

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

На правах рукописи

Коваленко Анна Андреевна

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИОНОТРОПНЫХ И МЕТАБОТРОПНЫХ
РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗЕ

Специальность 1.5.5 – «Физиология человека и животных»

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Зубарева Ольга Евгеньевна

Санкт-Петербург

2023

Оглавление

Введение	5
Актуальность	5
Цель и задачи исследования	9
Научная новизна	9
Научно-практическая значимость	10
Методология и методы исследования	11
Положения, выносимые на защиту	11
Апробация результатов	12
Публикации	12
Личный вклад автора	14
Структура и объём диссертации	14
1. Обзор литературы	15
1.1 Характеристика эпилепсии и других судорожных состояний	15
1.2 Моделирование судорожных состояний	16
1.2.1 Моделирование острых судорог	16
1.2.2 Моделирование эпилепсии	17
1.3 Патогенетические механизмы эпилептогенеза	18
1.4 Общая характеристика глутаматных рецепторов	20
1.4.1 Классификация глутаматных рецепторов	20
1.4.2 Строение ионотропных рецепторов глутамата	21
1.4.3 Функционирование NMDA- и AMPA-рецепторов	23
1.4.4 Особенности субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов	25
1.4.5 Строение метаботропных рецепторов глутамата	28
1.4.6 Функционирование метаботропных рецепторов глутамата	29
1.5 Функции ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата	32
1.5.1 Функции NMDA- и AMPA-рецепторов	34

1.5.2	Функции metabotropicных рецепторов глутамата.....	36
1.6	Роль ионотропных и metabotropicных рецепторов глутамата в формировании судорог и развитии эпилепсии.....	39
2.	Материалы и методы	42
2.1	Объект исследования	42
2.2	Экспериментальная процедура и использованные препараты	42
2.3	Регистрация спонтанных рецидивирующих судорог.....	43
2.4	Определение уровня экспрессии генов ионотропных и metabotropicных рецепторов глутамата	44
2.4.1	Выделение тотальной РНК.....	44
2.4.2	Обработка образцов РНК ДНКазой	45
2.4.3	Обратная транскрипция.....	46
2.4.4	Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	46
2.5	Определение уровня белка субъединиц ионотропных рецепторов глутамата.....	52
2.6	Статистическая обработка данных	53
3.	Результаты	54
3.1	Оценка стабильности экспрессии генов домашнего хозяйства в мозге крыс в моделях острых судорог и эпилепсии	54
3.2	Изменение продукции мРНК и белка ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс после острых судорог.....	58
3.3	Изменение продукции мРНК и белка ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс в модели эпилепсии.....	64
3.3.1	Изменение экспрессии генов на уровнях мРНК и белка ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии	64
3.3.2	Изменение экспрессии генов на уровнях мРНК и белка ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии.....	68
3.4	Изменение экспрессии генов metabotropicных рецепторов глутамата в мозге крыс после острых судорог.....	72
3.5	Изменение экспрессии генов metabotropicных рецепторов глутамата в мозге крыс в модели эпилепсии	75

<i>3.5.1 Изменение экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии</i>	<i>75</i>
<i>3.5.2 Изменение экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии</i>	<i>79</i>
4. Обсуждение.....	82
Выводы.....	93
Заключение.....	94
Список сокращений.....	96
Список использованной литературы.....	101
Приложение.....	127

Введение

Актуальность

Судорожные приступы встречаются у 10% населения планеты и приводят к эпилепсии у 1-2% людей во всем мире [1]. Эпилепсия — это хроническое и сложно поддающееся лечению неврологическое заболевание, которым страдают миллионы людей [2]. Она характеризуется предрасположенностью к возникновению спонтанных эпилептических припадков и может сопровождаться различными психиатрическими и неврологическими проявлениями [3]. В 40% случаев эпилепсия является приобретенной, в связи с чем предотвращение развития данного заболевания у пациентов из группы риска является важной медицинской проблемой [4]. Трудности в профилактике и лечении эпилепсии связаны с недостаточным знанием патогенетических механизмов ее развития.

Физиологические исследования показывают, что судороги возникают вследствие ненормальной и синхронной гиперактивности нейронных сетей в головном мозге [5]. Основной гипотезой развития гипервозбудимости нейронов является нарушение баланса между тормозными и возбуждающими системами в различных отделах головного мозга [6]. В частности, в основе дисбаланса может быть дефицит тормозных процессов, связанный в основном с недостаточной ГАМК (гамма-аминомасляная кислота)-ергической нейротрансмиссией. Другой причиной нарушения баланса может являться гиперактивность основной возбуждающей нейромедиаторной системы мозга — глутаматергической [6, 7].

В настоящее время широко применяются препараты, действующие на ГАМК-ергическую систему, в частности, для купирования судорог применяются агенты, усиливающие торможение путем повышения концентрации внеклеточной ГАМК (например, вальпроат, тиагабин, вигабатрин) или потенцирующих ГАМК_A-рецепторы (например, бензодиазепины). С другой стороны, только один препарат, снижающий возбуждение путем специфического воздействия на глутаматные рецепторы — антагонист рецепторов α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) перампанел — в настоящее время используется для лечения фокальной эпилепсии [8]. Возбуждающие пирамидные нейроны имеют более высокую плотность в коре головного мозга и гиппокампе по сравнению с тормозными ГАМК-ергическими интернейронами [9], что делает глутаматергическую систему перспективной мишенью для разработки подходов к лечению, а также предотвращению развития эпилепсии.

Функционирование глутаматергической системы определяется свойствами рецепторов глутамата. Глутаматные рецепторы делятся на два основных суперсемейства: (1) ионотропные рецепторы (iGluRs), которые образуют мембранные катионные каналы; (2) метаботропные

рецепторы (mGluRs), которые связаны с эффекторами через G-белки. iGluRs включают NMDA- (N-метил-D-аспартат), AMPA- и каинатные рецепторы, и все они образуются путем гетеромерной сборки 4 субъединиц, которые определяют ионную селективность и кинетические свойства ионных каналов. NMDA-рецепторы являются тетрамерами и могут состоять из трех типов субъединиц: GluN1, GluN2(a-d) и GluN3(a-b), которые определяют их функциональные характеристики [10]. AMPA-рецепторы также являются тетрамерами, в состав которых могут входить субъединицы GluA1–4. Основная популяция AMPA-рецепторов имеет в своем составе GluA2 субъединицу, которая обеспечивает непроницаемость канала для ионов Ca^{2+} [11]. Напротив, NMDA-рецепторы высоко проницаемы для ионов Ca^{2+} , но они ингибируются физиологическими концентрациями внеклеточного Mg^{2+} . Деполяризация мембраны снимает блокаду Mg^{2+} ионного канала NMDA-рецептора, тем самым обеспечивая большой приток внеклеточного Ca^{2+} в нейроны, когда NMDA-рецепторы активируются глутаматом в присутствии коагониста глицина [9]. iGluRs играют важную роль в обеспечении процессов синаптической пластичности [12], поэтому нарушение их субъединичного состава может приводить не только к развитию судорожного приступа, но и к формированию когнитивных нарушений [13, 14].

