

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Зайцев А.В.

Санкт-Петербург

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Эпилепсия и эпилептогенез	9
1.1.1. Эпилептическая активность и механизмы ее генерации	9
1.1.2. Вклад энторинальной коры в генерацию эпилептической активности....	13
1.1.3 Вклад гиппокампа в генерацию эпилептической активности.....	14
1.2. Модели <i>in vitro</i> и их классификация	17
1.2.1. Препараты мозга, используемые в <i>in vitro</i> исследованиях	17
1.2.2. Наиболее часто используемые модели эпилептической активности <i>in vitro</i>	19
1.2.3. Факторы, влияющие на возникновение эпилептической активности <i>in vitro</i>	22
1.3. Роль глутаматергической системы при эпилепсии и эпилептогенезе	23
1.3.1. Пресинаптические нарушения.....	24
1.3.2. Постсинаптические нарушения.....	26
1.3.3. Транспорт глутамата	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1. Объект исследования.....	39
2.2. Модель эпилептиформной активности в переживающем срезе.....	39
2.3. Электрофизиологические методы регистрации.....	40
2.3.1. Регистрация полевых постсинаптических потенциалов.....	40
2.3.2 Регистрация синаптической активности методом патч-кламп	41
2.4. Статистическая обработка.....	50
3. Результаты и обсуждение	52
3.1. Начало эпилептиформной активности в энторинальной коре и гиппокампе .52	52
3.2. Типы эпилептиформных разрядов в энторинальной коре	53
3.3. Эпилептиформная активность в гиппокампе	61
3.4. Одновременная регистрация эпилептиформной активности в коре и гиппокампе	63
3.5. Биофизические свойства пирамидных нейронов CA1 после периода эпилептиформной активности	68
3.6. Глутаматергическая передача между синапсами CA3-CA1 гиппокампа.....	75

3.6.1. Увеличение базовой синаптической передачи	75
3.6.2. Пресинаптические свойства	79
3.6.3. Постсинаптические характеристики.....	84
3.7. Глутаматергическая передача в энторинальной коре	86
3.7.1. Пресинаптические свойства	87
3.7.2. Постсинаптические свойства.....	87
3.8. Обсуждение обнаруженных постсинаптических изменений в энторинальной коре и гиппокампе	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	94
ВЫВОДЫ	98
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	99

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 4-АП – 4-аминопиридин
ACSF – искусственная спинномозговая жидкость
AMPA – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
AP5 – 2-амино-5-фосфовалериановая кислота
BDA – биотинилированный декстранамин
CA – Аммонов рог, область собственно гиппокампа
CC – режим фиксации тока
ССК – холецистокинин
CGE – каудальная область ганглиозного возвышения
CNQX – 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-дион
CsMeS – цезий метансульфонат
EAAT – транспортер глутамата
FV – пресинаптический спайк
КА – каиновая кислота
LTP – долговременная потенция
MGE – медиальная область ганглиозного возвышения
МК-801 – дизоциллин
NMDA – N-метил-D-аспарагиновая кислота
O-LM – *oriens-lacunosum moleculare*
TLE – височная эпилепсия
 V_{hold} – потенциал фиксации
VC – режим фиксации напряжения
VGLUT2 – везикулярный транспортер глутамата 2 типа
ВПСТ – возбуждающий постсинаптический ток
ГАМК – γ -аминомасляная кислота
мВПСТ – миниатюрный возбуждающий постсинаптический ток
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ПР – проэпилептический раствор
ЭК – энторинальная кора
ЭР – эпилептиформный разряд

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Височная эпилепсия – широко распространенная форма фокальной эпилепсии человека. Среди прочих форм фокальных эпилепсий она наиболее часто является фармакорезистентной [1], 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 [2–4]. В нескольких независимых исследованиях было продемонстрировано, что нейроны глубоких слоев энторинальной коры могут выступать в качестве источника эпилептической активности [5–7]. 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 [8]. Также эпилептическая активность может поступать из энторинальной коры в область СА1 напрямую по височно-гиппокампальному пути [9]. 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 [10]. В ряде исследований сообщалось, что собственная активность гиппокампа может препятствовать распространению эпилептической активности [11,12].

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 [13]. 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 [14,15]. 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 иктальная активность, превышающая по своей суммарной длительности иктальную 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 иктальная, так и интериктальная активность. В энторинальной коре наблюдалась более длительная иктальная 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» (Санкт-Петербург, 2016), XIX Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016), XXIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017» (Санкт-Петербург, 2017), XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2018» (Санкт-Петербург, 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» (Санкт-Петербург, 2019), XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2020» (Санкт-Петербург, 2020), 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).

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 (глава включает в себя 3 раздела и 9 подразделов), описания материалов и методов (глава включает в себя 4 раздела и 2 подраздела), результатов и обсуждения (глава включает в себя 7 разделов и 5 подразделов), заключения, выводов и списка использованных источников. Диссертация содержит 29 рисунков. Прилагаемый список литературы включает 353 литературных источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпилепсия и эпилептогенез

1.1.1. Эпилептическая активность и механизмы ее генерации

Эпилепсия – одно из самых распространенных неврологических заболеваний, которым страдает около 1% населения планеты [16]. Под этим термином понимают широкий спектр расстройств, характеризующихся появлением спонтанных повторяющихся эпилептических приступов различной степени тяжести [17]. Височная эпилепсия – наиболее распространенная форма эпилепсии у взрослых [18]. У пациентов, страдающих височной эпилепсией, эпилептическая активность часто носит фокальный характер, хотя в ряде случаев наблюдаются вторично генерализованные эпилептические приступы. У большинства пациентов эпилептический очаг локализован в медиальных структурах височной доли: гиппокампе, амигдале или парагиппокампальной извилине. Фармакологическая терапия не всегда позволяет справиться с эпилептическими приступами, фармакорезистентность наблюдается у 25–30% пациентов – в этом случае показано хирургическое лечение [19].

Экспериментальные и клинические исследования показали, что нервная ткань у пациентов с эпилепсией и экспериментальных животных отличается от нормальной нервной ткани на молекулярном уровне [20]. Хронический процесс, сопровождающийся биохимическими и структурными изменениями, в результате которого нервная ткань приобретает способность генерировать спонтанные эпилептические разряды, получил название эпилептогенеза. Под этим термином обычно подразумевают период от воздействия провоцирующего фактора, такого как травма или инсульт, до возникновения первого эпилептического приступа. Традиционно, выделяют три основных фазы эпилептогенеза: острое повреждение головного мозга (воздействие провоцирующего фактора), латентный период, в ходе которого происходит «созревание» эпилептического очага, и собственно эпилепсия [21]. К провоцирующим факторам высокого риска относятся: черепно-мозговая травма, инсульт, эпилептический статус, повторяющиеся и продолжительные фебрильные судороги, церебральный тромбоз и нейроинфекции; поэтому нейробиологические основы эпилептогенеза часто исследуются путем экспериментального моделирования таких повреждений [22]. Воздействие провоцирующего фактора приводит к повышенной активности нейронов, накоплению внутриклеточного кальция, эксцитотоксичности, запуску сигнальных каскадов, изменениям экспрессии генов. В последующие дни в области травмы развиваются воспалительные процессы, активируются медиаторы воспаления, запускается активность

глиальных и эндотелиальных клеток. На более поздней стадии эпилептогенеза происходят процессы роста: отрастание новых аксонов, синаптогенез и ангиогенез. Следствием этих процессов является перестройка микроархитектуры нервной ткани [23]. Обычно латентная фаза эпилептогенеза представляет собой клинически тихий период. Инвазивность многих современных методов не позволяет применять их для изучения механизмов эпилептической активности, наблюдаемой непосредственно у пациентов, что ограничивает наши знания о конкретных процессах, отвечающих за появление, распространение и прекращение эпилептической активности. Исследования нервных тканей, полученных либо посмертно либо при хирургическом лечении эпилепсии, показали, что хроническая фаза эпилепсии ассоциирована с появлением структурных изменений – разрастанием мшистых волокон в гиппокампе, астроглиозом, гибелью нервных клеток в отдельных областях мозга. Тем не менее, возникновение эпилептической активности возможно и в отсутствие этих изменений – в ходе острых эпизодов эпилептической активности, наблюдаемых после травматического воздействия, в результате реакции на определенные фармакологические агенты, вызванных скачком температуры и гипоксией в детском возрасте (фебрильные судороги). Все это указывает на то, что даже нормальная нервная ткань при определенных условиях обладает потенциальной способностью генерировать эпилептические разряды. *In vivo* и *in vitro* модели острой эпилептиформной активности имитируют подобные состояния, однако остается неясным, насколько точно они способны повторять процессы, наблюдающиеся в человеческом мозге.

В нескольких *in vitro* исследованиях сообщалось, что регистрируемая интериктальная активность была опосредована работой ГАМК_A-рецепторов. В частности, одновременная регистрация активности как интернейронов, так и пирамидных нейронов медиальной энторинальной коры в бикикуллиновой *in vitro* модели показала, что предиктальные события сопровождалась активностью интернейронов, в то время как пирамидные нейроны еще не генерировали потенциалов действия [24]. Что касается гиппокампа, то визуализация транзистентных кальциевых сигналов показала, что в ходе интериктальной активности большинство кальциевых сигналов берут свое начало в слое *stratum oriens*, содержащем тела *oriens lacunosum-moleculare* и аксо-аксональных интернейронов [25].

Хотя сам факт вовлечения интернейронов в генерацию интериктальных разрядов отмечался неоднократно, вклад, который эти разряды вносят в развитие эпилептиформного состояния, остается широко дискутируемым вопросом. Согласно одной из возможных интерпретаций, активность интернейронов носит сдерживающий

характер и препятствует развитию эпилептиформного состояния. В частности, в нескольких исследованиях было показано, что активность интернейронов значительно усиливается в период, предшествующий началу иктального разряда, однако затем сменяется длительным деполяризационным блоком, в то время как пирамидные клетки активно генерируют потенциалы действия; при этом отмечалось, что активность интернейронов могла быть вторичной по своей природе и быть следствием повышения активности глутаматергических нейронов [26–28]. Переход к иктальной активности связан, по этой гипотезе, с усиленным выбросом глутамата и увеличением внеклеточной концентрации ионов K^+ , происходящих из-за активного спайкования глутаматергических клеток. Однако, эти наблюдения удалось повторить далеко не во всех исследованиях.

Новые данные, полученные с применением оптогенетического подхода, также не дают однозначного ответа на вопрос, какую роль играют интернейроны в развитии эпилептиформного состояния. В *in vivo* модели оптогенетическая активация парвальбуминовых интернейронов подавляла каинат-индуцированную иктальную активность [29], тогда как в моделях *in vitro* их же оптогенетическая активация вызывала спонтанные иктальные события [30,31]. Противоречивы и результаты исследования Sessolo M. и соавторов, где в рамках одной и той же модели удалось получить разнонаправленный ответ оптогенетической стимуляции парвальбуминовых интернейронов: она либо способствовала распространению иктальных разрядов, либо препятствовала, в зависимости от того, насколько далеко активируемые парвальбуминовые интернейроны располагались от очага возникновения эпилептиформной активности [32]. Наконец, однозначный проэпилептический эффект наблюдался в исследовании, где кратковременная активация ГАМК_A-рецепторов (путем оптогенетической стимуляции или с помощью локальной аппликации ГАМК) инициировала иктальные события в двух *in vitro* моделях, в *in vivo* 4-аминопипидиновой модели, а также в срезах новой коры, полученной постоперационно от пациентов, страдающих эпилепсией [33]. Последствия активации парвальбуминовых интернейронов могут зависеть от пространственно-временных характеристик их активации, поскольку было замечено, что переключение между антиэпилептическим и проэпилептическим эффектом происходило при изменении временного интервала фотостимуляции интернейронов относительно начала иктального разряда: в пилокарпиновой модели фотодеполяризация интернейронов уменьшала длительность иктального разряда, если она была запущена одновременно с началом разряда, но приводила к удлинению разрядов, если ее включение было задержано на несколько секунд [34].

Неоднозначность роли, которую ГАМКа-рецептор-опосредованная синаптическая активность играет в развитии эпилепсии, могла бы объяснить гипотеза о том, что, в определенных условиях, ГАМК обладает деполяризующим эффектом. Согласно этой гипотезе, увеличение внутриклеточной концентрации ионов Cl^- может смещать эквивалентный потенциал для ГАМКа-рецептор-опосредованных токов до значений, превышающих величину потенциала покоя мембраны, и открытие каналов ГАМКа-рецепторов перестает эффективно гиперполяризовать пирамидные нейроны. Поскольку активация дендритных рецепторов чаще оканчивается деполяризацией, было предположено, что накопление ионов Cl^- в дендритах происходит быстрее, чем в соме [35]. Что касается неонатальных судорог, накопление ионов Cl^- может быть связано с высокой активностью NKCC1 котранспортера в незрелых нейронах, который импортирует в клетку ионы Na^+ , K^+ и Cl^- [36]. ГАМКа-рецептор-опосредованной деполяризации могут также способствовать HCO_3^- -токи, которые имеют потенциал реверсии, близкий к положительным значениям (от -10 до -15 мВ) [37]. Кроме того, активация постсинаптических ГАМКа-рецепторов может повышать внеклеточную концентрацию K^+ [38], что деполяризует соседние клетки и способствует эпилептиформной активности. K^+ может поступать во внеклеточную среду через потенциал-зависимые K^+ -каналы, открывающиеся во время интенсивной спайковой активности; также повышение внеклеточной концентрации K^+ связывают с работой KCC2 котранспортера, выкачивающего ионы K^+ и Cl^- после ГАМКа-рецептор-опосредованного притока Cl^- в пирамидные клетки. Наконец, HCO_3^- -зависимая деполяризация может приводить к активации потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [39].

С другой стороны, еще в начале 1960-ых годов было высказано предположение, что ГАМКергические связи способствуют синхронизации нейрональных ансамблей во время генерации основных мозговых ритмов. Позже было показано, что для генерации гамма-осцилляций, вызываемых в условиях *in vitro*, требуется ГАМКа-рецептор-опосредованное торможение, а потенциалы действия, генерируемые быстроразряжающимися интернейронами, привязаны к конкретной фазе этих осцилляций, что, вместе с результатами компьютерного моделирования, позволило предположить, что интернейронные сети играют ключевую роль в синхронизации спайкования пирамидных нейронов в ходе гамма-осцилляций [40]. Впрочем, также существует мнение, что синхронизация активности пирамидных клеток области СА3, залпы потенциалов действия которых наблюдаются во время высокочастотных колебаний в гиппокампе, связана с наличием между ними рекуррентных возбуждающих связей, а не с работой интернейронов [41].

Таким образом, согласно существующим на сегодняшний день гипотезам, переходу к иктальной активности могут способствовать усиленный выброс глутамата, увеличение внеклеточной концентрации ионов K^+ , деполяризационный блок активности интернейронов (связанный с истощением запасов ГАМК либо с чрезмерной деполяризацией интернейронов) синхронизация активности интернейронов, а также деполяризующее действие ГАМК.

Механизмы, лежащие в основе поддержания иктальной активности, в настоящее время активно изучаются. Неоднократно отмечалось, что иктальные разряды в моделях *in vitro* генерируются с определенной периодичностью. Установлено, что иктальный разряд сложно подавить сразу после его возникновения, в частности, фотостимуляция интернейронов непосредственно в ходе разряда демонстрировала наименьшую эффективность [31]. Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные указывают на то, что как у пациентов, так и в моделях эпилепсии, отдельно взятый иктальный разряд с высокой вероятностью прекращается самостоятельно [42,43]. Точные механизмы, обеспечивающие остановку разряда, неизвестны.

1.1.2. Вклад энторинальной коры в генерацию эпилептической активности

Энторинальная кора, расположенная в передней части парагиппокампальной извилины, весьма консервативна по своей структуре, и у разных видов имеет схожее строение. В энторинальной коре выделяют шесть клеточных слоев, при этом IV слой отличается малым числом клеток и выступает границей между богатыми клетками поверхностными (II и III) и глубокими (V и VI) слоями [44]. Для цитоархитектурной организации латеральной энторинальной коры характерна кластеризация нейронов II слоя в форме широких островков, менее выраженный слой III и глубокие слои, тогда как в медиальной энторинальной коре, расположенной каудальнее и медиальнее латеральной, слои организованы более гомогенно. Известно, что медиальная энторинальная кора выполняет роль интерфейса между гиппокампальной формацией и областями новой коры: в медиальную энторинальную кору поступает информация от мультисенсорных ассоциативных височных и затылочных областей [45].

Нейрохирургические данные, а также результаты имиджинга указывают на то, что парагиппокампальная область глубоко вовлечена в патогенез эпилепсии [46–48]. Например, у некоторых пациентов, страдающих височной эпилепсией, эпилептиформная активность появлялась вначале в энторинальной коре, а потом уже в гиппокампе; в энторинальной коре при этом наблюдались атрофические изменения [5]. Более того, степень атрофии энторинальной коры коррелировала со степенью гиперсинхронизации

активности, регистрируемой в энторинальной коре и гиппокампе. Эти данные позволяют предположить, что энторинальная кора может служить источником генерации эпилептиформной активности, распространяющейся затем в другие лимбические структуры. Тот факт, что в нескольких моделях височной эпилепсии наблюдалась выраженная уязвимость нейронов III слоя энторинальной коры, наряду с данными о том, что повреждение нейронов энторинальной коры становилось необратимым уже спустя 48 часов после продолжительного периода эпилептиформной активности [49,50], позволяет предположить, что структурные изменения, происходящие в энторинальной коре, являются важным звеном раннего этапа эпилептогенеза.

На переживающих срезах, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, было показано, что иктальные разряды, вызываемые разными способами (повышенной концентрацией K^+ , пониженной концентрацией Mg^{2+} и 4-аминопиридином), чаще всего генерируются в энторинальной коре и отсюда распространяются в области CA1 и CA3 гиппокампа [6,7]. *In vitro* исследования, опирающиеся на использование изолированного мозга, также подтвердили роль энторинальной коры в генерации иктальных разрядов [51].

1.1.3 Вклад гиппокампа в генерацию эпилептической активности

Гиппокамп – важная часть археокортекса. У млекопитающих это трехслойная структура, расположенная на медиальной поверхности височной доли головного мозга. Будучи важной частью лимбической системы, гиппокамп играет жизненно важную роль в осуществлении поведенческих и эмоциональных реакций, а также процессов памяти. Ему присуще наличие синхронизированных осцилляций, наблюдаемых как в физиологических, так и в патофизиологических условиях: тета-ритмы, гамма-ритмы, а также высокочастотные осцилляции и эпилептические разряды. Следовательно, гиппокамп может быть вовлечен в патогенез височной эпилепсии [52]. Высокочастотные осцилляции, находящиеся в диапазоне 80–200 Гц, регистрируются как в нормальном, так и в эпилептическом гиппокампе. Высокочастотные осцилляции большей частоты (200–600 Гц) рассматривают исключительно как патологический феномен [10].

Мультимодальная сенсорная информация поступает в гиппокампальную формацию от нейронов, расположенных в поверхностных слоях энторинальной коры (слои II и III) (рис. 1). Зубчатая извилина контролирует вход информации из энторинальной коры в области CA1-CA3 гиппокампа. Область CA1 получает как информацию от CA3 через коллатерали Шаффера, так и дополнительную сенсорную информацию непосредственно от пирамидных нейронов III слоя энторинальной коры через височно-гиппокампальный

(ТА) путь, что позволяет области CA1 выступать в роли интегратора. Из области CA1 информация передается обратно в энторинальную кору на нейроны V слоя [53].

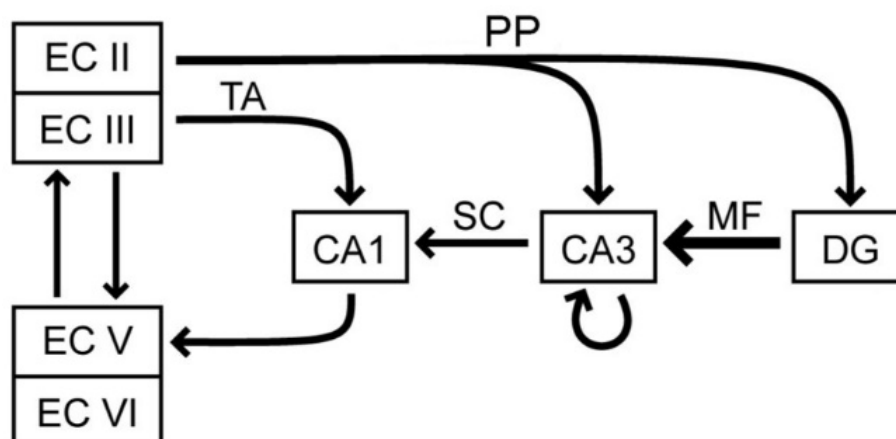


Рисунок 1. Схема возбуждающих связей между областями гиппокампальной формации.

EC (entorhinal cortex) – энторинальная кора; CA1, CA3 (Cornus Ammonius 1, 3) – области гиппокампа; DG (dentate gyrus) – зубчатая извилина; PP (perforant pathway) – перфорантный путь; TA (temporoammonic pathway) – височно-гиппокампальный путь; MF (mossy fibers) – мшистые волокна; SC (Schaffer collaterals) – коллатерали Шаффера. Воспроизведено с модификациями по [54].

Наличие трисинаптической петли связей между энторинальной корой и гиппокампом приводит к тому, что парагиппокампальный регион способен быть очагом эпилептиформной активности. Иктальная активность может инициироваться в энторинальной коре и распространяться через зубчатую извилина в область CA3 и/или CA1. Кроме того, из-за афферентов, идущих от CA1 в энторинальную кору через субикулум, возбуждение может затем повторно войти в энторинальную кору в CA1 [9,51]. Также было замечено, что иктальная активность может идти напрямую из энторинальной коры в CA1 [55], либо же возникать в зубчатой извилине и впоследствии достигать энторинальной коры [8,56]. Также существует гипотеза, согласно которой локальных связей в гиппокампе может быть достаточно для устойчивой генерации эпилептиформной активности. Данная гипотеза опирается на данные о том, что, хотя пирамидные нейроны области CA1 и имеют мало прямых рекуррентных связей друг с другом, их коллатерали рекуррентно иннервируют многие интернейроны в *s. oriens/pyramidale* [57]. Соответственно, в условиях, когда ГАМК оказывает деполяризующее действие, ГАМКергические интернейроны в *s. oriens/pyramidale* способны синхронно возбуждать

пирамидные нейроны, которые, в свою очередь, обеспечат feedback возбуждение этих интернейронов, замыкая, таким образом, систему положительной обратной связи, что будет поддерживать эпилептическую активность в гиппокампе [58].

Согласно многочисленным наблюдениям, эпилептизация нервной ткани сопровождается повышением возбудимости пирамидных нейронов CA1 и CA3 областей [59–61]. Пирамидные нейроны области CA3 генерируют залпы потенциалов действия, обеспечивая сильную и синхронизированную активацию пирамидных нейронов области CA1 [62]. Увеличение доли пирамидных нейронов области CA1, генерирующих залпы потенциалов действия, было замечено в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии [63–65]. В то время как в контрольных срезах ортодромная активация нейронов CA1 вызывала только одиночный популяционный спайк, в эпилептических срезах наблюдалась генерация залпов популяционных спайков по типу «все или ничего» [63]. Нейроны, генерирующие залпы потенциалов действия, предположительно могут вовлекать другие нейроны в синхронизированную популяционную активность, выступая в качестве инициаторов эпилептиформных разрядов и водителей ритма [65].

Активность относительно единообразных пирамидных нейронов находится под контролем ГАМКергических интернейронов, классификация которых до сих пор является предметом споров [66–68]. Торможение влияет на порог активации пирамидных клеток, паттерн генерации потенциалов действия, величину синаптической силы [69]. Регулируя активность пирамидных клеток, интернейроны способны синхронизировать сетевую активность. Более 21 типа тормозных интернейронов было выявлено в области CA1 гиппокампа [67]. Наиболее полно изучены корзинчатые клетки, аксоны которых заканчиваются на телах и проксимальных дендритах пирамидных клеток. Корзинчатые клетки влияют на пирамидные клетки, регулируя временные характеристики спайкования, скорость осцилляции, синхронизацию активности. Аксо-аксональные клетки [70] оканчиваются исключительно на начальных сегментах аксонов, модулируя инициацию потенциалов действия. ГАМКергические терминали аксонов бистратифицированных клеток [69], сонаправлены глутаматергическим терминалям коллатералей Шаффера, идущим к дендритам пирамидных клеток CA1, поэтому активация этих интернейронов обеспечивает торможение конкретного нервного пути. O-LM клетки (*oriens-lacunosum moleculare*) [71] функционируют сходным образом, обеспечивая специфическое ингибирование пути, оканчивающегося в другой дендритной области – на апикальном холмике, который преимущественно иннервируется глутаматергическими афферентами, приходящими из энторинальной коры и таламуса. С применением каинатной и пилокарпиновой моделей эпилепсии было показано, что в гиппокампе экспериментальных

крыс усилено соматическое и ослаблено дендритное торможение [72]. В более позднем исследовании было предположено, что ослабление дендритного торможения может быть следствием потери О-ЛМ клеток. Однако, помимо потери О-ЛМ клеток, наблюдалась также и гибель аксо-аксональных клеток, что должно было ослабить и перисоматическое торможение, повлиять на механизм генерации потенциалов действия [73]. Сообщалось также, что в гиппокампе пилоткарпиновых крыс утрачено ГАМКергическое торможение, осуществляемое холецистокинин-содержащими корзинчатыми клетками (ССК-клетками) [74]. Потеря ССК-содержащих ГАМКергических терминалей на гранулярных клетках была описана и в зубчатой извилине [75].

Роль тормозных интернейронов в синхронизации гиппокампальной сетевой активности была изучена в *in vitro* модели, в которой для вызова эпилептиформных разрядов использовался краткий эпизод (0,5 с) тетанической стимуляции [76]. Эксперименты с одновременным отведением синаптической активности показали, что интернейроны, расположенные в *stratum lacunosum–moleculare* и *stratum radiatum*, были малоактивны в ходе эпилептиформных разрядов. В то же время, большинство интернейронов в *stratum oriens* и *stratum pyramidale* демонстрировали высокий уровень активности, причем генерируемые ими потенциалы действия были крайне синхронны потенциалам, генерируемым пирамидными клетками. Кроме того, повреждение *stratum lacunosum–moleculare* и *stratum radiatum* не оказывало существенного влияния на синхронизацию сетевой активности, оцениваемой в двух точках методом регистрации полевых потенциалов, в то время как повреждение *stratum oriens* и *stratum pyramidale* несколько нарушало синхронизацию. Эти данные также свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что пирамидные клетки и интернейроны *s. oriens/pyramidale* образуют систему положительной обратной связи, отвечающую за синхронизацию нейронов.

1.2. Модели *in vitro* и их классификация

1.2.1. Препараты мозга, используемые в *in vitro* исследованиях

Переживающие срезы мозга грызунов. При изучении эпилептоподобной активности широко используются комплексные срезы, в которых частично сохранены связи между отдельными структурами: между энторинальной корой и гиппокампом [77], между энторинальной корой, гиппокампальной формацией и миндалиной [78], между неокортексом и таламусом [79], между передней частью поясной извилины и медиальным таламусом [80], между двумя гиппокампами [81].

Эпилептическую активность в переживающих срезах можно регистрировать несколькими способами. Регистрация полевых потенциалов используется для изучения

популяционных свойств [82], внутриклеточная регистрация (с помощью острых микроэлектродов или патч-электродов) [83] позволяет более тонко оценивать синаптическую активность нейрона [84], свойства ионных каналов [85] и т.д. Если исследуемый нейрон был заполнен красителем, его можно идентифицировать и соотнести его морфологические свойства (например, вид дендритного и аксонального дерева) с его электрофизиологическими характеристиками. С помощью кальциевого имиджинга можно измерять динамику внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в отдельных клеточных компартментах (дендритах, шипиках), или же функциональную активность нейронных сетей. Таким образом, переживающие срезы подходят для проведения междисциплинарных исследований.

К недостаткам переживающих срезов можно отнести следующее. Во-первых, такие срезы претерпевают короткий период гипоксии и механических повреждений, что может в дальнейшем повлиять на свойства изучаемых клеток [86]. Во-вторых, известно, что одним из последствий изоляции изучаемых структур мозга является резкое снижение спонтанной синаптической активности [87]. Это важно учитывать при использовании срезов неокортекса, поскольку в этих областях коры именно внешние синаптические входы обычно выступают в роли основного источника возбуждения. Снижение спонтанной активности не столь критично, например, при использовании срезов гиппокампа, поскольку нужный уровень возбуждения может быть получен за счет его локальных нейронных сетей. С другой стороны, хотя ключевые глутаматергические и ГАМКергические синаптические связи сохраняются в гиппокампальных срезах, в них оказываются перерезанными связи, оказывающие модулирующее воздействие (дофаминергические, серотонинергические, холинергические и т.д.). В-третьих, горизонтальный срез мозга взрослой крысы, толщиной 400 мкм, составляет менее одной десятой всей структуры гиппокампа. Поскольку аксоны нейронов гиппокампа могут ветвиться вдоль его продольной оси [88], часть внутренних гиппокампальных связей оказывается утеряна. Наконец, время жизни среза составляет всего 6-12 часов. В работе [89] было показано, что здоровое состояние клеток гиппокампа и коры поддерживается только первые 4 часа.

Изолированный гиппокамп и изолированный мозг. В ряде исследований, в том числе исследований эпилептоподобной активности, используются *in vitro* модели на основе изолированного гиппокампа грызунов [90,91] и изолированного мозга морской свинки [92]. Эти модели позволяют оценить вклад различных структур мозга в исследуемый процесс, они были разработаны для преодоления методологических ограничений, связанных с использованием переживающих срезов. Показано, что в

изолированном мозге морской свинки *in vitro* сохраняются связи между диэнцефалическими и телэнцефалическими структурами обоих полушарий [93]. Более того, сохраняются сосудистая система, гематоэнцефалический барьер и их взаимодействие с паренхимой головного мозга [94–96]. Изолированный мозг удобен для изучения направлений распространения эпилептоподобной активности, также его можно использовать для изучения связи между активностью нейронов и внеклеточными/гематоэнцефалическими/сосудистыми компартментами в ходе генерации паттернов эпилептоподобной активности; изолированный гиппокамп интересен тем, что демонстрирует спонтанную активность [87]. Тем не менее, изучение клеточных механизмов генерации и распространения эпилептоподобной активности, которое легко осуществимо в более простых *in vitro* моделях, сложно реализовать в изолированном гиппокампе и изолированном мозге.

Органотипическая культура гиппокампа. Преимуществом использования органотипической культуры гиппокампа по сравнению с переживающими срезами мозга является стабильный уровень здоровых клеток в течение нескольких недель. Однако следует иметь в виду, что в процессе культивирования происходит существенная перестройка синаптических связей [97]. В культуре со временем растет число рекуррентных взаимодействий, поэтому усиливается и эпилептическая активность. Сначала наблюдается интериктальная активность, через пару недель уже происходят иктальные разряды [98]. Поэтому органотипическая культура удобна для исследования механизмов эпилептогенеза. Методика приготовления органотипической культуры подробно описана в работе [99].

1.2.2. Наиболее часто используемые модели эпилептической активности *in vitro*

Модели, основанные на подавлении тормозной активности. Фармакологическое подавление торможения применяется в исследованиях эпилептоподобной активности достаточно давно [100]. Для этой цели обычно используют бикикуллин и пикротоксин – антагонисты ГАМК_A-рецепторов. Было показано, что в отсутствие ГАМК_A-рецептор-обусловленной синаптической передачи могут возникать синхронизированные интериктальные разряды [101,102]. В дальнейшем было подтверждено, что регистрируемые разряды связаны с глутаматергической синаптической передачей, а именно обусловлены активностью AMPA/KA- и NMDA-рецепторов [103]. Как правило, для генерации иктальных разрядов в таких моделях требуются дополнительные фармакологические воздействия (по крайней мере, в срезах мозга взрослых животных),

например, повышение $[K^+]_o$ до 5 мМ [104]. Однако в срезах мозга молодых животных можно зарегистрировать иктальные события, используя перфузирующий раствор с $[K^+]_o = 3.5$ мМ [105]. Кроме того, используя антагонисты ГАМК_A-рецепторов, иктальные разряды удалось получить в области СА1 в срезах мозга взрослых морских свинок [106]. Таким образом, этот тип *in vitro* моделей не слишком подходит для изучения иктогенеза, но его можно использовать для изучения изменений возбуждающей активности, характерных для хронической эпилепсии [107].

4-аминопиридиновая модель. 4-аминопиридин блокирует несколько типов калиевых каналов, из них наибольшую роль в ткани мозга играют калиевые каналы DR- и А-типов [108,109]. Хотя механизм конвульсионного действия 4-аминопиридина все еще требует дальнейших исследований, общепринятой считается гипотеза о том, что блокада калиевых каналов приводит к увеличению ширины спайков пресинаптического нейрона из-за задержки реполяризации и к повышению концентрации кальция в силу деполяризации нейрона. В результате этих процессов усиливается выброс медиатора [110,111], за счет чего возникает эпилептоподобная активность [110].

Добавление 4-аминопиридина в перфузирующий раствор позволяет быстро вызывать как интериктальную, так и иктальную активность в нервной ткани [112]. Еще одним преимуществом модели является возможность изучения роли ГАМК_A-рецепторов в эпилептогенезе с помощью этой модели, поскольку 4-аминопиридин не нарушает их работу [113]. Представляет интерес то, что регистрируемые в 4-аминопиридиновой модели медленные интериктальные разряды блокируются бикикуллином, антагонистом ГАМК_A-рецепторов [61].

Каинатная модель. Каинат обладает широким спектром действия, демонстрируя как пресинаптический, так и постсинаптический эффект, поэтому остается неясным, чем именно обусловлена его эпилептогенность [114–116]. Каиновая кислота может деполяризовать пирамидные нейроны зоны СА3 гиппокампа [117] и интернейроны [118], которые экспрессируют каинатные рецепторы, с другой стороны, может оказывать пресинаптическое воздействие на глутаматергические и ГАМКергические терминалы [115], а также на ионные каналы [119].

В работе на интактном гиппокампе было показано, что при введении каиновой кислоты даже возникает «зеркальный» очаг эпилептоподобной активности в контралатеральном гиппокампе [60]. Несмотря на проэпилептический эффект каината *in vivo* [114] и его способность вызывать тонико-клонические разряды, подобные иктальным, при наномолярных концентрациях *in vitro* [120], каинат не получил широкого

распространения в исследованиях эпилептоподобной активности в переживающих срезах гиппокампа.

