой (мВ/пА); x_c – ток в точке перегиба (пА), при котором наблюдался максимальный наклон кривой. Кроме того, оценивались параметры генерируемых потенциалов действия. Для оценки формы потенциала действия использовались первые потенциалы действия, генерируемые в ответ на пороговые ступеньки тока. Под пороговым значением потенциала (мВ) понимался потенциал, при котором интерполированная скорость увеличения напряжения (dV/dt) превышала 10 мВ/мс. Длительность потенциала действия (мс) оценивалась как его ширина на высоте его полуамплитуды. Амплитуда потенциала действия (мВ) измерялась от порога до пика.

Статистическая обработка

Статистический анализ и построение графиков выполнялись с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (SYSTAT Software; США). Проверка нормальности распределения данных производилась с применением критерия Колмогорова-Смирнова или критерия Шапиро-Уилка. Для сопоставления данных двух

независимых выборок использовался *t*-критерий Стьюдента, в случае последовательных измерений – парный *t*-критерий Стьюдента. Оценка изменений синаптической проводимости на трех временных интервалах и оценка коэффициента синхронизации иктальных разрядов на четырех временных интервалах осуществлялись при помощи однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями. Данные приведены в виде среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего). Достоверным уровнем отличий признавалась $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эпилептиформная активность *in vitro* в энторинальной коре и гиппокампе

Во всех наших экспериментах мы использовали комбинированные срезы мозга крысы, содержащие как энторинальную кору, так и гиппокамп, поэтому на первой этапе нашего исследования нашей задачей было оценить, как происходит развитие эпилептиформной активности. Для выполнения этой задачи мы провели эксперименты по одновременной регистрации спонтанных постсинаптических токов нейронов глубоких слоев энторинальной коры и нейронов области СА1 гиппокампа. Значение потенциала фиксации, выбранное для этой серии экспериментов, было близким к потенциалу реверсии ГАМКергических постсинаптических токов, что позволяло значительно снизить их амплитуду, в то время как глутаматергические постсинаптические токи при выбранном значении потенциала фиксации имели высокие амплитуды и были хорошо различимы. Указанный режим регистрации позволил нам изучить особенности генерации глутаматергических постсинаптических токов в составе иктальных разрядов в обеих структурах (рис. 1).

Чтобы оценить, насколько согласованно эпилептиформная активность возникала в обеих структурах, мы использовали коэффициент синхронизации, представляющий собой разницу между временем появления первых высокоамплитудных отрицательных постсинаптических токов в начале каждого иктального разряда, рассчитанный на 4 временных интервалах (рис. 1, Б). Значимые различия были обнаружены в отношении начального этапа развития эпилептиформного состояния в срезе: в гиппокампе эпилептиформная активность регистрировалась раньше всего – наблюдался сильный всплеск постсинаптических токов, большая часть которых представляла собой ГАМКергические токи, однако присутствовали и глутаматергические; в энторинальной коре всплеск постсинаптических токов возникал значительно позднее. В ходе последующих 10 минут регистрации ведущая роль принадлежала, скорее, уже энторинальной коре. В целом, мы наблюдали стабильную генерацию иктальных разрядов как в энторинальной коре, так и в гиппокампе: за первые 20 минут после подачи проэпилептического раствора (ПР2) и в энторинальной коре, и в гиппокампе возникало порядка 4 иктальных разрядов (в энторинальной коре: $4,0 \pm 0,4$; в области СА1 гиппокампа: $4,3 \pm 0,6$; $n = 6$, $t = 0,5$, $p > 0,05$) (рис. 1, В).

Оценив временную динамику регистрируемой активности, мы подробнее сосредоточились на свойствах самих иктальных разрядов. Вначале мы проанализировали среднюю частоту залпов постсинаптических токов в ходе иктальных разрядов в течение 20 минут после подачи проэпилептического раствора, и выяснили, что иктальные разряды, генерируемые в обеих структурах, состояли из залпов, генерируемых со сходной частотой (в энторинальной коре: $0,77 \pm 0,08$ Гц; в области СА1 гиппокампа: $0,94 \pm 0,10$ Гц; $n = 6$, $t = 1,3$, $p > 0,05$) (рис. 1, Г). Однако, в энторинальной коре, в отличие от гиппокампа, залпы постсинаптических токов чаще представляли собой не одиночные разряды, а пачечную активность (в энторинальной коре: 69 ± 6 %; в области СА1 гиппокампа: 31 ± 12 %; $n = 5$, $t = 2,9$, $p = 0,02$) (рис. 1, Д). Наконец, мы проанализировали суммарную длительность иктальной активности в обеих структурах в течение 20 минут после подачи проэпилептического раствора. Оказалось, что в энторинальной коре иктальная активность была гораздо продолжительней: доля, которую время иктальной активности составляет от

общего времени регистрации, была значительно увеличена в энторинальной коре по сравнению с гиппокампом (в энторинальной коре: $37,7 \pm 3,2\%$; в области СА1 гиппокампа: $19 \pm 3\%$; $n = 6$, $t = 4,2$, $p = 0,002$) (рис. 1, Е).