Многие исследователи сходятся во мнении о важной роли NMDA- и AMPA-рецепторов в патогенезе эпилептических синдромов [15, 16]. У пациентов с эпилепсией, а также при моделировании данного заболевания продемонстрировано изменение паттерна экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов [17–19], однако связь этих изменений с эпилептогенезом остается малоизученной.

В отличие от iGluRs, mGluRs только модулируют возбуждающую и тормозную синаптическую передачу [9, 20]. Различные типы mGluRs присутствуют на пресинаптической и постсинаптической мембране нейронов и на мембранах глиальных клеток, обеспечивая тонкую регуляцию передачи сигнала. Существует три группы mGluRs, которые включают восемь подтипов, разделение на которые основано на их нуклеотидной последовательности, связывании с определенным типом G-белков и селективности к лигандам [21].

Группа I включает mGluR1 и mGluR5, сопряженные с белками G_q/G_{11} . Они экспрессируются в основном постсинаптически, и их активация стимулирует путь фосфолипазы C. Инициация этого пути приводит к гидролизу фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата с образованием инозитол-1,4,5-трисфосфата и диацилглицерола, которые увеличивают высвобождение внутриклеточного Ca^{2+} и активируют протеинкиназу C, соответственно [9]. Рецепторы этой группы могут способствовать активации глутаматных NMDA-рецепторов.

Группа II включает mGluR2 и mGluR3, сопряженные с белками G_i/G_o . mGluR2 имеет преимущественно пресинаптическую локализацию, тогда как mGluR3 может располагаться как пресинаптически, так и на постсинаптической мембране, где он взаимодействует с mGluR5 [21, 22]. Эффекты активации постсинаптических рецепторов данной группы заключаются в ингибировании аденилатциклазы и Ca^{2+} каналов и активации K^+ каналов [21]. Основная функция пресинаптических mGluRs II группы заключается в ингибировании высвобождения нейромедиаторов [23].

Группа III включает mGluR4, mGluR6, mGluR7 и mGluR8, которые также связаны с белками G_i/G_o и ингибируют высвобождение нейротрансмиттеров [9]. mGluR4, mGluR7 и mGluR8 локализованы пресинаптически в активной зоне высвобождения нейротрансмиттера [23]. mGluR6 локализованы исключительно в дендритах ON-биполярных клеток сетчатки и в данной работе не рассматриваются.

Эффективность лигандов mGluRs в лечении неврологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, тревога, депрессия, шизофрения и эпилепсия, подтверждается последними исследованиями [9, 21]. Однако неясно, можно ли использовать лиганды mGluRs для предотвращения развития эпилепсии из-за ограниченности данных об экспрессии генов mGluR на разных стадиях эпилептогенеза [24].

Известно, что длительное нарушение экспрессии генов mGluRs может привести к нарушению синаптической пластичности, повышению концентрации глутамата и чрезмерному возбуждению нейронных сетей при эпилепсии [9]. Продукция mGluRs группы I усиливается в гиппокампе как у пациентов с эпилепсией, так и у крыс после судорог, вызванных электрической стимуляцией [25–27]. В исследовании Aronica с соавторами также обнаружено повышение экспрессии mGluR3 в астроцитах крыс в модели височной эпилепсии [26]. В другом исследовании показано значительное снижение экспрессии mGluR2 и mGluR3 и функции обоих подтипов в зубчатой извилине гиппокампа и коре головного мозга в пилокарпиновой модели эпилепсии через 24 часа после индукции припадков [28]. Данные об изменении экспрессии mGluRs III группы в мозге крыс после судорог в настоящее время практически отсутствуют. Таким образом, изменения экспрессии генов всех типов mGluRs и роль этих изменений в эпилептогенезе до сих пор остаются малоизученными.

Следует отметить, что описанные выше исследования проводились либо на модели острых судорог, либо на хронической модели. В качестве модели острых судорог часто используется пентилентетразоловая модель. Конвульсант пентилентетразол позволяет смоделировать именно острый судорожный приступ, который не сопровождается спонтанными судорогами после

латентного периода [29]. Признанной моделью височной эпилепсии считается литий-пилокарпиновая модель. После введения пилокарпин индуцирует одиночный судорожный приступ. После латентного периода, длящегося несколько дней или недель, у животных наблюдаются спонтанные рецидивирующие судороги (хроническая фаза модели) [30]. Сопоставление изменений, происходящих с рецепторами глутамата в моделях острых судорог и эпилепсии, в одном исследовании ранее не проводилось. Использование этих двух моделей позволит провести сравнительный анализ изменений, происходящих в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели и после пентилентетразол-индуцированных судорог, и обнаружить те, которые могут вносить вклад в эпилептизацию мозга. Выявление патогенетических изменений, которые происходят в процессе эпилептогенеза и приводят к возникновению, повторению и прогрессированию судорог, имеет важное значение для терапевтических инноваций.

Кроме того, основная масса проведенных исследований ограничена только одной областью мозга — гиппокампом. Между тем, развитие эпилептических процессов затрагивает гораздо большее количество структур мозга, в частности, височную кору [31]. Более того, в последние годы появились данные о том, что для дорзальной и вентральной областей гиппокампа характерны различия по биохимическим свойствам и транскриптому, а также по участию в реализации физиологических функций [32, 33]. В связи с этим, данные области гиппокампа следует исследовать отдельно.