Модель с пониженной концентрацией внеклеточного Mg^{2+} . Такой тип моделей в первую очередь основан на потенцировании NMDA-рецепторов за счет снижения эффективности их магниевого блока. Показано, что в переживающих гиппокампальных срезах мозга крысы снижение внеклеточной концентрации Mg^{2+} ведет к появлению повторяющихся краткосрочных разрядов, по своим свойствам напоминающих интериктальные. Длительность таких разрядов составляет от 30 до 120 мс, они возникают в области СА3 и распространяются в область СА1 гиппокампа, обычно не затрагивая зубчатую извилину [121]. Роль NMDA-рецепторов в генерации эпилептоподобной активности в рамках этой модели подтверждается экспериментальными данными об успешном подавлении регистрируемых спонтанных и вызванных эпилептоподобных разрядов после добавления в перфузирующий раствор антагониста NMDA-рецепторов AP5 [122]. Понижение внеклеточной концентрации Mg^{2+} до 0,2, 0,1 или номинально 0 ммоль/л позволяет индуцировать спонтанную эпилептиформную активность в изолированном гиппокампе, полученном от новорожденных мышей [123]. В этом исследовании также было продемонстрировано, что снижение $[Mg^{2+}]_o$ до 0,2 ммоль/л и повышение $[K^+]_o$ до 5 ммоль/л в изолированном гиппокампе мышей на 3–4 дни жизни приводит к появлению высоко воспроизводимой спонтанной эпилептоподобной активности, которая частично блокируется применением антагониста NMDA-рецепторов CPP. Добавление CPP (10 мкмоль/л) в перфузирующий раствор приводило к обратимому исчезновению иктальных разрядов, в то время как интериктальные события продолжали наблюдаться. Добавление CPP в сочетании с блокатором AMPA-рецепторов CNQX в 5 из 7 экспериментов приводило к полному исчезновению эпилептоподобной активности [123]. Модель пониженного магния широко используется в исследованиях на клеточных культурах. Используя культуральную среду с низким содержанием Mg^{2+} , Jiang Q. с соавторами показали, что ранняя эпилептиформная активность приводит к временному снижению экспрессии GluN2B субъединицы на 7 день культивирования [124].

Модель с повышенной концентрацией внеклеточного K^+ . Повышенная концентрация K^+ в перфузирующем растворе приводит к возникновению эпилептоподобной активности [125]. В работе [126] показано, что при повышенной концентрации K^+ на фоне пачечной активности пирамидных нейронов гиппокампа наблюдаются NMDA-рецептор опосредованные токи вследствие сдвига равновесного потенциала K^+ . Модель повышенной концентрации K^+ может быть использована для исследования роли астроцитов в эпилептогенезе, поскольку они отвечают за буферизацию

K^+ , тем самым влияя на возбудимость нейронов. Поскольку изменения концентрации K^+ недостаточно, чтобы вызвать иктальные разряды, этот фактор чаще используют совместно с другими, к примеру, с 4-аминопиридином [61] или с пониженной концентрацией Mg^{2+} [127].

1.2.3. Факторы, влияющие на возникновение эпилептической активности *in vitro*

При выборе модели необходимо учитывать возможную роль выключенного компонента системы в исследуемом процессе. К примеру, бикикуллиновая модель не подходит для изучения роли интернейронов в генерации эпилептических событий, поэтому такие исследования обычно проводятся с использованием 4-аминопиридиновой модели [31,128]. Модель пониженной концентрации Mg^{2+} не позволяет изучить роль NMDA-рецепторов, 4-аминопиридиновую модель необходимо с осторожностью применять для исследования пресинаптических процессов.

В работах на гиппокампальных и неокортикальных переживающих срезах с использованием нескольких *in vitro* моделей было показано, что характер вызванной эпилептоподобной активности зависит от возраста исследуемого животного. Эпилептоподобная активность чаще возникала у молодых животных по сравнению с животными более старших возрастных групп (23-26, 41-47 дни жизни), а иктальные события у 41-47-дневных животных были менее продолжительны по сравнению с более молодыми животными [129].

Свой вклад в эффективность той или иной *in vitro* модели вносят и другие экспериментальные условия – температура, скорость протока аэрируемого раствора, кислотность и осмолярность раствора.

Осмолярность перфузирующего раствора существенно сказывается на возбудимости сети, поэтому должна быть строго выдержана не только в ходе эксперимента, но и на подготовительной стадии [130]. Оптимальной является осмолярность 290 мОсм/л, понижение осмолярности уже на 10% приводит к набуханию клеток, уменьшению межклеточного пространства, повышению возбудимости нейронов и появлению эпилептиформной активности [131]. Повышенная осмолярность приводит к сморщиванию клеток, что препятствует формированию эпилептиформной активности.

Еще одним фактором, который необходимо учитывать в электрофизиологическом эксперименте, в том числе на моделях эпилептиформной активности *in vitro*, является кислотность перфузирующего раствора. Оптимальным является pH 7,4. Повышение кислотности приводит к понижению возбудимости, тогда как в щелочном растворе

наблюдается повышенная возбудимость нейронов [132]. Кислотность изменяет проводимость каналов синаптических рецепторов, в частности, повышение кислотности приводит к уменьшению NMDA-рецептор опосредованной проводимости [133] и увеличению ГАМК_A-рецептор опосредованной проводимости [134]. Оптимальный уровень кислотности обычно достигается путем аэрации раствора карбогеном, но важно иметь в виду, что есть температурная зависимость [97]. Из-за того, что CO₂ медленнее растворяется в теплых растворах, нежели при комнатной температуре, необходимо уменьшить концентрацию NaHCO₃. Рекомендуют использовать концентрацию NaHCO₃ 21 ммоль/л при 35°C и 26 ммоль/л при комнатной температуре [97].

Влияние температуры на работу нейронов не ограничивается изменением кислотности, температура также влияет на кинетику каналов и других белков. Например, температурная зависимость потенциал-управляемых натриевых и калиевых каналов приводит к изменению формы спайков под действием температуры [135]. Поэтому и эпилептическая активность в моделях *in vitro* существенно зависит от температуры, при температуре ниже 32°C сложно вызвать эпилептиформные состояния активности сети [136].

Как уже было отмечено, для генерации эпилептиформной активности необходимо поддерживать высокий уровень оксигенации перфузирующего раствора. Для этого необходимо поддерживать скорость потока не менее 4 мл/мин [137].

Эпилептическая активность возникает из-за нарушения баланса возбуждения и торможения в нервной ткани. Однако факторы, приводящие к нарушению баланса, могут отличаться в разных случаях. Поэтому, чтобы выявлять общие закономерности, независимые от первичных провоцирующих факторов, предпочтительно использовать несколько моделей эпилептической активности в исследованиях.

1.3. Роль глутаматергической системы при эпилепсии и эпилептогенезе

В физиологических условиях концентрация глутамата во внеклеточной среде поддерживается на низком уровне, в диапазоне от 0,6 до 2,0 мкмоль/л [138–140]. При эпилепсии наблюдается многократное повышение концентрации глутамата: биопсия участков коры, полученных постоперационно от пациентов, страдающих фармакорезистентными формами эпилепсии, показала 70-80% увеличение концентрации глутамата в эпилептогенных областях коры по сравнению с неэпилептогенными [141]. Внутригиппокампальный микродиализ продемонстрировал, что повышение уровня глутамата предшествует наступлению эпилептического приступа [142]. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что тоническое повышение внеклеточной концентрации

глутамата может способствовать эпилептической активности, усиливая ее [142–146]. Откачивание глутамата из внеклеточного пространства после эпилептического приступа также нарушено и происходит медленнее, чем в норме [142]. Более того, сообщалось об устойчивом повышении внеклеточной концентрации глутамата в эпилептогенном гиппокампе пациентов, страдающих височной эпилепсией [147].

Одним из возможных механизмов накопления глутамата связан с нарушением работы глутамин-синтетазы – фермента, ответственного за синтез глутамина из глутамата и аммиака. Снижение экспрессии этого фермента, как и ослабление его активности, было обнаружено в астроцитах гиппокампа пациентов, полученного в ходе хирургического лечения височной эпилепсии [148]. Было предположено, что дефицит этого фермента может приводить к накоплению глутамата в астроцитах и внеклеточном пространстве, а также к возникновению рецидивирующих судорог и нейропатологических изменений, типичных для височной эпилепсии [148,149]. С другой стороны, даунрегуляция глутамин-синтетазы может быть следствием, а не причинным фактором заболевания.

1.3.1. Пресинаптические нарушения

Изучению пресинаптических изменений в ходе эпилептогенеза и при эпилепсии уделяется относительно мало внимания. Значительная доля проведенных исследований была посвящена оценке частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (мВПСТ). В частности, выявлено увеличение частоты мВПСТ нейронов области СА3 в модели постишемической спонтанной эпилептиформной активности [150], проекционных нейронов латеральной амигдалы спустя 14–16 недель после эпилептического статуса, вызванного пилокарпином [151], нейронов области СА1 в латентный период, спустя 7 дней после эпилептического статуса, вызванного введением каината [152]. Однако неясно, связано ли наблюдавшееся увеличение частоты мВПСТ с увеличением вероятности выброса глутамата или же оно было обусловлено подключением молчащих синапсов. Кроме того, необходимо учитывать, что высвобождение глутамата контролируется пресинаптическими рецепторами: как гетерорецепторами (аденозиновыми, мускариновыми и ГАМКб-рецепторами), так и ауторецепторами (ионотропными и метаботропными глутаматными рецепторами) [153]. Graebenitz и соавт. продемонстрировали, что различия в частоте мВПСТ у контрольных и пилокарпиновых мышей нивелируются в присутствии антагониста NMDA-рецепторов AP5, что может быть связано с регулирующим влиянием пресинаптических NMDA-ауторецепторов на процесс высвобождения глутамата [151]. Согласно Thompson и соавторам, агонисты ГАМКб-рецепторов, CGP44533 и CGP35024, значительно снижали частоту мВПСТ в

энториальной коре. Ни один из агонистов не оказывал никакого влияния на амплитуду или кинетику миниатюрных ВПСТ. Однако эффект CGP44533 на частоту миниатюрных ВПСТ оказался снижен в срезах пилокарпиновых крыс, что может указывать на снижение функциональной активности пресинаптических ГАМК_B-рецепторов в пилокарпиновой модели эпилепсии [154].

Интересно, что в модели судорожных состояний, вызванных применением конвульсанта пентилентетразола, наоборот, выявлено уменьшение вероятности выброса глутамата. Спустя сутки после введения пентилентетразола наблюдается фасилитация полевых ответов в области CA1 гиппокампа при парной стимуляции коллатералей Шаффера, что свидетельствует об уменьшении вероятности выброса глутамата в этих синапсах [155,156]. Пентилентетразол, в отличие от пилокарпина и каината, не приводит к развитию приобретенной эпилепсии. По-видимому, снижение вероятности выброса глутамата в синапсах гиппокампа в этой модели может быть важным антиэпилептогенным фактором.

Морфологические исследования позволяют подойти к проблеме с другой стороны, отвечая на вопрос о том, что происходит с количеством везикул, а также числом и размерами пресинаптических терминалей. Так, эффект киндлинга на пресинаптические отростки был оценен при помощи иммуномечения: в качестве маркера пресинаптических везикулярных мембран использовался синаптофизин. Значительное увеличение иммунореактивности было отмечено на 28-й день в радиальном слое области CA1, в люцидном и радиальном слоях CA3, в хилусе и во внутренней трети молекулярного слоя зубчатой извилины, а также в II/III слоях пириформной коры [157]. 3D-реконструкция синаптических контактов нейронов CA3–CA1 гиппокампа показала, что эпилептический статус, индуцированный неоднократным введением низких доз каината, приводит к увеличению числа докированных (готовых к высвобождению) везикул в пресинаптических окончаниях уже через 7 дней после его индукции [152]. Согласно работе Murthy V. и соавторов, размер пула готовых к высвобождению везикул сильно коррелирует с вероятностью высвобождения медиатора, следовательно, полученные морфологические данные позволяют предположить, что вероятность высвобождения глутамата может быть повышена в исследуемых синапсах [158].

С помощью метода двухфотонной микроскопии было подробно исследовано, как индуцированный пилокарпином эпилептический статус влияет на пресинаптические процессы в терминалях мшистых волокон. В хроническую фазу пилокарпиновой модели значительно увеличились средняя площадь бутонов мшистых волокон и число активных зон, приходящихся на один бутон. Проведенные эксперименты со стимул-индуцированным

выбросом медиатора свидетельствовали как об ускорении высвобождения везикул из бутонов мшистых волокон, так и о появлении новой субпопуляции бутонов, характеризующейся более высокой скоростью высвобождения глутамата. Согласно данным электронной микроскопии, у животных, перенесших эпилептический статус, пресинаптические окончания содержали большее число готовых к высвобождению везикул, повышенным было также соотношение среднего числа готовых к высвобождению везикул к протяженности активной зоны [159].

Использование *in vivo* моделей эпилепсии позволяет учитывать не только внутригиппокампальные связи, но и афференты, приходящие из других областей мозга, а значит и роль, которую они играют в процессах эпилептогенеза. В работе 2015 г. при помощи пилокарпиновой модели эпилепсии была исследована динамика связей между супрааммиллярным ядром гипоталамуса и зубчатой извилиной и подробно изучена их реорганизация, начинающаяся в ходе латентного периода и продолжающаяся также после появления у животных спонтанных судорог [160]. Помимо нарушения паттерна распределения изучаемых афферентов, весь внутренний молекулярный слой зубчатой извилины получал гораздо более высокое, по сравнению с контролем, число окончаний аксонов, приходящих из латеральной и медиальной областей супрааммиллярного ядра. В частности, спустя 2 месяца после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса, на всем росто-каудальном протяжении зубчатой извилины во внутренней трети молекулярного слоя присутствовало множество крупных VGLUT-2-иммунопозитивных терминалей (VGLUT2 – везикулярный транспортер глутамата 2 типа). Количественный анализ показал, что средняя плотность VGLUT2- и VGLUT2/VGAT-иммуномеченных бутонов в молекулярном слое зубчатой извилины была выше у пилокарпиновых животных. Применение антероградного трейсера BDA продемонстрировало схожий паттерн реорганизации афферентов, идущих от супрааммиллярного ядра, с данными, полученными при иммуномечении окончаний аксонов на содержание VGLUT2 [160].

Таким образом, пресинаптические изменения могут быть одной из важных причин повышенной возбудимости нейронов при эпилепсии.

1.3.2. Постсинаптические нарушения

Общая характеристика глутаматергических ионотропных рецепторов

Ионотропные глутаматные рецепторы – это интегральные мембранные белки, состоящие из четырех крупных мультидоменных субъединиц (более 850 аминокислотных остатков), образующих ионный канал (рис. 2). Последний представляет собой проницаемую для ионов пору, пронизывающую мембрану [161–163]. Функциональные

рецепторы образуются исключительно путем сборки субъединиц в пределах одного функционального класса рецепторов: невозможно собрать функциональный рецептор, состоящий, например, из субъединиц AMPA-рецептора и каинатного рецептора [164]. Глутамат является основным эндогенным агонистом для большинства субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов, кроме GluN1 и GluN3A-B, связывающихся, в первую очередь, с глицином и D-серином.

Субъединицы ионотропных глутаматных рецепторов имеют схожий принцип построения, несмотря на невысокую идентичность аминокислотной последовательности [165,166]. Внеклеточная область, называемая аминоконцевым доменом (ATD), опосредует сборку рецепторов, а также их транспортировку и функциональную регуляцию. Лиганд-связывающий домен (LBD) содержит сайты связывания агонистов, конкурентных антагонистов и некоторых аллостерических модуляторов. Каждый LBD состоит из двух сегментов полипептидной цепи, S1 и S2, разделенных двумя трансмембранными спиралями (M1 и M3) и петлей, заходящей в мембрану (M2). Область M1-M2-M3 вместе с четвертой трансмембранной спиралью (M4) составляет трансмембранный домен (TMD). Цитоплазматический С-концевой домен (CTD) различается по длине и аминокислотному составу в зависимости от субъединицы, ответственен за локализацию рецептора, является местом посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и пальмитоилирование. В составе тетрамера четыре TMD, объединяясь, образуют катион-селективный ионный канал.

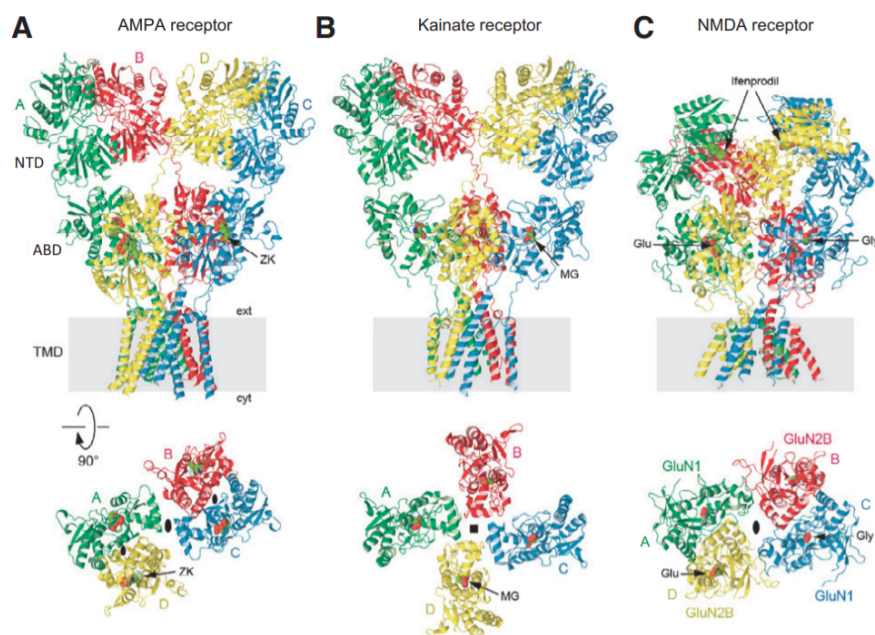


Рисунок 2. Структура глутаматергических ионотропных рецепторов

(А) Гомомерный GluA2-содержащий AMPA-рецептор в комплексе с конкурентным антагонистом ZK 200775 (ZK). (В) Гомомерный GluK2-содержащий каинатный рецептор в комплексе с агонистом SYM2081 (MG). (С) GluN1/2B-содержащий NMDA-рецептор в комплексе с глутаматом (Glu) и глицином (Gly), а также аллостерическим ингибитором ифенпродилом. Верхний ряд – вид на глутаматергические ионотропные рецепторы сбоку, нижний ряд – вид сверху на ABD домены рецептора. Каинатный рецептор находится в состоянии, считающимся десенситизированным. Черные овалы означают либо двустороннюю симметрию вращения самого рецептора (более крупные символы на границе раздела димер-димер), либо димеров NTD и ABD (более мелкие символы внутри димеров), а черный квадрат – 4-кратную симметрию.

Вклад каждого из глутаматных рецепторов в патофизиологию эпилепсии зависит от большого количества факторов, таких как поверхностная экспрессия рецепторов, частота открытия канала, кинетика диссоциации, катионная селективность, экспрессия сопутствующих белков, регуляция механизмов внутриклеточной трансдукции.

AMPA-рецепторы

AMPA-рецептор представляет собой лиганд-управляемый катионный канал, опосредующий быструю компоненту возбуждающих постсинаптических токов [167,168]. AMPA-рецепторы входят в состав зон постсинаптической плотности практически всех зрелых возбуждающих синапсов [169,170]. Функциональное разнообразие AMPA-рецепторов обеспечивается за счет их субъединичного состава, процессов посттранскрипционного редактирования, flip/flop изоформ, получаемых в ходе альтернативного сплайсинга, а также состава и стехиометрии вспомогательных белков.

Различают четыре субъединицы рецептора: GluA1, GluA2, GluA3 и GluA4. В гиппокампе взрослых грызунов, в основном, экспрессированы GluA1, GluA2 и GluA3 субъединицы [171], а функциональные рецепторы представлены либо гетеротетрамерами GluA1/GluA2 и GluA2/GluA3, либо гомотетрамерами GluA1 [172–174]. В то время как нейроны экспрессируют сугубо GluA2-содержащие AMPA-рецепторы [175–177], профиль экспрессии интернейрональных AMPA-рецепторов неодинаков и зависит от их эмбрионального происхождения. Часть интернейронов образуется в медиальной, а часть – в каудальной области ганглиозного возвышения (MGE и CGE) развивающегося конечного мозга [178,179]. Гиппокампальные MGE интернейроны экспрессируют AMPA-рецепторы, лишенные GluN2A субъединицы, тогда как CGE интернейроны – GluN2A-содержащие AMPA-рецепторы [178].

GluA2 субъединица играет ключевую роль в регуляции проницаемости канала. Подавляющее большинство (99.99%) синтезируемой пре-мРНК GluA2 субъединицы претерпевает посттранскрипционное редактирование [180]. Этот процесс катализируется воздействующей на РНК аденозиндеаминазой 2 (ADAR 2), которая преобразует аденозин в инозин (A→I), что затем на уровне белка приводит к замене нейтрального глутамина на положительно заряженный аргинин (Q→R) в порообразующем участке субъединицы; в результате редактирования формируется канал, непроницаемый для ионов Ca^{+2} [181,182]. AMPA-рецепторы, лишенные GluA2 субъединицы, являются проницаемыми для ионов Ca^{2+} [183]. Таким образом, существуют две популяции AMPA-рецепторов: (1) кальций-проницаемые AMPA-рецепторы, которые либо содержат неотредактированную GluA2 субъединицу, либо лишены GluA2 субъединицы; (2) непроницаемые для кальция AMPA-рецепторы, содержащие отредактированную GluA2 субъединицу.

Кодирующие GluA2, GluA3 и GluA4 пре-мРНК также могут быть отредактированы по другому сайту, получившему название «сайт R/G». ADAR2, заменяя аргинин на глицин (R→G), модулирует кинетику канала [184]. Согласно данным нескольких исследований, проанализированных в обзоре 2011 года, присутствие субъединиц, отредактированных по R/G сайту, повышает скорость выхода рецептора из десенситизированного состояния, что позволяет таким рецепторам эффективнее отвечать на пачечную стимуляцию [185].

Значительный вклад в функциональную гетерогенность AMPA-рецепторов вносят вспомогательные белки [186,187]. Образование комплексов со вспомогательными белками может способствовать доставке AMPA-рецепторов на плазматическую мембрану. Нокаут/нокдаун белков TARP и CNIN продемонстрировал, что они сокращают длительность AMPA-рецептор-опосредованных синаптических событий [188,189]. Коэкспрессия AMPA-рецепторов с SKAMP44 или GSG1L ведет к замедлению выхода из десенситизации [190,191], что влияет на кратковременную синаптическую пластичность – как фасилитацию, так и депрессию [192,193].

Транспорт AMPA-рецепторов зависит от их субъединичного состава, а именно: присутствие GluA1 характерно для активность-зависимого экзоцитоза на синаптическую мембрану, тогда как присутствие GluA2 является детерминантой эндоцитоза из синапсов и последующей эндосомальной сортировки [194]. Считается, что субъединица GluA2 и связанные с ней белки ответственны за латеральную диффузию AMPA-рецепторов из синапса и их эндоцитоз на участке плазматической мембраны, прилегающем к зоне постсинаптической плотности, который, предположительно, является специализированной эндоцитарной зоной [195,196].

AMPA-рецепторы преимущественно экспрессируются в центральной части постсинаптической области [36]. Число AMPA-рецепторов на постсинаптической мембране тесно связано с уровнем базовой синаптической передачи и синаптической пластичности [197–200]. Доставка AMPA-рецепторов в синапсы и удаление из них динамически регулируются за счет посттрансляционных модификаций белков [194,201–203]. Было неоднократно подтверждено, что посттрансляционные модификации, в том числе фосфорилирование субъединиц AMPA-рецепторов, играют немаловажную роль в формировании долговременной синаптической потенциации (long-term potentiation (LTP)) [204–206], долговременной синаптической депрессии (long-term depression (LTD)) [207–209] процессах гомеостатического масштабирования [210–212] и гипервозбудимости [213,214]. Фосфорилирование модулирует как свойства ионных каналов AMPA-рецепторов, так и доставку AMPA рецепторов на постсинаптическую мембрану, влияя, в конечном итоге, на величину синаптической силы [197,215,216].

AMPA-рецепторы тесно вовлечены в патогенез эпилепсии. Недавно был разработан специальный трейсер для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) – [11C]К-2.16-18, позволяющий визуализировать и количественно оценить плотность AMPA-рецепторов, находящихся на клеточной поверхности. Повышенное поглощение [11C]К-2 наблюдалось в нескольких областях мозга человека, в том числе в клинически идентифицированной эпилептогенной зоне. Неоднократно отмечалось, что встраивание кальций-проницаемых AMPA-рецепторов, лишенных GluA2 субъединицы, тесно связано с процессами эпилептогенеза. В частности, снижение уровня экспрессии GluA2 субъединицы было показано после судорог, индуцированных гипоксией [217] и в пилокарпиновой модели эпилепсии [218]. При этом токи, опосредованные AMPA-рецепторами, демонстрировали внутреннее выпрямление вольт-амперной характеристики, присущее кальций-проницаемым AMPA-рецепторам [218]. Снижение уровня экспрессии GluA2 субъединицы наблюдалось также в амигдале, пириформной коре и лимбических областях после киндинга [219,220] и в области СА1 гиппокампа и в зубчатой извилине после судорог, вызванных пентилентетразолом [221]. Krestel H. и соавторы показали, что экспериментально-индуцированная избирательная экспрессия в нейронах гиппокампа кальций-проницаемых AMPA-рецепторов (содержащих субъединицу GluA2 с неотредактированным Q/R сайтом) приводила к повышению сетевой возбудимости, но у таких животных не развивалось никаких нейропатологических симптомов, ассоциируемых с эпилепсией [222]. Впрочем, гипервозбудимость гиппокампальных нейрональных сетей не наблюдалась у мышей, нокаутных по GluA2 субъединице [223]. Относительно общепринятой считается концепция, согласно которой увеличение

внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} во время синаптической активности, связанное с присутствием кальций-проницаемых AMPA-рецепторов, приводит к запуску внутриклеточных сигнальных каскадов, участвующих в процессах эпилептогенеза [222].

Свой вклад в патогенез эпилепсии вносит также посттранскрипционное редактирование GluA2 субъединицы по R/G сайту. Усиление процессов R/G редактирования отмечалось в гиппокампе пациентов, страдающих фармакорезистентной формой эпилепсии [224].

Кроме того, у мышей, демонстрирующих спонтанные абсансные припадки, была идентифицирована мутация в гене *Gria4*, кодирующем GluA4 субъединицу [225], приводящая к снижению экспрессии GluA4 субъединицы. GluA4-содержащие рецепторы имеют самую высокую скорость десенситизации в ответ на глутамат [226]. Следовательно, понижение уровня экспрессии GluA4 может увеличить продолжительность ответа на глутамат, что, в свою очередь, может усилить генерацию эпилептиформных разрядов нейронами, в которых экспрессия GluA4 была изменена [227].

NMDA-рецепторы

NMDA-рецептор — один из трех типов ионотропных глутаматных рецепторов. К настоящему моменту известно семь различных субъединиц NMDA-рецепторов (GluN1, GluN2A-D, GluN3A и GluN3B), отличающихся по своим физиологическим и фармакологическим свойствам [228]. Для сборки функционального NMDA-рецептора требуются две GluN1-субъединицы, являющиеся облигатными, а также присутствие двух других субъединиц — это могут быть две GluN2-субъединицы или же комбинация субъединиц GluN2 и GluN3 [229,230]. Гомозиготные мутантные мыши, лишённые GluN1-субъединицы, погибают спустя несколько часов после рождения [231].

Субъединицы NMDA-рецепторов имеют идентичную мембранную топологию (рис. 3, А). Все субъединицы содержат большой внеклеточный N-концевой домен, три трансмембранных домена (M1, M3, M4), порообразующий (M2) и внутриклеточный C-концевой домены. Функционально у субъединиц можно выделить amino-концевой (ATD), лиганд-связывающий (LBD), трансмембранный (TMD) и цитозольный домены (CTD) [232]. Показано, что ATD участвует в регуляции открытия канала и его инактивации, а также отвечает за аллостерическую регуляцию активности ионного канала путем связывания с модуляторными соединениями. Роль регуляции через ATD для NMDA-рецепторов выражена сильнее, чем для других ионотропных рецепторов глутамата [233]. LBD тремя короткими линкерами связан с TMD. Трансмембранные спирали M1, M3 и M4 от каждой из четырех субъединиц способствуют формированию

ионного канала [232]. CTD является наиболее вариабельным доменом и имеет важное значение при регуляции работы канала. Цитозольные домены содержат различные сайты фосфорилирования и сайты связывания внутриклеточных белков, что определяет их роль в регуляции функции рецептора [232].

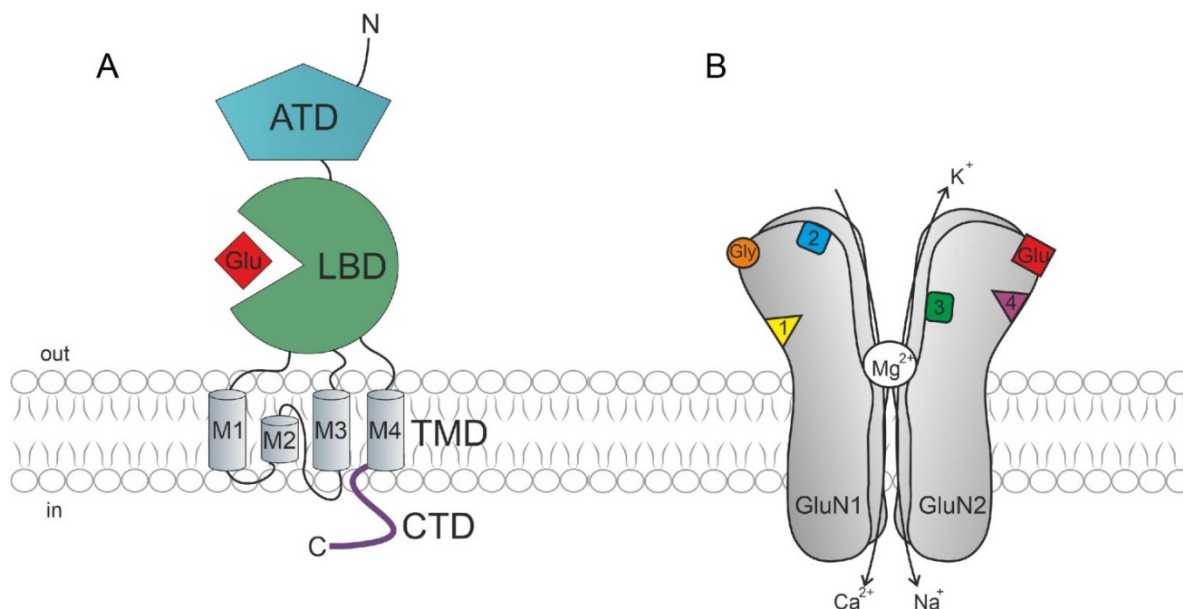


Рисунок 3. Структура NMDA-рецептора.

А – схематическое изображение мембранной топологии субъединицы NMDA-рецептора. ATD – аминоконцевой домен, LBD – лиганд-связывающий домен, TMD – трансмембранный домен, CTD – цитозольный домен. В – схематическое изображение регуляторных сайтов NMDA-рецептора. Gly, Glu – сайты специфического связывания медиатора (глутамат) и коагониста (глицин). Модуляторные сайты: 1 – полиаминовый сайт, 2 – сайт связывания неконкурентных антагонистов, 3 – сайт связывания двухвалентных катионов, 4 – сайт связывания нейростероидов. На схеме также показан транспорт ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} через ионный канал NMDA-рецептора, в покое пора рецептора заблокирована ионом Mg^{2+} . Воспроизведено с модификациями по [232,234].

Для активации NMDA-рецепторов необходимо одновременное связывание с ними глутамата и глицина, что отличает их от других типов глутаматных рецепторов [235]. Сайты связывания глицина расположены на GluN1- и GluN3-субъединицах [236,237], в то время как GluN2-субъединицы выступают в качестве сайтов связывания глутамата [236]. Четыре глутамат-связывающих GluN2A–D-субъединицы ответственны за биофизические свойства NMDA-рецепторов, а их преобладание зависит от области мозга и периода развития [238–241]. GluN2-субъединицы влияют на эффективность действия глутамата. Например, EC_{50} для NMDA-рецепторов, содержащих две субъединицы GluN1 и две субъединицы GluN2D, в пять раз ниже, чем для рецепторов, содержащих GluN1/2A, тогда как рецепторы GluN1/2B и GluN1/2C имеют промежуточные значения EC_{50} [242–244].

Канал NMDA-рецептора проницаем для ионов Ca^{2+} , Na^+ и K^+ . Разные подтипы NMDA-рецепторов демонстрируют сходную проницаемость для ионов Na^+ и K^+ ($P_{\text{K}}/P_{\text{Na}} = 1,14$), при этом они более проницаемы для ионов Ca^{2+} по сравнению с одновалентными ионами ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{X}} = 1,8-4,5$). Важной функциональной особенностью NMDA-рецепторов является Mg^{2+} блок, который сильно зависит от мембранного потенциала и возрастает при его сдвиге к негативным значениям.

При эпилепсии часто выявляется нарушение свойств NMDA-рецепторов, обусловленное изменением их субъединичного состава, числа NMDA-рецепторов или их локализации [245]. Эти изменения со стороны NMDA-рецепторов могут возникать в результате гиперактивности в ЦНС, наблюдаемой при судорожных состояниях, и также могут поддерживать патологическую гиперактивность. Роль NMDA-рецепторов в эпилептогенезе в настоящее время довольно активно исследуется. Ряд экспериментальных работ посвящен изучению изменений экспрессии генов субъединиц NMDA-рецепторов после судорожных состояний [246–249]. Анализ изменений субъединичного состава NMDA-рецепторов на ранних сроках после первого судорожного приступа позволяет выявить потенциальный вклад данных рецепторов в эпилептогенез.

В различных моделях судорожных состояний были выявлены быстрые изменения экспрессии субъединиц NMDA-рецепторов после эпилептической активности. Так, кратковременная гиперэкспрессия GluN1- и GluN2B-субъединиц наблюдается *in vitro* и *in vivo* в пилокарпиновой модели [250,251]. Di Maio с соавторами предположили, что такая гиперэкспрессия является результатом активации двух независимых сигнальных путей: кальций-зависимого НАДФ-оксидазного пути и пути, запускаемого фосфорилированием киназ ERK1/2 [250,252]. Работая с культурой нейронов гиппокампа, они показали, что кратковременное воздействие пилокарпина вызывает быструю гиперэкспрессию GluN2B-субъединицы, наблюдаемую через 24 ч после воздействия [250], и впоследствии приводит к усилению экспрессии GluN2A-субъединицы [252]. Ранняя активация продукции GluN2B-субъединицы была выявлена в гиппокампе после судорог, вызванных пентилентетразолом [155], и в модели пентилентетразол-индуцированного киндлинга [253]. С другой стороны, есть данные и о том, что эпилептическая активность приводит к изменениям экспрессии GluN2A-субъединицы. В гиппокампе взрослых крыс на следующий день после последнего введения 3-меркаптопропионовой кислоты, которую вводили 1 раз в течение 4 дней в дозе 45 мг/кг, было показано повышение экспрессии гена, кодирующего GluN2A-субъединицу [254]. При использовании модели острого эпилептического статуса через 1 ч после индукции также обнаруживается увеличение экспрессии гена GluN2A-субъединицы в гиппокампальной области мышей [246].