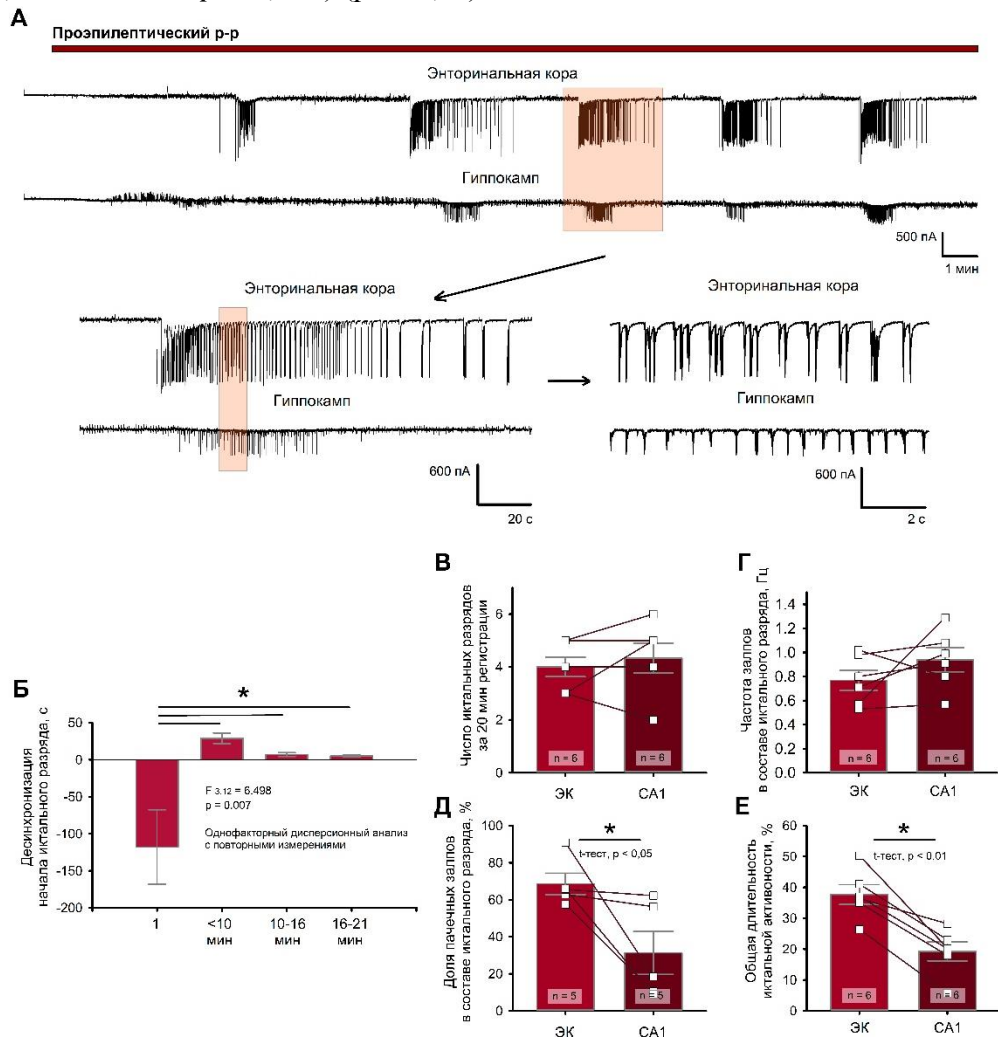


Рис. 1. Одновременная регистрация иктальных разрядов в энторинальной коре и области СА1 гиппокампа. Регистрация спонтанных постсинаптических токов выполнялась при потенциале фиксации равном -57 мВ. А – регистрируемые спонтанные постсинаптические токи в энторинальной коре (верхняя запись) и области СА1 гиппокампа (нижняя запись) непосредственно после подачи проэпилептического раствора. Отдельные залпы постсинаптических токов, регистрируемые в ходе иктального разряда, показаны при большем временном разрешении справа. Б – коэффициент синхронизации возникновения иктальных разрядов за 20 минут регистрации в обеих структурах (однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, апостериорный тест Бонферрони). В – среднее число иктальных разрядов за 20 минут регистрации. Г – средняя частота залпов глутаматергических постсинаптических токов в ходе иктальных разрядов за 20 минут регистрации. Д – доля пачечных залпов от общего числа залпов постсинаптических токов в составе третьего иктального разряда. Е – доля суммарного времени иктальной активности относительно 20 минут регистрации.

Типы эпилептиформных разрядов

Использованный нами состав проэпилептического раствора приводил к быстрому появлению эпилептиформной активности в срезе (спустя минуты после подачи проэпилептического раствора), что позволило нам изучить все этапы развития эпилептиформной активности в срезе: от начала подачи проэпилептического раствора до этапа стабильной генерации иктальных разрядов. И в энторинальной коре, и в гиппокампе наблюдались как интериктальные, так и иктальные разряды, хотя в гиппокампе интериктальная активность была интенсивнее.

В энторинальной коре первые синхронизированные синаптические события наблюдались через 4-6 мин с момента перфузии. На этом этапе регистрировались

исключительно залпы тормозных токов – эпилептиформные разряды 1 типа (ЭР1, рис. 2), продолжительность каждого из которых составляла приблизительно 1 с. Длительность этого этапа составляла около 4.1 ± 0.8 мин ($n = 17$).

При регистрации иктальных разрядов в режиме фиксации напряжения было выявлено, что их основу составляют повторяющиеся токи сложной кинетики – эпилептиформные разряды 2 типа (ЭР2, рис. 2), накладывающиеся друг на друга. 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). В большинстве случаев такие повторяющиеся токи кластеризовались в начале иктального разряда, и частота их генерации постепенно падала к концу разряда. В нашей модели в некоторых срезах режим генерации иктальных разрядов мог сменяться режимом, подобным эпилептическому статусу, когда ЭР2 генерировались постоянно, с низкой частотой (0.24 ± 0.02 Гц, $n = 22$) и характеризовались низкой вариабельностью формы.

Чтобы установить, активностью каких постсинаптических рецепторов были обусловлены ЭР1 и ЭР2, были зарегистрированы синаптические события при разных значениях мембранного потенциала от -100 до $+30$ мВ с шагом 5 мВ, 5-25 записей усреднялись на каждом уровне. Далее для полученных усредненных разрядов был построен ряд вольт-амперных характеристик на разных временных интервалах от начала эпилептиформного разряда. Каждая вольт-амперная характеристика была аппроксимирована при помощи уравнений, где в качестве коэффициентов использовались проводимости g_{AMPA} , g_{GABA} и g_{NMDA} . На рисунке 2 приведены вычисленные проводимости, представленные в виде временных функций. Синаптическая активность в ходе ЭР1 представляла собой практически полностью ГАМКа-рецептор-опосредованный ответ. В случае ЭР2 ГАМКа-рецептор-опосредованный ответ являлся ведущим только в момент инициации разряда, после чего, с небольшой задержкой, активировалась проводимость возбуждающих глутаматных рецепторов AMPA и NMDA типа.

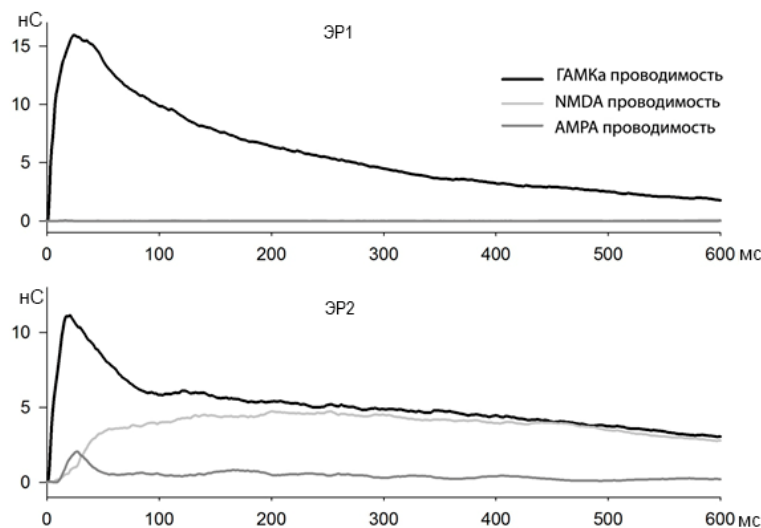


Рис. 2. Вклад AMPA-, NMDA- и ГАМК-рецептор-опосредованных проводимостей в синаптическую активность в ходе эпилептиформных разрядов 1 и 2 типов (ЭР1 и ЭР2).

Влияние эпилептиформной активности *in vitro* на биофизические свойства пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа

От мембранных свойств нейрона зависит то, как клетка будет трансформировать поступающие на нее сигналы в потенциалы действия. Исследования, выполненные *in vivo*, продемонстрировали, что эпилептический статус, индуцированный хемоконвульсантами, влияет на пассивные и активные мембранные свойства нейронов, в том числе в первые сутки и часы после воздействия (Minge and Bähring, 2011; Smirnova *et al.*, 2018). Поэтому, приступая к оценке последствий эпилептиформной активности *in vitro*, мы в первую очередь проверили, не изменились ли пассивные и активные мембранные свойства изучаемых нейронов (рис. 3).