Традиционно для оценки уровня экспрессии генов интереса применяется метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР). Для более точного измерения относительной экспрессии генов данным методом необходимы подходящие референсные гены (гены домашнего хозяйства) для нормализации получаемых результатов [34]. Однако в последние годы появляется все больше данных о том, что экспрессия генов, традиционно рассматриваемых как гены домашнего хозяйства, может быть нестабильной при различных воздействиях. Выбор нестабильных референсных генов может вести к получению ложных результатов [35–40]. Появляется все больше данных о том, что стабильность экспрессии референсных генов следует проверять для конкретных экспериментальных условий — идеальный набор должен включать не менее 8 генов [41]. Однако, анализ экспрессии такого числа генов требует большого расхода времени, реактивов и биологических образцов. Решением данной проблемы может быть применение мультиплексных систем, позволяющих оценивать экспрессию нескольких генов в одной реакции. Тем не менее, подавляющее большинство работ, посвященных оценке стабильности экспрессии референсных генов в образцах лабораторных крыс используют технологию детекции накопления продукта реакции с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green, не позволяющую проводить мультиплексный анализ.

В связи с этим в рамках выполнения данной работы были разработаны мультиплексные системы для ПЦР в реальном времени с применением флуоресцентно меченых зондов (технология TaqMan) для 9 генов домашнего хозяйства. Кроме того, был использован новый подход, который заключается в расчете комплексного рейтинга стабильности референсных генов на основе четырех различных алгоритмов [37, 40, 42–46]. Это позволило выбрать самые стабильно экспрессирующиеся гены в структурах мозга крыс для обеих использованных экспериментальных моделей.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: провести анализ изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс в моделях острых судорог и эпилепсии.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Разработать мультиплексные тест-системы для быстрого анализа экспрессии генов домашнего хозяйства в тканях крыс и оценить стабильность экспрессии этих генов в различных областях мозга в модели судорог, вызванных пентилентетразолом, а также в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии;
2. Описать динамику изменений экспрессии генов ионотропных (на уровнях мРНК и белка) и метаботропных (на уровне мРНК) глутаматных рецепторов в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также височной коре мозга крыс после острых пентилентетразол-индуцированных судорог;
3. Провести анализ изменений экспрессии генов ионотропных (на уровнях мРНК и белка) и метаботропных (на уровне мРНК) глутаматных рецепторов в различных областях мозга крыс на этапе эпилептогенеза в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии;
4. В хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии исследовать особенности экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс с выраженными спонтанными рецидивирующими судорогами.

Научная новизна

При анализе стабильности экспрессии 9 генов домашнего хозяйства (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) в височной коре, дорзальной и вентральной областях гиппокампа крыс в моделях острых судорог и эпилепсии, нами показано, что показатели стабильности экспрессии референсных генов различаются для этих двух моделей. Кроме того, показатели стабильности были регионспецифичны. В частности, они не совпадали даже между дорзальной и вентральной областями гиппокампа. Наши данные указывают на необходимость

дифференцированного отбора референсных генов в разных областях мозга, включая дорзальный и вентральный гиппокамп.

Впервые в одном исследовании проведен комплексный анализ изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата на моделях острых судорог и эпилепсии. Изменения экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов обнаружены в обеих использованных моделях, однако они были более выражены в модели хронических судорог и сохранялись до хронической фазы.

Показано, что продукция мРНК метаботропных рецепторов глутамата практически не меняется при острых судорогах, в то время как в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии и в латентную и в хроническую фазы выявлены существенные изменения, которые могут вносить вклад в эпилептогенез.

Впервые получено описание изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс. Показано, что выявленные изменения были регион-специфичными. В модели острых судорог изменения экспрессии генов рецепторов глутамата обнаружены только в дорзальной области гиппокампа и височной коре крыс. В литий-пилокарпиновой модели эпилепсии изменения продукции мРНК ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата изменения затрагивают также и вентральный гиппокамп, изменения в котором были даже более выражены, чем в дорзальном гиппокампе.

Научно-практическая значимость

В ходе работы были разработаны мультиплексные тест-системы, которые позволяют анализировать экспрессию 9 референсных генов в 3 реакциях. Использование этих систем позволяет проводить экспериментальный подбор оптимальных референсных генов для нормализации данных ОТ-ПЦР в образцах тканей/клеточных линий лабораторных крыс при существенной экономии расходных материалов и трудозатрат. Эти тест-системы могут быть в дальнейшем использованы для поиска стабильных референсных генов в образцах тканей и клеточных линий лабораторных крыс, полученных в различных экспериментальных условиях. В данной работе с помощью описанных тест-систем определены наиболее стабильные и валидные для нормализации данных ОТ-ПЦР референсные гены в пентилентетразоловой модели острых судорог и литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Дополнительно были разработаны и оптимизированы мультиплексные системы для анализа экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также метаботропных рецепторов глутамата, которые могут применяться другими исследователями при изучении нарушений функционирования глутаматергической системы.

Результаты проведенного исследования могут быть использованы при разработке новых методов лечения эпилепсии. В частности, согласно нашим результатам, использование агонистов метаботропных рецепторов III группы в сочетании с другими фармакологическими агентами может быть перспективным подходом к предотвращению развития эпилепсии.

Полученные данные могут быть использованы для преподавания курсов нейробиологии, патофизиологии, биохимии психических и нервных болезней, молекулярной физиологии.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с применением комплексного подхода, совмещающего патофизиологические (моделирование острых судорог и эпилепсии), поведенческие (оценка развития спонтанных рецидивирующих судорог в модели эпилепсии), биохимические и молекулярно-биологические (выделение тотальной РНК, оценка уровня экспрессии генов на уровне мРНК с помощью обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени и на уровне белка методом вестерн блоттинга) методы, а также различные методы статистической обработки результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Выбор оптимальных референсных генов для нормализации данных количественной ОТ-ПЦР при анализе экспрессии генов в мозге крыс различается для модели острых судорог, индуцированных введением пентилентетразола, и литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Выбор зависит от анализируемого периода и области мозга, включая различные отделы гиппокампа.

2. Острые судороги, вызванные пентилентетразолом, приводят к слабо выраженным изменениям экспрессии исследованных генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата. Эти изменения наблюдаются только в дорзальной области гиппокампа и височной коре крыс.

3. В литий-пилокарпиновой модели эпилепсии изменения продукции мРНК ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата носят более долговременный характер, затрагивают большее количество генов и областей мозга, чем в пентилентетразоловой модели.

4. В латентную фазу (период эпилептогенеза) литий-пилокарпиновой модели во всех исследованных областях мозга крыс экспрессия генов основных субъединиц ионотропных NMDA- и AMPA-рецепторов и III группы метаботропных рецепторов глутамата снижается, в то время как продукция мРНК метаботропных рецепторов I группы повышается.