Наконец, в острую фазу пилокарпиновой модели было выявлено повышение экспрессии как GluN2A-, так и GluN2B-субъединиц [251]. Противоречивость данных об изменении субъединичного состава NMDA-рецепторов после эпилептической активности может быть обусловлена тем, что были использованы различные экспериментальные модели, модельные животные и подходы к анализу экспрессии.

Каинатные рецепторы

По сравнению с AMPA- и NMDA-рецепторами, функциональная роль каинатных рецепторов менее ясна [255]. Каинатные рецепторы представлены пятью субъединицами: GluK1–5. Этот тип рецепторов экспрессирован по всей ЦНС, но наиболее широко распространены GluK2 и GluK5 субъединицы [256]. В ходе регистрации токов, опосредованных каинатными рецепторами нейронов ганглия заднего корешка спинного мозга крыс, была отмечена быстрая, по сравнению с AMPA-рецептор-опосредованными токами, десенситизация в ответ на каинат [257]. Кроме того, агонисты домоат, каинат и глутамат обладают более высокой активностью в отношении каинатных рецепторов по сравнению с их связыванием с AMPA-рецепторами [257,258]. Каинатные рецепторы расположены как на постсинаптических, так и на пресинаптических мембранах.

Пресинаптические каинатные рецепторы модулируют высвобождение ГАМК, участвуя в тормозной нейротрансмиссии. Lauri S. с соавт. предположили, что поступление кальция через пресинаптические каинатные рецепторы может выступать в качестве спускового крючка для высвобождения кальция из депо, в то время как потенциал-зависимые кальциевые каналы играют ведущую роль только когда уровень внеклеточного кальция достаточно высок (~4 ммоль/л) [259]. Это исследование позволило разрешить прежние разногласия по поводу способности антагонистов каинатных рецепторов блокировать индукцию долговременной потенциации в этих синапсах [260,261], поскольку эксперименты, результаты которых были противоречивыми, проводились в условиях, различающихся по уровню внеклеточного кальция. Дополнительным подтверждением роли каинатных рецепторов в индукции долговременной потенциации в этих синапсах выступило исследование, в котором был выполнен нокаут GLUK5 или GLUK6 субъединиц [262]. Хотя у мышей, нокаутных по GLUK5, LTP вырабатывалась нормально, у нокаутных по GLUK6 мышей величина LTP была значительно снижена по сравнению с диким типом. Поскольку ранее сообщалось, что селективные антагонисты GLUK5 способны блокировать формирование LTP на синапсах, образуемых мшистыми волокнами, Lauri S. с соавторами предположили, что: гранулярные клетки в норме экспрессируют гетеромерные каинатные рецепторы, включающие как GLUK5, так и

GLUK6; рецепторы, не содержащие GLUK5, остаются функциональными; а в случае нокаута GLUK6 формирование функциональных рецепторов оказывается нарушено [259].

Роль постсинаптических каинатных рецепторов в глутаматергической передаче трудно однозначно установить из-за большого числа модулирующих эффектов, приписываемых этим рецепторам, а также их способности функционировать как по ионотропному, так и по метаботропному пути [263–265]. Одной из важных патологических характеристик височной эпилепсии является разрастание мшистых волокон, сопровождающееся образованием aberrантных синапсов. Исследование структуры aberrантных синапсов показало, что гранулярные клетки зубчатой извилины экспрессируют «*de novo*» каинатные рецепторы [266–268]. Было высказано предположение, что почти половина глутаматергической передачи в этих синапсах опосредована новообразованными постсинаптическими каинатными рецепторами [266,269,270]. Встраивание каинатных рецепторов, следовательно, ведет к гипервозбудимости зубчатой извилины, и, в конечном итоге, способствует генерации эпилептиформной активности [266]. Изучение роли «*de novo*» каинатных рецепторов в генерации ВПСП гранулярными клетками показало, что появление этих рецепторов увеличивало временной интервал синаптической суммации и модифицировало паттерн генерации потенциалов действия – вместо генерации редких нерегулярных спайков наблюдалась ритмическая активность [267,268].

Сообщалось, что в тканях пациентов, страдающих рефрактерной височной эпилепсией, увеличено уровень экспрессии GluK4 и GluK5 [225]. Помимо этого, было обнаружено, что в неокортексе и гиппокампе пациентов, страдающих эпилепсией, повышен уровень посттранскрипционного редактирования по Q/R сайту субъединицы GluK2 [271]; в неокортексе также наблюдалось повышенное Q/R редактирование и субъединицы GluK1 [272].

Осуществление гиперэкспрессии или нокаута GluK2 у мышей показало, что в гиппокампе GluK2-содержащие рецепторы глубоко вовлечены в судорожную активность [215, 217]. Делеция GluK2 уменьшала развитие судорог у мышей после инъекции каината [209]. Уровень экспрессии GluK1 и GluK5 были хронически повышен в случае постиктальных спонтанных судорог [207]. Применение селективного антагониста GluK5-содержащих рецепторов предотвращало как пилокарпин-индуцированные лимбические судороги у крыс, так и эпилептиформную активность, индуцированную при помощи электрической стимуляции *in vitro* и *in vivo* [210]. Недавние исследования показали, что GluK2 подвергается посттрансляционным модификациям, таким как S-нитрозилирование (SNO), наблюдаемое у крыс в модели эпилепсии. Образующийся при этом кальций-

зависимый цитозольный комплекс GluK2-PSD95-nNOS может представлять собой терапевтическую мишень при эпилепсии [226]. Orav с соавторами [227] описали нейропиплин-толлоидоподобный белок 1 (NETO1), который также может представлять из себя потенциальную терапевтическую мишень для воздействия на эпилептическую активность: в культуре ГАМКергических нейронов NETO1 выступал в качестве вспомогательного белка каинатных рецепторов, необходимого для доставки их субъединиц в дендриты и образования синапсов, содержащих каинатные рецепторы.

1.3.3. Транспорт глутамата

Только 20% высвобождаемого из пресинаптических окончаний глутамата взаимодействует с глутаматными рецепторами, остальные 80% – изымаются из синаптической щели за счет работы транспортеров глутамата [273]. На сегодняшний день выделено пять Na^+ -зависимых экстраинаптических транспортеров глутамата (extrasynaptic glutamate receptors 1-5) (EAAT1-5) [274]. Все белки семейства EAAT у человека и мышей образуются в результате тримеризации больших мультидоменных субъединичных белков. EAAT1 и EAAT2 преимущественно экспрессируются астроцитами [275,276], но также могут быть обнаружены и в других типах клеток, например, в клетках микроглии и олигодендроглии [277]. Сообщалось также о присутствии EAAT2 в нейронах, в частности, на пресинаптических окончаниях [278,279]. EAAT3, в отличие от EAAT1 и EAAT2, экспрессируется исключительно в нейронах, преимущественно располагаясь на постсинаптической мембране сомы и дендритов. Экспрессия EAAT3 особенно высока в гиппокампе, стриатуме, мозжечке и обонятельных луковицах, также сообщалось о пресинаптической экспрессии в ГАМКергических синаптических окончаниях клеток Пуркинье мозжечка [280,281]. Высокая экспрессия EAAT4 наблюдается на постсинаптических мембранах дендритных шипиков клеток Пуркинье мозжечка [282], а экспрессия EAAT5 была обнаружена исключительно в фоторецепторах сетчатки [283]. Несмотря на молекулярное разнообразие переносчиков глутамата, около 90% обратного захвата глутамата обеспечивается за счет EAAT2 [284–286]. Уровень экспрессии EAAT3 в мозге взрослых млекопитающих приблизительно в 100 раз ниже по сравнению с EAAT2 [287]. Тем не менее, в определенных группах синапсов гиппокампа и стриатума вклад EAAT3 в процесс обратного захвата глутамата оценивается в ~ 20% и ~ 40%, соответственно [288].

Считается, что глиальные транспортеры глутамата (EAAT1-2) обеспечивают базовую регуляцию концентрации глутамата, в то время как нейрональные транспортеры (EAAT3) осуществляют его прицельный захват, в том числе из синаптической щели, и

модулируют глутаматергическую активность в отдельных синапсах [280,288,289]. Несмотря на значительные функциональные различия между ними, нокдаун как глиальных, так и нейрональных транспортеров приводит к цитотоксичности, которая и в том и в другом случае протекает схоже. В частности, нокдаун транспортеров глутамата приводит к быстрому наступлению нейродегенерации, поведенческим нарушениям, в том числе, к двигательным нарушениям и судорогам, что, в целом, напоминает эпилепсию [288].

Согласно клиническим данным, при височной эпилепсии наблюдаются изменения экспрессии как астроцитарных (EAAT1–2), так и нейрональных (EAAT3) транспортеров, хотя профиль экспрессии и варьировал в зависимости от специфики патологии. Значительная доля клинических данных свидетельствует в пользу того, что при височной эпилепсии происходит снижение экспрессии EAAT2 в астроцитах склеротического гиппокампа, в то время как экспрессия EAAT3 в нейронах повышается [290,291]. Моделирование эпилепсии на животных позволяет подробнее изучить клеточные и молекулярные изменения, связанные с судорожной активностью, в том числе и временную динамику экспрессии транспортеров глутамата. Безусловно, данные, полученные при фармакологическом моделировании судорожной активности, могут сильно отличаться от реальной клинической картины заболевания, тем не менее, они могут быть полезны для понимания патофизиологии эпилепсии. Как показало изучение судорожной активности у крыс, тяжелые судороги, индуцированные однократным введением пентилентетразола, приводили к повышению уровня экспрессии EAAT1 в гиппокампе крыс, однако оно было кратковременным, и уровень экспрессии снижался до нормальных значений через 48 часов [292,293]. Противоречивые результаты были получены в рамках литий-пилокарпиновой модели, которая считается лучшей моделью височной эпилепсии человека. Методом вестерн-блоттинга было показано, что спустя сутки после индуцированного пилокарпином эпилептического статуса уровень экспрессии белка EAAT2 был понижен в гиппокампе 6-недельных мышей [294]. Зубарева с соавторами недавно показали, что экспрессия мРНК EAAT2 повышена в латентной фазе в нескольких областях мозга, в то время как экспрессия мРНК EAAT1 и EAAT3 не претерпевала значимых изменений [295]. Есть также данные об увеличении экспрессии мРНК EAAT2 в гиппокампе крыс через месяц после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса [296]. В хронической фазе было показано трехкратное увеличение экспрессии мРНК EAAT3 в зубчатой извилине, в то время как уровень мРНК EAAT2 оставался неизменным [297]. К разнонаправленным изменениям экспрессии транспортеров глутамата приводила и судорожная активность, вызванная

внутри мозговым введением хемоконвульсантов. Экспрессия EAAT2 увеличивалась в ипсилатеральном гиппокампе мышей спустя 1 сутки после внутригиппокампальной инъекции каиновой кислоты, и опускалась до значений, близких к контрольным, на 4-7 сутки после инъекции [298]. В другом исследовании было обнаружено, что, помимо изменений количества EAAT2, введение каината приводило к повышению количества EAAT1 в ипсилатеральном гиппокампе мышей на 1 и 3 дни после инъекции [299].

Таким образом, функциональные изменения в работе транспортеров глутамата, выражающиеся в изменении их кинетики и скорости клиренса глутамата из межклеточного пространства, могут вносить значительный вклад в патогенез эпилепсии, дополняя изменения, связанные с нарушением геометрии синапсов и реорганизацией синаптических связей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. 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 (artificial cerebrospinal fluid – ACSF) следующего состава (в моль/л): 1.0 MgSO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 2.0 CaCl₂, 2.5 KCl, 13,3 глюкозы, 24 NaHCO₃, 126 NaCl; рН 7.3–7.4. Раствор аэрировался газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂. 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 вибраторе (Microm HM 650V; Microm; Germany) и инкубировались в ACSF в течение 1 часа до начала электрофизиологического эксперимента (рис. 4).

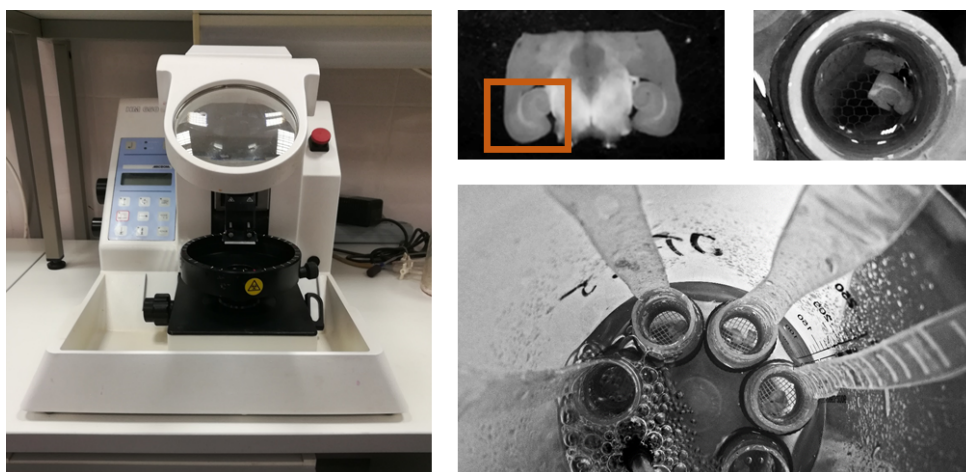


Рисунок 4. Приготовление переживающих срезов

Слева – вибратор Microm HM 650V. Справа – вырезаемый участок мозга крысы, содержащий энторинальную кору и гиппокамп (показан рамкой) и емкость для хранения и аэрирования переживающих срезов.

2.2. Модель эпилептиформной активности в переживающем срезе

Эпилептиформная активность в комбинированных срезах мозга крысы, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, вызывалась с помощью двух проэпилептических перфузирующих растворов. Оба раствора имели пониженную концентрацию магния и содержали 4-аминопиридин – блокатор калиевых каналов Kv1 семейства. Проэпилептический перфузирующий раствор 1 (ПП1) 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).

2.3. Электрофизиологические методы регистрации

2.3.1. 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 стимуляция коллатералей Шаффера, при этом стимулирующий электрод помещался в радиальный слой на границе CA1-CA2 областей на расстоянии 1 мм от регистрирующего электрода. Биполярный скрученный стимулирующий электрод изготовлялся из изолированной нихромовой проволоки диаметром 0,7 мм. Зависимость амплитуды полевых ВПСП и амплитуды пресинаптического спайка (fiber volley – FV) от силы стимуляции определяли путем увеличения силы тока от 25 до 300 мкА с шагом 25 мкА, подаваемого при помощи стимулятора А365 (World Precision Instruments, США). Ответы регистрировали с помощью микроэлектродного усилителя 1800 (А-М Systems, США). Для оцифровки данных использовался аналого-цифровой преобразователь NI USB-6211 (National Instruments, США) и программное обеспечение WinWCP v5 (University of Strathclyde, Великобритания). Полученные зависимости амплитуды полевых ответов от силы стимуляции аппроксимировались сигмоидальной функцией Гомперца:

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

где e – число Эйлера ($e = 2,71828\dots$), 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 $a \times k/e$. Коэффициент синаптической передачи (соотношение input/output) рассчитывался как отношение амплитуды полевых ВПСП к амплитуде FV.

2.3.2 Регистрация синаптической активности методом патч-кламп

Для регистрации синаптической активности использовались две электрофизиологические установки (рис. 5 и 6).

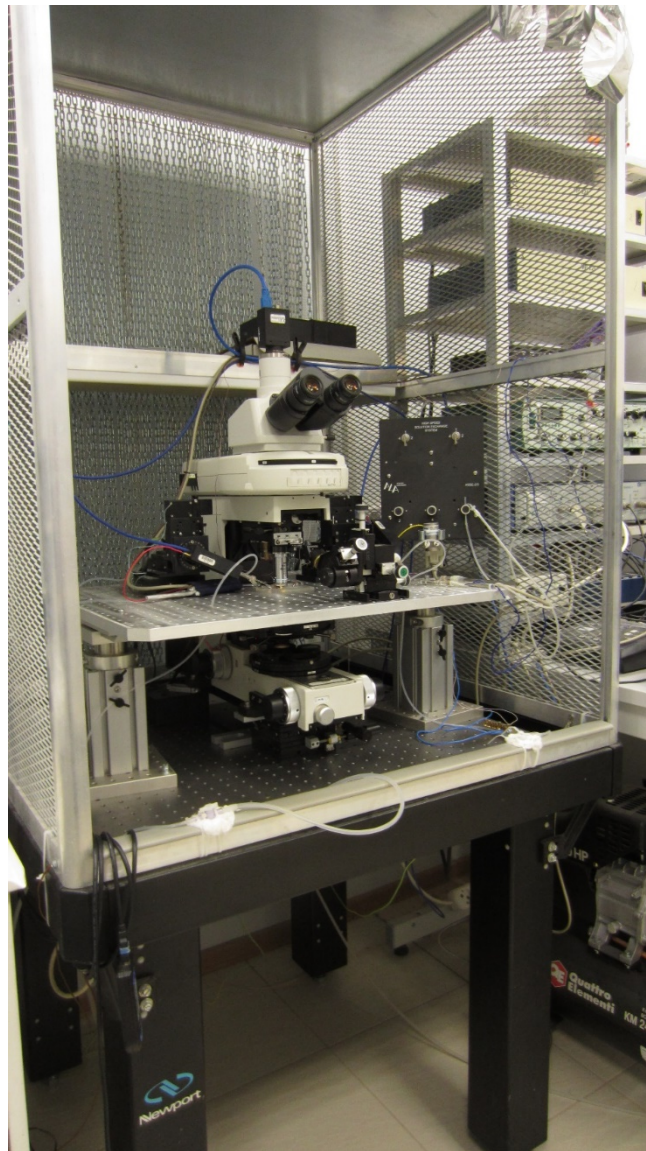


Рисунок 5. Электрофизиологическая установка № 1.

Для визуализации пирамидных нейронов при работе на электрофизиологической установке № 1 применялись видеочамера WAT-127LH (Watec Inc.; США), видеочамера Grasshopper 3, модель 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 патч-кламп усилителя AM-Systems 2400 (AM-Systems; США), патч-кламп усилителя MultiClamp™ 700B (Molecular devices, США), аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments; США) и программного обеспечения WinWCP (SIPBS; Великобритания). Для подведения патч-

электродов к клетке использовались микроманипуляторы MP-255 (Sutter Instruments, USA). Для подачи перфузирующего раствора в камеру использовались 2 перистальтических насоса Miniature Peristaltic Pump BQ50-1J (Longer Precision Pump, Китай). Температура подаваемого перфузирующего раствора регулировалась при помощи термоконтроллера Thermoclamp1 (AM-Systems, США). Электрическая стимуляция осуществлялась при помощи изолятора стимулов Isostim A320 (World Precision Instruments, США).

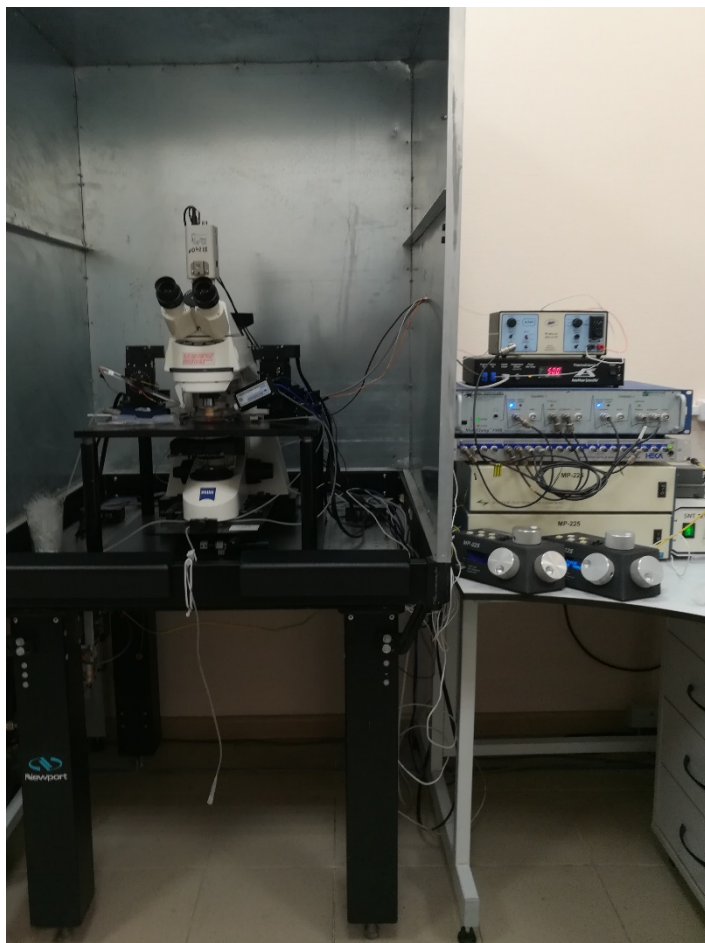


Рисунок 6. Электрофизиологическая установка № 2.

Электрофизиологическая установка № 2 была аналогичной первой, за исключением нижеперечисленных элементов: видеокамеры Sanyo VCB-3512P (Sanyo Electric, Япония), микроскопа Zeiss Axioscop 2 FS Plus (Zeiss; Германия), патч-кламп усилителя НЕКА ЕРС-8 (НЕКА, Германия); аналого-цифрового преобразователя ЛН 8 + 8 (НЕКА, Германия), программного обеспечения Patch Master v2x90.1 software (НЕКА, Germany), изолятора стимулов Isostim A365 (World Precision Instruments, США).

Экспериментальные данные, полученные на двух установках, были объединены. При сборе данных осуществлялась фильтрация высоких частот (на частоте 5-10 кГц при регистрации эпиплептиформных 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°C (рис. 7). Скорость перфузии равнялась 5-7 мл/мин. Патч-электроды с входным сопротивлением 2–5 МОм изготавливались из боросиликатного стекла (WPI; UK) на пуллере для изготовления микропипеток Р-1000 (Sutter Instrument; Novato, CA, USA). Осуществлялась патч-кламп регистрация в конфигурации «целая клетка». Применялись три типа пипеточных растворов. Раствор 1 на основе глюконата калия имел следующий состав: 114 глюконата калия, 6 KCl, 0,2 EGTA, 10 HEPES, 4 ATP-Mg и 0,3 GTP (в ммоль/л); pH доводился до 7,25 при помощи KOH. Раствор 2 на основе метансульфоната цезия имел следующий состав: 127 CsMeSO₃, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 6 QX314, 4 ATP-Mg и 0,3 GTP (в ммоль/л); pH доводился до 7,25 при помощи CsOH. 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); pH доводился до 7,25 при помощи CsOH. 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 [300,301]. 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%.

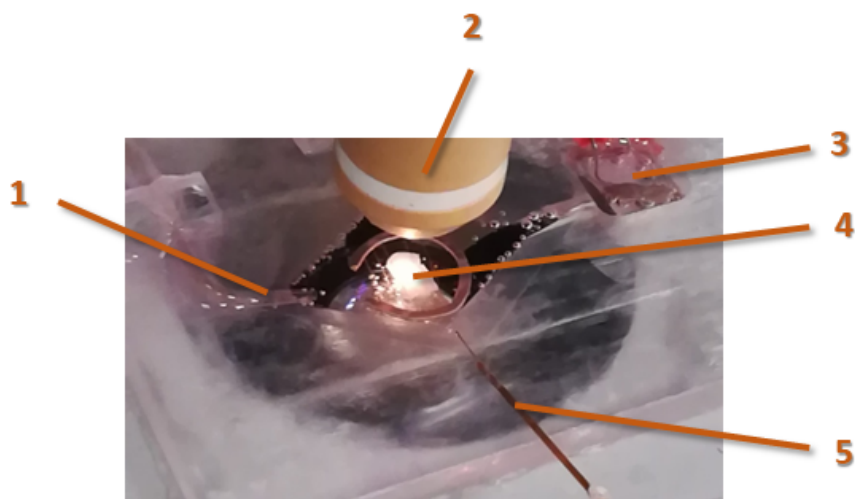


Рисунок 7. Камера для регистрации электрофизиологической активности в срезе.

1 – перфузирующий раствор, подаваемый в камеру, 2 – объектив микроскопа, 3 – дополнительная камера, где расположены референсный электрод и трубочка, отводящая перфузирующий раствор из камеры, 4 – переживающий срез, 5 – стимулирующий электрод.

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. Все эксперименты по регистрации вызванных возбуждающих постсинаптических токов в синапсах CA3-CA1 гиппокампа выполнялись в присутствии одного из блокаторов ГАМКа рецепторов: бикикуллина (20 мкмоль/л), пикротоксина (50 мкмоль/л), габазина (10 мкмоль/л), либо же их комбинации. Вызванные постсинаптические токи в энторинальной коре регистрировались в ACSF при разных значениях потенциала фиксации в диапазоне от -107 до +43 мВ, что позволяло построить вольт-амперные характеристики и оценить AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованные синаптические проводимости методом численной оптимизации, как описано далее.

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

Для получения вольт-амперных характеристик 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 вольт-амперных характеристик. Полученные кривые были аппроксимированы разными функциями с использованием Wolfram Mathematica 10 (Champaign, USA).

Вольт-амперная характеристика 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.

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

Вольт-амперная характеристика NMDA-рецептор-опосредованных токов была аппроксимирована следующей функцией [303]:

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

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).

Вольт-амперные характеристики AMPA-, NMDA- и ГАМКа-рецептор-опосредованных токов, полученные в контрольном и проэпилептическом растворах, представлены на рисунке 8.

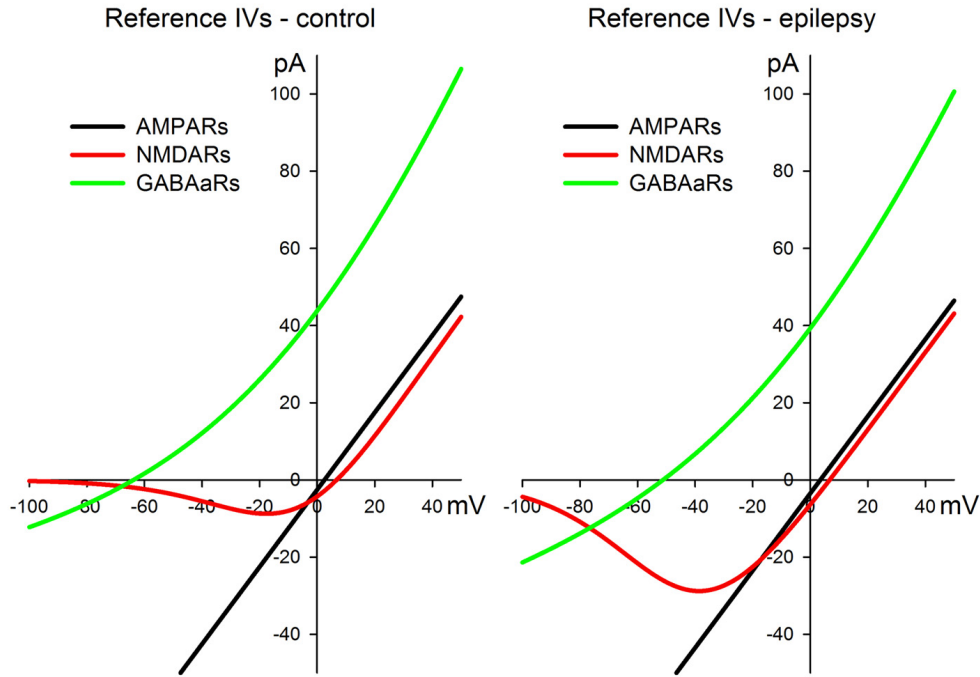


Рисунок 8. Вольт-амперные характеристики AMPA-, NMDA- и ГАМКa-рецептор-опосредованных токов, используемые для оценки синаптических проводимостей. Слева – набор кривых, полученных в контрольном растворе (ACSF). Справа – набор кривых, полученных в проэпилептическом перфузирующем растворе.

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 вольт-амперных характеристик (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-, ГАМКa- 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 вольт-амперных характеристик, 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.

Оффлайн-компенсация добавочного сопротивления (R_{series})

В режиме фиксации напряжения наличие добавочного сопротивления ведет к несоответствию между задаваемой величиной потенциала фиксации и величиной мембранного потенциала [304]. Разница между этими значениями (ΔU) пропорциональна величине тока фиксации (I_{total}) и добавочного сопротивления (R_{series}):

$$\Delta U = I_{total} * R_{series} \quad (9).$$

В серии экспериментов по оценке синаптических проводимостей величина потенциала фиксации для каждой полученной вольт-амперной характеристики корректировалась оффлайн путем вычитания величины ошибки ΔU , рассчитанной согласно уравнению 9. Для измерения добавочного сопротивления подавались ступеньки потенциала от -27 мВ до +43 мВ.

Биофизические свойства нейронов

Для изучения биофизических свойств нейронов оценивалось изменение потенциала в ответ на подаваемые ступеньки тока разной величины (от -50 до +25 пА, с шагом 10-20 пА), продолжительность которых составляла 1500 мс. В анализ включались только нейроны с типичным 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 (С, пФ). Для расчета С 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 (Гц) определялась как количество потенциалов действия, приходящихся на одну ступеньку тока.

Восходящая часть полученной частотно-токовой кривой была аппроксимирована функцией Гомперца (уравнение 1), используя Wolfram Mathematica 10, где a – асимптота максимальной частоты генерации потенциалов действия (Гц); $a \cdot k/e$ – 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.

2.4. 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 осуществлялась при помощи однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и апостериорного теста Даннета. Оценка изменений коэффициента синхронизации иктальных разрядов производилась при помощи однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями 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% ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Начало эпилептиформной активности в энторинальной коре и гиппокампе

Эпилептиформная активность в комбинированных срезах мозга крысы, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, индуцировалась при помощи двух проэпилептических перфузирующих растворов: проэпилептического перфузирующего раствора с концентрацией ионов калия, близкой к физиологической (ПР1), и проэпилептического перфузирующего раствора с повышенной концентрацией ионов калия (ПР2). Применение проэпилептического раствора 2 приводило к быстрому развитию эпилептиформного состояния в срезе, первые синхронизированные события регистрировались уже спустя 4-6 минут с начала перфузии как в энторинальной коре, так и в гиппокампе (рис. 9).

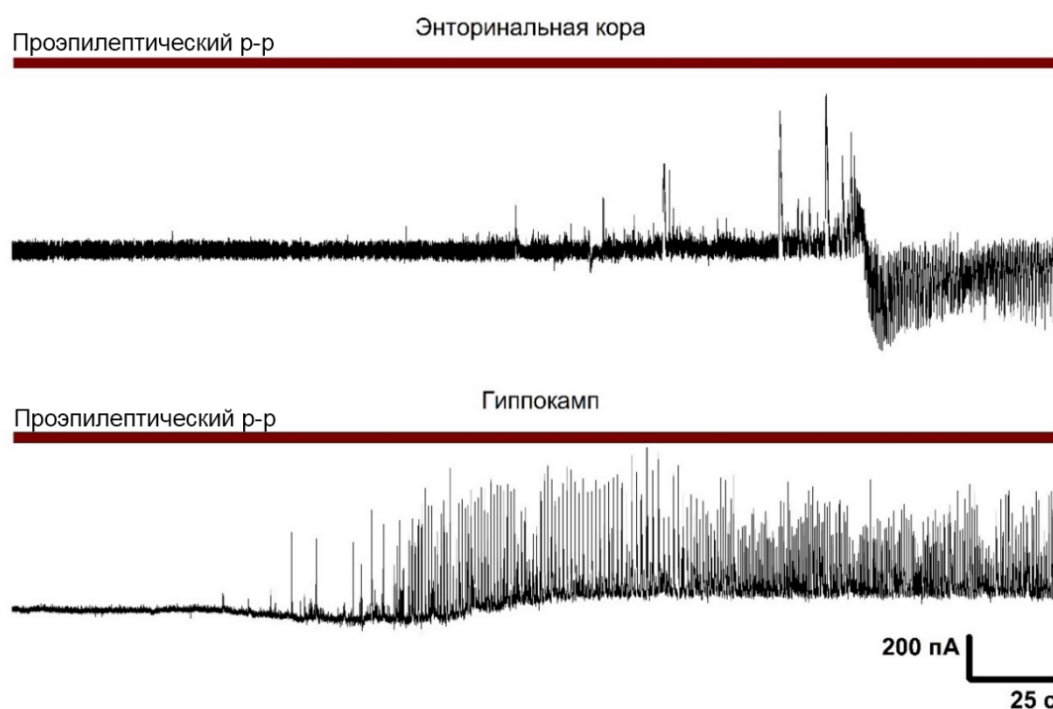


Рисунок 9. Начало эпилептиформной активности в энторинальной коре и гиппокампе.

На рисунке приведены записи спонтанных синаптических токов, зарегистрированных в режиме фиксации напряжения ($V_{\text{hold}} = -27$ мВ) в двух разных срезах. Начало регистрации – время подачи 4-аминопиридин-содержащего проэпилептического раствора 2.

После начала перфузии проэпилептическими растворами наблюдалось увеличение мембранного потенциала в пирамидных нейронах глубоких слоев энторинальной коры с -69 ± 3 мВ до -59 ± 2 мВ в случае ПР1 и от -69 ± 3 мВ до -51 ± 3 мВ в случае ПР2. В этих

нейронах наблюдались спонтанные деполяризующие потенциалы, частота которых начинала увеличиваться спустя несколько минут. При использовании ПР2 эти спонтанные деполяризующие потенциалы иногда приводили к генерации одиночных потенциалов действия. Для оценки изменений в спонтанной спайковой активности возбуждающих и тормозных нейронов перед началом эпилептоподобной активности была подсчитана частота высокоамплитудных спонтанных синаптических событий (>25 пА), которые, предположительно, возникают в ответ на потенциал действия [305] [305]. Чтобы различить между собой тормозные и возбуждающие синаптические события, при регистрации в режиме фиксации напряжения нами было выбрано значение командного потенциала, равное -27 мВ (находящиеся между значениями потенциалов реверсии для глутамат- и ГАМК-опосредованных ионных токов). Было обнаружено, что в энторинальной коре частота зарегистрированных тормозных постсинаптических токов (ТПСТ) увеличивалась с $1,1 \pm 0,2$ Гц в начале регистрации до $5,1 \pm 0,2$ Гц ($n = 21$, критерий Уилкоксона, $p < 0,05$,) перед появлением первого синхронизированного события. Частота возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) оставалась неизменной ($0,12 \pm 0,04$ Гц против $0,5 \pm 0,2$ Гц, $n = 21$, критерий Уилкоксона, $p > 0,05$). Анализ тормозных постсинаптических токов (ТПСТ), регистрируемых на нейронах области СА1 гиппокампа, также показал увеличение их частоты перед появлением первого синхронизированного события: $0,39 \pm 0,08$ Гц против $1,40 \pm 0,28$ Гц, $n = 7$, парный t-критерий Стьюдента, $p < 0.01$).