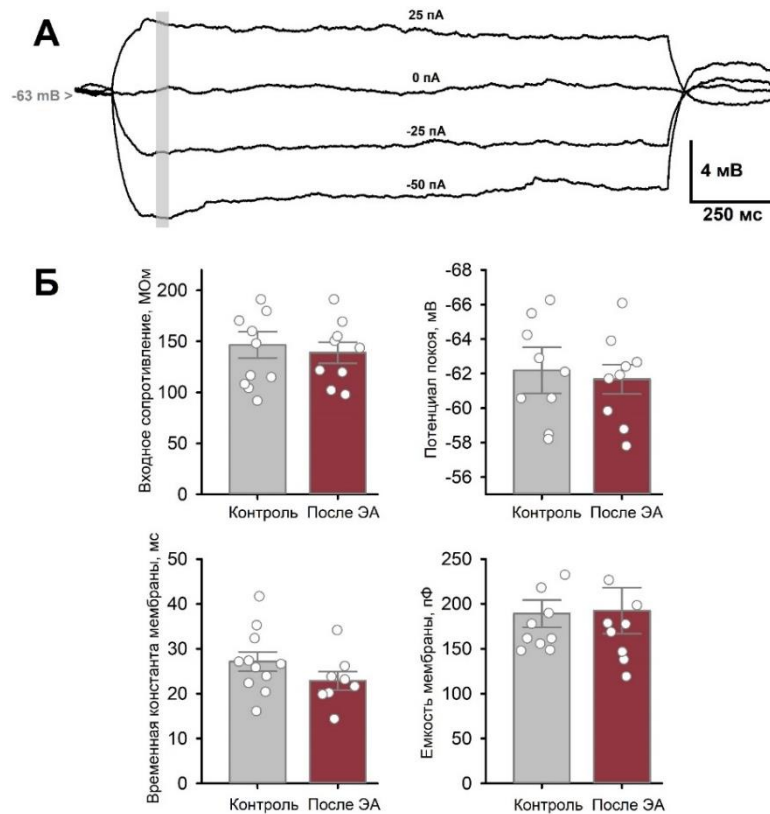


Рис. 3. Пассивные мембранные свойства пирамидных нейронов области CA1 после периода эпилептиформной активности *in vitro*. А – репрезентативная совокупность подпороговых ответов пирамидных нейронов области CA1 на подаваемые ступеньки тока от -50 до +25 мВ. Серым цветом выделен временной интервал, который использовался для получения усредненных значений мембранного потенциала для оценки входного сопротивления. Регистрация выполнялась в присутствии блокатора ГАМК_A рецепторов бикуккуллина. Б – мембранные свойства пирамидных нейронов. Значимых различий не обнаружено.

Для определения пассивных свойств пирамидных нейронов области CA1 на нейрон подавались ступеньки тока (от -50 до +25 пА с шагом 25 пА). Зарегистрированное изменение напряжения в ответ на подаваемую ступеньку тока затем использовалось для расчета таких параметров, как входное сопротивление, временная константа мембраны и емкость мембраны. Ни один из проанализированных показателей значимо не изменился спустя 1 час после периода эпилептиформной активности *in vitro*: входное сопротивление (контроль: 150 ± 14 мОм, $n = 10$; после ЭА: 139 ± 10 мОм; $n = 9$; непарный t -критерий Стьюдента, $p = 0,51$); временная константа мембраны (контроль: $27,7 \pm 2,3$ мс, $n = 10$; после ЭА: $22,9 \pm 2,0$ мс; $n = 8$; непарный t -критерий Стьюдента, $p = 0,15$); емкость мембраны (контроль: 189 ± 15 пФ, $n = 10$; после ЭА: 192 ± 26 пФ; $n = 9$; непарный t -критерий Стьюдента, $p = 0,91$); потенциал покоя (контроль: $-62,0 \pm 1,5$ мВ, $n = 10$; после ЭА: $-61,7 \pm 0,9$ мВ; $n = 9$; непарный t -критерий Стьюдента, $p = 0,86$) (рис. 3).

Следующим нашим шагом было проверить, не повлиял ли период эпилептиформной активности *in vitro* на активные мембранные свойства нейронов. Для этого на нейроны подавались деполяризующие ступеньки тока возрастающей интенсивности, в ответ на

которые нейрон генерировал потенциалы действия с разной частотой. Выполнение данного экспериментального протокола позволяло построить кривую зависимости частоты генерации потенциалов действия от величины подаваемого тока (частотно-токовую кривую, рис. 4, А). Далее мы исследовали, изменяется ли форма частотно-токовой кривой после периода эпилептиформной активности *in vitro*. Для этого восходящая часть полученной частотно-токовой кривой аппроксимировалась функцией Гомперца (уравнение 1), и ее параметры оценивались как в контроле, так и после периода эпилептиформной активности *in vitro*. Не было обнаружено значимых различий ни по одному из проанализированных параметров. В частности, не менялись: максимальный наклон кривой, ток в точке перегиба кривой, максимальная частота генерации потенциалов действия (рис. 4, Б).

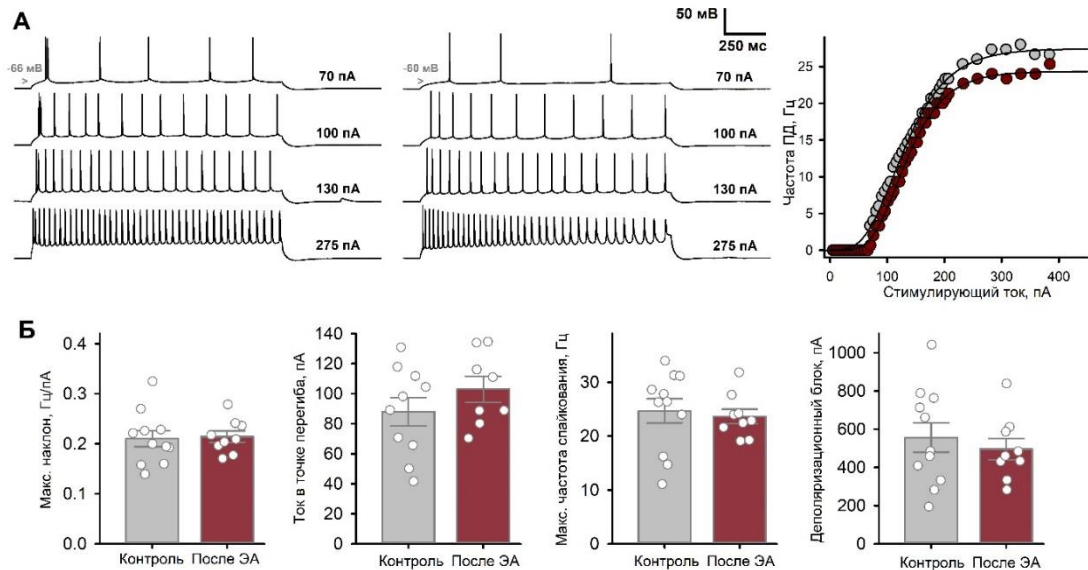


Рис. 4. Свойства частотно-токовой характеристики после периода эпилептиформной активности *in vitro*. А, слева – репрезентативные примеры изменений потенциала нейрона в ответ на подаваемые депполяризующие ступеньки тока, которые затем использовались для построения частотно-токовой характеристики (в контроле и после периода эпилептиформной активности). Справа – репрезентативные примеры частотно-токовых характеристик, аппроксимированных при помощи функции Гомперца. Серым цветом показана частотно-токовая характеристика в контроле, красным – после периода эпилептиформной активности. Б – параметры частотно-токовой характеристики. Значимых различий не обнаружено.

Влияние эпилептиформной активности *in vitro* на вероятность выброса глутамата в синапсах области СА1 гиппокампа и энторинальной коры Миниатюрные ВПСТ

Когда генерация потенциалов действия блокирована селективным блокатором потенциал-управляемых Na^+ -каналов тетродотоксином (ТТХ), момент спонтанного слияния везикулы с пресинаптической мембраной может быть зарегистрирован в форме миниатюрного постсинаптического тока. Оценка частоты миниатюрных ВПСТ служит критерием для определения изменений вероятности выброса медиатора. Частота миниатюрных ВПСТ пирамидных нейронов области СА1 гиппокампа, зарегистрированных после периода вызванной эпилептиформной активности *in vitro*, значимо не отличалась от контрольных значений (в контроле = 0.21 ± 0.05 Гц; $n = 7$; после ЭА = 0.18 ± 0.03 Гц; $n = 7$, $t = 0.6$, $p = 0.60$) (рис. 5).