5. В хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии (после формирования спонтанных рецидивирующих судорог) снижение экспрессии генов отдельных субъединиц ионотропных рецепторов сохраняется в вентральной области гиппокампа и височной коре.

Характер изменений продукции мРНК метаботропных глутаматных рецепторов отличается от наблюдаемого в латентную фазу. Изменения экспрессии генов II группы метаботропных рецепторов глутамата выявляются только в хроническую фазу.

Апробация результатов

Результаты работы представлены на различных всероссийских и международных конференциях:

- 7 конференций с устными докладами (1. IV Всероссийская конференция с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология», Пущино, Россия, 2018; 2. XXI международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей "Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье", Санкт-Петербург, Россия, 2018; 3. VIII Международный молодежный медицинский конгресс. Санкт-Петербургские научные чтения, Санкт-Петербург, Россия, 2019; 4. 27-я междисциплинарная международная конференция по неврологии и биологической психиатрии "Стресс и поведение" 27th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference "Stress and Behavior", Санкт-Петербург, Россия, 2020; 5. VII молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 2020; 6. VIII Молодёжная Школа-Конференция по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 2022; 7. Всероссийская конференция с международным участием «Интегративная физиология», Санкт-Петербург, Россия, 2022);
- 5 конференций со стендовыми докладами (1. 11-й Нейронаучный форум Федерации европейских нейронаучных сообществ 11th FENS Forum of neuroscience, Берлин, Германия, 2018; 2. 26-я Международная конференция "Стресс и поведение" по неврологии и биопсихиатрии 26th International "Stress and Behavior" Neuroscience and Biopsychiatry Conference, Санкт-Петербург, Россия, 2019; 3. XXVI Международная научная конференция «Ломоносов», Москва, Россия, 2019; 4. VI съезд физиологов с международным участием, Сочи, Россия, 2019; 5. Всероссийская с международным участием конференция Российского нейрохимического общества, Санкт-Петербург, Россия, 2022).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 работ в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего

образования Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертационных исследований (из них 6 – в международных журналах, индексируемых в базах данных PubMed, Scopus и Web of Science):

1. Постникова Т.Ю., Зубарева О.Е., Коваленко А.А., Ким К.Х., Магазаник Л.Г., Зайцев А.В. Эпилептический статус вызывает нарушения синаптической пластичности в гиппокампе крыс, сопровождающиеся изменением экспрессии NMDA рецепторов // Биохимия. 2017. Т. 82 (3). С. 418-428. (перевод: 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 // Biochemistry (Mosc). 2017. V. 82 (3). P. 282-290. DOI: 10.1134/S0006297917030063)
2. 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. V. 3. P. 94-100. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.08.047
3. Schwarz A.P., Malygina D.A., Kovalenko A.A., Trofimov A.N., Zaitsev A.V. Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples // Molecular and Cellular Probes. 2020. 101611. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101611
4. Schwarz A.P.*, Kovalenko A.A.*, Malygina D.A., Postnikova T.Yu., Zubareva O.E., Zaitsev A.V. Reference Gene Validation in the Brain Regions of Young Rats after Pentylenetetrazole-Induced Seizures // Biomedicines. 2020. V. 8 (8). 239. DOI: 10.3390/biomedicines8080239.
* — равный вклад авторов
5. Ергина Ю.Л., Коваленко А.А., Зайцев А.В. Роль NMDA-рецепторов в эпилептогенезе // Рос Физиол Журн. 2020. Т. 106 (12). С. 1455-1478. (перевод: J. L. Ergina J.L., Kovalenko A.A., Zaitsev A.V. The role of NMDA receptors in epileptogenesis // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2021. V. 51. P. 793-806. DOI: 10.1007/s11055-021-01136-9)
6. Kovalenko A.A., Zakharova M.V., Zubareva O.E., Schwarz A.P., Postnikova T.Y., Zaitsev A.V. Alterations in mRNA and protein expression of glutamate receptor subunits following pentylenetetrazole-induced acute seizures in young rats // Neuroscience. 2021. V. 468. P. 1-15. 10.1016/j.neuroscience.2021.05.035
7. Kovalenko A.A., Zakharova M.V., Schwarz A.P., Dyomina A.V., Zubareva O.E., Zaitsev A.V. Changes in metabotropic glutamate receptor gene expression in rat brain in a lithium–pilocarpine model of temporal lobe epilepsy // Int J Mol Sci. 2022. V. 23. 2752. DOI: 10.3390/ijms23052752

8. Dyomina A.V., Kovalenko A.A., Zakharova M.V., Postnikova T.Yu., Griflyuk A.V., Smolensky I.V., Antonova I.V., Zaitsev A.V. MTEP, a selective mGluR5 antagonist, had a neuroprotective effect but did not prevent the development of spontaneous recurrent seizures and behavioral comorbidities in the rat lithium–pilocarpine model of epilepsy // *Int J Mol Sci*. 2022. V. 23. 497. DOI: 10.3390/ijms23010497
9. Диеспиров Г.П., Постникова Т.Ю., Грифлюк А.В., Коваленко А.А., Зайцев А.В. Изменение свойств глутаматергической системы гиппокампа крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии // *Биохимия*. 2023. Т. 88 (3). С. 429-442. (перевод: Diespirov G.P., Postnikova T.Y., Griflyuk A.V., Kovalenko A.A., Zaitsev A.V. Alterations in the properties of the rat hippocampus glutamatergic system in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy // *Biochemistry (Mosc)*. 2023. V. 88 (3). P. 353-363. DOI: 10.1134/S0006297923030057)

Личный вклад автора

Все эксперименты были выполнены лично автором или при его участии. Полученные результаты были статистически обработаны и проанализированы лично автором. В подготовке каждой публикации автор принимал непосредственное участие.

Структура и объём диссертации

Рукопись содержит титульную страницу, оглавление, введение, 4 основные главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), заключение, выводы, список сокращений, список использованной литературы (250 источников) и приложение, включающее 3 рисунка. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, включает 42 рисунка и 7 таблиц.