3.2. Типы эпилептиформных разрядов в энторинальной коре

Чтобы охарактеризовать синхронизированную синаптическую активность в энторинальной коре на протяжении основных стадий развития эпилептиформного состояния в срезе, была использована одновременная регистрация сразу двух пирамидных нейронов глубоких слоев энторинальной коры методом патч-клямпы в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока и/или напряжения. Благодаря высокой степени коррелированности синхронизированной синаптической активности между соседними пирамидными клетками, были исследованы синаптические токи, лежащие в основе эпилептиформных разрядов.

После начала перфузии проэпилептическим раствором в срезе наблюдалась смена типов синхронизированной синаптической активности. Первые синхронизированные синаптические события наблюдались через 4-6 мин с момента перфузии как раствором ПР1, так и ПР2. I тип синхронизированной синаптической активности (I Тип) присутствовал во всех срезах (рис. 10). В ходе него наблюдались исключительно залпы тормозных токов

– интериктальные разряды 1 типа (ЭР1), продолжительность каждого из которых составляла приблизительно 1 с. Длительность I типа составляла более 30 минут в случае использования проэпилептического раствора 1, и 4.1 ± 0.8 мин ($n = 17$) в случае использования проэпилептического раствора 2.

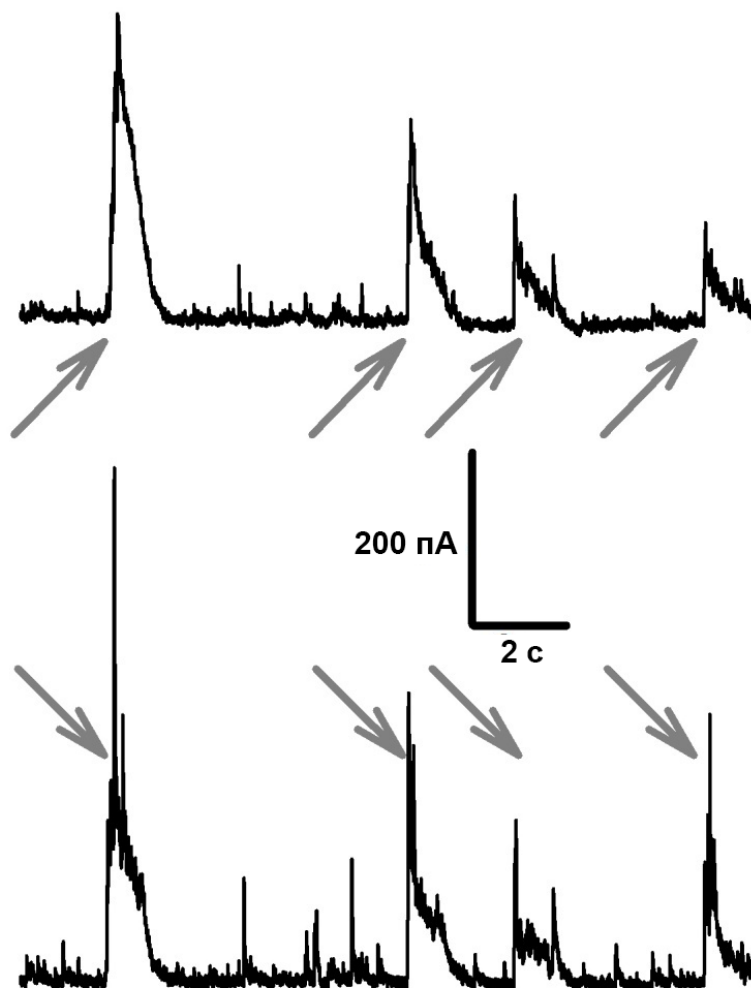


Рисунок 10. Эпилептиформные разряды 1 типа (ЭР1), наблюдаемые в ходе эпилептиформной активности. Одновременная регистрация активности двух соседних пирамидных нейронов энторинальной коры осуществлялась методом патч-кламп в режиме фиксации напряжения. Потенциал фиксации ($V_{\text{hold}} = -27$ мВ). Стрелки указывают на ЭР1. Наблюдается высокая корреляция между ЭР1 двух случайно выбранных соседних пирамидных клеток.

Вслед за I типом синхронизированной синаптической активности наступал II тип, который характеризовался появлением иктальных разрядов, в литературе также иногда именуемых SLE (seizure-like event) (рис. 11, А, Б). При регистрации этих событий в режиме фиксации тока наблюдался залп потенциалов действия длительностью от 30 до 80

секунд (рис. 11, Б, верхняя запись). При одновременной регистрации двух нейронов в режимах фиксации напряжения/фиксации тока показано, что началом иктального разряда служит или короткий залп высокоамплитудных тормозных постсинаптических токов (ТПСТ) или длительный залп ТПСТ меньшей амплитуды (отмечен звездочкой на рисунке 11, Б).

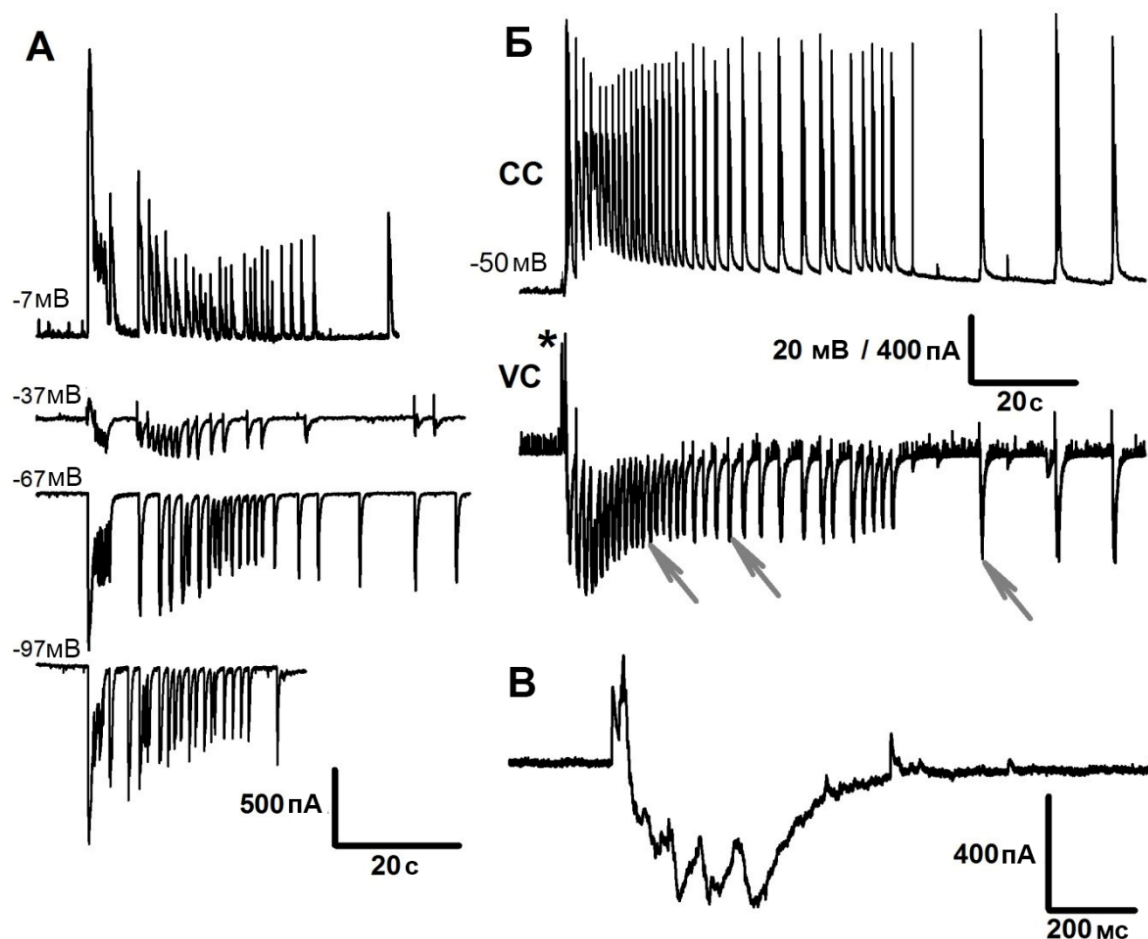


Рисунок 11. Синхронизированная синаптическая активность II типа. А – иктальные разряды, вызванные при помощи ПР1 и зарегистрированные в режиме фиксации напряжения при различных значениях потенциала фиксации. В состав иктального разряда входят компоненты, реверсирующие при разных значениях потенциала. Б – иктальные разряды, вызванные при помощи ПР2. Синаптическая активность двух соседних нейронов регистрировалась одновременно в режиме фиксации тока (сверху) и в режиме фиксации напряжения (снизу, $V_{\text{hold}} = -27$ мВ). Звездочкой отмечен первоначальный залп тормозных постсинаптических токов в начале иктального разряда. Стрелки указывают на повторяющиеся паттерны, составляющие основу иктального разряда. Пример повторяющегося паттерна представлен на рисунке В.

При регистрации иктальных разрядов в режиме фиксации напряжения было выявлено, что их основу составляют повторяющиеся токи сложной кинетики – эпилептиформные разряды 2 типа (ЭР2), накладывающиеся друг на друга (рис. 11, А, Б). 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) (рис. 11, В). В большинстве случаев такие повторяющиеся токи кластеризовались в начале иктального разряда, и частота их генерации постепенно падала к концу разряда.

Длительность II типа синхронизированной синаптической активности зависела от типа используемого эпилептогенного раствора. В случае применения ПР1 II тип активности можно было наблюдать в течение нескольких часов, что позволяло зарегистрировать более 20 иктальных разрядов (1–2 иктальных разряда каждые 5 мин). Применение ПР2 часто приводило к переключению синхронизированной синаптической активности с II типа на III тип, чего не наблюдалось при применении ПР1.

В ходе III типа активности паттерны синаптических событий, составляющих иктальный разряд (эпилептиформные разряды 2 типа), генерировались постоянно, с низкой частотой (0.24 ± 0.02 Гц, $n = 22$) 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 напряжения показала, что каждому ЭР2 соответствовал залп потенциалов действия в пирамидных клетках (рис. 12).

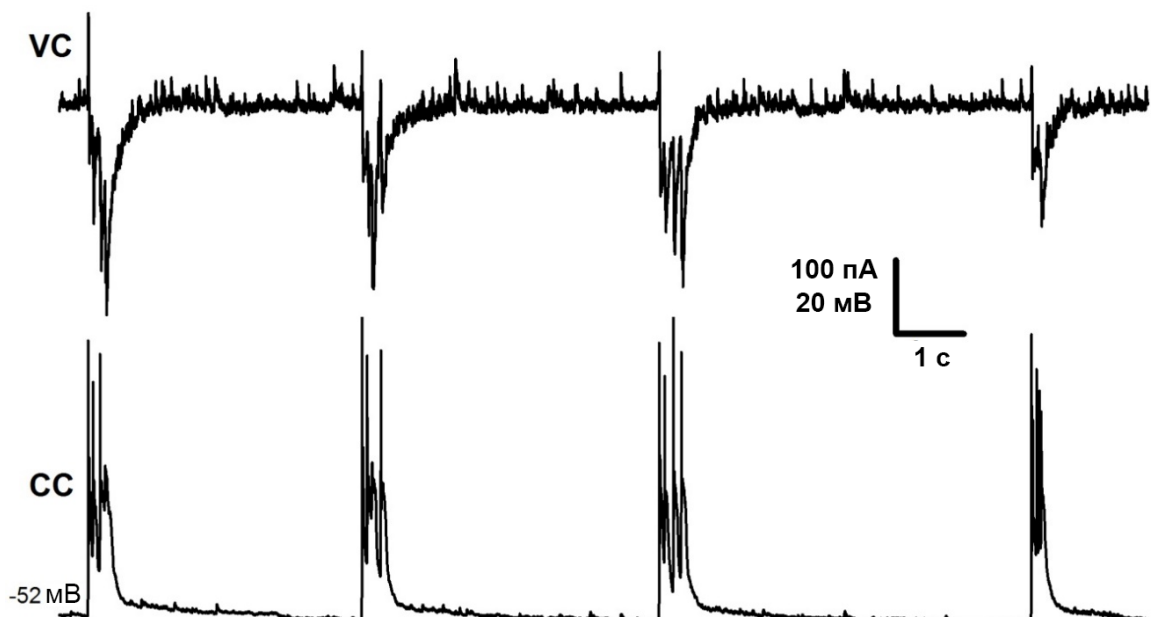


Рисунок 12. Эпилептиформные разряды II типа (ЭР2). Одновременная регистрация синаптической активности двух соседних клеток: в режиме фиксации напряжения (сверху, VC, $V_{\text{hold}} = -27$ мВ) и в режиме фиксации тока (снизу, CC).

Переключение между описанными режимами синхронной синаптической активности при использовании ПР2 наблюдалось в большинстве срезов и проиллюстрировано на рисунке 13, А. Тем не менее, в некоторых срезах не наблюдалось всех типов активности. Например, в одних срезах активность I типа была единственным регистрируемым типом, а в других срезах отсутствовали иктальные разряды и тип I непосредственно замещался типом III (рис. 13, Б). Кроме того, данные одновременной регистрации в режиме фиксации напряжения указывают на то, что в некоторых случаях (<5% срезов) в двух соседних нейронах могут возникать различные типы синаптической активности в ходе эпилептиформных разрядов (рис. 13, В). Другими словами, ЭР1 и ЭР2 могут сосуществовать в соседних нейронах в одном и том же срезе.

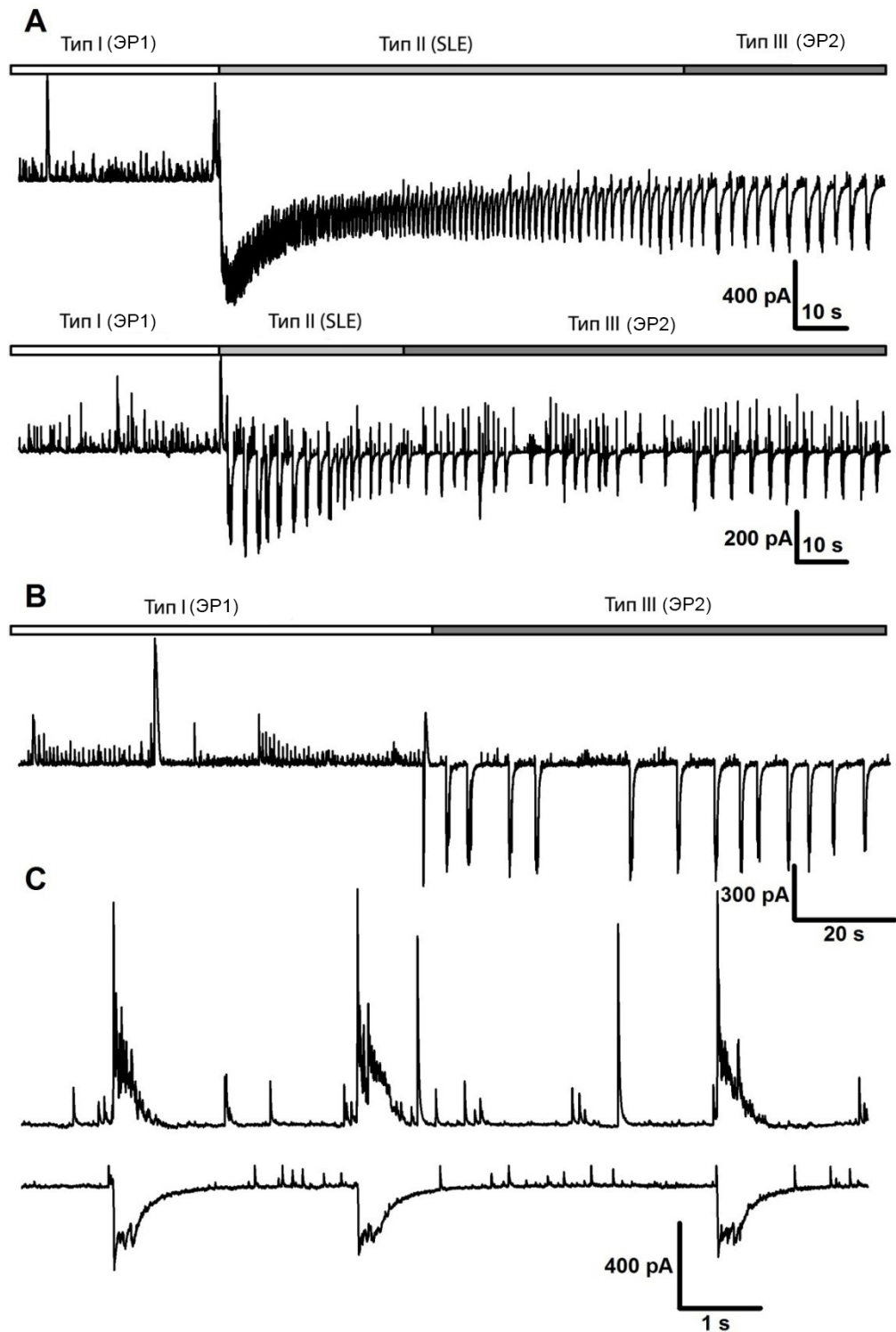


Рисунок 13. Переключение между режимами синхронизированной синаптической активности. А – два примера типичной синаптической активности, зарегистрированной в режиме фиксации напряжения в разных срезах, демонстрирующих все три типа активности. И тоническая, и клоническая фазы иктального разряда присутствуют на верхней записи, в то время как на нижней – только клоническая фаза. Б – в некоторых клетках I тип активности непосредственно сменялся III типом. В – одновременная регистрация синаптической активности двух соседних клеток в режиме фиксации напряжения ($V_{\text{hold}} = -27$ мВ). Регистрируемые клетки получают разные типы синаптического входа в ходе активности III типа.

Первая клетка (верхняя запись) демонстрирует ЭР1, вторая клетка (нижняя запись) – ЭР2.

Чтобы установить, активностью каких постсинаптических рецепторов были обусловлены эпилептиформные разряды 1 и 2 типов, 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 (рис. 14). Каждая вольт-амперная характеристика была аппроксимирована при помощи уравнений, где в качестве коэффициентов использовались проводимости g_{AMPA} , g_{GABA} и g_{NMDA} (см. раздел 2.3. Материалы и методы).

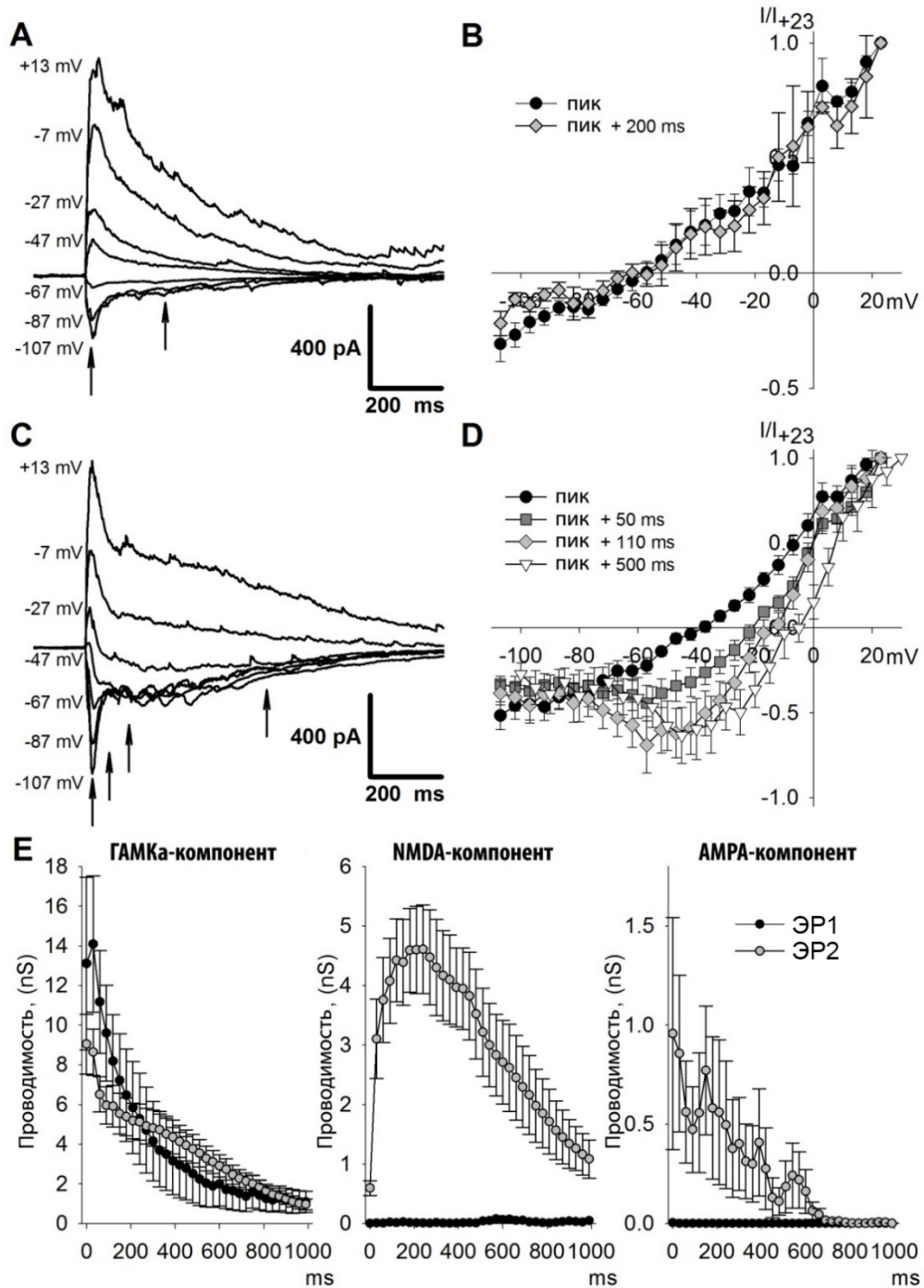


Рисунок 14. Оценка синаптических проводимостей в ходе ЭР1 и ЭР2. Усредненные записи ЭР1 (А) и ЭР2 (С) в режиме фиксации напряжения при разных значениях потенциала. Стрелки указывают на момент времени, для которого приведены вольт-амперные характеристики на В и D. Е – вычисленные проводимости как функции времени для ЭР1 (черные точки) и ЭР2 (белые точки). ИИР1 опосредованы активностью ГАМКа рецепторов, в то время как ИИР2 представлены всеми синаптическими компонентами. $n = 5$ и 10 нейронов для ЭР1 и ЭР2, соответственно.

На рисунке 15 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.

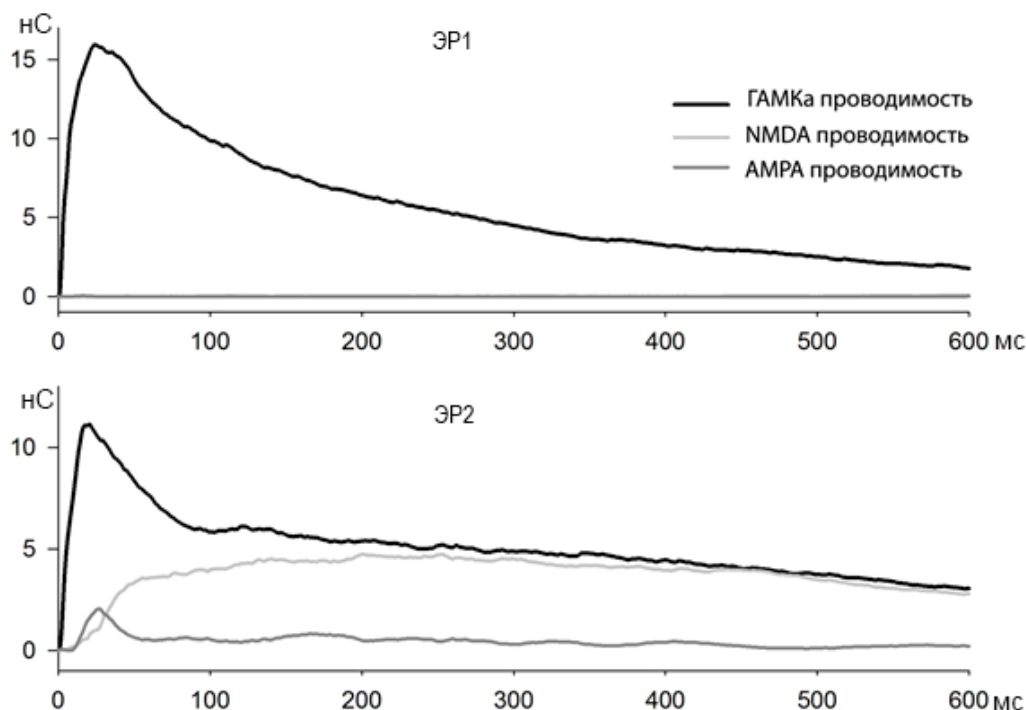


Рисунок 15. Вклад AMPA-, NMDA- и ГАМК-рецептор-опосредованных проводимостей в синаптическую активность в ходе эпилептиформных разрядов 1 и 2 типов (ЭР1 и ЭР2).

3.3. Эпилептиформная активность в гиппокампе

В этой серии экспериментов использовался сугубо проэпилептический раствор 2 с высокой концентрацией ионов K^+ (8.5 ммоль/л), в энторинальной коре ранее приводивший к быстрому развитию эпилептиформного состояния. Было замечено, что уже в течение первых 5 минут после начала подачи проэпилептического раствора в нейронах области CA1 гиппокампа регистрировалась спонтанная интериктальная активность, представлявшая собой положительно направленные токи в режиме фиксации напряжения при потенциале фиксации равном -27 мВ, что указывает на преобладание ГАМКергической компоненты синаптической активности (рис. 16).

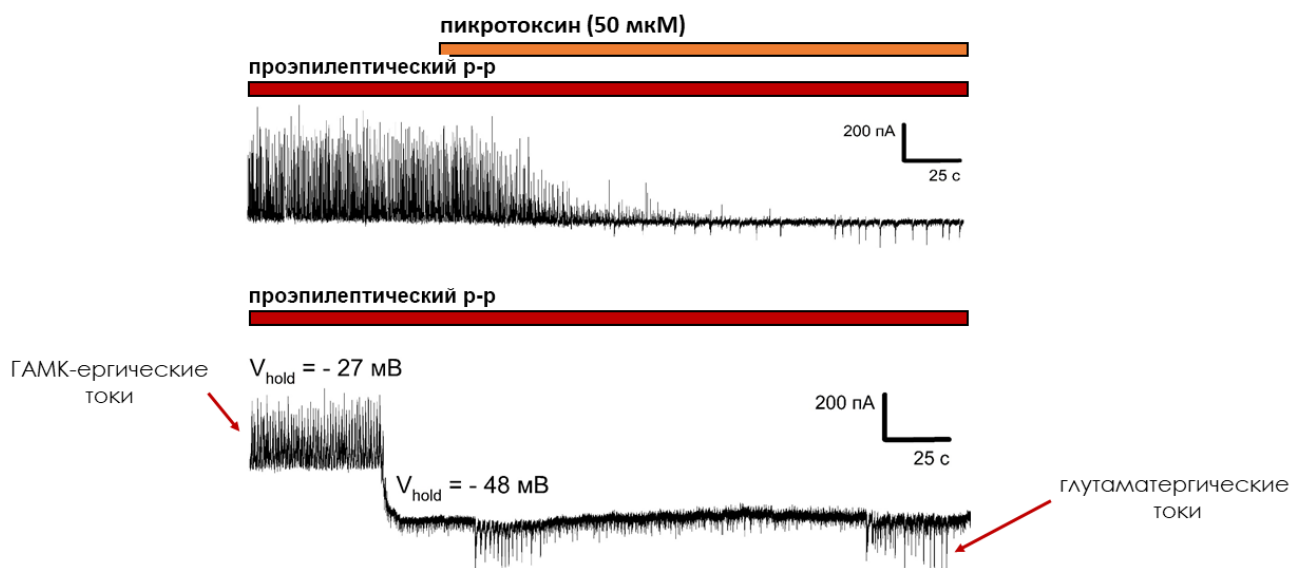
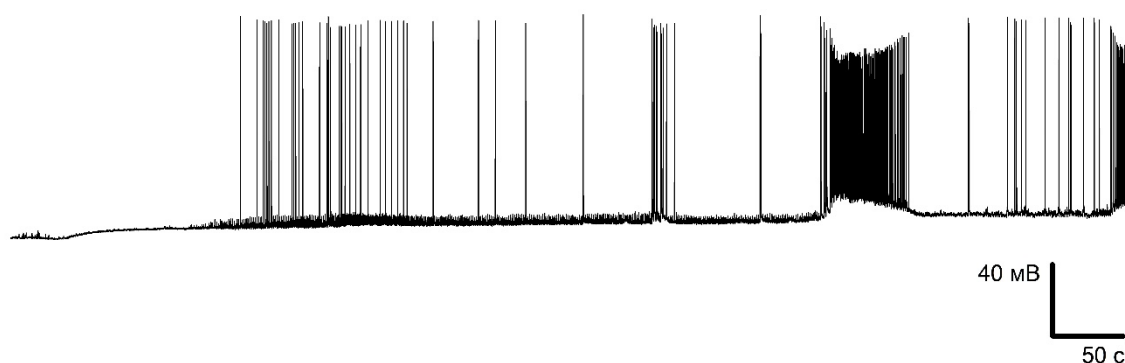


Рисунок 16. Спонтанная интериктальная активность в области СА1 гиппокампа

Мы дополнительно подтвердили тормозную природу наблюдаемых интериктальных разрядов двумя методами: добавлением блокатора ГАМК_A-рецепторов пикротоксина (50 мкмоль/л) (рис. 16, верхняя запись) и изменением потенциала фиксации (рис. 16, нижняя запись). Интериктальная активность ослабевала как в присутствии пикротоксина, так и при изменении значения потенциала фиксации на значение, соответствующее точке реверсии ГАМК_A-рецептор-опосредованных постсинаптических токов. Мы также проанализировали, как развитие эпилептиформного состояния в срезе влияет на свойства интериктальной активности и выяснили, что частота залпов ГАМК_A-рецептор-опосредованных постсинаптических токов в ходе интериктальной активности была сопоставимой как в начале ее появления, так и спустя 15 минут после подачи проэпилептического раствора (на 1-2 минуте после появления синхронизированных интериктальных разрядов: $0,99 \pm 0,06$ Гц; спустя 15 минут: $1,54 \pm 0,22$ Гц, $n = 5$, парный t-критерий Стьюдента, $p > 0,05$). Таким образом, в гиппокампе наблюдалась интенсивная спонтанная интериктальная активность, основу которой составляли ГАМК_A-рецептор-опосредованные постсинаптические токи.

Частота и интенсивность наблюдаемых ГАМК_A-рецептор-опосредованных постсинаптических токов были столь высоки, что мешали различать глутаматергический компонент спонтанной активности, поэтому анализ глутаматергических постсинаптических токов выполнялся

при потенциале около -50 мВ, близком к потенциалу реверсии ГАМКергических постсинаптических токов, что позволяло либо полностью нивелировать их регистрацию, либо же значительно снизить их амплитуду. При потенциале фиксации около -50 мВ, глутаматергическая спонтанная синаптическая активность представляла собой отрицательные токи, имеющие большую амплитуду, что позволяло легко отличить их от ГАМКа-рецептор-опосредованных токов (рис. 16, нижняя запись). Было выяснено, что залпы глутаматергических постсинаптических токов генерировались преимущественно пачечно, являясь составными компонентами иктального разряда. Частота залпов глутаматергических постсинаптических токов внутри пачки составляла $1,03 \pm 0,20$ Гц, а общая частота таких залпов в расчете на время регистрации (после их появления и до окончания времени записи) составляла $0,32 \pm 0,05$ Гц. Время появления первого иктального разряда варьировало между срезами: самый ранний детектированный иктальный разряд наблюдался спустя 2,9 мин после начала подачи проэпилептического раствора, самый поздний детектированный разряд – спустя 17,5 мин после начала подачи



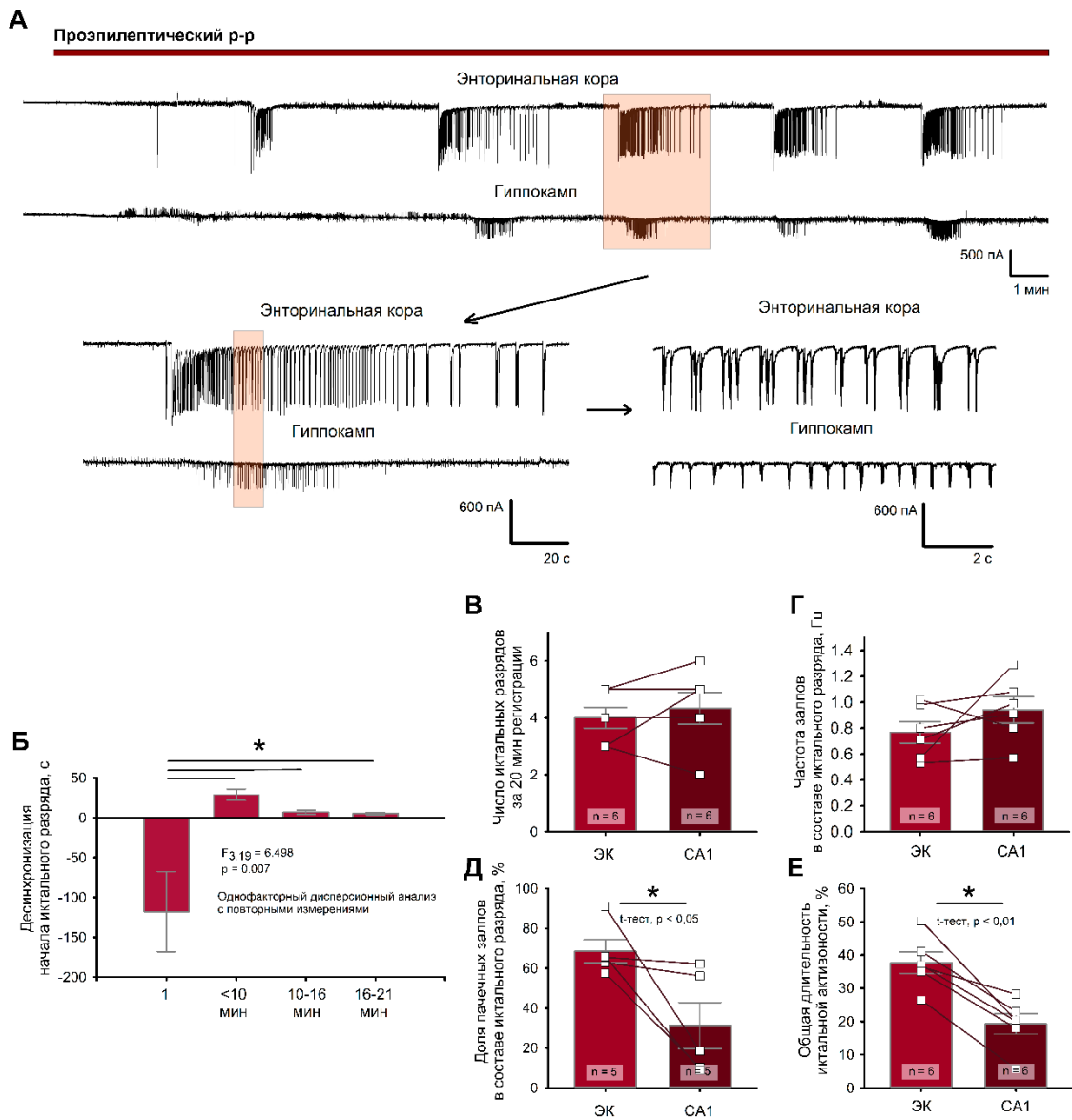
проэпилептического раствора. При регистрации в режиме фиксации тока пирамидные нейроны области CA1 генерировали потенциалы действия, так же сгруппированные в пачки (рис. 17).