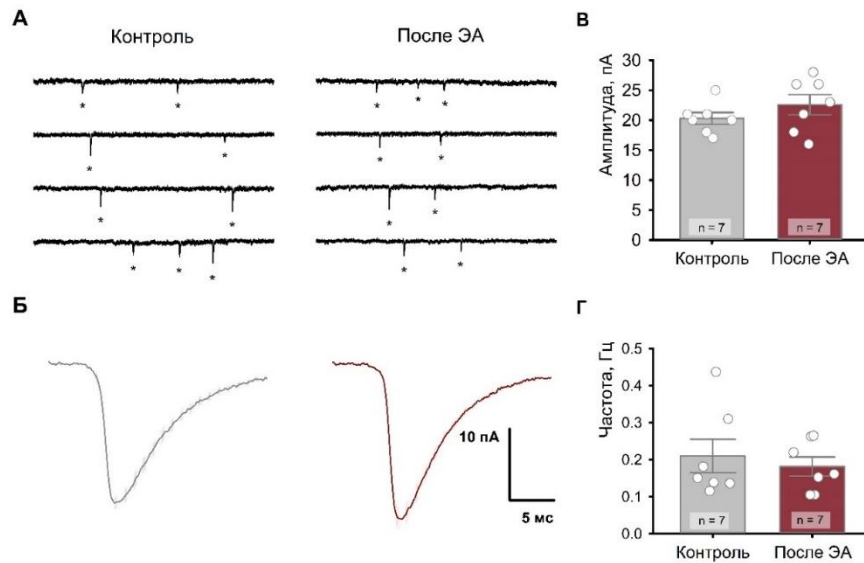


Рис. 5. Свойства миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (миниатюрных ВПСТ) пирамидных нейронов области СА1 гиппокампа крысы через 1 час после периода эпилептиформной активности *in vitro* (ЭА), вызванной перфузией переживающего среза проэпилептическим раствором. А – репрезентативные примеры миниатюрных ВПСТ пирамидных нейронов области СА1 гиппокампа крысы, зарегистрированных при потенциале фиксации, равном -80 мВ, в контрольных условиях (слева) и спустя 1 час после периода эпилептиформной активности (справа). * – отдельные миниатюрные ВПСТ. Б – усредненные миниатюрные ВПСТ в контроле и после периода эпилептиформной активности. В, Г – амплитуда (В) и частота (Г) миниатюрных ВПСТ в контроле и после периода эпилептиформной активности *in vitro*.

В энторинальной коре изменений частоты миниатюрных ВПСТ как через 10 мин, так и через час после смены проэпилептического раствора на контрольный раствор выявлено не было (Amakhin *et al.*, 2018) (рис. 6).

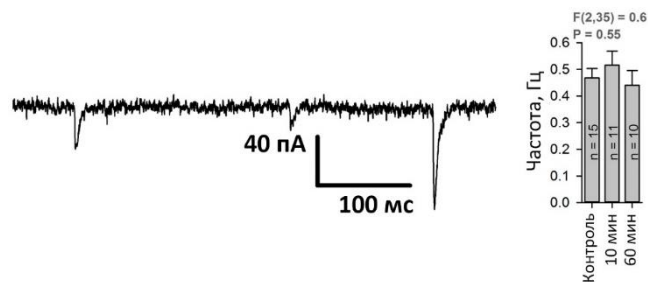


Рис. 6. Частота миниатюрных ВПСТ нейронов энторинальной коры спустя 10 и 60 минут после периода эпилептиформной активности

Парное отношение

Потенциалы действия перемещаются вдоль по аксону до пресинаптических терминалей, активируя потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, которые запускают секрецию нейромедиаторов. Когда два импульса приходят один за другим в быстрой последовательности (около 20–100 мс), считается, что Ca^{2+} , оставшийся после первого импульса, временно увеличивает вероятность высвобождения медиатора в ответ на второй стимул, что получило название «кратковременная пластичность» (Katz and Miledi, 1968; Zucker and Regehr, 2002). Относительная пиковая амплитуда первого и второго импульсов, известная как парное соотношение, таким образом, отражает величину пресинаптической вероятности высвобождения медиатора.

Чтобы изучить эффект кратковременной эпилептиформной активности *in vitro* на вероятность выброса медиатора в синапсах CA3-CA1 гиппокампа, нами были зарегистрированы ответы на парный стимул в условиях фиксации потенциала на уровне -80 мВ в присутствии блокаторов ГАМК_A рецепторов. При оценке парного отношения не выявлено различий между контрольными ответами и ответами, зарегистрированными спустя 1 час после прекращения кратковременной эпилептиформной активности (контроль = 1.72 ± 0.09 ; $n = 11$; после ЭА = 1.73 ± 0.11 ; $n = 9$, $t = 0.02$, $p = 0.98$) (рис. 7).

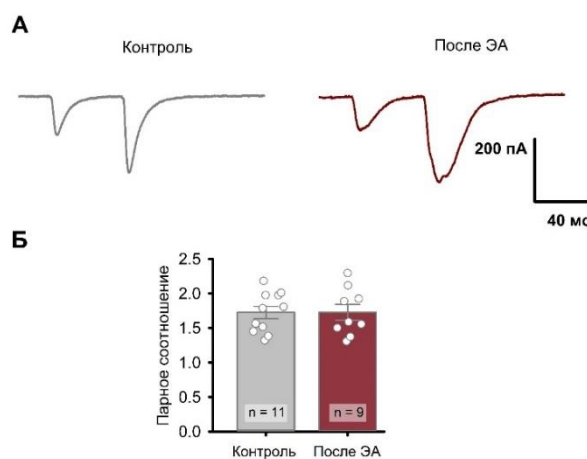


Рис. 7. Ответы пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа на парную стимуляцию в контрольных условиях и после периода эпилептиформной активности *in vitro*. А – примеры возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа, вызванных парной стимуляцией, в ACSF (контрольные условия) и спустя 1 час после периода эпилептиформной активности *in vitro* (после ЭА). $V_{hold} = -80$ мВ. Б – парное отношение амплитуд вызванных ВПСТ в ответ на второй и первый стимулы (парное отношение).

В целом, на основе данных о частоте миниатюрных событий и экспериментов по регистрации ответов на парный стимул можно сделать вывод о том, что вероятность высвобождения глутамата в синапсах CA3-CA1 гиппокампа и энторинальной коры не меняется после периода эпилептиформной активности *in vitro*.

Постсинаптические изменения в синапсах CA3-CA1 гиппокампа и синапсах энторинальной коры в ответ на эпилептиформную активность *in vitro*

Возбуждающая синаптическая передача в центральных синапсах опосредуется связыванием глутамата со специализированными рецепторами на постсинаптической мембране. Существует три основных типа инотропных рецепторов, чувствительных к глутамату: AMPA-, NMDA- и каинатные рецепторы. Синаптическая пластичность может происходить за счет изменения состава и свойств постсинаптических инотропных глутаматных рецепторов, в частности, широко известен механизм встраивания дополнительных AMPA-рецепторов на постсинаптическую мембрану, лежащий в основе формирования одной из форм долговременной потенциации (LTP). Доставка AMPA-рецепторов как в синапсы, так и из них, включает в себя процессы латеральной диффузии (Choquet and Triller, 2013) и везикулярного транспорта (Newpher and Ehlers, 2008). AMPA-рецепторы, как правило, подвижны и быстро диффундируют, а в случае формирования LTP AMPA-рецепторы закрепляются на месте (Orazo, Sainlos and Choquet, 2012; Choquet and Triller, 2013). Мы предположили, что формирование абнормальной синаптической пластичности, запускаемое эпилептиформной активностью, также может сопровождаться изменением характеристик постсинаптических рецепторов, и, в частности, AMPA-рецепторов.