1. Обзор литературы

1.1 Характеристика эпилепсии и других судорожных состояний

Эпилепсия является хроническим неврологическим заболеванием человека, которое проявляется в предрасположенности организма к формированию судорожных приступов [3]. Согласно современной классификации, введенной Всемирной Противоэпилептической Лигой, причины развития эпилепсии могут быть генетической, структурной, метаболической, иммунной, инфекционной или неизвестной этиологии [47]. При диагностике данного заболевания особое внимание уделяется типу судорожных приступов пациента. В зависимости от того, какая часть мозга вовлечена в формирование судорог, они могут быть фокальными (парциальными) и генерализованными. В современной классификации отдельно выделяют судороги с неясной локализацией судорожного очага. Развитие фокальных судорог связано с одной областью мозга, однако возможно и вовлечение других регионов. Структура мозга, в которой развивается судорожный очаг, определяет, какую форму будут иметь фокальные судорожные приступы. В развитие генерализованных судорог вовлечены структуры обоих полушарий мозга, они могут начаться фокально и затем эпилептическая активность распространяется по всему мозгу [5, 47–49].

Фокальные и генерализованные приступы в свою очередь классифицируются по моторным и немоторным проявлениям [47]. Основным типом судорожных припадков, сопровождающимся двигательными симптомами, является тонико-клонический приступ [50]. Тонико-клонические судороги сопровождаются двухсторонними симметричными судорожными движениями всех конечностей и потерей сознания пациента [51].

Физиологические исследования показывают, что эпилептические приступы являются результатом чрезмерной активности нервных клеток. В настоящее время полагают, что это связано с нарушением баланса между возбуждающими и тормозными нейромедиаторными системами различных отделов мозга [49, 52]. Не все судороги связаны с эпилепсией, например, эпилептический статус (*status epilepticus*, SE) может не сопровождаться эпилептизацией мозга [53]. SE — это состояние, при котором у пациента развиваются постоянные или повторяющиеся судорожные приступы продолжительностью не менее 5 минут и между приступами человек не приходит в сознание [54]. Менее 50% людей с SE имели предшествующие судорожные приступы или эпилепсию [50]. Причинами развития SE могут служить полученные травмы головного мозга, инфекции, инсульт, гипоксия, опухолевые заболевания, нарушения метаболизма и энергетического обмена, генетические мутации, осложнение различных неврологических расстройств, отравление ядами или передозировка лекарственными средствами. Длительные фебрильные судороги являются наиболее частой причиной возникновения SE у детей [55].

В свою очередь SE может запускать процессы эпилептогенеза. Кроме того, травмы головного мозга, инфекции, ишемия и инсульт также могут являться факторами, приводящими к развитию эпилепсии [56]. Приобретенная форма эпилепсии наблюдается примерно в 40% случаев [4]. Процесс эпилептогенеза происходит до и после первого неспровоцированного судорожного приступа; этот процесс, а также частота и тяжесть спонтанных судорог могут прогрессировать в течение нескольких недель в экспериментальных моделях и в течение многих лет у людей [57, 58].

1.2 Моделирование судорожных состояний

В настоящее время изучение эпилептических синдромов является актуальным, в связи с тем, что достаточно высокий процент (30–40 %) больных не чувствительны к стандартным противосудорожным препаратам [59]. Учитывая высокий процент именно приобретенной формы эпилепсии, выявление патогенетических изменений, которые происходят в процессе эпилептогенеза и приводят к возникновению, повторению и прогрессированию судорог, имеет важное значение для разработки новых терапевтических подходов. В основе решения этой проблемы лежит использование подходящих моделей эпилепсии и других судорожных состояний.

При моделировании эпилепсии используются различные варианты первичного повреждения мозга, которое может запустить эпилептогенез. К ним относятся: эксайтотоксический SE, индукция судорог электрической стимуляцией, а также индукция воспалительных процессов гипертермией и вирусной инфекцией [60]. Наиболее распространенные модели основаны на введении определенных веществ (конвульсантов) экспериментальным животным, которые вызывают развитие судорог. К таким конвульсантам относятся, например, каиновая кислота, пилокарпин и пентилентетразол [61]. Однако, не все они после однократного введения приводят к развитию эпилепсии.

1.2.1 Моделирование острых судорог

Конвульсант пентилентетразол (ПТЗ) позволяет смоделировать именно острый судорожный приступ, который не сопровождается хроническими изменениями в мозге. ПТЗ — бициклическое производное тетразола. Он характеризуется высокой биодоступностью благодаря легкому проникновению через биологические мембраны, быстрому распределению по органам после внутривенной инъекции, равномерному распределению в мозге и способности стимулировать эпилептогенную активность путем блокирования ГАМК-опосредованной передачи. ПТЗ является антагонистом ионотропных ГАМК_A-рецепторов и связывается с сайтами узнавания бензодиазепаина (Рис. 1.1) [62, 63].

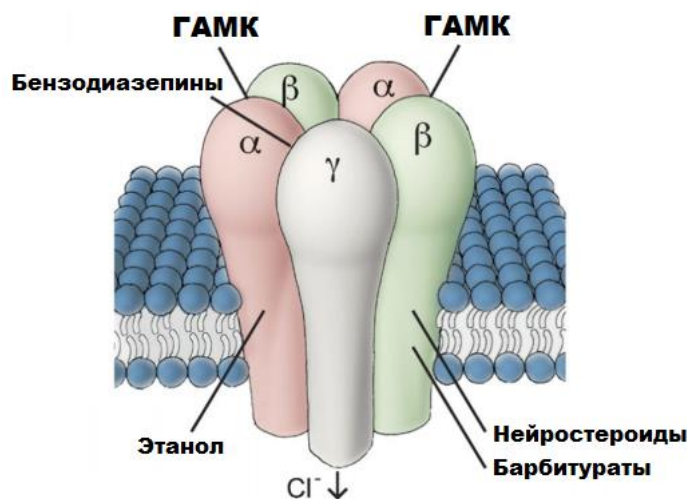


Рисунок 1.1. Схема строения ГАМК_A-рецептора. Сайт связывания ГАМК находится между α и β субъединицами, а сайт узнавания бензодиазепинов – между α и γ субъединицами [64].

Эффект действия ПТЗ является дозозависимым, при высоких концентрациях (60–100 мг/кг) он способен индуцировать генерализованные тонико-клонические судороги. Данная модель часто используется при проверке эффективности различных антиэпилептических препаратов [65]. ПТЗ также используется в модели киндлинга, при которой введение конвульсанта в подпороговой дозе повторяется несколько дней подряд и также приводит к развитию длительных тонико-клонических припадков. Морфологические исследования в данной модели обнаруживают снижение плотности и количества нейронов в гиппокампе, сходное с изменениями, происходящими в пилокарпиновой и каиновой моделях эпилепсии [63].