Рисунок 17. Потенциалы действия в ходе эпилептиформной активности в области CA1 гиппокампа.

3.4. Одновременная регистрация эпилептиформной активности в коре и гиппокампе

После того, как мы установили основные типы эпилептиформных разрядов, наблюдающихся в энторинальной коре и гиппокампе, мы решили оценить, какой вклад каждая из этих структур вносит в развитие эпилептиформного состояния в срезе, особое внимание уделив генерации иктальной активности в этих двух структурах. Для этого нами

была проведена серия экспериментов по одновременной регистрации спонтанных постсинаптических токов нейронов глубоких слоев энторинальной коры и нейронов области CA1 гиппокампа. Значение потенциала фиксации (-50 мВ), 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. 18).

Рисунок 18. Одновременная регистрация иктальных разрядов в энторинальной коре и области CA1 гиппокампа.

A – регистрируемые спонтанные постсинаптические токи в энторинальной коре (верхняя запись) и области CA1 гиппокампа (нижняя запись) непосредственно после подачи

проэпилептического раствора. Время подачи проэпилептического раствора обозначено цветной линией. Рамкой выделен отдельный иктальный разряд, приведенный ниже в большем временном разрешении слева. 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. Данные приведены для 4 временных интервалов: 1 – первый иктальный разряд, проанализированный отдельно; 2 – первые 10 минут; 3 – 10-16 минут; 4 – 16-21 минута регистрации после добавления проэпилептического раствора. 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.

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. 18, 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 -критерий Стьюдента = - 0,500, $p > 0,05$) (рис. 18, 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 -критерий Стьюдента = -1,316, $p > 0,05$) (рис. 18, Г). Однако, в энторинальной коре, в

отличие от гиппокампа, залпы постсинаптических токов чаще представляли собой не одиночные разряды, а пачечную активность (в энторинальной коре: $69 \pm 6 \%$; в области СА1 гиппокампа: $31 \pm 12 \%$; $n = 5$, t -критерий Стьюдента = 2,882, $p = 0,02$) (рис. 18, 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: $37,70 \pm 3,20 \%$; в области СА1 гиппокампа: $19,24 \pm 3,06 \%$; $n = 6$, t -критерий Стьюдента = 4,172, $p = 0,002$) (рис. 18, Е).

Сопоставимое число иктальных разрядов (4 разряда), регистрируемых в обеих областях переживающего среза за одинаковый промежуток времени (20 минут от времени подачи проэпилептического раствора) свидетельствует в пользу предположения, что, возникнув в одной точке, иктальный разряд распространяется в соседние области, вовлекая их в генерацию эпилептиформной активности. Однако на основе наших данных нельзя сделать однозначный вывод о том, в какой именно области переживающего среза в данный момент времени находится очаг эпилептиформной активности, для получения ответов на этот вопрос уместнее проводить эксперименты по множественной регистрации в нескольких точках переживающего среза, что было выполнено в ряде других исследований и выходит за рамки задачи, выполняемой в данной серии экспериментов.

Данные других *in vitro* исследований, выполненных с применением комбинированных срезов, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, свидетельствуют о том, что эпилептиформная активность в первую очередь возникает в энторинальной коре и оттуда распространяется в области СА1 и СА3 гиппокампа. Подобное было продемонстрировано в отношении эпилептиформной активности, индуцированной при помощи 4-аминопирина, высоких внеклеточных концентраций калия и низких внеклеточных концентраций магния [7,306]. Эксперименты по низкочастотной электростимуляции гиппокампа, а также опыты по перерезке связей между гиппокампом и энторинальной корой свидетельствуют в пользу того, что эпилептиформные разряды, генерируемые гиппокампом, оказывают сдерживающий эффект на эпилептиформную активность, подавляя генерацию иктальных разрядов. В то же время, замкнутая структура связей внутри парагиппокампального региона потенциально способна поддерживать рециркулирование возбуждения внутри трисинаптической петли, что делает вовлечение гиппокампа в генерацию иктальной активности теоретически возможным. В пользу участия пирамидных нейронов гиппокампа в поддержании иктальной активности

свидетельствуют результаты, полученные в модели электрического киндлинга: оптогенетическое торможение активности пирамидных нейронов СА3 гиппокампа *in vivo* ослабляло судорожную активность и генерализованные судороги у животных [307]. Помимо этого, есть данные, что применение 4-аминопиридина в комбинации с литий-пилокарпиновой моделью эпилепсии индуцировало иктальные разряды в гиппокампе *in vitro* [308].

Использованный нами вариант 4-аминопиридиновой модели обеспечивал стабильную генерацию иктальных разрядов, а также приводил к быстрому появлению эпилептиформной активности в срезе (спустя минуты после подачи проэпилептического раствора), что отличает выбранную нами модель от ее вариаций, требующих выдерживания срезов мозга в 4-аминопиридин-содержащем растворе в течении нескольких часов. Это позволяло нам изучить все этапы развития эпилептиформной активности в срезе: от начала подачи проэпилептического раствора до этапа стабильной генерации иктальных разрядов.

Поскольку мы изучали эпилептиформную активность, индуцированную в рамках 4-аминопиридиновой *in vitro* модели, нужно подчеркнуть, что свойства такой активности могут отличаться от эпилептической активности у пациентов. 4-аминопиридин изменяет свойства синаптической передачи: вызванная 4-аминопиридином блокада K^+ -каналов приводит к тому, что увеличивается полуширина спайка, потенциал покоя становится более деполяризован, усиливается высвобождение как возбуждающих, так и тормозных нейротрансмиттеров [309]. Тем не менее, к относительным преимуществам 4-аминопиридиновой модели можно отнести тот факт, что в отличие от моделей, основанных на дезингибировании, в данном случае и возбуждение, и торможение сохраняются, что чуть более физиологично. Помимо этого, 4-аминопиридиновые модели отличаются надежностью: 4-аминопиридин успешно вызывал разряды, подобные иктальным, как в *in vitro*, так и в *in vivo* моделях [310]; схожие последствия наблюдались и в трех клинически детектированных случаях отравления 4-аминопиридином [311]. Сообщалось также, что применение 4-аминопиридиновой *in vitro* модели в сочетании с использованием срезов мозга крыс, содержащих гиппокамп и энторинальную кору, позволяло получать эпилептиформную активность, схожую по своим свойствам с эпилептическими разрядами, наблюдаемыми у пациентов [61,312].

Было предложено несколько гипотез о том, как именно 4-аминопиридин влияет на сетевую активность в срезе мозга. Показано, что на начальных этапах развития эпилептиформной активности в переживающем срезе наблюдается активация ГАМК-ергических интернейронов. Одна из гипотез заключается в том, что краткий всплеск

активности ГАМК-ергических интернейронов может приводить к генерации иктябрьных событий посредством посттормозного возвратного возбуждения (postinhibitory rebound excitation, PIR). Посттормозное возвратное возбуждение опосредовано активностью персистирующих Na^+ -каналов, способных деактивироваться при гиперполяризованных потенциалах, а затем активироваться при подпороговых потенциалах, когда клетка возвращается к потенциалу покоя. Персистирующие Na^+ -токи сдвигают мембранный потенциал в сторону порога активации потенциал-зависимых Na^+ -каналов, которые затем и опосредуют посттормозное возвратное возбуждение [313]. Кроме того, частично заблокированные 4-аминопиридином выходящие потенциал-зависимые K^+ -токи менее успешно противодействуют входящему потенциал-зависимому Na^+ -току [313]. Другая гипотеза связывает проэпилептический эффект активности ГАМК-ергических интернейронов с тем, что ГАМК начинает оказывать деполяризующее действие.

В ходе развития 4-аминопиридин-опосредованной эпилептиформной активности также наблюдается медленная деполяризация мембранного потенциала. Было предложено два потенциальных механизма ее возникновения: первый заключается в том, что во время повторяющейся сетевой активности происходит накопление внеклеточного K^+ , который оказывает прямое деполяризующее действие на мембранный потенциал клетки [314]; согласно второму механизму, совокупность токов (т. е. Na^+ , K^+ , Cl^- и HCO_3^-) участвует в формировании медленной деполяризации.

Такими образом, полученные нами данные о протекании эпилептиформной активности в нашей вариации 4-аминопиридиновой *in vitro* модели, в целом, согласуются с экспериментальными данными, полученными в различных *in vitro* моделях.

3.5. Биофизические свойства пирамидных нейронов CA1 после периода эпилептиформной активности

Эпилептиформная активность влияет на пассивные и активные мембранные свойства нейронов, в том числе в первые сутки и часы после воздействия, как показали результаты оценки мембранных свойств нейронов после пилокарпин- и каинат-индуцированного эпилептического статуса [85,315]. От мембранных свойств нейрона зависит то, как клетка будет трансформировать поступающие на нее сигналы в потенциалы действия. Поэтому, прежде чем оценивать изменения глутаматергической передачи, мы проверили, не влияет ли индуцированная в наших экспериментах эпилептиформная активность на пассивные и активные мембранные свойства нейронов.

Для определения пассивных свойств пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа 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, в соответствии с алгоритмом, приведенным в разделе Материалы и методы. 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. 19).

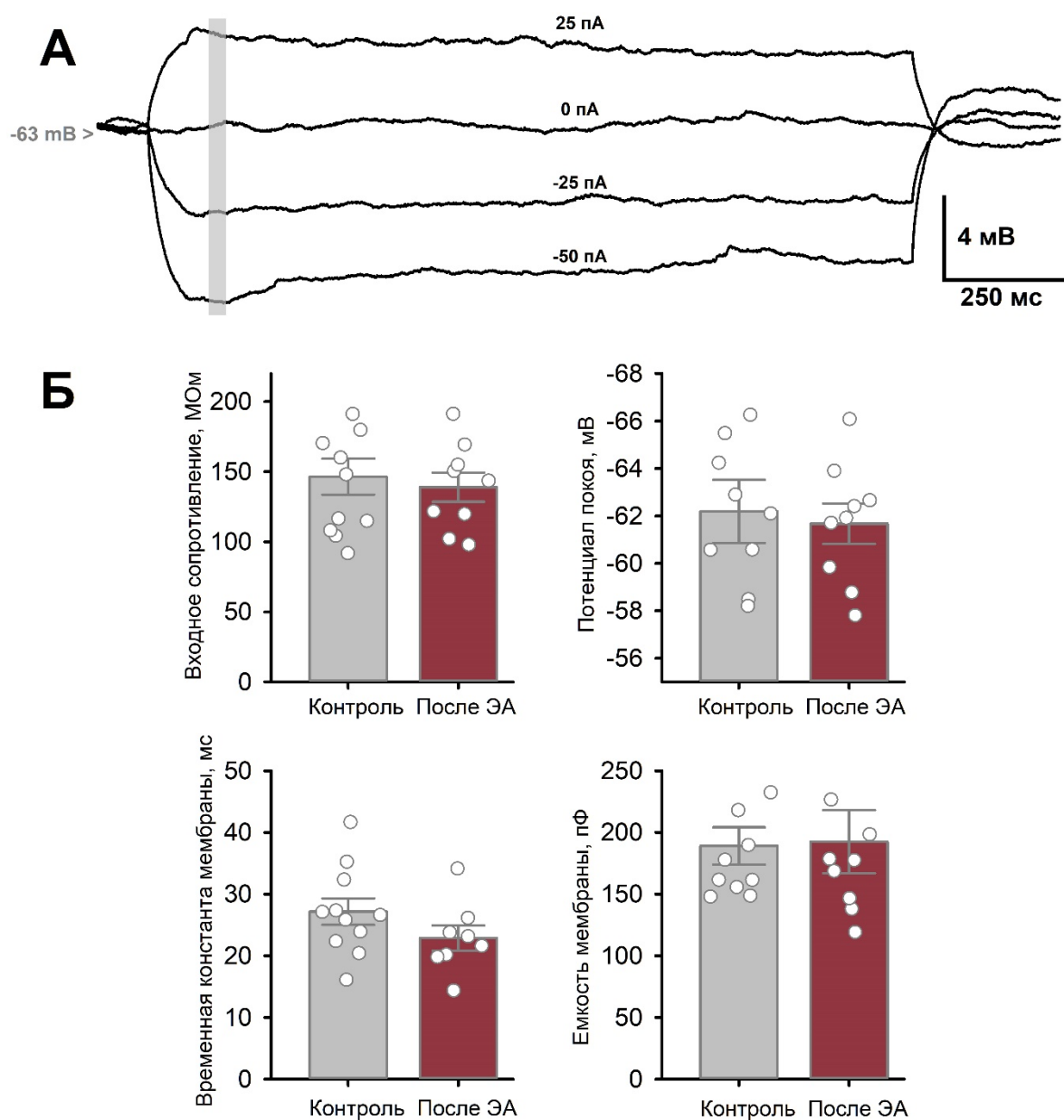


Рисунок 19. Пассивные мембранные свойства пирамидных нейронов области CA1 после периода эпилептиформной активности *in vitro*.

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 бичукуллина.

Б – Мембранные свойства пирамидных нейронов. Значимых различий не обнаружено.

Затем нами были оценены активные мембранные свойства нейронов. Для этого на нейроны подавались деполяризующие ступеньки тока разной величины, что, в конечном итоге, приводило к генерации потенциалов действия. Для каждой подаваемой на нейрон ступеньки тока определялась соответствующая ей частота потенциалов действия, генерируемых нейроном, что позволяло построить кривую зависимости частоты генерации потенциалов действия от величины подаваемого тока (частотно-токовую кривую). 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. 20, Б).

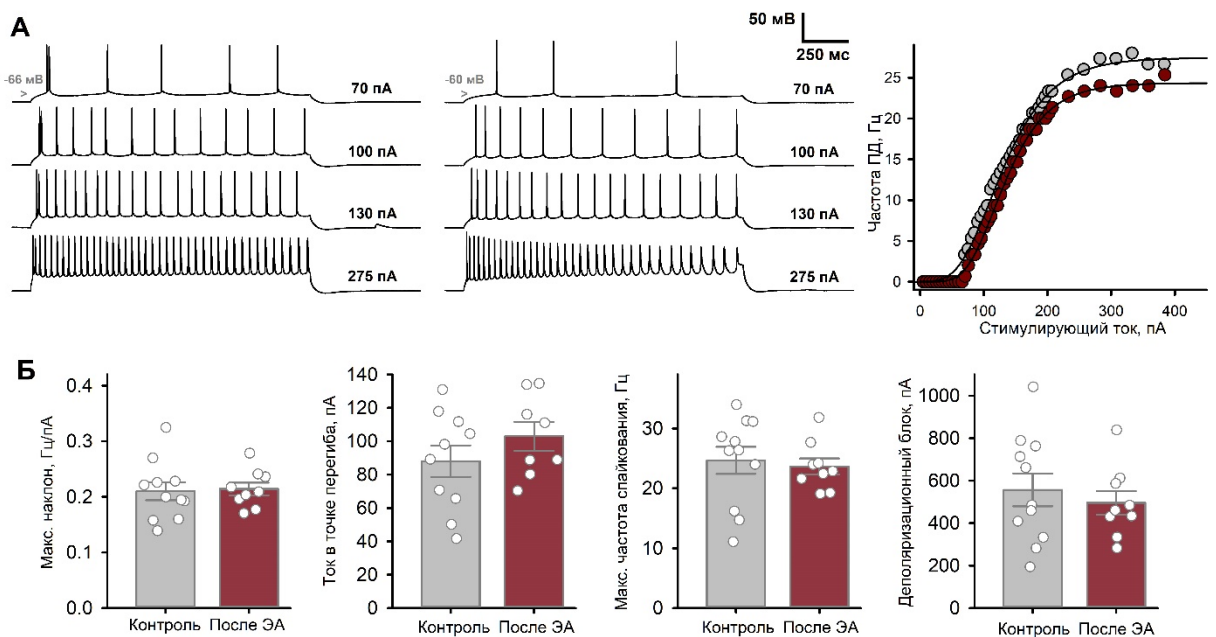


Рисунок 20. Свойства частотно-токовой характеристики после периода эпилептиформной активности *in vitro*.

А, слева – репрезентативные примеры изменений потенциала нейрона в ответ на подаваемые деполяризующие 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.

Кроме того, было проверено, не влияет ли краткий период эпилептиформной активности *in vitro* на форму генерируемых потенциалов действия. Для этого анализировались характеристики первых потенциалов действия, генерируемых в ответ на пороговые ступеньки тока. Период эпилептиформной активности *in vitro* не повлиял ни на амплитуду, ни на полуширину, ни на фазу нарастания потенциала действия; не поменялись также потенциал, при котором наблюдалась генерация первого потенциала действия, ни величина тока реобазы – тока, приводящего к генерации первого потенциала действия (рис. 21).

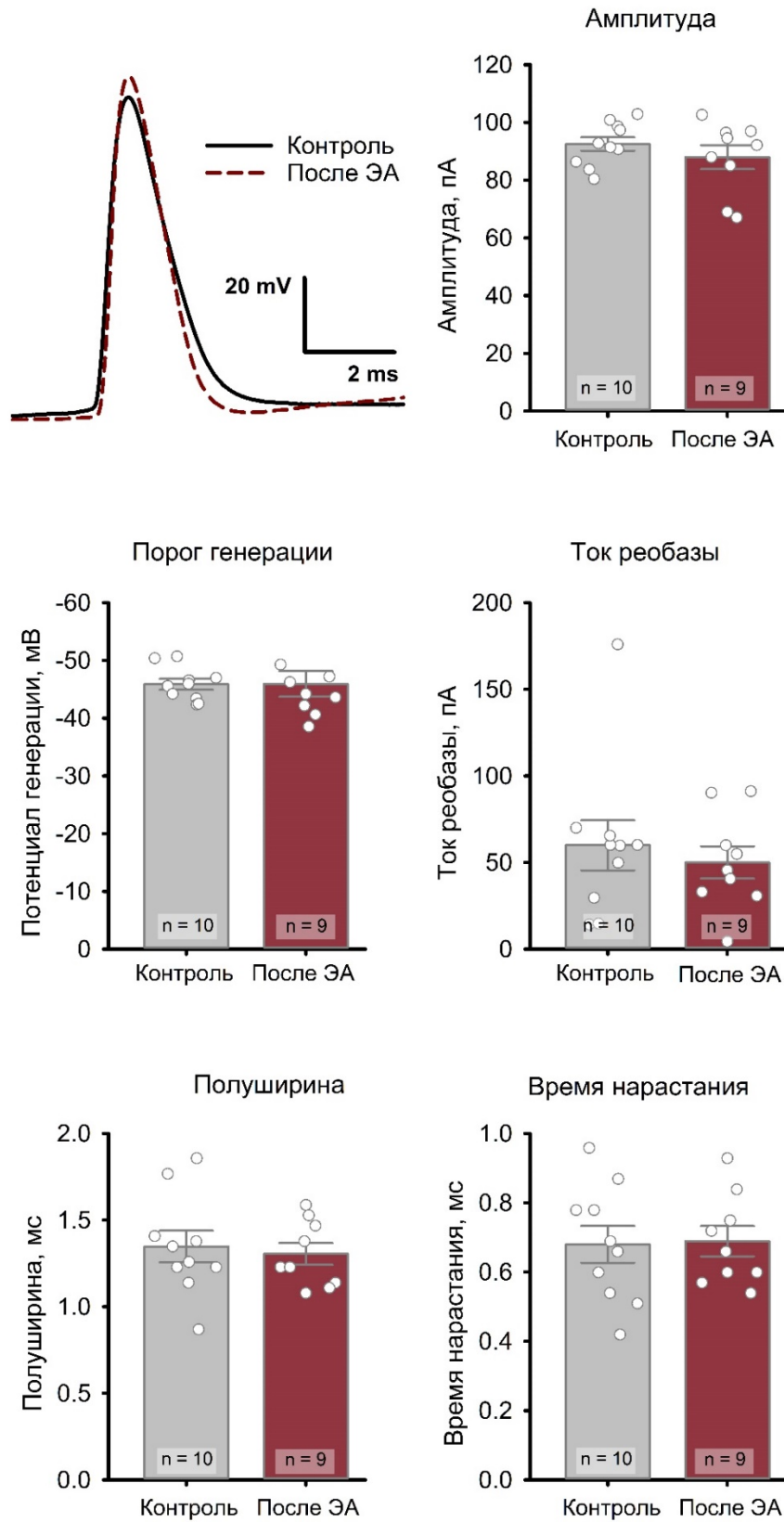


Рисунок 21. Свойства потенциалов действия после периода эпиплептической активности *in vitro*.

В верхнем левом углу – форма потенциала действия в контроле и после периода эпилептиформной активности. Диаграммы иллюстрируют величину амплитуды, порога генерации, полуширина и времени нарастания потенциалов действия. Значимых различий не обнаружено.

Проведенные эксперименты показали, что спустя 1 час после эпилептиформной активности *in vitro* не наблюдается изменений пассивных и активных мембранных свойств нейронов области CA1 гиппокампа, хотя в ряде исследований такие изменения наблюдались.

Неоднократно отмечалось, что эпилептиформная активность влияет на величину входного сопротивления. К увеличению входного сопротивления приводило применение пентилентетразола [156], киндлинга [316], а также увеличение входного сопротивления нейронов было описано для крыс, генетически предрасположенных к эпилепсии [317]. Впрочем, каинат-индуцированный эпилептический статус не изменил входное сопротивление нейронов области CA1 [315], не повлияла ни на входное сопротивление, ни на потенциал покоя нейронов пириформной коры и абнормальная активность, индуцированная повторяющимися залпами тетанической стимуляции [318]. В литий-пилокарпиновой модели же, наоборот, наблюдалось снижение входного сопротивления нейронов энторинальной коры [85]. В целом, сильная реактивность входного сопротивления в ответ на эпилептиформную активность согласуется с представлениями о тесной связи между входным сопротивлением и процессами гомеостатической и негомеостатической пластичности [319].

Помимо входного сопротивления, другие биофизические свойства также оказывались изменены вследствие эпилептиформной активности, причем некоторые из них – спустя часы или сутки после воздействия. Через 3-4 часа после каинат-индуцированного эпилептического статуса увеличивались время задержки (латентность) и полуширина потенциала действия [315]. Спустя сутки после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса уменьшилась временная константа мембраны энторинальных и префронтальных нейронов [85]. После киндлинга наблюдалась деполяризация мембраны нейронов области CA1 [316]. Воздействие тетродотоксина (0,5 мкмоль/л) на незрелые культивируемые нейроны гиппокампа в течение 7-9 дней, приводящее к появлению спонтанных эпилептиформных разрядов, также повлияло на биофизические свойства культивируемых нейронов. После того как состав культуральной среды был замещен на обычный, отмечалось удлинение потенциала действия, отсутствие следовой гиперполяризации и более высокая частота спайкования [320]. Также

сообщалось, что характер спайкования существенно менялся после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса [63,64]. В частности, в контрольных срезах подавляющее большинство нейронов (97%) генерировали одиночные спайки в ответ на подаваемые деполяризующие ступеньки тока. Другая ситуация наблюдалась в эпилептических срезах: только 53% пирамидных клеток генерировали потенциалы действия стандартно, остальным 47% была присуща генерация высокочастотных залпов – от 3 до 6 потенциалов действия в составе залпа. При этом 10% клеток, способных генерировать залпы, демонстрировали также спонтанную активность в покое [63]. Подобное изменение мембранных свойств нейронов области CA1 после эпилептического статуса может быть связано со гиперактивацией Ca^{2+} -каналов Т-типа, согласно данным Su H. и соавторов [64]. Также было показано, что аномальная активность нейронов снижает калиевые токи А-типа [321] и токи, активируемые гиперполяризацией [322,323], но увеличивает токи, опосредованные кальциевыми каналами Т-типа [63,324] и постоянные натриевые токи [325] – все упомянутые выше изменения вносят свой вклад в величину мембранных характеристик нейронов.

Таким образом, изменения мембранных свойств сильно зависят от используемой модели и продолжительности эпилептической активности. Вероятно, короткий период эпилептиформной активности в наших экспериментах был недостаточен для того, чтобы повлиять на мембранные свойства нейронов.

3.6. Глутаматергическая передача между синапсами CA3-CA1 гиппокампа.

3.6.1. Увеличение базовой синаптической передачи

Были зарегистрированы полевые ВПСП в ответ на внеклеточную стимуляцию коллатералей Шаффера. Спустя 1 час после краткосрочного периода эпилептиформной активности переживающие срезы оставались значительно более возбудимыми по сравнению с контролем. Хотя порог генерации полевых ВПСП был одинаковым в обеих группах (контроль: 52 ± 2 мкА, $n = 11$; после ЭА: 46 ± 4 мкА; $n = 6$; t-критерий Стьюдента = 1,49, $p = 0,16$), амплитуда полевых ВПСП росла значительно быстрее в ответ на увеличение силы стимулирующего тока (рис. 22, Б, слева, ANOVA с повторными измерениями: $F_{7,105} = 4,3$, $p < 0,001$). Кроме того, порог генерации популяционного спайка был намного ниже, чем в контрольных срезах (контроль: 150 ± 21 мкА, $n = 11$; 4-АП-срезы: 58 ± 5 мкА; $n = 6$; t-критерий Стьюдента = 3,18, $p < 0,01$).

Чтобы выяснить, не может ли наблюдаемое увеличение синаптической силы быть результатом повышенной пресинаптической возбудимости, был построен график зависимости амплитуды пресинаптического спайка (FV) (параметр, указывающий на

деполяризацию пресинаптического аксона) от силы стимула в контроле и срезах после ЭА (рис. 22, Б, справа). Было обнаружено, что эта зависимость не различалась между группами (эффект эпилептиформной активности: $F_{1,105} = 3,4$, $p = 0,08$), что позволяет предположить, что возбудимость пресинаптических аксонов не пострадала.

Чтобы оценить эффективность базовой синаптической передачи, был определен средний наклон I/O кривой, построенной как отношение амплитуды полевых ВПСП к амплитуде пресинаптического спайка (FV) (рис. 22, В, слева). С использованием сигмоидальной функции Гомперца (Ур. 1) для определения максимального наклона кривой, было установлено, что этот параметр был значительно больше в срезах после ЭА (9 ± 2), чем в контрольных ($4,8 \pm 0,7$, $t = 2,35$, $p = 0,03$; рис. 22, В, справа).

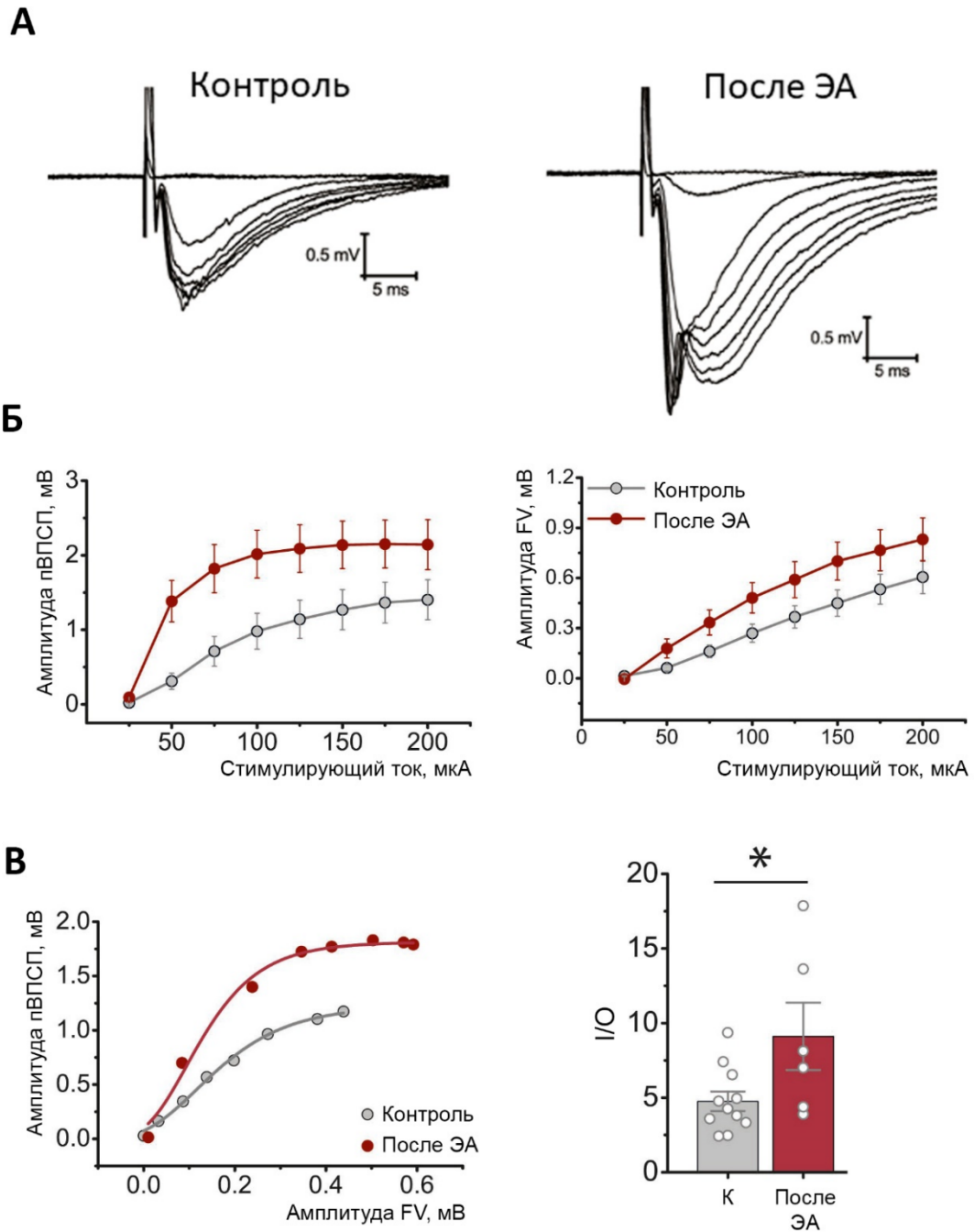


Рисунок 22. Влияние кратковременной эпилептиформной активности на эффективность базовой синаптической передачи между синапсами CA3-CA1 гиппокампа

А – репрезентативные примеры полевых постсинаптических токов (ПСТ) в контроле и после периода эпилептиформной активности;

Б – зависимость амплитуды полевых ВПСП от силы стимулирующего тока (слева), зависимость амплитуды пресинаптического спайка (FV) от силы стимулирующего тока (справа);

В – изменение максимального наклона I/O кривой после периода кратковременной эпилептиформной активности (слева), изменение соотношения входа/выхода (I/O соотношения).

* – $p < 0,05$ - достоверное отличие от контрольной группы по критерию Стьюдента.

Взятые вместе, эти данные указывают на то, что возбудимость нейронов области CA1 увеличивается после эпилептиформной активности за счет повышения эффективности синаптической передачи между синапсами CA3-CA1 гиппокампа. Полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными о последствиях кратковременной эпилептиформной активности *in vitro*. Перфузия гиппокампальных срезов раствором с высокой концентрацией K^+ (10 ммоль/л) в течение 10 минут привела к изменению наклона полевых ВПСП, зарегистрированных в радиальном слое CA1; при этом потенцирование ответов достигало максимума через 30 минут после отмыва проэпилептического раствора и все еще обнаруживалось спустя 60 минут [326]. Аналогичные данные были получены в двух других исследованиях: (1) потенцирование полевых ВПСП наблюдалось спустя 50 мин после того, как раствор с высокой концентрацией K^+ был заменен контрольным [327], и (2) спустя более 40 мин после отмыва 4-АП-содержащего раствора (200 мкмоль/л) [328].

Примечательно, что даже крайне короткий период эпилептиформной активности (40 с) приводил к потенциации амплитуды полевых ВПСП (20 мин после отмыва), хотя в этих экспериментах срезы гиппокампа были подвергнуты воздействию очень высокой внеклеточной концентрации K^+ (50 ммоль/л KCl) [329]. Эпилептиформная активность, длительность которой составляла 0,5–3 мин, также приводила к потенцированию полевых ВПСП в органотипических срезах гиппокампа. Указанная потенциация сохранялась в течение 15 мин после отмыва «не содержащего Mg^{2+} » проэпилептического раствора, и в течение 30 мин после отмыва проэпилептического раствора, содержащего бикакуллин [330]. В другом исследовании использование проэпилептического раствора с повышенной концентрацией K^+ увеличило наклон полевых ВПСП в области CA1, в то время как на амплитуду пресинаптического спайка (FV) это не повлияло [331].

Кроме того, эпилептиформная активность, индуцированная при помощи блокады ГАМК_A-рецептор-опосредованного торможения, приводила к стойким изменениям свойств полевых ВПСП, регистрируемых в *stratum radiatum/moleculare* области CA3. Потенциация полевых ВПСП, определяемая как не менее чем 20 % увеличение наклона восходящей фазы полевых ВПСП, наблюдалась в течение 120 минут после отмыва пенициллина (2000 IU/мл) и прекращения спонтанных эпилептиформных разрядов [332].