Постсинаптические изменения в синапсах CA3-CA1 гиппокампа.

Чтобы проверить, не привел ли период эпилептиформной активности *in vitro* к изменению свойств глутаматергических рецепторов пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа, нами были зарегистрированы AMPA-рецептор-опосредованные и NMDA-

рецептор-опосредованные возбуждающие постсинаптические токи (ВПСТ) пирамидных нейронов области CA1 и оценено соотношение пиковых амплитуд указанных токов (рис. 8).

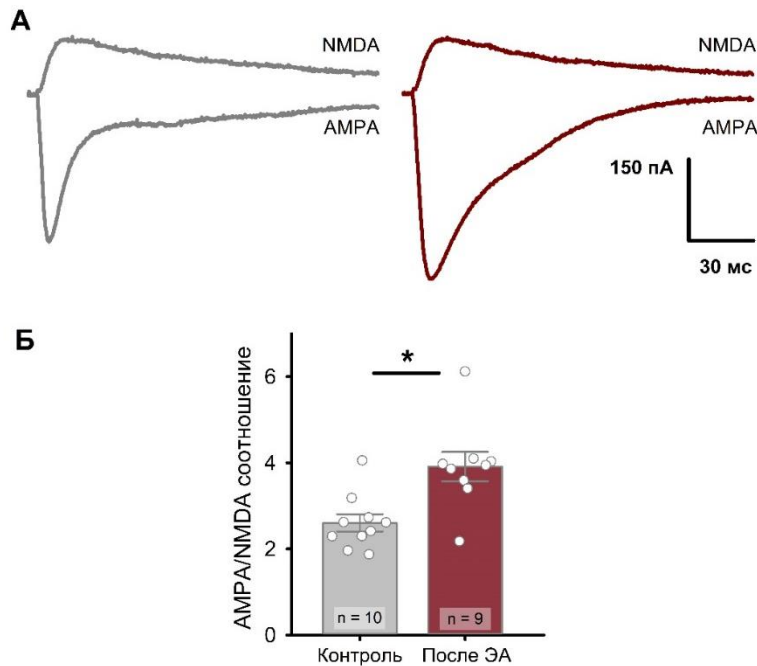


Рис. 8. AMPA/NMDA соотношение (соотношение пиковых амплитуд AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованных ВПСТ нейронов области CA1 гиппокампа крысы) увеличено спустя 1 час после прекращения кратковременной вызванной эпилептиформной активности. А – примеры ответов в контроле (серым цветом) и спустя 1 час после прекращения кратковременной вызванной эпилептиформной активности (красным цветом). «NMDA» - NMDA-рецептор-опосредованные ВПСТ при потенциале фиксации, равном +40 мВ, в присутствии DNQX (10 мкмоль/л). «AMPA» - AMPA-рецептор-опосредованные ВПСТ при потенциале фиксации, равном -80 мВ. Б – соотношение пиковых амплитуд AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованных ВПСТ (AMPA/NMDA соотношение).

Было обнаружено, что короткий период эпилептиформной активности приводит к увеличению AMPA/NMDA соотношения. (Контроль = $2,61 \pm 0,20$; $n = 10$; после ЭА = $3,91 \pm 0,34$; $n = 9$; $t = 3,4$, $p = 0,003$). Увеличение AMPA/NMDA соотношения указывает на то, что эпилептиформная активность привела к встраиванию дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану, а также на то, что именно постсинаптические изменения лежат в основе обнаруженной ранее повышенной возбудимости нейрональных сетей гиппокампа.

Постсинаптические изменения в синапсах энторинальной коры.

Для оценки постсинаптических изменений в синапсах энторинальной коры нами были зарегистрированы постсинаптические токи (ПСТ) пирамидных нейронов в ответ на внеклеточную электрическую стимуляцию. ПСТ были получены при разных значениях потенциала фиксации, что позволило сформировать два набора ПСТ: в контрольных условиях и в ходе эпилептиформной активности (рис. 9). Эффект эпилептиформной активности оценивался спустя 10–15 минут от ее начала, при этом для дальнейшего анализа отбирались только срезы, продемонстрировавшие не менее 3 иктальных разрядов. Для полученных наборов ПСТ затем была реализована процедура разложения на синаптические проводимости. Было обнаружено, что амплитуда моносинаптического пика и площадь под кривой AMPA-рецептор-опосредованной проводимости увеличились в ходе эпилептиформной активности: средние значения пиковой проводимости и площади под графиком выросли на 130% и 427%, соответственно (рис. 9, Б). Оценка NMDA-рецептор-опосредованной проводимости показала, что эпилептиформная активность не повлияла ни на пиковую величину проводимости, ни на площадь под кривой (рис. 9, В). Вследствие этого, увеличилось (в 4,66 раза) и среднее значение отношения пиковых проводимостей,

опосредованных AMPA- и NMDA-рецепторами (рис. 9, Г). Следует отметить, что, хотя величина площади под кривой NMDA-рецептор-опосредованной проводимости и не изменилась по сравнению с контрольными значениями, эпилептиформная активность повлияла на время ее инактивации, что выразилось в увеличении полуширины NMDA-рецептор-опосредованной проводимости (64 ± 12 мс в контроле и 377 ± 67 мс в ходе ЭА, $n = 8$, парный t -критерий Стьюдента, $p = 0.005$).