1.2.2 Моделирование эпилепсии

Каиновая кислота и пилокарпин широко используются для моделирования височной эпилепсии и вызывают патологическое состояние, сходное с заболеванием человека [61]. Каиновая кислота является циклическим аналогом L-глутамата и агонистом каиновых рецепторов. Ben-Ari и Lagowska (1978) и Ben-Ari с коллегами (1979) впервые показали, что внутримышечные инъекции каиновой кислоты у грызунов вызывают судороги и нейропатологические изменения, которые сходны с таковыми у некоторых пациентов с эпилепсией, в частности дегенерацию нейронов, которая в основном происходит в поле СА3 дорзального гиппокампа [66, 67]. После латентного периода, длящегося от 6 до 22 дней, у животных возникали спонтанные рецидивирующие судороги [68].

Пилокарпин — агонист мускариновых холинергических рецепторов – впервые описан как конвульсант в исследовании TurSKI с коллегами [69]. Позднее была разработана модель эпилепсии, при которой пилокарпин вводился после предварительного введения раствора

хлорида лития [30]. В пилокарпиновой модели без введения лития смертность животных достигает 30-40%. Показатели смертности снижаются, если за сутки до введения пилокарпина, животным вводить раствор хлорида лития. Это связано с тем, что при предварительном введении лития, для индукции SE достаточно ввести более низкую дозу пилокарпина, так как чувствительность к конвульсанту возрастает [61].

Пилокарпин вызывает дисбаланс между возбуждающей и тормозной передачей, что приводит к SE (острая фаза модели) [30]. Затем механизм поддержания судорог меняется, поскольку антагонист мускариновых рецепторов атропин не предотвращает развитие судорог [70]. Было установлено, что глутаматергическая система, в частности NMDA-рецепторы, участвует в поддержании припадков [30, 71, 72]. Это утверждение было подкреплено данными о повышении уровня глутамата в гиппокампе после начала судорог [72]. После латентного периода, длящегося несколько дней или недель, у животных наблюдались спонтанные судороги (хроническая фаза) [30]. Впоследствии у подопытных животных отмечались нарушения памяти и поведения [73, 74], которые сопровождалась нейродегенеративными процессами в височной коре, миндалине, гиппокампе и некоторых других областях мозга [30], аналогично поражениям у пациентов с височной эпилепсией [75]. В связи с тем, что литий-пилокарпиновая модель наиболее точно воспроизводит патологические изменения, происходящие у пациентов с височной эпилепсией, именно эта модель была использована в данной работе.

1.3 Патогенетические механизмы эпилептогенеза

К механизмам эпилептизации относят генетические и эпигенетические изменения, молекулярные и структурные перестройки, происходящие в клетках мозга и приводящие к дисфункции нейронных цепей. Множество механизмов эпилептогенеза, выявленных на животных моделях, позволяет предположить, что эпилептизация зависит от целой сети взаимодействующих патогенетических и компенсаторных изменений [56]. Различные формы молекулярной и клеточной пластичности, которые, как предполагается, приводят к возникновению первых неспровоцированных судорог, также в дальнейшем могут способствовать прогрессированию эпилептического состояния [57].

В настоящее время принято считать, что гипервозбудимость нейронов является следствием дисбаланса между тормозными и возбуждающими системами в различных отделах головного мозга. В частности, в основе нарушения баланса может быть дефицит тормозных процессов, связанный в основном с недостаточной ГАМК-ергической нейротрансмиссией и внеклеточным калиевым током. Другой причиной нарушения баланса может являться гиперактивность возбуждающих систем, например, глутаматергической, а также функциональные нарушения лиганд- или потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов [7, 52, 57]. Экспрессия

субъединиц глутаматных NMDA- и AMPA-рецепторов может быть изменена, что еще больше повышает возбудимость нейронов и снижает порог развития судорог [76]. Кроме того, чрезмерное поступление ионов кальция в нейроны из-за гиперфункционирования NMDA-рецепторов приводит к активации синтазы оксида азота, кальпаинов и NADPH-оксидазы. Последний фермент играет важную роль в генерации активных форм кислорода. Кальций также накапливается в митохондриях, что приводит к митохондриальной недостаточности (снижению продукции АТФ) [16].

В дополнение к нейрональным нарушениям в мозге больных эпилепсией наблюдаются микро- и астроглиоз [76]. Микроглиоз характеризуется повышенной экспрессией и секрецией провоспалительных цитокинов (в частности, интерлейкина 1 бета (IL-1 β), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). Роль цитокинов в формировании судорог и эпилептогенезе изучалась с помощью моделей с генетически модифицированными животными или фармакологических методов. Введение IL-1 β [77, 78], компонентов системы комплемента [79] или простагландинов [80] в мозг грызунов снижает порог развития судорог. Клеточные механизмы, которые лежат в основе этих эффектов, способствующих развитию судорог, включают повышение возбуждающей глутаматергической передачи (Рис. 1.2) и снижение тормозной ГАМК-ергической передачи [81]. Предполагается, что опосредованная цитокинами воспалительная реакция также способствует повреждению гематоэнцефалического барьера [76].

Таким образом, важную роль в эпилептогенезе играет именно глутаматергическая нейромедиаторная система. Функциональная активность данной системы определяется работой ее рецепторов, в связи с чем особое внимание уделяется изменениям, происходящими с ионотропными NMDA- и AMPA-рецепторами. Эти рецепторы опосредуют синаптическую передачу в глутаматергическом синапсе. Особого внимания заслуживают NMDA-рецепторы, так как они обеспечивают вход ионов кальция в клетку и запуск различных внутриклеточных каскадов [10]. AMPA-рецепторы, не содержащие GluA2 субъединицу, проницаемы для кальция и могут способствовать накоплению кальция, что также может привести к гибели нейронов [16]. Функциональные характеристики этих рецепторов напрямую зависят от их субъединичного состава, и эпилептогенез может сопровождаться его перестройкой [82, 83]. Метаботропные глутаматные рецепторы (mGluRs) модулируют возбуждающую и тормозную синаптическую передачу и пластичность [9, 20]. mGluRs необходимы для поддержания баланса возбуждения/торможения [23]. Нарушения работы и ионотропных, и метаботропных рецепторов глутамата могут вносить вклад в эпилептогенез, но изменения, происходящие с данными рецепторами во время эпилептизации мозга, изучены недостаточно.