Наблюдаемое в нашей работе повышение возбудимости пирамидных нейронов может быть следствием воздействия различных факторов. В число возможных

механизмов входят увеличение вероятности высвобождения глутамата, увеличение количества рецепторов на постсинаптической мембране, а также увеличение входного сопротивления мембраны.

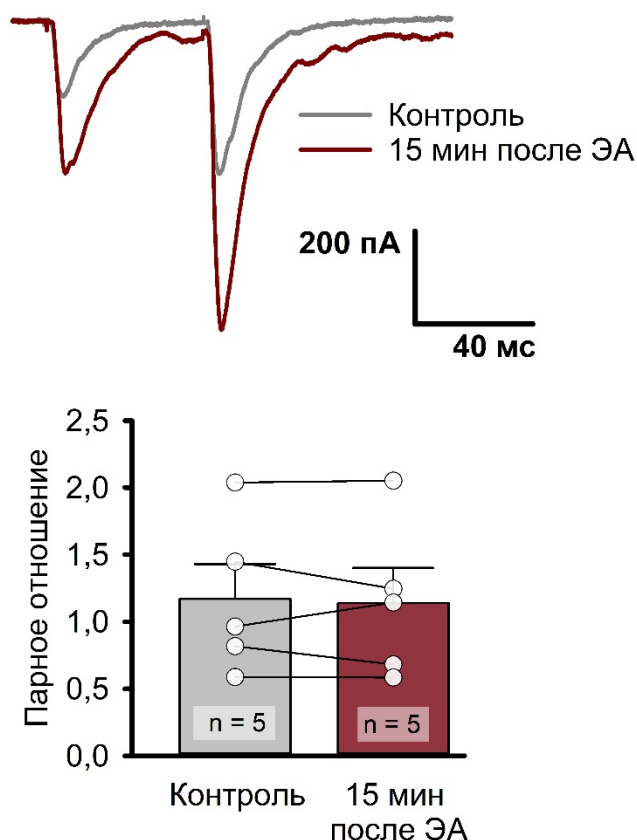
3.6.2. Пресинаптические свойства

Парное отношение

Небольшой размер пресинаптических окончаний (~ 1-2 мкм) затрудняет прямую электрофизиологическую регистрацию, поэтому большинство исследователей сосредотачивается на регистрации активности постсинаптических нейронов, чтобы на основе полученных данных сделать выводы о пресинаптических изменениях. Обычно анализируют постсинаптические токи, возникшие в ответ на электрическую, химическую или оптогенетическую стимуляцию. В случае моделей *in vitro*, подобная стимуляция обеспечивает стабильный уровень синаптической активации. К настоящему времени сложился набор протоколов, используемых для анализа относительного вклада синаптической передачи.

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 стимула, временно увеличивает вероятность высвобождения медиатора в ответ на второй стимул, что получило название «кратковременная пластичность» [333,334]. Относительная пиковая амплитуда первого и второго импульсов, известная как парное соотношение, таким образом, отражает величину пресинаптической вероятности высвобождения медиатора. Если вероятность высвобождения медиатора из пресинаптической терминали высока, то везикулярный пул будет истощен после первого импульса, что приведет к ослаблению синаптического ответа на второй стимул, то есть к синаптической депрессии. Напротив, если вероятность высвобождения медиатора низка, то ответ на второй стимул может быть усилен из-за медленного очищения пресинаптического внутриклеточного Ca^{2+} – феномен, называемый синаптической фасилитацией. Следовательно, изменение парного отношения зачастую интерпретируется как отражающее изменения вероятности высвобождения медиатора, хотя существует множество альтернативных механизмов, приводящих к изменению парного соотношения. Например, ускорение обратного захвата нейромедиатора из синаптической щели, осуществляемое за счёт транспортеров на астроцитах и синаптических окончаниях, способно модулировать парное соотношение.

Чтобы изучить эффект кратковременной epileptiformной активности *in vitro* на вероятность выброса медиатора, сначала были зарегистрированы ответы на парный стимул на раннем сроке – спустя 15 минут после начала отмыва переживающего среза от проэпилептического раствора. В условиях фиксации потенциала на уровне -80 мВ в присутствии блокаторов ГАМК_A рецепторов были получены ответы пирамидных нейронов области CA1 на парный стимул (рис. 23). 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 epileptiformной активности (контроль = $1,17 \pm 0,26$; n = 5; после epileptiformной активности = $1,14 \pm 0,26$; n = 5; парный t-критерий Стьюдента = 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

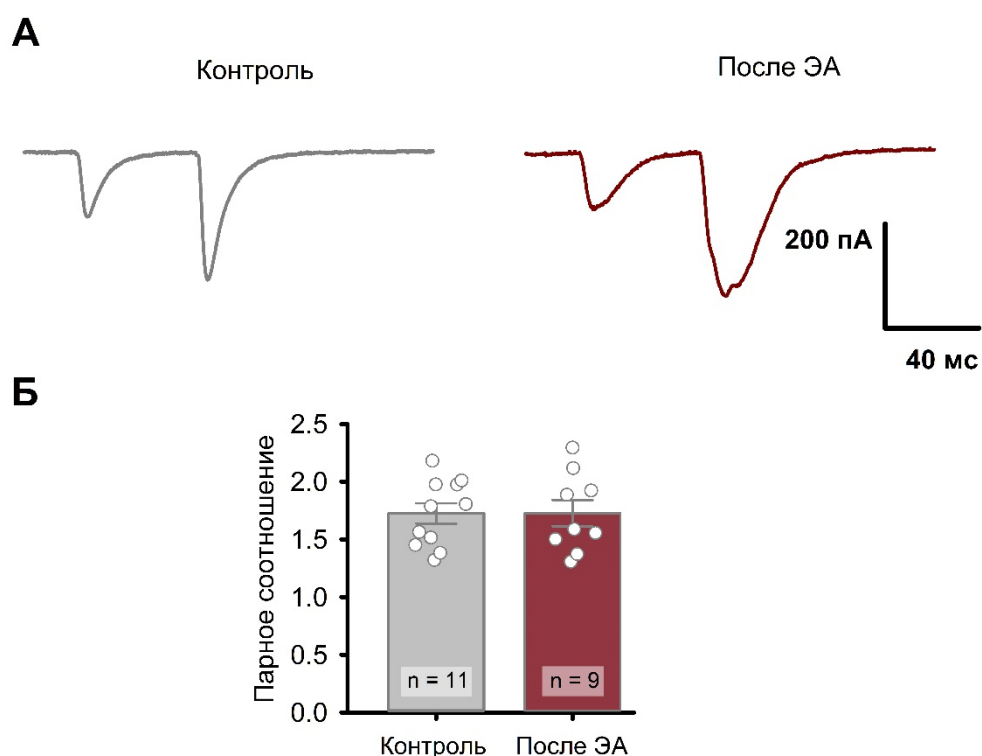


кратковременной epileptiformной активности.

Рисунок 23. 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 СА3-СА1 гиппокампа спустя 1 час после прекращения кратковременной эпилептиформной активности – сроке, достаточном для запуска внутриклеточных сигнальных каскадов и формирования синаптической пластичности. Методом, описанным выше, были получены ответы пирамидных нейронов области СА1 на парный стимул (рис. 24). 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 -критерий Стьюдента = - 0,02, $p = 0,98$). Полученные данные свидетельствуют о том, что вероятность выброса медиатора в синапсах СА3-СА1 гиппокампа сохранялась на



уровне контрольных значений.

Рисунок 24. Ответы пирамидных нейронов области СА1 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). $V_{\text{hold}} = -80$ мВ. Б – парное отношение амплитуд вызванных ВПСТ в ответ на второй и первый стимулы (парное отношение).

На сегодняшний день наиболее подробно исследованы пресинаптические изменения, наблюдаемые непосредственно в ходе эпилептиформной активности. Показан эффект 4-АП на величину парного соотношения – в ходе перфузии переживающих срезов 4-АП-содержащим ACSF фасилитация ответов сменялась депрессией [328,335,336], что свидетельствует о увеличении вероятности выброса глутамата. Эта гипотеза подтверждается и данными о увеличении частоты миниатюрных ВПСТ в ходе 4-АП-индуцированной эпилептиформной активности [328]. Однако продолжительность этих изменений остается неясной. Противоречивые данные были получены в *in vitro* модели, в которой эпилептиформная активность индуцировалась инкубацией в бикакуллине (50 мкмоль/л) на протяжении ночи: частота миниатюрных ВПСТ была увеличена, в то время как парное отношение не изменилось. Наиболее вероятным объяснением этого результата служит не изменение вероятности высвобождения глутамата, а преобразование молчащих синапсов в функциональные [337].

Миниатюрные ВПСТ после периода эпилептиформной активности

Когда генерация потенциалов действия блокирована тетродотоксином (ТТХ), селективным блокатором потенциал-управляемых Na^+ -каналов, высвобождение нейромедиатора из пресинаптической терминали становится стохастическим процессом. В этих условиях момент спонтанного слияния везикулы с пресинаптической мембраной может быть зарегистрирован на постсинаптическом нейроне в форме миниатюрного постсинаптического тока (миниатюрного ПСТ), в частности, в виде либо миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (миниатюрных ВПСТ), либо миниатюрных тормозных постсинаптических токов (миниатюрных ТПСТ). В то время как пресинаптические события, связанные с генерацией потенциалов действия, предпочтительно связаны с активностью высокопороговых потенциал-управляемых Ca^{2+} каналов P/Q (CaV2.2) и N (CaV2.1) типов, стохастический вход Ca^{2+} в случае миниатюрных ПСТ опосредован, в основном, низкопороговыми Ca^{2+} -каналами T типа, в том числе CaV3.1 и CaV3.2 [338]. Следует отметить, что в генерацию миниатюрных ПСТ вовлечены как Ca^{2+} -зависимые, так и Ca^{2+} -независимые процессы [339]. Частота и

амплитуда миниатюрных ПСТ используются в качестве критериев для оценки количества синапсов и относительной силы синапсов, соответственно [340]. Оценка частоты миниатюрных ВПСТ также служит критерием для определения изменений вероятности выброса медиатора.

Регистрация миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов в области CA1 гиппокампа проводилась в присутствии тетродотоксина (0,5 мкмоль/л), а также в присутствии блокаторов ГАМК_A-рецепторов (рис. 25, А). Частота миниатюрных ВПСТ, зарегистрированных после кратковременного периода вызванной эпилептиформной активности, значимо не отличались от контрольных значений (в контроле = 0.21 ± 0.05 Гц; $n = 7$; после ЭА = 0.18 ± 0.03 Гц; $n = 7$), что свидетельствует об отсутствии изменений вероятности высвобождения глутамата в синапсах CA3-CA1 гиппокампа (рис. 25, Г).

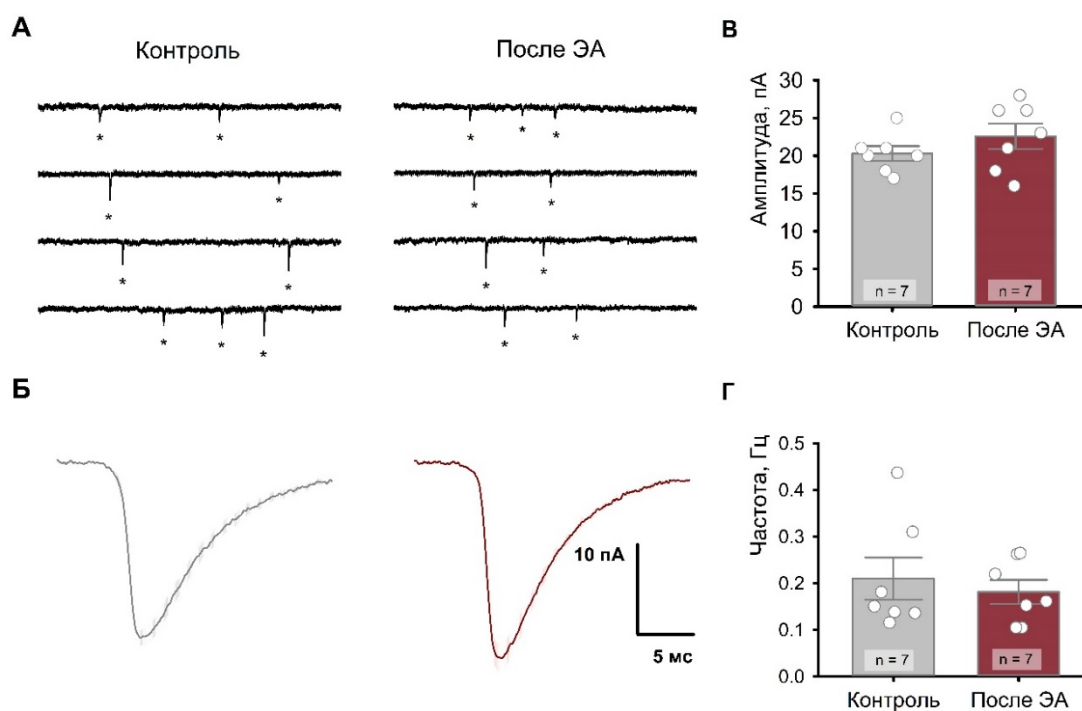


Рисунок 25. Свойства миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (миниатюрных ВПСТ) пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа крысы через 1 час после периода эпилептиформной активности *in vitro* (ЭА), вызванной перфузией переживающего среза проэпилептическим раствором.

А – репрезентативные примеры миниатюрных ВПСТ пирамидных нейронов области CA1 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 наших экспериментах величина амплитуды миниатюрных ВПСТ оставалась неотличимой от контрольных значений (в контроле = 20.29 ± 0.97 пА; $n = 7$; после ЭА = 22.57 ± 1.69 пА; $n = 7$) (рис. 25, В), хотя в ряде исследований было показано, что эпилептиформная активность влияет на свойства миниатюрных ответов. Амплитуда миниатюрных ВПСТ, зарегистрированных в пирамидных нейронах области CA1, была повышена в срезах мозга животных после пилокарпин-индуцированных судорог [341] и судорог, индуцированных гипоксией [213]. Различия в последствиях эпилептиформной активности могут быть связаны с тем, что в вышеуказанных исследованиях эпилептиформная активность моделировалась *in vivo*, а не *in vitro*.

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 не меняется после периода эпилептиформной активности *in vitro*.

3.6.3. Постсинаптические характеристики

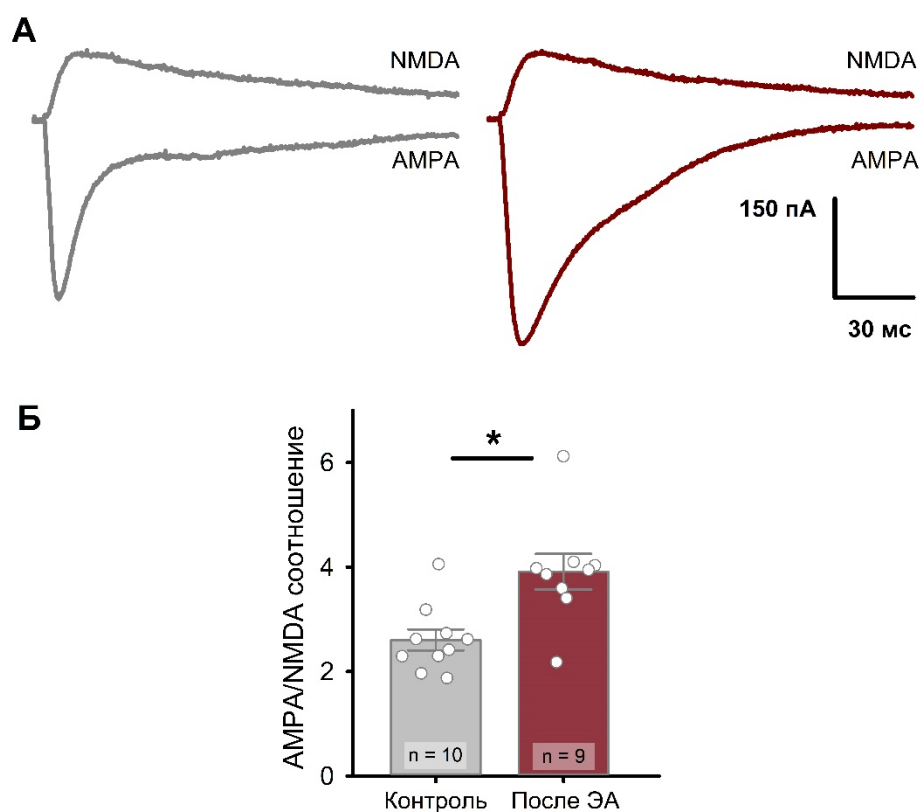
AMPA/NMDA соотношение после периода эпилептиформной активности

Возбуждающая синаптическая передача в центральных синапсах опосредуется пресинаптическим высвобождением глутамата, который связывается со специализированными рецепторами на постсинаптической мембране. Три основных типа ионотропных рецепторов, чувствительных к глутамату – AMPA-, NMDA- и каинатные рецепторы – имеют различную кинетику. Кинетика AMPA-рецептор-опосредованных токов характеризуется быстрой фазой нарастания (2-7 мс) и быстрой фазой спада (20-30 мс). Напротив, NMDA-рецепторы, которые обычно активируются только после вызванного деполяризацией снятия Mg^{2+} -опосредованного блока, демонстрируют медленное нарастание (~ 20 мс) и имеют медленную двухэкспоненциальную кинетику спада (40–200 мс).

Встраивание AMPA-рецепторов является широко известным механизмом синаптической пластичности, происходящим во время обучения и вовлеченным в формирование памяти [342]. Доставка AMPA-рецепторов как в синапсы, так и из них, включает в себя процессы латеральной диффузии [343] и везикулярного транспорта [344]. Оказавшись на синаптической мембране, AMPA-рецепторы, как правило, подвижны и быстро диффундируют; в случае же формирования долговременной потенциации (LTP)

AMPA-рецепторы закрепляются на месте [343,345]. Как недавно было подтверждено, участки плазматической мембраны, где наблюдаются закрепление и кластеризация AMPA-рецепторов, находятся напротив сайтов высвобождения медиатора, что обеспечивает оптимальную активацию рецепторов [346,347].

Представляется вероятным, что формирование абнормальной синаптической пластичности, запускаемое эпилептиформной активностью, также будет сопровождаться изменением свойств постсинаптических рецепторов, и, в частности, свойств AMPA рецепторов. Чтобы проверить это предположение, были зарегистрированы AMPA-рецептор-опосредованные и NMDA-рецептор-опосредованные возбуждающие постсинаптические токи (ВПСТ) (рис. 26). Соотношение AMPA- и NMDA-рецепторов на постсинаптической мембране оценивалось через соотношение пиковых амплитуд AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованных ответов. Было обнаружено, что короткий период эпилептиформной активности приводит к увеличению AMPA /NMDA соотношения. (CTRL = $2,61 \pm 0,20$; n = 10; 4-АП = $3,91 \pm 0,34$; n = 9; t-критерий Стьюдента = -3,39, p=



0,003).

Рисунок 26. Соотношение AMPA и NMDA рецепторов на постсинаптической мембране 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 мМ). «AMPA» - AMPA-рецептор-опосредованные ВПСТ при потенциале фиксации, равном -80 мВ.

Б – соотношение пиковых амплитуд AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованных ВПСТ (AMPA/NMDA соотношение).

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 нейронных сетей гиппокампа.

Ранее сообщалось, что эпилептиформная активность влияет на величину AMPA/NMDA соотношения, хотя это и было показано на другой модели эпилепсии. AMPA/NMDA соотношение было увеличено в органотипических срезах гиппокампа после их инкубации в бикикуллине (50 мкмоль/л) в течение ночи. Добавление в инкубационный раствор блокатора NMDA-рецепторов CPP предотвращало этот эффект эпилептиформной активности, что свидетельствует, как минимум, о NMDA-рецептор-опосредованном характере указанных изменений [337].

Как упоминалось ранее, амплитуда миниатюрных ВПСТ является мерой ионного потока через постсинаптические рецепторы, и в нашем исследовании амплитуда миниатюрных ВПСТ не изменялась, что не полностью согласуется с данными эксперимента по оценке AMPA/NMDA соотношения. Одной из причин наблюдаемых различий может выступать тот факт, что стимуляция коллатералей Шаффера обеспечивает сугубо поступление информации от нейронов области CA3, в то время как в генерации миниатюрных событий принимает участие все многообразие терминалей, оканчивающихся на нейронах CA1. В настоящее время также накопился значительный объем данных, свидетельствующих о том, что спонтанное и вызванное высвобождение медиатора могут быть раздельными явлениями с разными регуляторными механизмами и выполняемой функциональной ролью [348,349].

3.7. Глутаматергическая передача в энторинальной коре.

3.7.1. Пресинаптические свойства

Поскольку в гиппокампе мы не выявили пресинаптических изменений после эпилептиформной активности *in vitro* ни методом регистрации ответов на парный стимул, ни путем оценки частоты миниатюрных событий, в энторинальной коре мы не стали проводить столь же подробный анализ. Кроме того, в нашей лаборатории уже была выполнена оценка миниатюрных событий в энторинальной коре в похожей *in vitro* модели, где переживающие срезы выдерживались в проэпилептическом растворе в течение часа. Изменений частоты миниатюрных ВПСТ как через 10 мин, так и через час после смены проэпилептического раствора на контрольный раствор выявлено не было (рис. 27) [350].

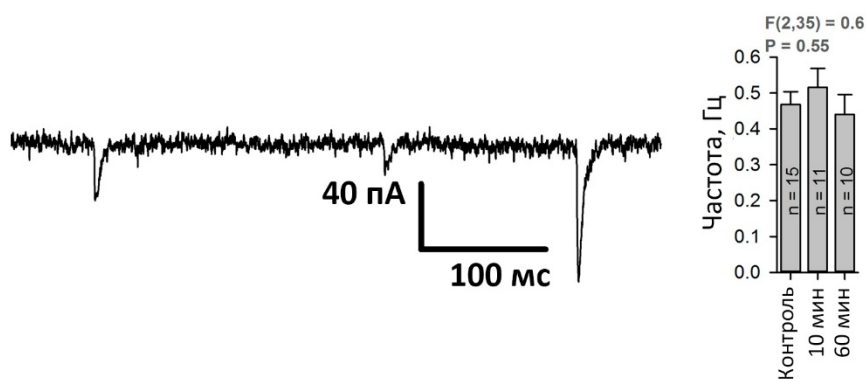


Рисунок 27. Частота миниатюрных ВПСТ нейронов энторинальной коры спустя 10 и 60 минут после периода эпилептиформной активности

3.7.2. Постсинаптические свойства

Увеличение AMPA-рецептор-опосредованных ответов.

Как было описано выше, в гиппокампе основным последствием краткого периода эпилептиформной активности было изменение постсинаптических свойств нейронов гиппокампа. Проводя эксперименты в энторинальной коре, мы сосредоточили наше внимание на оценке постсинаптических изменений, а именно: изменений AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованной синаптической передачи.

Для выполнения этой задачи нами были зарегистрированы постсинаптические токи (ПСТ) 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. 28). 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, как описано в главе Материалы и методы (раздел 2.3.2. Регистрация синаптической активности методом патч-кламп).

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. 28, Б). Оценка NMDA-рецептор-опосредованной проводимости показала, что эпилептиформная активность не повлияла ни на пиковую величину проводимости, ни на площадь под кривой (рис. 28, В). Вследствие этого, увеличилось (в 4,66 раза) и среднее значение отношения пиковых проводимостей, опосредованных AMPA- и NMDA-рецепторами (рис. 28, 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 выражалось 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, $p = 0.005$).

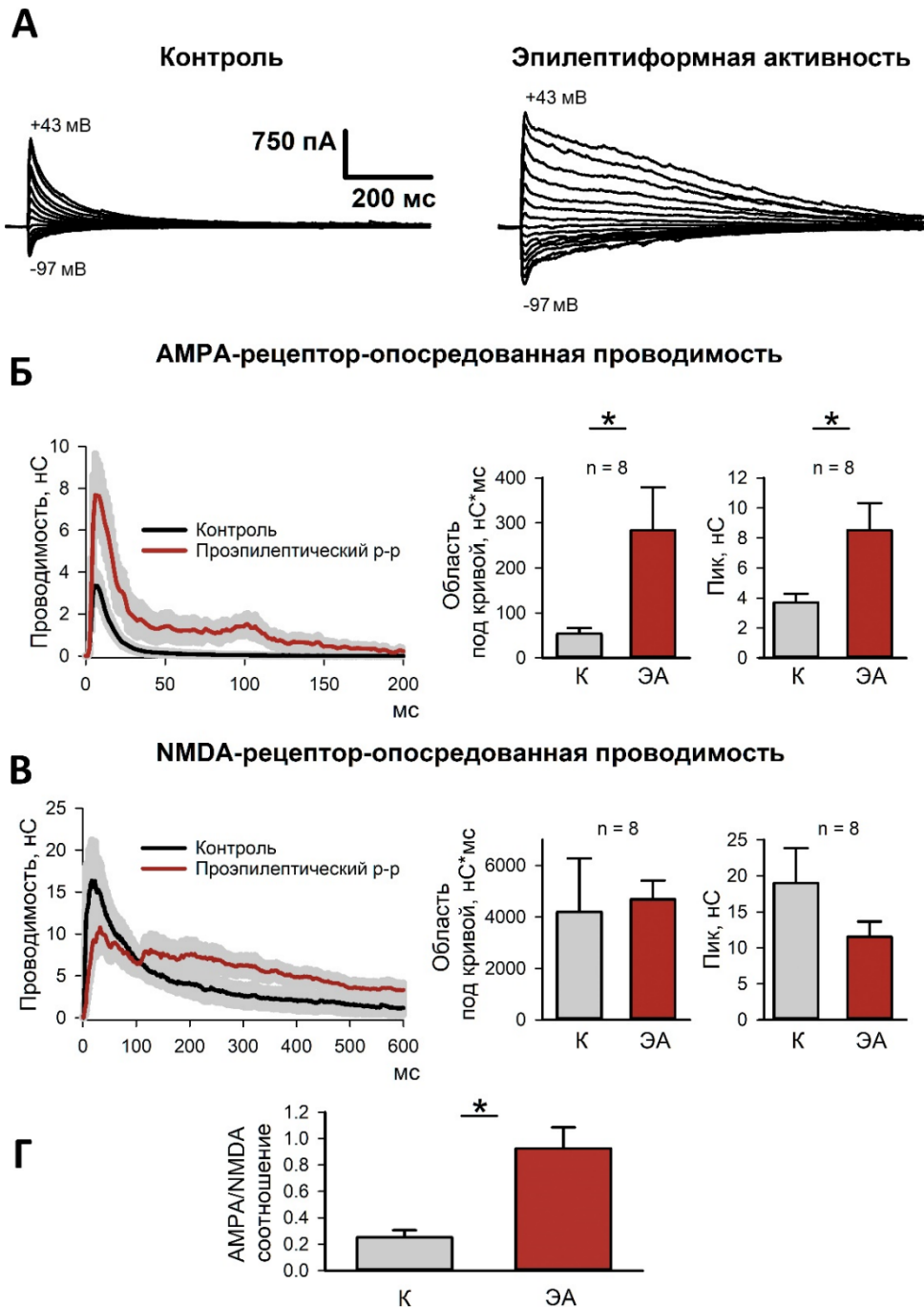


Рисунок 28. АМРА- и NMDA-рецептор-опосредованные компоненты ответа нейронов энторинальной коры крысы на внеклеточный электрический стимул в контрольных условиях (К) и в ходе эпилептиформной активности (ЭА).

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 – АМРА-рецептор-опосредованная синаптическая проводимость, вычисленная методом разложения вызванных ПСТ на синаптические проводимости, опосредованные АМРА-, NMDA- и ГАМК_A-рецепторами. Слева – величина АМРА-

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 $0,019$ для пика и области под кривой, соответственно);

В – NMDA-рецептор-опосредованная синаптическая проводимость, вычисленная методом разложения вызванных ПСТ на синаптические проводимости, опосредованные AMPA-, NMDA- и ГАМКа-рецепторами. (парный t-критерий Стьюдента);

Г – отношение пиковых моносинаптических проводимостей, опосредованных AMPA- и NMDA-рецепторами (парный t-критерий Стьюдента, $p = 0,006$).

Потенциация AMPA-рецептор-опосредованных ответов после прекращения эпилептиформной активности.

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 (ACSF), затем в срезе вызывалась эпилептиформная активность (ACSF заменялся проэпилептическим раствором), 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. 29). 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).

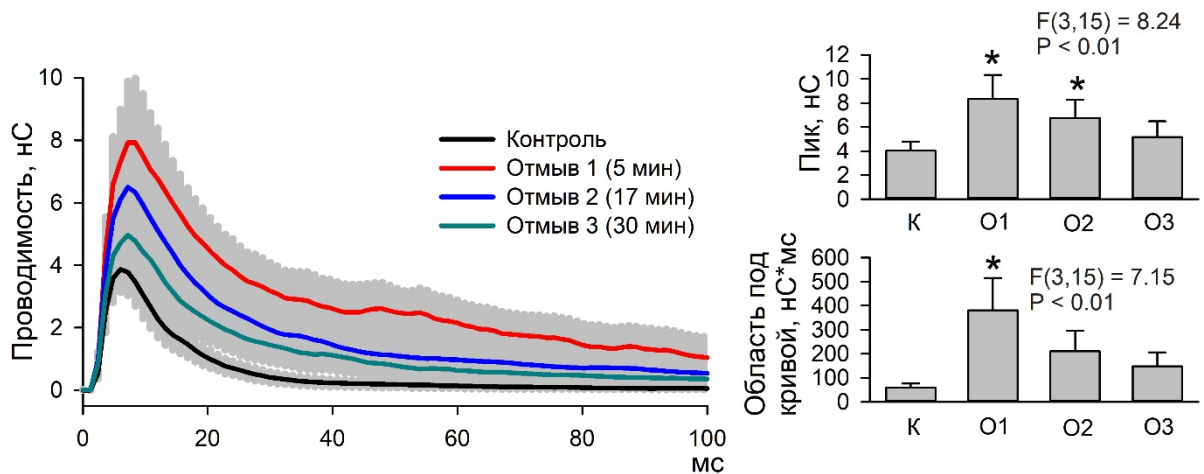


Рисунок 29. Потенциация АМРА-рецептор-опосредованного компонента вызванного ответа сохраняется после прекращения эпилептиформной активности.

Слева – АМРА-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 АМРА-рецептор-опосредованной проводимости. Звездочки указывают на существенное отличие от контрольного уровня (апостериорный тест Даннета).

3.8. Обсуждение обнаруженных постсинаптических изменений в энторинальной коре и гиппокампе

И в гиппокампе, и в энторинальной коре наблюдалось увеличение АМРА-рецептор-опосредованного компонента синаптических ответов после краткого периода эпилептиформной активности *in vitro*. 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 АМРА-рецептор-опосредованной синаптической передачи в гиппокампе. [218]. Потенцирование АМРА-рецептор-опосредованных токов наблюдалось также в срезах мозга 10-дневных крысят, полученных спустя 1 час после судорог *in vivo*, вызванных гипоксией. Введение антагонистов АМРА-рецепторов NBQX, топирамата или GYKI-53773 немедленно после судорог *in vivo* ослабляло потенцирование АМРА-рецептор-опосредованных токов, фосфорилирование GluA1 субъединицы, а также препятствовало формированию повышенной склонности к судорогам, наблюдаемой у крысят, не получавших антагонистов [213]. 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 – временной период, недоступный при использовании моделей *in vivo*. Сильное увеличение амплитуды (в 2 раза) и площади под кривой (в 3 раза) AMPA-рецептор-опосредованных ответов в энторинальной коре спустя 5 минут после периода эпилептиформной активности, которые мы наблюдали, свидетельствуют в пользу гипотезы о высокой эпилептогенности энторинальной коры.

Хотя период эпилептиформной активности *in vitro* привел в наших экспериментах к постсинаптическим изменениям в синапсах CA3-CA1 гиппокампа, о чем свидетельствует увеличение AMPA/NMDA соотношения, в то же время мы не обнаружили увеличения амплитуды миниатюрных ВПСТ – показателя, так же используемого для оценки постсинаптических изменений. Одним из возможных объяснений данного противоречия может служить тот факт, что миниатюрные события складываются из активности всего спектра эфферентов, приходящих на нейроны CA1, тогда как вызванные события являются последствием стимуляции коллатералей Шаффера, то есть опосредованы только эфферентами, приходящими от нейронов области CA3. Кроме того, недавно было показано, что спонтанное и синхронное высвобождение медиатора представляют собой разные процессы [338–340].

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 [183]. Фосфорилирование S831 и S845 сайтов GluA1 субъединицы наблюдалось спустя 1 час после судорог, вызванных пентилентетразолом, и спустя 24 часа после судорог, вызванных гипоксией [214]. В другом исследовании было замечено, что уровень поверхностной экспрессии субъединицы GluA1 был увеличен как следствие 40-минутного периода судорог, индуцированных пилокарпином 183 [341]. 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 [351]. 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 [352]. 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 [61], 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 ГАМК_A-рецептор-опосредованная проводимость, тогда как в случае эпилептиформных разрядов 2 типа ГАМК_A-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 [112].

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 икctalных разрядов [12]. 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 [85,315]. 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 [353]. 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 [353]. 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 поменялась 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 [353]. 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 [84].