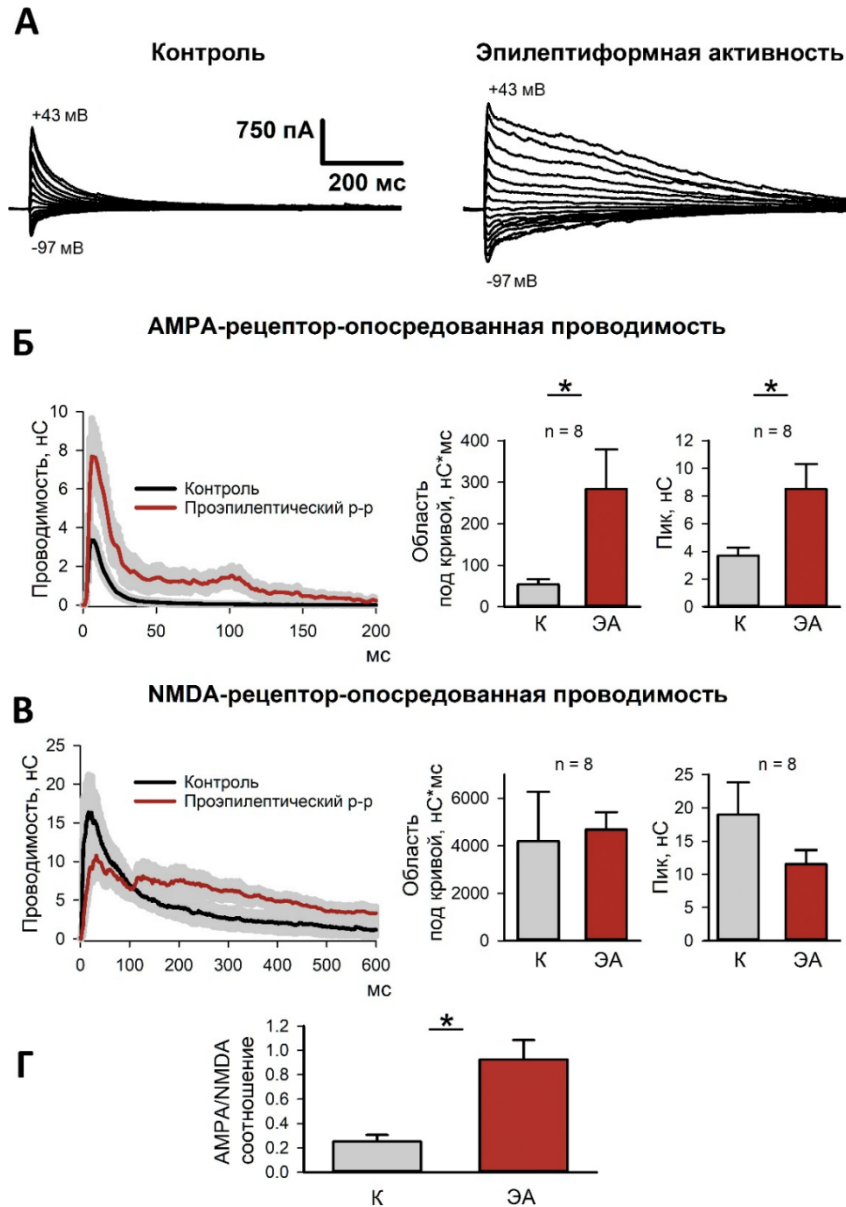


Рис. 9. AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованные компоненты ответа нейронов энторинальной коры крысы на внеклеточный электрический стимул в контрольных условиях (К) и в ходе эпилептиформной активности (ЭА). А – два набора вызванных постсинаптических токов (вызванных ПСТ), зарегистрированных от одного и того же нейрона при разных значениях потенциала фиксации в контрольных условиях (слева) и в ходе эпилептиформной активности (справа); Б – AMPA-рецептор-опосредованная синаптическая проводимость, вычисленная методом разложения вызванных ПСТ на синаптические проводимости. Слева – величина AMPA-рецептор-опосредованной проводимости относительно функции времени в контрольных условиях (черная линия) и в ходе эпилептиформной активности (красная линия). Справа – диаграммы, иллюстрирующие область под кривой и моносинаптический пик AMPA-рецептор-опосредованной проводимости (парный t -критерий Стьюдента, $p = 0,04$ и $0,02$ для пика и области под кривой, соответственно); В – NMDA-рецептор-опосредованная синаптическая проводимость; Г – отношение пиковых проводимостей, опосредованных AMPA- и NMDA-рецепторами (парный t -критерий Стьюдента, $p = 0,006$).

В следующей серии экспериментов было проверено, как изменяется наблюдаемая в энторинальной коре потенциация AMPA-рецептор-опосредованных компонентов ответа на внеклеточный электрический стимул с течением времени. Вызванные ответы вначале регистрировались в контрольном перфузирующем растворе, затем в срезах вызывалась эпилептиформная активность, затем эпилептиформная активность останавливалась (проэпилептический раствор заменялся на ACSF, срезы отмывались) и, наконец, снова регистрировались вызванные ответы на разных временных промежутках. Во всех срезах эпилептиформная активность продолжалась менее 5 мин после начала отмыва от проэпилептического раствора. Вызванные ответы регистрировались три раза после отмыва: спустя 5 (O1), 17 (O2) и 30 мин (O3) (рис. 10). После прекращения эпилептиформной активности величина AMPA-рецептор-опосредованной проводимости возвращалась к уровню контрольных значений постепенно. Пиковое значение AMPA-рецептор-опосредованной проводимости оставалось увеличенным по сравнению с контролем спустя 5 и 17 мин после отмыва (средние значения по сравнению с контролем были увеличены на 107% и 68% для O1 и O2 соответственно; однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, $p = 0,002$, с последующим апостериорным тестом Даннета).

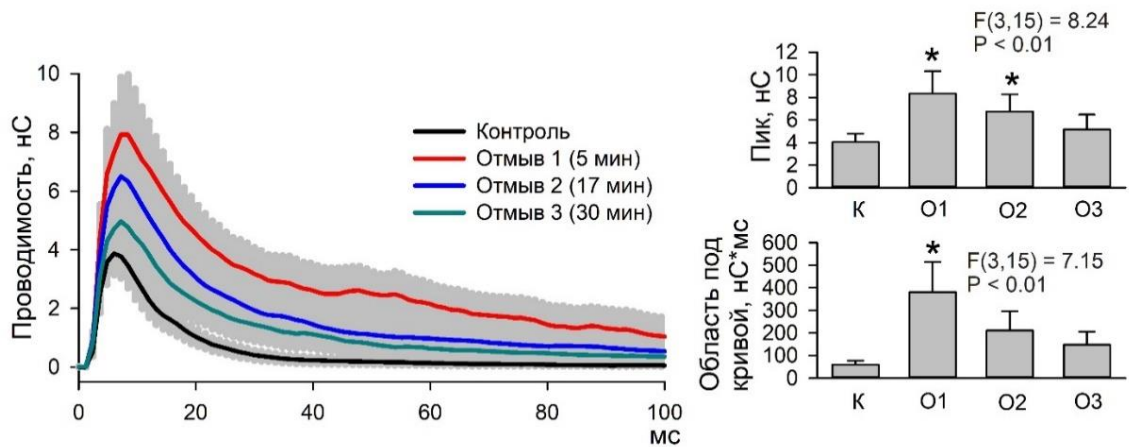


Рис. 10. Потенциация AMPA-рецептор-опосредованного компонента вызванного ответа сохраняется после прекращения эпилептиформной активности. Слева – AMPA-рецептор-опосредованная синаптическая проводимость относительно функции времени в контрольных условиях и после прекращения эпилептиформной активности. Оценка величины синаптической проводимости проводилась в трех точках: 5, 17 и 30 мин после отмыва. «К», «O1», «O2» и «O3» обозначают оценку в контроле и спустя 5, 17 и 30 минут, соответственно. Справа – пиковые значения и область под кривой AMPA-рецептор-опосредованной проводимости. Звездочки указывают на существенное отличие от контрольного уровня (апостериорный тест Даннета).

Таким образом, и в гиппокампе, и в энторинальной коре период эпилептиформной активности *in vitro* приводил к увеличению AMPA-рецептор-опосредованного компонента синаптических ответов. Полученные нами данные согласуются с результатами патч-кламп экспериментов, выполненных после судорог, индуцированных *in vivo*. Так, пилокарпин-индуцированная эпилептическая активность *in vivo*, остановленная спустя 10 минут после появления судорог, соответствующих 5 степени по шкале Ричина, приводила к изменениям AMPA-рецептор-опосредованной синаптической передачи в гиппокампе (Rajasekaran, Todorovic and Karur, 2012). Потенцирование AMPA-рецептор-опосредованных токов наблюдалось также в срезах мозга 10-дневных крысят, полученных спустя 1 час после судорог *in vivo*, вызванных гипоксией. Применение *in vitro* модели позволило нам дополнить эти данные, продемонстрировав, что увеличение AMPA-рецептор-опосредованного компонента синаптических ответов происходит уже спустя минуты после остановки эпилептиформной активности.