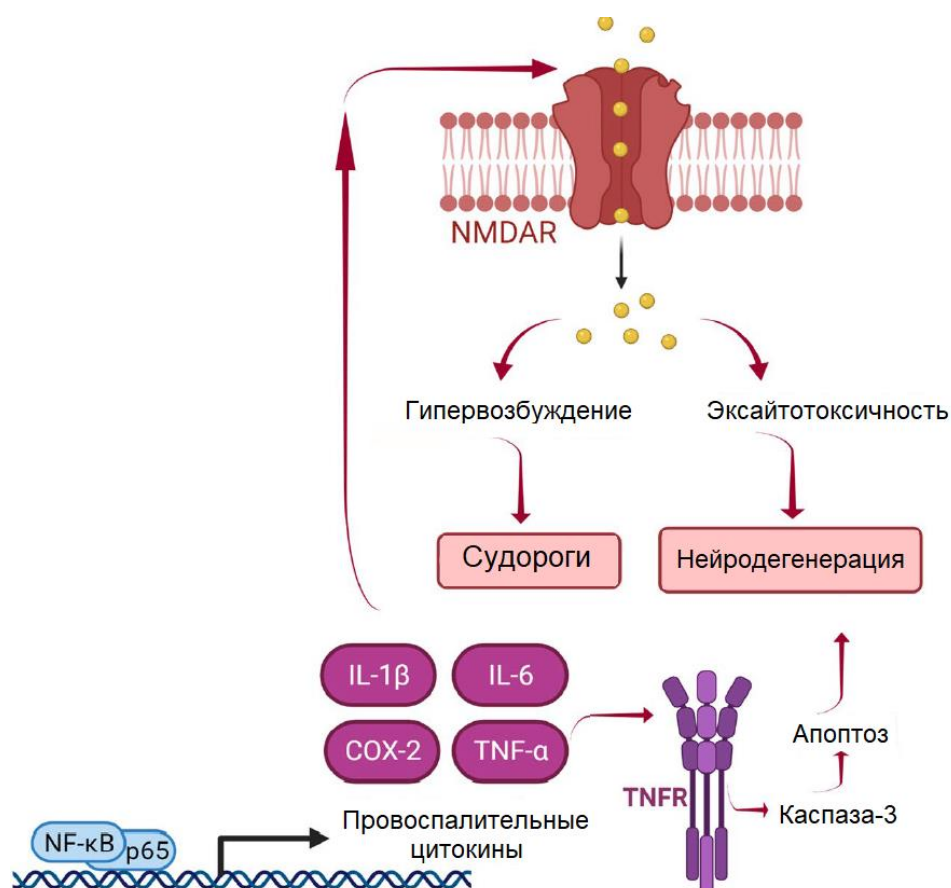


Рисунок 1.2. Схематическое представление роли провоспалительных цитокинов в развитии судорог [84]. NMDAR – ионотропный глутаматный NMDA-рецептор; TNFR – рецептор фактора некроза опухоли; IL-1 β , IL-6, TNF- α – провоспалительные цитокины; COX-2 – циклооксигеназа-2; NF- κ B – транскрипционный фактор.

1.4 Общая характеристика глутаматных рецепторов

1.4.1 Классификация глутаматных рецепторов

Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером, участвующим в широком спектре функций нервной системы, таких как обучение и память, долговременная потенция и синаптическая пластичность. Рецепторы глутамата делятся на 2 семейства: ионотропные и метаботропные. Кроме того, семейство ионотропных рецепторов (iGluRs) включает в себя подсемейства NMDA-, AMPA- и каинатные рецепторы, названные так по их химическим агонистам [85]. Все iGluRs представляют собой мембранные каналы, которые открываются при взаимодействии с лигандом. Помимо основных типов iGluRs существуют плохо охарактеризованные рецепторы «дельта» (GluD1 и GluD2), которые структурно гомологичны AMPA- и каинатным рецепторам; однако они не функционируют как катионные каналы. Вместо этого они связывают пресинаптические и постсинаптические элементы с помощью внеклеточного гликопротеина [86]. В связи с тем, что данное исследование сосредоточено на изучении изменений, происходящих с NMDA- и AMPA-рецепторами,

подробное описание структуры и функций ионотропных рецепторов глутамата будет представлено только для них.

Метаботропные (mGluRs), напротив, являются рецепторами, связанными с G-белками и имеющими классическую структуру с семью трансмембранными доменами. Основываясь на гомологии последовательностей и фармакологии, их подразделяют на подсемейства I, II и III групп [9]. К I группе относятся mGluR1 и mGluR5, связанные с G_q/G_{11} белками. Рецепторы II (mGluR2, mGluR3) и III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) групп сопряжены с G_i/G_o белками.

1.4.2 Строение ионотропных рецепторов глутамата

Все iGluRs представляют собой тетрамерные комплексы, которые являются лиганд-управляемыми ионными каналами [85]. Для NMDA-рецепторов описано 3 типа субъединиц: GluN1, GluN2(a-d) и GluN3(a-b) (Рис. 1.3) [10]. GluN1 является облигатной субъединицей, необходимой для сборки и транспортировки других субъединиц, а также для формирования функционального канала NMDA-рецептора [87].

В состав AMPA-рецепторов могут входить субъединицы GluA1, GluA2, GluA3 и GluA4. Большинство AMPA-рецепторов являются гетеротетрамерами и имеют в своем составе GluA2 субъединицу [11].

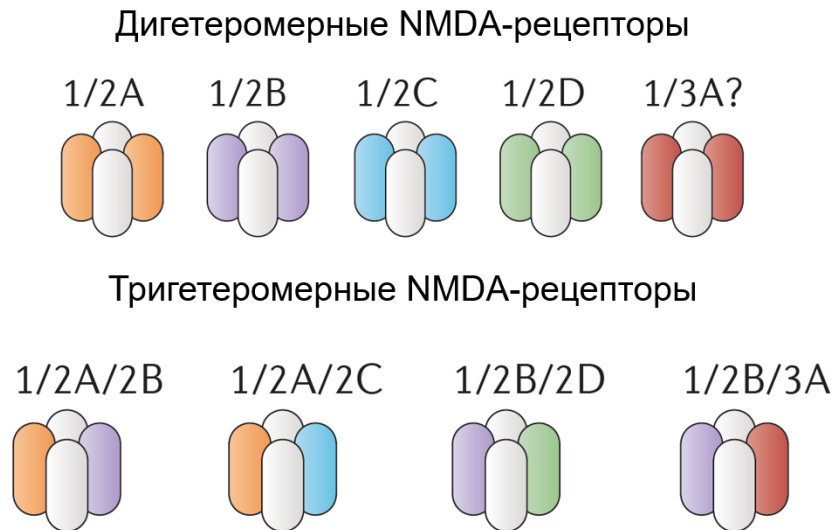


Рисунок 1.3. Различные популяции NMDA-рецепторов [10].