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 [183]. 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 [214,341]. 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. И в энторинальной коре, и в гиппокампе наблюдались как интериктальная, так и иктальная активность. В обеих зонах наблюдались ГАМКергические токи, 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 энторинальной коре и области CA1 гиппокампа в изучаемый период: в обеих структурах наблюдалось увеличение AMPA/NMDA-соотношения. В энторинальной коре было выявлено усиление AMPA-рецептор-опосредованного компонента ответов на 3 исследованных временных интервалах как в ходе эпилептиформной активности *in vitro*, так и в течение получаса после отмыва проэпилептического раствора.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Wieser, H.G. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004, 45, 695–714.
2. Boido, D.; Jesuthasan, N.; De Curtis, M.; Uva, L. Network dynamics during the progression of seizure-like events in the hippocampal-parahippocampal regions. *Cereb. Cortex* 2014, 24, 163–173.
3. Calcagnotto, M.E.; Barbarosie, M.; Avoli, M. Hippocampus-entorhinal cortex loop and seizure generation in the young rodent limbic system. *J. Neurophysiol.* 2000, 83, 3183–3187.
4. Behr, J.; Lyson, K.J.; Mody, I. Enhanced propagation of epileptiform activity through the kindled dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 1998, 79, 1726–1732.
5. Bartolomei, F.; Khalil, M.; Wendling, F.; Sontheimer, A.; Regis, J.; Ranjeva, J.-P.; Guye, M.; Chauvel, P. Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia* 2005, 46, 677–687.
6. Bear, J.; Lothman, E.W. An in vitro study of focal epileptogenesis in combined hippocampal-parahippocampal slices. *Epilepsy Res.* 1993, 14, 183–193.
7. Barbarosie, M.; Avoli, M. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J. Neurosci.* 1997, 17, 9308–9314.
8. Lu, Y.; Zhong, C.; Wang, L.; Wei, P.; He, W.; Huang, K.; Zhang, Y.; Zhan, Y.; Feng, G.; Wang, L. Optogenetic dissection of ictal propagation in the hippocampal-entorhinal cortex structures. *Nat. Commun.* 2016, 7, 10962.
9. Barbarosie, M.; Louvel, J.; Kurcewicz, I.; Avoli, M. CA3-released entorhinal seizures disclose dentate gyrus epileptogenicity and unmask a temporoammonic pathway. *J. Neurophysiol.* 2000, 83, 1115–1124.
10. Engel, J.; Bragin, A.; Staba, R.; Mody, I. High-frequency oscillations: What is normal and what is not? *Epilepsia* 2009, 50, 598–604.
11. Caron, D.; Canal-Alonso, Á.; Panuccio, G. Mimicking CA3 Temporal Dynamics Controls Limbic Ictogenesis. *Biology (Basel)*. 2022, 11.
12. Barbarosie, M.; Avoli, M. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J. Neurosci.* 1997, 17, 9308–9314.
13. Ziburkus, J.; Cressman, J.R.; Schiff, S.J. Seizures as imbalanced up states: excitatory and inhibitory conductances during seizure-like events. *J. Neurophysiol.* 2013, 109, 1296–1306.
14. Cohen, I.; Navarro, V.; Clemenceau, S.; Baulac, M.; Miles, R. On the origin of interictal

- activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* (80-.). 2002, 298, 1418–1421.
15. Dulla, C.G.; Janigro, D.; Jiruska, P.; Raimondo, J. V.; Ikeda, A.; Lin, C.C.K.; Goodkin, H.P.; Galanopoulou, A.S.; Bernard, C.; de Curtis, M. How do we use in vitro models to understand epileptiform and ictal activity? A report of the TASK1-WG4 group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. *Epilepsia Open* 2018, 3, 460–473.
 16. Bell, G.S.; Sander, J.W. CPD - Education and self-assessment. The epidemiology of epilepsy: The size of the problem. *Seizure* 2001, 10, 306–316.
 17. Berg, A.T.; Berkovic, S.F.; Brodie, M.J.; Buchhalter, J.; Cross, J.H.; Van Emde Boas, W.; Engel, J.; French, J.; Glauser, T.A.; Mathern, G.W.; et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010, 51, 676–685.
 18. Williamson, P.; Engel, J. Complex partial seizures. In *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*; Engel, J., Pedley, T., Eds.; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, Pennsylvania, 1997, 557–566.
 19. Engel J., J. Mesial temporal lobe epilepsy: What have we learned? *Neuroscientist* 2001, 7, 340–352.
 20. Leśkiewicz, M.; Lasoń, W. The neurochemical mechanisms of temporal lobe epilepsy: an update. *Przegląd Lek.* 2007, 64, 960–964.
 21. Pitkänen, A.; Lukasiuk, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol.* 2011, 10, 173–186.
 22. Holtkamp, M.; Meierkord, H. Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, 64, 2023–2041.
 23. Arellano, J.I.; Muñoz, A.; Ballesteros-Yáñez, I.; Sola, R.G.; DeFelipe, J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 2004, 127, 45–64.
 24. Gnatkovsky, V.; Librizzi, L.; Trombin, F.; De Curtis, M. Fast activity at seizure onset is mediated by inhibitory circuits in the entorhinal cortex in vitro. *Ann. Neurol.* 2008, 64, 674–686.
 25. Muldoon, S.F.; Villette, V.; Tressard, T.; Malvache, A.; Reichinnek, S.; Bartolomei, F.; Cossart, R. GABAergic inhibition shapes interictal dynamics in awake epileptic mice. *Brain* 2015, 138, 2875–2890.
 26. Derchansky, M.; Jahromi, S.S.; Mamani, M.; Shin, D.S.; Sik, A.; Carlen, P.L. Transition to seizures in the isolated immature mouse hippocampus: A switch from dominant phasic inhibition to dominant phasic excitation. *J. Physiol.* 2008, 586, 477–494.
 27. Ziburkus, J.; Cressman, J.R.; Barreto, E.; Schiff, S.J. Interneuron and pyramidal cell

- interplay during in vitro seizure-like events. *J. Neurophysiol.* 2006, 95, 3948–3954.
28. Huberfeld, G.; Menendez de la Prida, L.; Pallud, J.; Cohen, I.; Le Van Quyen, M.; Adam, C.; Clemenceau, S.; Baulac, M.; Miles, R. Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat. Neurosci.* 2011, 14, 627–634.
 29. Krook-Magnuson, E.; Armstrong, C.; Oijala, M.; Soltesz, I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat. Commun.* 2013, 4, 1376.
 30. Shiri, Z.; Manseau, F.; Lévesque, M.; Williams, S.; Avoli, M. Interneuron activity leads to initiation of low-voltage fast-onset seizures. *Ann. Neurol.* 2015, 77, 541–546.
 31. Yekhlief, L.; Breschi, G.L.; Lagostena, L.; Russo, G.; Taverna, S. Selective activation of parvalbumin- or somatostatin-expressing interneurons triggers epileptic seizurelike activity in mouse medial entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.* 2015, 113, 1616–1630.
 32. Sessolo, M.; Marcon, I.; Bovetti, S.; Losi, G.; Cammarota, M.; Ratto, G.M.; Fellin, T.; Carmignoto, G. Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity. *J. Neurosci.* 2015, 35, 9544–9557.
 33. Chang, M.; Dian, J.A.; Dufour, S.; Wang, L.; Moradi Chameh, H.; Ramani, M.; Zhang, L.; Carlen, P.L.; Womelsdorf, T.; Valiante, T.A. Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through post-inhibitory rebound excitation. *Neurobiol. Dis.* 2018, 109, 102–116.
 34. Magloire, V.; Cornford, J.; Lieb, A.; Kullmann, D.M.; Pavlov, I. KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. *Nat. Commun.* 2019, 10, 1225.
 35. Misgeld, U.; Deisz, R.A.; Dodt, H.U.; Lux, H.D. The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science* (80-.). 1986, 232, 1413–1415.
 36. Sipilä, S.T.; Huttu, K.; Yamada, J.; Afzalov, R.; Voipio, J.; Blaesse, P.; Kaila, K. Compensatory enhancement of intrinsic spiking upon NKCC1 disruption in neonatal hippocampus. *J. Neurosci.* 2009, 29, 6982–6988.
 37. Rivera, C.; Voipio, J.; Kaila, K. Two developmental switches in GABAergic signalling: The K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J. Physiol.* 2005, 562, 27–36.
 38. Barolet, A.W.; Morris, M.E. Changes in extracellular K⁺ evoked by GABA, THIP and baclofen in the guinea-pig hippocampal slice. *Exp. Brain Res.* 1991, 84, 591–598.
 39. Autere, A.M.; Lamsa, K.; Kaila, K.; Taira, T. Synaptic activation of GABA(A) receptors induces neuronal uptake of Ca²⁺ in adult rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 1999, 81, 811–816.
 40. Bartos, M.; Vida, I.; Jonas, P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations

- in inhibitory interneuron networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007, 8, 45–56.
41. Dzhala, V.I.; Staley, K.J. Mechanisms of fast ripples in the hippocampus. *J. Neurosci.* 2004, 24, 8896–8906.
 42. Breton, V.; Bardakjian, B.; Carlen, P. Phase coherent currents underlying neocortical seizure-like state transitions. *eNeuro* 2019, 6.
 43. Suffczynski, P.; Lopes Da Silva, F.H.; Parra, J.; Velis, D.N.; Bouwman, B.M.; Van Rijn, C.M.; Van Hese, P.; Boon, P.; Khosravani, H.; Derchansky, M.; et al. Dynamics of epileptic phenomena determined from statistics of ictal transitions. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2006, 53, 524–532.
 44. Amaral, D.G.; Insausti, R.; Cowan, W.M. The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organization. *J. Comp. Neurol.* 1987, 264, 326–355.
 45. Insausti, R.; Herrero, M.T.; Witter, M.P. Entorhinal cortex of the rat: Cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* 1997, 7, 146–183.
 46. Spencer, S.S.; Spencer, D.D. Entorhinal–Hippocampal Interactions in Medial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 1994, 35, 721–727.
 47. Bernasconi, N.; Bernasconi, A.; Andermann, F.; Dubeau, F.; Feindel, W.; Reutens, D.C. Entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy: A quantitative MRI study. *Neurology* 1999, 52, 1870–1876.
 48. Plate, K.H.; Wieser, H.G.; Yasargil, M.G.; Wiestler, O.D. Neuropathological findings in 224 patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol.* 1993, 86, 433–438.
 49. Du, F.; Eid, T.; Lothman, E.W.; Köhler, C.; Schwarcz, R. Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 1995, 15, 6301–6313.
 50. Du, F.; Eid, T.; Schwarcz, R. Neuronal damage after the injection of aminoxyacetic acid into the rat entorhinal cortex: A silver impregnation study. *Neuroscience* 1997, 82, 1165–1178.
 51. Uva, L.; Librizzi, L.; Wendling, F.; De Curtis, M. Propagation dynamics of epileptiform activity acutely induced by bicuculline in the hippocampal-parahippocampal region of the isolated guinea pig brain. *Epilepsia* 2005, 46, 1914–1925.
 52. Téllez-Zenteno, J.F.; Hernández-Ronquillo, L. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res. Treat.* 2012, 2012, 1–5.
 53. Witter, M.P.; Doan, T.P.; Jacobsen, B.; Nilssen, E.S.; Ohara, S. Architecture of the entorhinal cortex a review of entorhinal anatomy in rodents with some comparative notes. *Front. Syst. Neurosci.* 2017, 11.

54. Cheng, S. The crisp theory of hippocampal function in episodic memory. *Front. Neural Circuits* 2013, 7.
55. Ang, C.W.; Carlson, G.C.; Coulter, D.A. Massive and specific dysregulation of direct cortical input to the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 2006, 26, 11850–11856.
56. Meyer, M.; Kienzler-Norwood, F.; Bauer, S.; Rosenow, F.; Norwood, B.A. Removing entorhinal cortex input to the dentate gyrus does not impede low frequency oscillations, an EEG-biomarker of hippocampal epileptogenesis. *Sci. Rep.* 2016, 6, 25660.
57. Freund, T.F.; Buzsáki, G. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus* 1996, 6, 347–470.
58. Isomura, Y.; Fujiwara-Tsukamoto, Y.; Takada, M. Glutamatergic propagation of GABAergic seizure-like afterdischarge in the hippocampus in vitro. *J. Neurophysiol.* 2003, 90, 2746–2751.
59. Bernard, C.; Wheal, H. V. A role for synaptic and network plasticity in controlling epileptiform activity in CA1 in the kainic acid-lesioned rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 1996, 495, 127–142.
60. Khalilov, I.; Holmes, G.L.; Ben-Ari, Y. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat. Neurosci.* 2003, 6, 1079–1085.
61. Avoli, M.; D’Antuono, M.; Louvel, J.; Köhling, R.; Biagini, G.; Pumain, R.; D’Arcangelo, G.; Tancredi, V. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog. Neurobiol.* 2002, 68, 167–201.
62. Wheal, H. V.; Chad, J.E.; Cannon, R.C.; Bernard, C. Pro-epileptic changes in synaptic function can be accompanied by pro- epileptic changes in neuronal excitability. *Trends Neurosci.* 1998, 21, 167–174.
63. Sanabria, E.R.G.; Su, H.; Yaari, Y. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Physiol.* 2001, 532, 205–216.
64. Su, H.; Sochivko, D.; Becker, A.; Chen, J.; Jiang, Y.; Yaari, Y.; Beck, H. Upregulation of a T-Type Ca²⁺ Channel Causes a Long-Lasting Modification of Neuronal Firing Mode after Status Epilepticus. *J. Neurosci.* 2002, 22, 3645–3655.
65. Chen, S.; Su, H.; Yue, C.; Remy, S.; Royeck, M.; Sochivko, D.; Opitz, T.; Beck, H.; Yaari, Y. An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *J. Neurophysiol.* 2011, 105, 117–129.
66. Ascoli, G.A.; Alonso-Nanclares, L.; Anderson, S.A.; Barrionuevo, G.; Benavides-

- Piccione, R.; Burkhalter, A.; Buzsáki, G.; Cauli, B.; DeFelipe, J.; Fairén, A.; et al. Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008, 9, 557–568.
67. Klausberger, T.; Somogyi, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science* (80-.). 2008, 321, 53–57.
 68. DeFelipe, J.; López-Cruz, P.L.; Benavides-Piccione, R.; Bielza, C.; Larrañaga, P.; Anderson, S.; Burkhalter, A.; Cauli, B.; Fairén, A.; Feldmeyer, D.; et al. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013, 14, 202–216.
 69. Buhl, E.H.; Halasy, K.; Somogyi, P. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 1994, 368, 823–828.
 70. Somogyi, P.; Nunzi, M.G.; Gorio, A.; Smith, A.D. A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res.* 1983, 259, 137–142.
 71. McBain, C.J.; DiChiara, T.J.; Kauer, J.A. Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 1994, 14, 4433–4445.
 72. Cossart, R.; Dinocourt, C.; Hirsch, J.C.; Merchan-Perez, A.; De Felipe, J.; Ben-Ari, Y.; Esclapez, M.; Bernard, C. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat. Neurosci.* 2001, 4, 52–62.
 73. Dinocourt, C.; Petanjek, Z.; Freund, T.F.; Ben-Ari, Y.; Esclapez, M. Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J. Comp. Neurol.* 2003, 459, 407–425.
 74. Wyeth, M.S.; Zhang, N.; Mody, I.; Houser, C.R. Selective reduction of cholecystokinin-positive basket cell innervation in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 2010, 30, 8993–9006.
 75. Sun, C.; Sun, J.; Erisir, A.; Kapur, J. Loss of cholecystokinin-containing terminals in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 2014, 62, 44–55.
 76. Fujiwara-Tsukamoto, Y.; Isomura, Y.; Kaneda, K.; Takada, M. Synaptic interactions between pyramidal cells and interneurone subtypes during seizure-like activity in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 2004, 557, 961–979.
 77. Dreier, J.P.; Heinemann, U. Regional and time dependent variations of low Mg²⁺ induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp. brain Res.* 1991, 87, 581–596.

78. von Bohlen und Halbach, O.; Albrecht, D. Tracing of axonal connectivities in a combined slice preparation of rat brains--a study by rhodamine-dextran-amine-application in the lateral nucleus of the amygdala. *J. Neurosci. Methods* 1998, 81, 169–175.
79. Coulter, D.A.; Lee, C.J. Thalamocortical rhythm generation in vitro: extra- and intracellular recordings in mouse thalamocortical slices perfused with low Mg²⁺ medium. *Brain Res.* 1993, 631, 137–142.
80. Chang, W.P.; Lu, H.C.; Shyu, B.C. Treatment with direct-current stimulation against cingulate seizure-like activity induced by 4-aminopyridine and bicuculline in an in vitro mouse model. *Exp. Neurol.* 2015, 265, 180–192.
81. Toprani, S.; Durand, D.M. Fiber tract stimulation can reduce epileptiform activity in an in-vitro bilateral hippocampal slice preparation. *Exp. Neurol.* 2013, 240, 28–43.
82. Buzsáki, G. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* 2004, 7, 446–451.
83. Martina, M.; Taverna, S. *Patch-Clamp Methods and Protocols*; 2014; Vol. 1183.
84. 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.
85. Smirnova, E.Y.; Amakhin, D. V.; Malkin, S.L.; Chizhov, A. V.; Zaitsev, A. V. Acute Changes in Electrophysiological Properties of Cortical Regular-Spiking Cells Following Seizures in a Rat Lithium–Pilocarpine Model. *Neuroscience* 2018, 379, 202–215.
86. Schurr, A.; Payne, R.S.; Heine, M.F.; Rigor, B.M. Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in the hippocampal slice preparation. *J. Neurosci. Methods* 1995, 59, 129–138.
87. Whittington, M.A.; Traub, R.D. Interneuron Diversity series: Inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci.* 2003, 26, 676–682.
88. Freund, T.F.; Buzsáki, G. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus* 1996, 6, 347–470.
89. Fukuda, A.; Czurkó, A.; Hida, H.; Muramatsu, K.; Lénárd, L.; Nishino, H. Appearance of deteriorated neurons on regionally different time tables in rat brain thin slices maintained in physiological condition. *Neurosci. Lett.* 1995, 184, 13–16.
90. Jackson, J.; Amilhon, B.; Goutagny, R.; Bott, J.B.; Manseau, F.; Kortleven, C.; Bressler, S.L.; Williams, S. Reversal of theta rhythm flow through intact hippocampal circuits. *Nat. Neurosci.* 2014, 17, 1362–1370.
91. Zhang, M.; Ladas, T.P.; Qiu, C.; Shivacharan, R.S.; Gonzalez-Reyes, L.E.; Durand, D.M. Propagation of epileptiform activity can be independent of synaptic transmission, gap

- junctions, or diffusion and is consistent with electrical field transmission. *J. Neurosci.* 2014, 34, 1409–1419.
92. de Curtis, M.; Paré, D.; Lliás, R.R. The electrophysiology of the olfactory–hippocampal circuit in the isolated and perfused adult mammalian brain in vitro. *Hippocampus* 1991, 1, 341–354.
 93. De Curtis, M.; Biella, G.; Forti, M.; Panzica, F. Multifocal spontaneous epileptic activity induced by restricted bicuculline ejection in the piriform cortex of the isolated guinea pig brain. *J. Neurophysiol.* 1994, 71, 2463–2476.
 94. de Curtis, M.; Biella, G.; Buccellati, C.; Folco, G. Simultaneous investigation of the neuronal and vascular compartments in the guinea pig brain isolated in vitro. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 1998, 3, 221–228.
 95. Librizzi, L.; Janigro, D.; De Biasi, S.; de Curtis, M. Blood-brain barrier preservation in the in vitro isolated guinea pig brain preparation. *J. Neurosci. Res.* 2001, 66, 289–297.
 96. Librizzi, L.; Noe, F.; Vezzani, A.; de Curtis, M.; Ravizza, T. Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. *Ann. Neurol.* 2012, 72, 82–90.
 97. Raimondo, J. V.; Heinemann, U.; de Curtis, M.; Goodkin, H.P.; Dulla, C.G.; Janigro, D.; Ikeda, A.; Lin, C.C.K.; Jiruska, P.; Galanopoulou, A.S.; et al. Methodological standards for in vitro models of epilepsy and epileptic seizures. A TASK1-WG4 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE. *Epilepsia* 2017, 58, 40–52.
 98. Dyhrfeld-Johnsen, J.; Berdichevsky, Y.; Swiercz, W.; Sabolek, H.; Staley, K.J. Interictal spikes precede ictal discharges in an organotypic hippocampal slice culture model of epileptogenesis. *J. Clin. Neurophysiol.* 2010, 27, 418–424.
 99. De Simoni, A.; Yu, L.M.Y. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: Interface method. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 1439–1445.
 100. Borgström, L.; Norberg, K.; Siesjö, B.K. Glucose Consumption in Rat Cerebral Cortex in Normoxia, Hypoxia and Hypercapnia. *Acta Physiol. Scand.* 1976, 96, 569–574.
 101. Schwartzkroin, P.A.; Prince, D.A. Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. *Brain Res.* 1978, 147, 117–130.
 102. Wong, R.K.; Traub, R.D.; Miles, R. Cellular basis of neuronal synchrony in epilepsy. *Adv. Neurol.* 1986, 44, 583–592.
 103. Williamson, R.; Wheal, H. V The contribution of AMPA and NMDA receptors to graded bursting activity in the hippocampal CA1 region in an acute in vitro model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 1992, 12, 179–188.
 104. Traub, R.D.; Borck, C.; Colling, S.B.; Jefferys, J.G. On the structure of ictal events in

- vitro. *Epilepsia* 1996, 37, 879–891.
105. Khalilov, I.; Esclapez, M.; Medina, I.; Aggoun, D.; Lamsa, K.; Leinekugel, X.; Khazipov, R.; Ben-Ari, Y. A novel in vitro preparation: The intact hippocampal formation. *Neuron* 1997, 19, 743–749.
 106. Karnup, S.; Stelzer, A. Seizure-like activity in the disinhibited CA1 minislice of adult guinea-pigs. *J. Physiol.* 2001, 532, 713–730.
 107. Meier, C.L.; Dudek, F.E. Spontaneous and stimulation-induced synchronized burst afterdischarges in the isolated CA1 of kainate-treated rats. *J. Neurophysiol.* 1996, 76, 2231–2239.
 108. Choquet, D.; Korn, H. Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 1992, 99, 217–240.
 109. Yao, J.A.; Tseng, G.N. Modulation of 4-AP block of a mammalian A-type K channel clone by channel gating and membrane voltage. *Biophys. J.* 1994, 67, 130–142.
 110. Galvan, M.; Grafe, P.; Bruggencate, G. Ten Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice. *Brain Res.* 1982, 241, 75–86.
 111. Buckle, P.J.; Haas, H.L. Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J. Physiol.* 1982, 326, 109–122.
 112. 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, 10.
 113. Gonzalez-Sulser, A.; Wang, J.; Motamedi, G.K.; Avoli, M.; Vicini, S.; Dzakpasu, R. The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array. *Neuropharmacology* 2011, 60, 1142–1153.
 114. Ben-Ari, Y.; Cossart, R. Kainate, a double agent that generates seizures: Two decades of progress. *Trends Neurosci.* 2000, 23, 580–587.
 115. Huettner, J.E. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 2003, 70, 387–407.
 116. Шубина, Л.В.; Мальков, А.Е.; Кичигина, В.Ф. Каиновая Модель Височной Эпилепсии И Ее Применение Для Изучения Роли Эндоканнабиноидной Системы В Нейропротекции. *Российский Физиологический Журнал Им И М Сеченова* 2019, 105, 680–693.
 117. Westbrook, G.L.; Lothman, E.W. Cellular and synaptic basis of kainic acid-induced hippocampal epileptiform activity. *Brain Res.* 1983, 273, 97–109.
 118. Cossart, R.; Esclapez, M.; Hirsch, J.C.; Bernard, C.; Ben-Ari, Y. GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat. Neurosci.*

- 1998, 1, 470–478.
119. Melyan, Z.; Wheal, H. V.; Lancaster, B. Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron* 2002, 34, 107–114.
 120. Khalilov, I.; Dzhalala, V.; Medina, I.; Leinekugel, X.; Melyan, Z.; Lamsa, K.; Khazipov, R.; Ben-Ari, Y. Maturation of kainate-induced epileptiform activities in interconnected intact neonatal limbic structures in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 1999, 11, 3468–3480.
 121. Mody, I.; Lambert, J.D.; Heinemann, U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 1987, 57, 869–888.
 122. Stanton, P.K.; Jones, R.S.G.; Mody, I.; Heinemann, U. Epileptiform activity induced by lowering extracellular $[Mg^{2+}]$ in combined hippocampal-entorhinal cortex slices: Modulation by receptors for norepinephrine and N-methyl-d-aspartate. *Epilepsy Res.* 1987, 1, 53–62.
 123. Moser, J.; Kilb, W.; Werhahn, K.-J.; Luhmann, H.J. Early developmental alterations of low- Mg^{2+} -induced epileptiform activity in the intact corticohippocampal formation of the newborn mouse in vitro. *Brain Res.* 2006, 1077, 170–177.
 124. Jiang, Q.; Wang, J.; Wu, X.; Jiang, Y. Alterations of NR2B and PSD-95 expression after early-life epileptiform discharges in developing neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2007, 25, 165–170.
 125. Jensen, M.S.; Yaari, Y. The Relationship Between Interictal and Ictal Paroxysms in an In Vitro Model of focal Hippocampal Epilepsy. 1988, 591–598.
 126. Poolos, N.P.; Mauk, M.D.; Kocsis, J.D. Activity-evoked increases in extracellular potassium modulate presynaptic excitability in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 1987, 58, 404–416.
 127. Huberfeld, G.; Blauwblomme, T.; Miles, R. Hippocampus and epilepsy: Findings from human tissues. *Rev. Neurol. (Paris)*. 2015, 171, 236–251.
 128. Avoli, M.; de Curtis, M. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog. Neurobiol.* 2011, 95, 104–132.
 129. Wong, M.; Yamada, K.A. Developmental characteristics of epileptiform activity in immature rat neocortex: A comparison of four in vitro seizure models. *Dev. Brain Res.* 2001, 128, 113–120.
 130. Schwartzkroin, P.A.; Baraban, S.C.; Hochman, D.W. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. *Epilepsy Res.* 1998, 32, 275–285.
 131. Dudek, F.E.; Obenaus, A.; Tasker, J.G. Osmolality-induced changes in extracellular volume alter epileptiform bursts independent of chemical synapses in the rat: Importance

- of non-synaptic mechanisms in hippocampal epileptogenesis. *Neurosci. Lett.* 1990, 120, 267–270.
132. Chesler, M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol. Rev.* 2003, 83, 1183–1221.
133. Taira, T.; Smirnov, S.; Voipio, J.; Kaila, K. Intrinsic proton modulation of excitatory transmission in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 1993, 4, 93–96.
134. Pasternack, M.; Smirnov, S.; Kaila, K. Proton modulation of functionally distinct GABA(A) receptors in acutely isolated pyramidal neurons of rat hippocampus. *Neuropharmacology* 1996, 35, 1279–1288.
135. Hodgkin, A.L.; Katz, B. The effect of temperature on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 1949, 109, 240–249.
136. Hill, M.W.; Wong, M.; Amarakone, A.; Rothman, S.M. Rapid cooling aborts seizure-like activity in rodent hippocampal-entorhinal slices. *Epilepsia* 2000, 41, 1241–1248.
137. Schuchmann, S.; Meierkord, H.; Stenkamp, K.; Breustedt, J.; Windmüller, O.; Heinemann, U.; Buchheim, K. Synaptic and nonsynaptic ictogenesis occurs at different temperatures in submerged and interface rat brain slices. *J. Neurophysiol.* 2002, 87, 2929–2935.
138. Lehmann, A.; Isacson, H.; Hamberger, A. Effects of In Vivo Administration of Kainic Acid on the Extracellular Amino Acid Pool in the Rabbit Hippocampus. *J. Neurochem.* 1983, 40, 1314–1320.
139. Benveniste, H.; Drejer, J.; Schousboe, A.; Diemer, N.H. Elevation of the Extracellular Concentrations of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus During Transient Cerebral Ischemia Monitored by Intracerebral Microdialysis. *J. Neurochem.* 1984, 43, 1369–1374.
140. Bouvier, M.; Szatkowski, M.; Amato, A.; Attwell, D. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* 1992, 360, 471–474, doi:10.1038/360471a0.
141. Haglid, K.G.; Wang, S.; Qiner, Y.; Hamberger, A. Excitotoxicity - Experimental correlates to human epilepsy. *Mol. Neurobiol.* 1994, 9, 259–263.
142. Doring, M.J.; Spencer, D.D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993, 341, 1607–1610.
143. Ovsepian, S. V.; O’Leary, V.B.; Zaborszky, L.; Ntziachristos, V.; Dolly, J.O. Amyloid Plaques of Alzheimer’s Disease as Hotspots of Glutamatergic Activity. *Neuroscientist* 2019, 25, 288–297.
144. Urbanska, E.M.; Czuczwar, S.J.; Kleinrok, Z.; Turski, W.A. Excitatory amino acids in

- epilepsy. *Restor. Neurol. Neurosci.* 1998, 13, 25–39.
145. Thomas, P.M.; Phillips, J.P.; Delanty, N.; O'Connor, W.T. Elevated extracellular levels of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid within the intraoperative, spontaneously epileptiform human hippocampus. *Epilepsy Res.* 2003, 54, 73–79.
 146. Ovsepiyan, S.V.; Blazquez-Llorca, L.; Freitag, S.V.; Rodrigues, E.F.; Herms, J. Ambient Glutamate Promotes Paroxysmal Hyperactivity in Cortical Pyramidal Neurons at Amyloid Plaques via Presynaptic mGluR1 Receptors. *Cereb. Cortex* 2017, 27, 4733–4749.
 147. Cavus, I.; Kasoff, W.S.; Cassaday, M.P.; Jacob, R.; Gueorguieva, R.; Sherwin, R.S.; Krystal, J.H.; Spencer, D.D.; Abi-Saab, W.M. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann. Neurol.* 2005, 57, 226–235.
 148. Eid, T.; Thomas, M.J.; Spencer, D.D.; Rundén-Pran, E.; Lai, J.C.K.; Malthankar, G. V.; Kim, J.H.; Danbolt, N.C.; Ottersen, O.P.; De Lanerolle, N.C. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: Possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 2004, 363, 28–37.
 149. Wang, Y.; Zaveri, H.; Ghosh, A.; Beckstrom, H.; de Lanerolle, N.; Eid, T. Inhibition of hippocampal glutamine synthetase causes spontaneously recurrent seizures in rats. *Epilepsia* 2006, 47, 328–329.
 150. Epsztein, J.; Milh, M.; Bihi, R.I.; Jorquera, I.; Ben-Ari, Y.; Represa, A.; Crépel, V. Ongoing epileptiform activity in the post-ischemic hippocampus is associated with a permanent shift of the excitatory-inhibitory synaptic balance in CA3 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 2006, 26, 7082–7092.
 151. Graebenitz, S.; Lesting, J.; Sosulina, L.; Seidenbecher, T.; Pape, H.C. Alteration of NMDA receptor-mediated synaptic interactions in the lateral amygdala associated with seizure activity in a mouse model of chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2010, 51, 1754–1762.
 152. Clarkson, C.; Smeal, R.M.; Hasenoehrl, M.G.; White, J.A.; Rubio, M.E.; Wilcox, K.S. Ultrastructural and functional changes at the tripartite synapse during epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 2020, 326, 113196.
 153. Yang, J.; Woodhall, G.L.; Jones, R.S.G. Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats. *J. Neurosci.* 2006, 26, 406–410.
 154. Thompson, S.E.; Ayman, G.; Woodhall, G.L.; Jones, R.S.G. Depression of glutamate and GABA release by presynaptic GABAB receptors in the entorhinal cortex in normal and chronically epileptic rats. *NeuroSignals* 2007, 15, 202–215.
 155. Postnikova, T.Y.; Zubareva, O.E.; Kovalenko, A.A.; Kim, K.K.; Magazanik, L.G.;

- Zaitsev, A.V. Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors. *Biochem.* 2017, 82.
156. Postnikova, T.Y.; Amakhin, D. V.; Trofimova, A.M.; Smolensky, I. V.; Zaitsev, A. V. Changes in Functional Properties of Rat Hippocampal Neurons Following Pentylentetrazole-induced Status Epilepticus. *Neuroscience* 2019, 399, 103–116.
157. Li, S.; Reinprecht, I.; Fahnstock, M.; Racine, R.J. Activity-dependent changes in synaptophysin immunoreactivity in hippocampus, piriform cortex, and entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* 2002, 115, 1221–1229.
158. Murthy, V.N.; Sejnowski, T.J.; Stevens, C.F. Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 1997, 18, 599–612.
159. Upreti, C.; Otero, R.; Partida, C.; Skinner, F.; Thakker, R.; Pacheco, L.F.; Zhou, Z.Y.; Maglakelidze, G.; Velišková, J.; Velišek, L.; et al. Altered neurotransmitter release, vesicle recycling and presynaptic structure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain* 2012, 135, 869–885.
160. Soussi, R.; Boulland, J.L.; Bassot, E.; Bras, H.; Coulon, P.; Chaudhry, F.A.; Storm-Mathisen, J.; Ferhat, L.; Esclapez, M. Reorganization of supramammillary–hippocampal pathways in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: evidence for axon terminal sprouting. *Brain Struct. Funct.* 2015, 220, 2449–2468.
161. Laube, B.; Kuhse, J.; Betz, H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J. Neurosci.* 1998, 18, 2954–2961.
162. Mano, I.; Teichberg, V.I. A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. *Neuroreport* 1998, 9, 327–331.
163. Sobolevsky, A.I.; Rosconi, M.P.; Gouaux, E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 2009, 462, 745–756.
164. Ayalon, G.; Segev, E.; Elgavish, S.; Stern-Bach, Y. Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 15053–15060.
165. Galen Wo, Z.; Oswald, R.E. Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 1995, 18, 161–168.
166. Paas, Y. The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci.* 1998, 21, 117–125.
167. Hollmann, M.; Heinemann, S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 1994, 17, 31–108.
168. Mori, H.; Mishina, M. Roles of diverse glutamate receptors in brain functions elucidated by subunit-specific and region-specific gene targeting. *Life Sci.* 2003, 74, 329–336.