Об изменении числа AMPA-рецепторов на постсинаптической мембране и их свойств в первые часы после периода эпилептиформной активности можно косвенно судить, опираясь на уровень поверхностной экспрессии белков субъединиц AMPA-рецепторов и данные о фосфорилировании сайтов S831 и S845. Фосфорилирование сайта S831 приводит к увеличению проводимости одиночных каналов, несущих в своем составе GluA1 субъединицу, а также способствует встраиванию GluA1-содержащих рецепторов в зону постсинаптического уплотнения; фосфорилирование сайта S845 увеличивает вероятность открытого состояния канала, а также способствует как встраиванию GluA1-содержащих рецепторов, так и продлевает время их пребывания в составе постсинаптической мембраны (Diering and Huganir, 2018). Фосфорилирование S831 и S845 сайтов GluA1 субъединицы наблюдалось спустя 1 час после судорог, вызванных пентилентетразолом, и спустя 24 часа после судорог, вызванных гипоксией (Rakhade *et al.*, 2012). В другом исследовании было замечено, что уровень поверхностной экспрессии субъединицы GluA1 был увеличен как следствие 40-минутного периода судорог, индуцированных пилокарпином 183 (Joshi *et al.*, 2017). Однако, другой характер экспрессии белка AMPA-рецепторов наблюдался через 3 часа после пилокарпин-индуцированных судорог: экспрессия субъединиц GluA1, GluA3 и GluA4 была понижена, в то же время наблюдалось повышение экспрессии субъединицы GluA2, в норме обеспечивающей непроницаемость AMPA-рецепторов для ионов Ca^{2+} , но теряющей это свойство в отсутствие ее редактирования по Q/R сайту (Russo *et al.*, 2013). В виду того, что степень редактирования GluA2 в этих экспериментах не оценивалась, данные о повышении экспрессии этой субъединицы могут быть истолкованы двояко, в том числе и как свидетельство усиления проводимости одиночных каналов AMPA-рецепторов за счет присутствия нередитированной формы GluA2 (Swanson, Kamboj and Cull-Candy, 1997). Также необходимо учитывать, что указанные изменения экспрессии GluA1, GluA3 и GluA4 оценивались для общей, а не поверхностной фракции белка, и только последние дают однозначный ответ на вопрос, приводит ли изменение общей экспрессии белка к изменениям на постсинаптической мембране. В целом, вышеприведенные данные об изменении экспрессии субъединиц AMPA-рецепторов согласуются с полученными нами данными и свидетельствуют в пользу гипотезы, что после периода эпилептиформной активности наблюдается встраивание дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование эпилепсии *in vitro* с помощью проэпилептического перфузирующего раствора в комбинированных срезах мозга крысы, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, позволяет индуцировать эпилептиформные разряды, демонстрирующие сходство с интериктальными и иктальными разрядами, наблюдаемыми у пациентов, страдающих височной эпилепсией. Применение 4-аминопиридин-содержащего проэпилептического перфузирующего раствора с высокой концентрацией ионов K^+ приводило к быстрому развитию эпилептиформного состояния в срезе: первые синхронизированные события наблюдались в течение первых 5 минут после подачи раствора. Всего за 20-минутный период регистрации (с момента подачи проэпилептического раствора) и в энторинальной коре, и в гиппокампе возникало в среднем около 4 иктальных разрядов. Согласно данным литературы, нейроны глубоких слоев энторинальной коры часто выступают в роли источника генерации иктальных разрядов (Avoli *et al.*, 2002), поэтому можно было ожидать, что первые эпилептиформные разряды также возникнут именно в энторинальной коре. Однако, в наших экспериментах по одновременной регистрации эпилептиформной активности в двух структурах первый всплеск постсинаптических токов регистрировался именно в гиппокампе, время его возникновения относительно начала подачи проэпилептического раствора составляло приблизительно 5 минут для энторинальной коры и 3 минуты для гиппокампа. В то же

время, иктальная активность в энторинальной коре была гораздо более продолжительной: доля, которую суммарное время иктальной активности составляло от общего времени регистрации, была значительно большей в энторинальной коре. Временная динамика спонтанной синаптической активности в энторинальной коре была проанализирована подробнее, что позволило выявить два типа эпилептиформных разрядов, устойчиво генерировавшихся в ходе развития эпилептиформной активности *in vitro*. Оценка синаптических проводимостей на протяжении каждого из разрядов показала, что в ходе эпилептиформных разрядов 1 типа наблюдалась преимущественно ГАМКа-рецептор-опосредованная проводимость, тогда как в случае эпилептиформных разрядов 2 типа ГАМКа-рецептор-опосредованная синаптическая проводимость являлась ведущей только на начальном этапе разряда, после чего, с небольшой задержкой, возрастала проводимость, опосредованная возбуждающими глутаматными рецепторами AMPA и NMDA типа (Amakhin *et al.*, 2016).

Таким образом, в наших экспериментах мы продемонстрировали, что гиппокамп оказывается активно вовлечен в генерацию иктальных разрядов. С другой стороны, согласно широко распространенной гипотезе, гиппокамп и зубчатая извилина выполняют важную функцию, сдерживая развитие эпилептиформной активности в срезе, поскольку генерируемые в них эпилептиформные разряды нарушают синхронизацию нейронов энторинальной коры и, таким образом, препятствуют генерации иктальных разрядов (M Barbarosie and Avoli, 1997). Учитывая подобную неоднозначность роли гиппокампа в генерации эпилептиформной активности, нам показалось важным ответить на вопрос, как именно подействует краткий период эпилептиформной активности на пирамидные нейроны гиппокампа.

Литературные данные указывают на то, что эпилептиформная активность может приводить к изменениям биофизических свойств нейронов в первые сутки и часы после воздействия, как было продемонстрировано в литий-пилокарпиновой и каинатной моделях эпилепсии (Minge and Bähring, 2011; Smirnova *et al.*, 2018). От мембранных свойств зависит, как именно нейрон трансформирует поступающие на нее сигналы в потенциалы действия. Поэтому, в первую очередь, мы проверили, не меняются ли биофизические свойства нейронов после 15-минутного периода эпилептиформной активности *in vitro*. В области CA1 гиппокампа не было выявлено ни изменений входного сопротивления, ни изменений других пассивных мембранных свойств, не изменились ни параметры частотно-токовой кривой, ни свойства самих потенциалов действия (Ergina *et al.*, 2021). Вероятнее всего, длительность эпилептиформной активности в наших экспериментах не была достаточной для того, чтобы повлиять на мембранные свойства нейронов.

Следующим нашим шагом было оценить базовый уровень синаптической передачи в гиппокампе после эпилептиформной активности – для этого мы использовали метод регистрации локальных полевых потенциалов. Регистрация и анализ полевых потенциалов, отводимых от радиального слоя области CA1 гиппокампа в ответ на стимулирующий ток разной интенсивности, показали, что уровень базовой синаптической передачи возрастал в 2 раза в срезах, перенесших эпилептиформную активность, по сравнению с контролем (Ergina *et al.*, 2021). Таким образом, краткого усиления ГАМКергической и глутаматергической передачи, наблюдаемого в ходе 15-минутной эпилептиформной активности, было достаточно для того, чтобы запустить процессы синаптической пластичности в гиппокампе. Увеличение базовой синаптической передачи могло быть вызвано перестройками как на пресинаптическом, так и на постсинаптическом уровне. К увеличению базовой синаптической передачи теоретически могло приводить и увеличение входного сопротивления нейронов, однако выполненная ранее оценка биофизических свойств показала, в том числе, что входное сопротивление нейронов не менялось, так что этот механизм не мог лежать в основе наблюдаемых изменений базовой синаптической передачи в гиппокампе. Вклад двух других возможных механизмов – пресинаптических и постсинаптических изменений – был последовательно проверен.