169. Polgár, E.; Watanabe, M.; Hartmann, B.; Grant, S.G.N.; Todd, A.J. Expression of AMPA receptor subunits at synapses in laminae I-III of the rodent spinal dorsal horn. *Mol. Pain* 2008, 4, 5.
170. Petralia, R.S.; Wenthold, R.J. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1992, 318, 329–354.
171. Zhu, J.J.; Esteban, J.A.; Hayashi, Y.; Malinow, R. Postnatal synaptic potentiation: Delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat. Neurosci.* 2000, 3, 1098–1106.
172. Henley, J.M.; Wilkinson, K.A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2016, 17, 337–350.
173. Mansour, M.; Nagarajan, N.; Nehring, R.B.; Clements, J.D.; Rosenmund, C. Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron* 2001, 32, 841–853.
174. Wenthold, R.J.; Petralia, R.S.; Blahos, J.; Niedzielski, A.S. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci.* 1996, 16, 1982–1989.
175. Jonas, P.; Major, G.; Sakmann, B. Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Physiol.* 1993, 472, 615–663.
176. Jonas, P.; Racca, C.; Sakmann, B.; Seeburg, P.H.; Monyer, H. Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 1994, 12, 1281–1289.
177. Geiger, J.R.P.; Melcher, T.; Koh, D.S.; Sakmann, B.; Seeburg, P.H.; Jonas, P.; Monyer, H. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 1995, 15, 193–204.
178. Matta, J.A.; Pelkey, K.A.; Craig, M.T.; Chittajallu, R.; Jeffries, B.W.; McBain, C.J. Developmental origin dictates interneuron AMPA and NMDA receptor subunit composition and plasticity. *Nat. Neurosci.* 2013, 16, 1032–1041.
179. Pelkey, K.A.; Chittajallu, R.; Craig, M.T.; Tricoire, L.; Wester, J.C.; McBain, C.J. Hippocampal gabaergic inhibitory interneurons. *Physiol. Rev.* 2017, 97, 1619–1747.
180. Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 1999, 51, 7–61.
181. Orlandi, C.; Barbon, A.; Barlati, S. Activity regulation of adenosine deaminases acting on RNA (ADARs). *Mol. Neurobiol.* 2012, 45, 61–75.
182. Casillas-Espinosa, P.M.; Powell, K.L.; O'Brien, T.J. Regulators of synaptic transmission:

- roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Epilepsia* 2012, 53 Suppl 9, 41–58.
183. Diering, G.H.; Huganir, R.L. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron* 2018, 100, 314–329.
 184. Krampfl, K.; Schlesinger, F.; Zörner, A.; Kappler, M.; Dengler, R.; Bufler, J. Control of kinetic properties of GluR2 flop AMPA-type channels: Impact of R/G nuclear editing. *Eur. J. Neurosci.* 2002, 15, 51–62.
 185. Barbon, A.; Barlati, S. Glutamate receptor RNA editing in health and disease. *Biochem.* 2011, 76, 882–889.
 186. Jackson, A.C.; Nicoll, R.A. The Expanding Social Network of Ionotropic Glutamate Receptors: TARPs and Other Transmembrane Auxiliary Subunits. *Neuron* 2011, 70, 178–199.
 187. Greger, I.H.; Watson, J.F.; Cull-Candy, S.G. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* 2017, 94, 713–730.
 188. Boudkkazi, S.; Brechet, A.; Schwenk, J.; Fakler, B. Cornichon2 Dictates the Time Course of Excitatory Transmission at Individual Hippocampal Synapses. *Neuron* 2014, 82, 848–858.
 189. Herring, B.E.; Shi, Y.; Suh, Y.H.; Zheng, C.Y.; Blankenship, S.M.; Roche, K.W.; Nicoll, R.A. Cornichon Proteins Determine the Subunit Composition of Synaptic AMPA Receptors. *Neuron* 2013, 77, 1083–1096.
 190. Shanks, N.F.; Savas, J.N.; Maruo, T.; Cais, O.; Hirao, A.; Oe, S.; Ghosh, A.; Noda, Y.; Greger, I.H.; Yates, J.R.; et al. Differences in AMPA and Kainate Receptor Interactomes Facilitate Identification of AMPA Receptor Auxiliary Subunit GSG1L. *Cell Rep.* 2012, 1, 590–598.
 191. Von Engelhardt, J.; Mack, V.; Sprengel, R.; Kavenstock, N.; Li, K.W.; Stern-Bach, Y.; Smit, A.B.; Seeburg, P.H.; Monyer, H. CKAMP44: A brain-specific protein attenuating short-term synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Science (80-.)*. 2010, 327, 1518–1522.
 192. Kamalova, A.; Futai, K.; Delpire, E.; Nakagawa, T. AMPA Receptor Auxiliary Subunit GSG1L Suppresses Short-Term Facilitation in Corticothalamic Synapses and Determines Seizure Susceptibility. *Cell Rep.* 2020, 32, 107921.
 193. Chen, X.; Aslam, M.; Gollisch, T.; Allen, K.; Von Engelhardt, J. CKAMP44 modulates integration of visual inputs in the lateral geniculate nucleus. *Nat. Commun.* 2018, 9, 261.
 194. Anggono, V.; Huganir, R.L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2012, 22, 461–469.
 195. Opazo, P.; Choquet, D. A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA

- receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 2011, 46, 1–8.
196. Lu, J.; Helton, T.D.; Blanpied, T.A.; Rácz, B.; Newpher, T.M.; Weinberg, R.J.; Ehlers, M.D. Postsynaptic Positioning of Endocytic Zones and AMPA Receptor Cycling by Physical Coupling of Dynamin-3 to Homer. *Neuron* 2007, 55, 874–889.
 197. Shepherd, J.D.; Huganir, R.L. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007, 23, 613–643.
 198. Kessels, H.W.; Malinow, R. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron* 2009, 61, 340–350.
 199. Huganir, R.L.; Nicoll, R.A. AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron* 2013, 80, 704–717.
 200. Collingridge, G.L.; Isaac, J.T.R.; Yu, T.W. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004, 5, 952–962.
 201. Jiang, J.; Suppiramaniam, V.; Wooten, M.W. Posttranslational modifications and receptor-associated proteins in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *NeuroSignals* 2007, 15, 266–282.
 202. Parkinson, G.T.; Hanley, J.G. Mechanisms of AMPA receptor endosomal sorting. *Front. Mol. Neurosci.* 2018, 11.
 203. Lussier, M.P.; Sanz-Clemente, A.; Roche, K.W. Dynamic regulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by posttranslational modifications. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 28596–28603.
 204. Lee, H.K.; Takamiya, K.; Han, J.S.; Man, H.; Kim, C.H.; Rumbaugh, G.; Yu, S.; Ding, L.; He, C.; Petralia, R.S.; et al. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 2003, 112, 631–643.
 205. Buonarati, O.R.; Hammes, E.A.; Watson, J.F.; Greger, I.H.; Hell, J.W. Mechanisms of postsynaptic localization of AMPA-type glutamate receptors and their regulation during long-term potentiation. *Sci. Signal.* 2019, 12.
 206. Barria, A.; Muller, D.; Derkach, V.; Griffith, L.C.; Soderling, T.R. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* (80-.). 1997, 276, 2042–2045.
 207. Steinberg, J.P.; Takamiya, K.; Shen, Y.; Xia, J.; Rubio, M.E.; Yu, S.; Jin, W.; Thomas, G.M.; Linden, D.J.; Huganir, R.L. Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression. *Neuron* 2006, 49, 845–860.
 208. Lee, H.K.; Barbarosie, M.; Kameyama, K.; Bear, M.F.; Huganir, R.L. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity.

- Nature 2000, 405, 955–959.
209. Chung, H.J.; Steinberg, J.P.; Huganir, R.L.; Linden, D.J. Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science* (80-.). 2003, 300, 1751–1755.
 210. Yong, A.J.H.; Tan, H.L.; Zhu, Q.; Bygrave, A.M.; Johnson, R.C.; Huganir, R.L. Tyrosine phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluA2 gates homeostatic synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020, 117, 4948–4958.
 211. Hayashi, T.; Huganir, R.L. Tyrosine phosphorylation and regulation of the AMPA receptor by Src family tyrosine kinases. *J. Neurosci.* 2004, 24, 6152–6160.
 212. Hu, J.H.; Park, J.M.; Park, S.; Xiao, B.; Dehoff, M.H.; Kim, S.; Hayashi, T.; Schwarz, M.K.; Huganir, R.L.; Seeburg, P.H.; et al. Homeostatic Scaling Requires Group I mGluR Activation Mediated by Homer1a. *Neuron* 2010, 68, 1128–1142.
 213. Rakhade, S.N.; Zhou, C.; Aujla, P.K.; Fishman, R.; Sucher, N.J.; Jensen, F.E. Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures. *J. Neurosci.* 2008, 28, 7979–7990.
 214. Rakhade, S.N.; Fitzgerald, E.F.; Klein, P.M.; Zhou, C.; Sun, H.; Hunganir, R.L.; Jensen, F.E. Glutamate receptor 1 phosphorylation at serine 831 and 845 modulates seizure susceptibility and hippocampal hyper excitability after early life seizures. *J. Neurosci.* 2012, 32, 17800–17812.
 215. Derkach, V.A.; Oh, M.C.; Guire, E.S.; Soderling, T.R. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007, 8, 101–113.
 216. Malinow, R.; Malenka, R.C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 2002, 25, 103–126.
 217. Sanchez, R.M.; Koh, S.; Rio, C.; Wang, C.; Lamperti, E.D.; Sharma, D.; Corfas, G.; Jensen, F.E. Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J. Neurosci.* 2001, 21, 8154–8163.
 218. Rajasekaran, K.; Todorovic, M.; Kapur, J. Calcium-permeable AMPA receptors are expressed in a rodent model of status epilepticus. *Ann. Neurol.* 2012, 72, 91–102.
 219. Prince, H.C.; Tzingounis, A. V.; Levey, A.I.; Conn, P.J. Functional downregulation of GluR2 in piriform cortex of kindled animals. *Synapse* 2000, 38, 489–498.
 220. Prince, H.K.; Conn, P.J.; Blackstone, C.D.; Huganir, R.L.; Levey, A.I. Down□Regulation of AMPA Receptor Subunit GluR2 in Amygdaloid Kindling. *J. Neurochem.* 1995, 64, 462–465.
 221. Ekonomou, A.; Smith, A.L.; Angelatou, F. Changes in AMPA receptor binding and

- subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylentetrazole-induced 'kindling' model of epilepsy. *Mol. Brain Res.* 2001, 95, 27–35.
222. Krestel, H.E.; Shimshek, D.R.; Jensen, V.; Nevian, T.; Kim, J.; Geng, Y.; Bast, T.; Depaulis, A.; Schonig, K.; Schwenk, F.; et al. A genetic switch for epilepsy in adult mice. *J. Neurosci.* 2004, 24, 10568–10578.
223. Jia, Z.; Agopyan, N.; Miu, P.; Xiong, Z.; Henderson, J.; Gerlai, R.; Taverna, F.A.; Velumian, A.; MacDonald, J.; Carlen, P.; et al. Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 1996, 17, 945–956.
224. Vollmar, W.; Gloger, J.; Berger, E.; Kortenbruck, G.; Köhling, R.; Speckmann, E.J.; Musshoff, U. RNA editing (R/G site) and flip-flop splicing of the AMPA receptor subunit GluR2 in nervous tissue of epilepsy patients. *Neurobiol. Dis.* 2004, 15, 371–379.
225. Beyer, B.; Deleuze, C.; Letts, V.A.; Mahaffey, C.L.; Boumil, R.M.; Lew, T.A.; Huguenard, J.R.; Frankel, W.N. Absence seizures in C3H/HeJ and knockout mice caused by mutation of the AMPA receptor subunit Gria4. *Hum. Mol. Genet.* 2008, 17, 1738–1749.
226. Mosbacher, J.; Schoepfer, R.; Monyer, H.; Burnashev, N.; Seeburg, P.H.; Ruppertsberg, J.P. A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* (80-.). 1994, 266, 1059–1062.
227. Meeren, H.K.M.; Pijn, J.P.M.; Van Luijtelaar, E.L.J.M.; Coenen, A.M.L.; Da Silva, F.H.L. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J. Neurosci.* 2002, 22, 1480–1495.
228. Hansen, K.B.; Yi, F.; Perszyk, R.E.; Furukawa, H.; Wollmuth, L.P.; Gibb, A.J.; Traynelis, S.F. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* 2018, 150, 1081–1105.
229. Ulbrich, M.H.; Isacoff, E.Y. Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* 2007, 4, 319–321.
230. Ulbrich, M.H.; Isacoff, E.Y. Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105, 14163–14168.
231. Forrest, D.; Yuzaki, M.; Soares, H.D.; Ng, L.; Luk, D.C.; Sheng, M.; Stewart, C.L.; Morgan, J.I.; Connor, J.A.; Curran, T. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 1994, 13, 325–338.
232. Traynelis, S.F.; Wollmuth, L.P.; McBain, C.J.; Menniti, F.S.; Vance, K.M.; Ogden, K.K.; Hansen, K.B.; Yuan, H.; Myers, S.J.; Dingledine, R. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 2010.
233. Regan, M.C.; Romero-Hernandez, A.; Furukawa, H. A structural biology perspective on

- NMDA receptor pharmacology and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015.
234. Tomek, S.E.; Lacrosse, A.L.; Nemirovsky, N.E.; Olive, M.F. NMDA Receptor Modulators in the Treatment of Drug Addiction. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013, 6, 251–268.
 235. Johnson, J.W.; Ascher, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987.
 236. Furukawa, H.; Singh, S.K.; Mancusso, R.; Gouaux, E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 2005, 438, 185–192.
 237. Yao, Y.; Harrison, C.B.; Freddolino, P.L.; Schulten, K.; Mayer, M.L. Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *EMBO J.* 2008, 27, 2158–2170.
 238. Monyer, H.; Sprengel, R.; Schoepfer, R.; Herb, A.; Higuchi, M.; Lomeli, H.; Burnashev, N.; Sakmann, B.; Seeburg, P.H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992, 256, 1217–1221.
 239. Monyer, H.; Burnashev, N.; Laurie, D.J.; Sakmann, B.; Seeburg, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994, 12, 529–540.
 240. Akazawa, C.; Shigemoto, R.; Bessho, Y.; Nakanishi, S.; Mizuno, N. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J. Comp. Neurol.* 1994, 347, 150–160.
 241. Zhong, J.; Carrozza, D.P.; Williams, K.; Pritchett, D.B.; Molinoff, P.B. Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain. *J. Neurochem.* 1995, 64, 531–539.
 242. Erreger, K.; Geballe, M.T.; Kristensen, A.; Chen, P.E.; Hansen, K.B.; Lee, C.J.; Yuan, H.; Le, P.; Lyuboslavsky, P.N.; Micale, N.; et al. Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 2007, 72, 907–920.
 243. Chen, P.E.; Geballe, M.T.; Katz, E.; Erreger, K.; Livesey, M.R.; O'Toole, K.K.; Le, P.; Lee, C.J.; Snyder, J.P.; Traynelis, S.F.; et al. Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol.* 2008, 586, 227–245.
 244. Hansen, K.B.; Bräuner-Osborne, H.; Egebjerg, J. Pharmacological characterization of ligands at recombinant NMDA receptor subtypes by electrophysiological recordings and intracellular calcium measurements. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2008, 11, 304–315.

245. Tajima, N.; Karakas, E.; Grant, T.; Simorowski, N.; Diaz-Avalos, R.; Grigorieff, N.; Furukawa, H. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature* 2016, 534, 63–68.
246. Ahmadi-rad, N.; Shojaei, A.; Javan, M.; Pourgholami, M.H.; Mirnajafi-Zadeh, J. Effect of minocycline on pentylenetetrazol-induced chemical kindled seizures in mice. *Neurol. Sci.* 2014, 35, 571–576.
247. Davoudi, M.; Shojaei, A.; Palizvan, M.R.; Javan, M.; Mirnajafi-Zadeh, J. Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. *Epilepsy Res.* 2013, 106, 54–63.
248. Lopes, M.W.; Soares, F.M.S.; De Mello, N.; Nunes, J.C.; Cajado, A.G.; De Brito, D.; De Cordova, F.M.; Da Cunha, R.M.S.; Walz, R.; Leal, R.B. Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. *Exp. Brain Res.* 2013, 226, 153–163.
249. Zubareva, O.E.; Kovalenko, A.A.; Karyakin, V.B.; Kalemenev, S. V.; Lavrent'eva, V. V.; Magazanik, L.G.; Zaitsev, A. V. Changes in the Expression of Genes of the Glutamate Transporter and Subunits of the NMDA and AMPA Receptors in the Rat Amygdala in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy. *Neurochem. J.* 2018, 12, 222–227.
250. Di Maio, R.; Mastroberardino, P.G.; Hu, X.; Montero, L.; Greenamyre, J.T. Pilocarpine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 2011, 42, 482–495.
251. Alsharafi, W.A.; Xiao, B.; Li, J. MicroRNA-139-5p negatively regulates NR2A-containing NMDA receptor in the rat pilocarpine model and patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2016, 57, 1931–1940.
252. Di Maio, R.; Mastroberardino, P.G.; Hu, X.; Montero, L.M.; Greenamyre, J.T. Thiol oxidation and altered NR2B/NMDA receptor functions in in vitro and in vivo pilocarpine models: implications for epileptogenesis. *Neurobiol. Dis.* 2013, 49, 87–98.
253. Zhu, X.; Dong, J.; Shen, K.; Bai, Y.; Zhang, Y.; Lv, X.; Chao, J.; Yao, H. NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress. *Brain Res. Bull.* 2015, 114, 70–78.
254. Gori, M.B.; Girardi, E. 3-Mercaptopropionic acid-induced repetitive seizures increase glun2a expression in rat hippocampus: A potential neuroprotective role of cyclopentyladenosine. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2013, 33, 803–13.
255. Pahl, S.; Tapken, D.; Haering, S.C.; Hollmann, M. Trafficking of kainate receptors. *Membranes (Basel)*. 2014, 4, 565–595.

256. Wisden, W.; Seeburg, P.H. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.* 1993, 13, 3582–3598.
257. Huettner, J.E. Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: Activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by con A. *Neuron* 1990, 5, 255–266.
258. Patneau, D.K.; Mayer, M.L. Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J. Neurosci.* 1990, 10, 2385–2399.
259. Lauri, S.E.; Bortolotto, Z.A.; Nistico, R.; Bleakman, D.; Ornstein, P.L.; Lodge, D.; Isaac, J.T.R.; Collingridge, G.L. A role for Ca²⁺ stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 2003, 39, 327–341.
260. Bortolotto, Z.A.; Clarke, V.R.J.; Delany, C.M.; Vignes, M.; Collingridge, G.L. reply: Kainate receptors and synaptic plasticity. *Nature* 2000, 406, 957–957.
261. Nicoll, R.A.; Mellor, J.; Frerking, M.; Schmitz, D. Kainate receptors and synaptic plasticity. *Nature* 2000, 406, 957.
262. Contractor, A.; Swanson, G.; Heinemann, S.F. Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 2001, 29, 209–216.
263. Frerking, M.; Nicoll, R.A. Synaptic kainate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000, 10, 342–351.
264. Contractor, A.; Mulle, C.; Swanson, G.T. Kainate receptors coming of age: Milestones of two decades of research. *Trends Neurosci.* 2011, 34, 154–163.
265. Valbuena, S.; Lerma, J. Non-canonical Signaling, the Hidden Life of Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* 2016, 92, 316–329.
266. Epsztein, J.; Represa, A.; Jorquera, I.; Ben-Ari, Y.; Crépel, V. Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J. Neurosci.* 2005, 25, 8229–8239.
267. Artinian, J.; Peret, A.; Mircheva, Y.; Marti, G.; Crépel, V. Impaired neuronal operation through aberrant intrinsic plasticity in epilepsy. *Ann. Neurol.* 2015, 77, 592–606.
268. Artinian, J.; Peret, A.; Marti, G.; Epsztein, J.; Crépel, V. Synaptic kainate receptors in interplay with INaP shift the sparse firing of dentate granule cells to a sustained rhythmic mode in temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 2011, 31, 10811–10818.
269. Peret, A.; Christie, L.A.; Ouedraogo, D.W.; Gorlewicz, A.; Epsztein, J.Ô.; Mulle, C.; Crépel, V. Contribution of Aberrant GluK2-Containing Kainate Receptors to Chronic Seizures in Temporal Lobe Epilepsy. *Cell Rep.* 2014, 8, 347–354.

270. Crépel, V.; Mulle, C. Physiopathology of kainate receptors in epilepsy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2015, 20, 83–88.
271. Grigorenko, E. V.; Bell, W.L.; Glazier, S.; Pons, T.; Deadwyler, S. Editing status at the Q/R site of the GluR2 and GluR6 glutamate receptor subunits in the surgically excised hippocampus of patients with refractory epilepsy. *Neuroreport* 1998, 9, 2219–2224.
272. Kortenbruck, G.; Berger, E.; Speckmann, E.J.; Musshoff, U. RNA editing at the Q/R site for the glutamate receptor subunits GluR2, GluR5, and GluR6 in hippocampus and temporal cortex from epileptic patients. *Neurobiol. Dis.* 2001, 8, 459–468.
273. Mahmoud, S.; Gharagozloo, M.; Simard, C.; Gris, D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells* 2019, 8, 184.
274. Rose, C.R.; Ziemens, D.; Untiet, V.; Fahlke, C. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* 2018, 136, 3–16.
275. Lehre, K.P.; Levy, L.M.; Ottersen, O.P.; Storm-Mathisen, J.; Danbolt, N.C. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: Quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 1995, 15, 1835–1853.
276. Karki, P.; Lee, E.; Aschner, M. Manganese Neurotoxicity: a Focus on Glutamate Transporters. *Ann. Occup. Environ. Med.* 2013, 25, 4.
277. Parkin, G.M.; Udawela, M.; Gibbons, A.; Dean, B. Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders. *World J. Psychiatry* 2018, 8, 51–63.
278. Chen, W.; Mahadomrongkul, V.; Berger, U. V.; Bassan, M.; DeSilva, T.; Tanaka, K.; Irwin, N.; Aoki, C.; Rosenberg, P.A. The Glutamate Transporter GLT1a Is Expressed in Excitatory Axon Terminals of Mature Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 2004, 24, 1136–1148.
279. Schmitt, A.; Asan, E.; Lesch, K.P.; Kugler, P. A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: Cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 2002, 109, 45–61.
280. Bjørn-Yoshimoto, W.E.; Underhill, S.M. The importance of the excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3). *Neurochem. Int.* 2016, 98, 4–18.
281. Rothstein, J.D.; Martin, L.; Levey, A.I.; Dykes-Hoberg, M.; Jin, L.; Wu, D.; Nash, N.; Kuncl, R.W. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 1994, 13, 713–725.
282. Nagao, S.; Kwak, S.; Kanazawa, I. EAAT4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms

- parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neuroscience* 1997, 78, 929–933.
283. Arriza, J.L.; Eliasof, S.; Kavanaugh, M.P.; Amara, S.G. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997, 94, 4155–4160.
284. Tanaka, K.; Watase, K.; Manabe, T.; Yamada, K.; Watanabe, M.; Takahashi, K.; Iwama, H.; Nishikawa, T.; Ichihara, N.; Kikuchi, T.; et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 1997, 276, 1699–1702.
285. Kim, K.; Lee, S.G.; Kegelman, T.P.; Su, Z.Z.; Das, S.K.; Dash, R.; Dasgupta, S.; Barral, P.M.; Hedvat, M.; Diaz, P.; et al. Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J. Cell. Physiol.* 2011, 226, 2484–2493.
286. Pajarillo, E.; Rizor, A.; Lee, J.; Aschner, M.; Lee, E. The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology* 2019, 161, 107559.
287. Holmseth, S.; Dehnes, Y.; Huang, Y.H.; Follin-Arbelet, V. V.; Grutle, N.J.; Mylonakou, M.N.; Plachez, C.; Zhou, Y.; Furness, D.N.; Bergles, D.E.; et al. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *J. Neurosci.* 2012, 32, 6000–6013.
288. Rothstein, J.D.; Dykes-Hoberg, M.; Pardo, C.A.; Bristol, L.A.; Jin, L.; Kuncl, R.W.; Kanai, Y.; Hediger, M.A.; Wang, Y.; Schielke, J.P.; et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996, 16, 675–686.
289. Tzingounis, A. V.; Wadiche, J.I. Glutamate transporters: Confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007, 8, 935–947.
290. Proper, E.A.; Hoogland, G.; Kappen, S.M.; Jansen, G.H.; Rensen, M.G.A.; Schrama, L.H.; Van Veelen, C.W.M.; Van Rijen, P.C.; Van Nieuwenhuizen, O.; Gispen, W.H.; et al. Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 2002, 125, 32–43.
291. Mathern, G.W.; Mendoza, D.; Lozada, A.; Pretorius, J.K.; Dehnes, Y.; Danbolt, N.C.; Nelson, N.; Leite, J.P.; Chimelli, L.; Born, D.E.; et al. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 1999, 52, 453–472.
292. Zaitsev, A. V.; Kim, K.K.; Vasilev, D.S.; Lukomsкая, N.Y.; Lavrentyeva, V. V.; Tumanova, N.L.; Zhuravin, I.A.; Magazanik, L.G. N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers prevent pentylenetetrazole-induced convulsions and morphological changes in

- rat brain neurons. *J. Neurosci. Res.* 2015, 93, 454–465.
293. Vasilev, D.S.; Tumanova, N.L.; Kim, K.K.; Lavrentyeva, V. V.; Lukomskaya, N.Y.; Zhuravin, I.A.; Magazanik, L.G.; Zaitsev, A. V. Transient Morphological Alterations in the Hippocampus After Pentylentetrazole-Induced Seizures in Rats. *Neurochem. Res.* 2018, 43, 1671–1682.
294. Chen, S.; Zeng, X.; Zong, W.; Wang, X.; Chen, L.; Zhou, L.; Li, C.; Huang, Q.; Huang, X.; Zeng, G.; et al. Aucubin Alleviates Seizures Activity in Li-Pilocarpine-Induced Epileptic Mice: Involvement of Inhibition of Neuroinflammation and Regulation of Neurotransmission. *Neurochem. Res.* 2019, 44, 472–484.
295. Zubareva, O.E.; Kovalenko, A.A.; Kalemenev, S. V.; Schwarz, A.P.; Karyakin, V.B.; Zaitsev, A. V. Alterations in mRNA expression of glutamate receptor subunits and excitatory amino acid transporters following pilocarpine-induced seizures in rats. *Neurosci. Lett.* 2018, 686, 94–100.
296. Sarfi, M.; Elahdadi Salmani, M.; Goudarzi, I.; Lashkar Boluki, T.; Abrari, K. Evaluating the role of astrocytes on β -estradiol effect on seizures of Pilocarpine epileptic model. *Eur. J. Pharmacol.* 2017, 797, 32–38.
297. Crino, P.B.; Jin, H.; Shumate, M.D.; Robinson, M.B.; Coulter, D.A.; Brooks-Kayal, A.R. Increased expression of the neuronal glutamate transporter (EAAT3/EAAC1) in hippocampal and neocortical epilepsy. *Epilepsia* 2002, 43, 211–218.
298. Hubbard, J.A.; Szu, J.I.; Yonan, J.M.; Binder, D.K. Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. *Exp. Neurol.* 2016, 283, 85–96.
299. Peterson, A.R.; Binder, D.K. Regulation of Synaptosomal GLT-1 and GLAST during Epileptogenesis. *Neuroscience* 2019, 411, 185–201.
300. Khalilov, I.; Leinekugel, X.; Mukhtarov, M.; Khazipov, R. Intracellular blockade of GABAA receptors in the rat hippocampal neurons. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2014, 8, 162–168.
301. Bender, V.A.; Bender, K.J.; Brasier, D.J.; Feldman, D.E. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 2006, 26, 4166–4177.
302. Barker, J.L.; Harrison, N.L. Outward rectification of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* 1988, 403, 41–55.
303. Jahr, C.E.; Stevens, C.F. Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics. *J. Neurosci.* 1990, 10, 3178–3182.
304. Single-Channel Recording; Sakmann, B., Neher, E., Eds.; Springer New York, NY: New

- York, 1995; ISBN 978-1-4419-1229-9.
305. Gibon, J.; Barker, P.A.; Séguéla, P. Opposing presynaptic roles of BDNF and ProBDNF in the regulation of persistent activity in the entorhinal cortex. *Mol. Brain* 2016, 9, 23.
 306. Bear, J.; Lothman, E.W. An in vitro study of focal epileptogenesis in combined hippocampal-parahippocampal slices. *Epilepsy Res.* 1993, 14, 183–193.
 307. Farzaneh, M.; Sayyah, M.; Mirzapourdelavar, H.; Gholami Pourbadie, H.; Zibaii, M.I.; Latifi, H. Optogenetic control of perforant pathway kindled seizures by photoinhibition of CA3 after insertion of Jaws into CA3 neuronal cells. *Exp. Neurol.* 2020, 328.
 308. Righes Marafiga, J.; Vendramin Pasquetti, M.; Calcagnotto, M.E. In vitro Oscillation Patterns Throughout the Hippocampal Formation in a Rodent Model of Epilepsy. *Neuroscience* 2021, 479, 1–21.
 309. Perreault, P.; Avoli, M. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 1991, 65, 771–785.
 310. Rensing, N.; Ouyang, Y.; Yang, X.F.; Yamada, K.A.; Rothman, S.M.; Wong, M. In vivo imaging of dendritic spines during electrographic seizures. *Ann. Neurol.* 2005, 58, 888–898.
 311. Spyker, D.A.; Lynch, C.; Shabanowitz, J.; Sinn, J.A. Poisoning with 4-aminopyridine: Report of three cases. *Clin. Toxicol.* 1980, 16, 487–497.
 312. Avoli, M.; Jefferys, J.G.R. Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *J. Neurosci. Methods* 2016, 260, 26–32.
 313. Angstadt, J.D.; Grassmann, J.L.; Theriault, K.M.; Levasseur, S.M. Mechanisms of postinhibitory rebound and its modulation by serotonin in excitatory swim motor neurons of the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 2005, 191, 715–732.
 314. Kaila, K.; Lamsa, K.; Smirnov, S.; Taira, T.; Voipio, J. Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *J. Neurosci.* 1997, 17, 7662–7672.
 315. Minge, D.; Bähring, R. Acute alterations of somatodendritic action potential dynamics in hippocampal ca1 pyramidal cells after kainate-induced status epilepticus in mice. *PLoS One* 2011, 6.
 316. Ghotbedin, Z.; Janahmadi, M.; Mirnajafi-Zadeh, J.; Behzadi, G.; Semnanian, S. Electrical low frequency stimulation of the kindling site preserves the electrophysiological properties of the rat hippocampal CA1 pyramidal neurons from the destructive effects of amygdala kindling: The basis for a possible promising epilepsy therapy. *Brain Stimul.*

- 2013, 6, 515–523.
317. Verma-Ahuja, S.; Pencek, T.L. Hippocampal CA1 neuronal properties in genetically epilepsyprone rats: Evidence for increased excitation. *Epilepsy Res.* 1994, 18, 205–215.
 318. Pelletier, M.R.; Carlen, P.L. Repeated tetanic stimulation in piriform cortex in vitro: Epileptogenesis and pharmacology. *J. Neurophysiol.* 1996, 76, 4069–4079.
 319. Beck, H.; Yaari, Y. Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008, 9, 357–369.
 320. Niesen, C.E.; Ge, S. Chronic epilepsy in developing hippocampal neurons: Electrophysiologic and morphologic features. *Dev. Neurosci.* 1999, 21, 328–338.
 321. Bernard, C.; Anderson, A.; Becker, A.; Poolos, N.P.; Deck, H.; Johnston, D. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science.* 2004, 305, 532–535.
 322. Shah, M.M.; Anderson, A.E.; Leung, V.; Lin, X.; Johnston, D. Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron* 2004, 44, 495–508.
 323. Marcelin, B.; Chauvière, L.; Becker, A.; Migliore, M.; Esclapez, M.; Bernard, C. H Channel-Dependent Deficit of Theta Oscillation Resonance and Phase Shift in Temporal Lobe Epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 2009, 33, 436–447.
 324. Yaari, Y.; Yue, C.; Su, H. Recruitment of apical dendritic T-type Ca²⁺ channels by backpropagating spikes underlies de novo intrinsic bursting in hippocampal epileptogenesis. *J. Physiol.* 2007, 580, 435–450.
 325. Royeck, M.; Kelly, T.; Opitz, T.; Otte, D.M.; Rennhack, A.; Woitecki, A.; Pitsch, J.; Becker, A.; Schoch, S.; Kaupp, U.B.; et al. Downregulation of spermine augments dendritic persistent sodium currents and synaptic integration after status epilepticus. *J. Neurosci.* 2015, 35, 15240–15253.
 326. Morgan, S.L.; Teyler, T.J. Epileptic-like activity induces multiple forms of plasticity in hippocampal area CA1. *Brain Res.* 2001, 917, 90–96.
 327. Iyengar, S.S.; Mott, D.D. Neuregulin blocks synaptic strengthening after epileptiform activity in the rat hippocampus. *Brain Res.* 2008, 1208, 67–73.
 328. Gu, Y.; Ge, S.-Y.; Ruan, D.-Y. Effect of 4-aminopyridine on synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 2004, 1006, 225–232.
 329. Fleck, M.W.; Palmer, A.M.; Barrionuevo, G. Potassium-induced long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1992, 580, 100–105.
 330. Debanne, D.; Thompson, S.M.; Gähwiler, B.H. A brief period of epileptiform activity strengthens excitatory synapses in the rat hippocampus in vitro. *Epilepsia* 2006, 47, 247–256.

331. Lopantsev, V.; Both, M.; Draguhn, A. Rapid plasticity at inhibitory and excitatory synapses in the hippocampus induced by ictal epileptiform discharges. *Eur. J. Neurosci.* 2009, 29, 1153–1164.
332. Schneiderman, J.H. The role of long-term potentiation in persistent epileptiform burst-induced hyperexcitability following GABA(A) receptor blockade. *Neuroscience* 1997, 81, 1111–1122.
333. Katz, B.; Miledi, R. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* 1968, 195, 481–492.
334. Zucker, R.S.; Regehr, W.G. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 2002, 64, 355–405.
335. Peña, F.; Bargas, J.; Tapia, R. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacology* 2002, 42, 807–812.
336. Smirnova, E.Y.; Chizhov, A. V.; Zaitsev, A. V. Presynaptic GABAB receptors underlie the antiepileptic effect of low-frequency electrical stimulation in the 4-aminopyridine model of epilepsy in brain slices of young rats. *Brain Stimul.* 2020, 13, 1387–1395.
337. Abegg, M.H.; Savic, N.; Ehrengruber, M.U.; McKinney, R.A.; Gähwiler, B.H. Epileptiform activity in rat hippocampus strengthens excitatory synapses. *J. Physiol.* 2004, 554, 439–448.
338. Catterall, W.A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011, 3, 1–23.
339. Südhof, T.C. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, 4, a011353.
340. Segal, M. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: Activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur. J. Neurosci.* 2010, 31, 2178–2184.
341. Joshi, S.; Rajasekaran, K.; Sun, H.; Williamson, J.; Kapur, J. Enhanced AMPA receptor-mediated neurotransmission on CA1 pyramidal neurons during status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 2017, 103, 45–53.
342. Liao, D.; Hessler, N.A.; Malinow, R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 1995, 375, 400–404.
343. Choquet, D.; Triller, A. The dynamic synapse. *Neuron* 2013, 80, 691–703.
344. Newpher, T.M.; Ehlers, M.D. Glutamate Receptor Dynamics in Dendritic Microdomains. *Neuron* 2008, 58, 472–497.
345. Opazo, P.; Sainlos, M.; Choquet, D. Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2012, 22, 453–460.

346. Lisman, J.E.; Raghavachari, S.; Tsien, R.W. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007, 8, 597–609.
347. Tang, A.H.; Chen, H.; Li, T.P.; Metzbower, S.R.; MacGillavry, H.D.; Blanpied, T.A. A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature* 2016, 536, 210–214.
348. Kaeser, P.S.; Regehr, W.G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annu. Rev. Physiol.* 2014, 76, 333–363.
349. Kavalali, E.T. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015, 16, 5–16.
350. 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.
351. Russo, I.; Bonini, D.; Via, L. La; Barlati, S.; Barbon, A. AMPA receptor properties are modulated in the early stages following pilocarpine-induced status epilepticus. *NeuroMolecular Med.* 2013, 15, 324–338.
352. Swanson, G.T.; Kamboj, S.K.; Cull-Candy, S.G. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J. Neurosci.* 1997, 17, 58–69.
353. 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.