Оценка пресинаптических изменений в синапсах между нейронами CA3-CA1 гиппокампа проводилась с применением двух методов. Анализ частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) – регистрируемых в условиях, когда генерация потенциалов действия заблокирована, и возникающих вследствие высвобождения отдельных квантов медиатора – показал, что частота таких токов не менялась после периода эпилептиформной активности, что указывает на то, что вероятность высвобождения медиатора осталась неизменной. Регистрация ответов пирамидных нейронов на парный стимул, позволяющая рассчитать отношение амплитуд ответов на второй и первый стимулы и, таким образом, оценить изменения кратковременной синаптической пластичности (фасилитации или депрессии), продемонстрировала, что парное отношение амплитуд ответов не меняется. Таким образом, ни одним из вышеуказанных методов не было выявлено пресинаптических изменений в синапсах CA3-CA1 гиппокампа после периода эпилептиформной активности *in vitro*. Для оценки постсинаптических изменений оценивалось соотношение пиковых амплитуд возбуждающих постсинаптических токов, опосредованных двумя основными типами инотропных рецепторов: AMPA- и NMDA-рецепторами. Соотношение пиковых амплитуд возбуждающих постсинаптических токов (AMPA/NMDA соотношение) увеличилось после периода эпилептиформной активности (Ergina *et al.*, 2021). Наиболее вероятной причиной увеличения AMPA/NMDA соотношения служит встраивание дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану – широко изученный процесс, лежащий в основе формирования долговременной синаптической пластичности.

В энторинальной коре постсинаптические изменения после периода эпилептиформной активности *in vitro* были изучены подробнее. Было показано, что после периода эпилептиформной активности *in vitro* наблюдалось сильное увеличение как пиковой амплитуды (в 2 раза), так и площади под кривой (в 3 раза) AMPA-рецептор-опосредованных ответов нейронов глубоких слоев энторинальной коры. Наблюдаемая потенциация AMPA-рецептор-опосредованного компонента ответа сохранялась после прекращения эпилептиформной активности в течение получаса (Amakhin *et al.*, 2018a).

Согласно данным литературы, об изменении числа и свойств AMPA-рецепторов на постсинаптической мембране можно судить, опираясь на уровень поверхностной экспрессии белков субъединиц AMPA-рецепторов и данные о фосфорилировании сайтов S831 и S845, которое способствует встраиванию GluA1-содержащих рецепторов в постсинаптическую мембрану (Diering and Huganir, 2018). Фосфорилирование S831 и S845 сайтов GluA1 субъединицы наблюдалось спустя 1 час после судорог, вызванных пентилентетразолом, и спустя 24 часа после судорог, вызванных гипоксией, а уровень поверхностной экспрессии субъединицы GluA1 был увеличен после 40-минутного периода пилокарпин-индуцированных судорог (Rakhade *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2017). Вышеприведенные данные об изменении экспрессии субъединиц AMPA-рецепторов согласуются с полученными нами данными и свидетельствуют в пользу гипотезы, что после периода эпилептиформной активности наблюдается встраивание дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану.

Таким образом, и в гиппокампе, и в энторинальной коре наблюдалось увеличение AMPA-рецептор-опосредованного компонента синаптических ответов после краткого периода эпилептиформной активности *in vitro*.

ВЫВОДЫ

1. При использовании 4-АП *in vitro* модели в энторинальной коре и гиппокампе возникали как интериктальные, так и иктальные разряды. В обеих зонах наблюдались ГАМКергические токи в ходе интериктальных разрядов, а глутаматергические токи проявлялись во время иктальной активности. В гиппокампе ГАМКергические события преобладали. Иктальная активность в энторинальной коре была более продолжительной.

2. В энторинальной коре было выявлено два типа эпилептиформных разрядов, опосредованных либо сугубо активностью ГАМКа-рецепторов, либо же активностью ГАМКа-, AMPA- и NMDA-рецепторов. Во втором случае ГАМКа-рецепторы опосредовали ранний компонент ответа, тогда как AMPA- и NMDA-рецепторы – поздний компонент.
3. Вероятность высвобождения глутамата в синапсах энторинальной коры и области CA1 гиппокампа не изменилась после эпилептиформной активности *in vitro* в изучаемый период. Эпилептиформная активность *in vitro* не повлияла на пассивные и активные мембранные свойства пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа: входное сопротивление, потенциал покоя, временную константу мембраны, форму потенциалов действия, параметры частотно-токовой кривой, максимальную частоту спайкования, момент наступления деполяризационного блока.
4. Эпилептиформная активность *in vitro* приводила к постсинаптическим изменениям в нейронах энторинальной коры и области CA1 гиппокампа в изучаемый период: в нейронах обеих структур наблюдалось увеличение AMPA/NMDA-соотношения. В энторинальной коре было выявлено усиление AMPA-рецептор-опосредованного компонента ответов как в ходе эпилептиформной активности *in vitro*, так и в течение получаса после отмыва проэпилептического раствора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

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. 106. С. 1455-1478.
5. **Ergina J.L.**, Amakhin D.V., Postnikova T.Y., Soboleva E.B., Zaitsev A.V. Short-term epileptiform activity potentiates excitatory synapses but does not affect intrinsic membrane properties of pyramidal neurons in the rat hippocampus *in vitro*. *Biomedicines.* 2021. 9(10). 1374.

Тезисы докладов:

1. **Ергина Ю.Л.**, Амахин Д.В. Исследование синаптической активности в энторинальной коре головного мозга крысы на модели острой эпилепсии в переживающем срезе // VI Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». 2016. С.218-221.
2. **Ергина Ю.Л.**, Амахин Д.В. Исследование вклада возбуждающих и тормозных входов в реализацию эпилептоподобного состояния в переживающих срезах энторинальной коры и гиппокампа крысы // XIX Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». 2016. С.206-207
3. **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.
4. Амахин Д.В., Чижов А.В., **Ергина Ю.Л.**, Соболева Е.Б., Зайцев А.В. Изменения свойств синаптической передачи в ходе эпилептоподобного состояния *in vitro* // XXIII Съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова. С.392-393.

5. Соболева Е.Б., **Ергина Ю.Л.**, Амахин Д.В. Изменения *in vitro* AMPA-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
6. **Ергина Ю.Л.**, Амахин Д.В. Усиление AMPA-рецептор-опосредованной синаптической передачи в энторинальной коре в ходе острого судорожного состояния *in vitro* // *Актуальные проблемы биомедицины.* 2018. С.94-95
7. **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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. **Ергина Ю.Л.**, Зайцев А.В. Воздействие кратковременной эпилептиформной активности на глутаматергическую передачу между синапсами CA3-CA1 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.
12. **Ергина Ю.Л.**, Вылекжанина Е.Н. Влияние короткого периода эпилептиформной активности на свойства глутаматергической передачи между синапсами CA3-CA1 гиппокампа // *Актуальные проблемы биомедицины.* 2021. С.55–56.
13. **Ергина Ю.Л.**, Амахин Д.В., Вылекжанина Е.Н., Соболева Е.Б., Чижов А.В. Изменение свойств синаптической передачи в синапсах CA3-CA1 гиппокампа после короткого периода эпилептиформной активности *in vitro* // VII Съезд физиологов СНГ с международным участием. 2022. С.29.