Субъединицы NMDA- и AMPA-рецепторов имеют идентичную мембранную топологию: за N-концевым доменом (NTD) следует агонист-связывающий домен (ABD), трансмембранный домен (TMD) и C-концевой домен (CTD) (Рис. 1.4) [85, 88].

Все субъединицы глутаматных рецепторов являются продуктами отдельных генов [85]. Гены крыс, кодирующие субъединицы NMDA-рецепторов, носят название *Grin1–3*, а AMPA-рецепторов – *Gria1–4*.

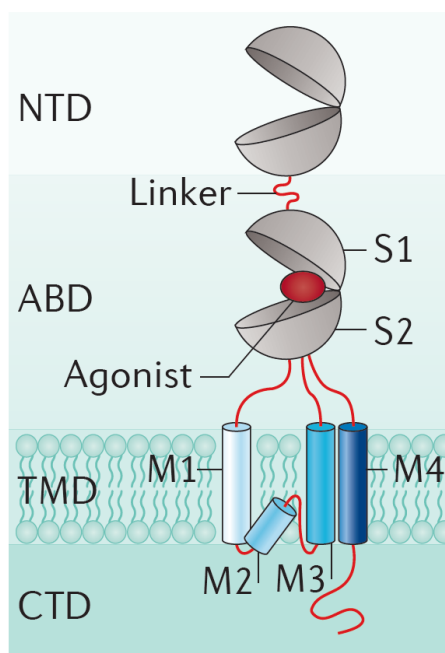


Рисунок 1.4. Общая схема расположения ионотропных глутаматных рецепторов в мембране. *NTD* – N-концевой домен; *ABD* – агонист-связывающий домен; *TMD* – трансмембранный домен; *M1–M4* – мембранные сегменты *TMD*; *CTD* – C-концевой домен [10].

Каждая субъединица NMDA-рецепторов подвержена альтернативному сплайсингу и имеет несколько изоформ. Обязательная GluN1 субъединица имеет восемь изоформ (GluN1-1–4a; GluN1-1–4b). Наличие различных изоформ в составе рецептора влияет на его фармакологические свойства, а также на характеристики открытия и закрытия канала [10, 89]. Каждая субъединица AMPA-рецепторов также подвергается альтернативному сплайсингу, в ходе которого могут появиться 2 сплайс-варианта: флип и флоп. Флип и флоп формы характеризуются различными фармакологическими свойствами. Кроме того, рецепторы, содержащие флип-вариант субъединиц, десенсибилизируются в 4 раза медленнее, чем флоп [85, 90]. Только для GluA2 субъединиц AMPA-рецепторов характерно редактирование РНК, при котором во втором сегменте TMD происходит замена кодона глутамина (Q) 607 на кодон аргинина (R), что обеспечивает непроницаемость GluA2-содержащих AMPA-рецепторов для ионов кальция (Рис. 1.5) [11].

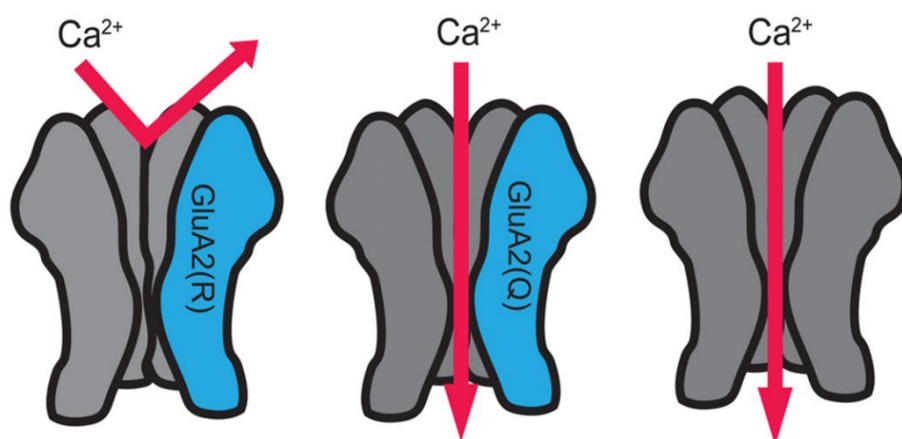


Рисунок 1.5. AMPA-рецепторы обычно содержат GluA2 (синий) в комбинации с GluA1, GluA3 или GluA4 (серый). AMPA-рецепторы, содержащие отредактированную субъединицу GluA2, непроницаемы для Ca^{2+} . AMPA-рецепторы, содержащие нередигированную субъединицу GluA2, и AMPA-рецепторы, не содержащие GluA2, проницаемы для Ca^{2+} [91].

1.4.3 Функционирование NMDA- и AMPA-рецепторов

Глутамат высвобождается в основном из синаптических пузырьков в синаптическую щель и быстро диффундирует из нее, активируя рецепторы пресинаптической и постсинаптической мембраны [15].

Первыми на глутамат реагируют AMPA-рецепторы [92]. Для активации ионного канала и NMDA-, и AMPA-рецептора необходимо связывание их с двумя молекулами агониста, которое запускает различные конформационные изменения, приводящие к открытию канала [93]. В норме AMPA-рецепторы, содержащие отредактированную GluA2 субъединицу, проницаемы только для ионов Na^+ и K^+ (Рис. 1.6Б) [94]. Открытие канала AMPA-рецепторов приводит к локальной деполяризации постсинаптической мембраны [92, 95].

NMDA-рецепторы представляют собой необычные лиганд-зависимые ионные каналы, поскольку активация не только требует связывания двух агонистов (глицина и глутамата), но также требует снятия блока Mg^{2+} путем деполяризации мембраны [96]. AMPA-рецепторы обеспечивают изменение мембранного потенциала для открытия канала NMDA-рецептора. В связи с этим на синаптической мембране NMDA-рецепторы обычно ко-локализованы с AMPA-рецепторами. Через канал NMDA-рецептора проходят ионы Na^+ , K^+ и Ca^{2+} (Рис. 1.6А). Попадание в клетку ионов кальция, который является вторичным мессенджером, приводит к запуску различных каскадов внутриклеточных реакций [92, 97].

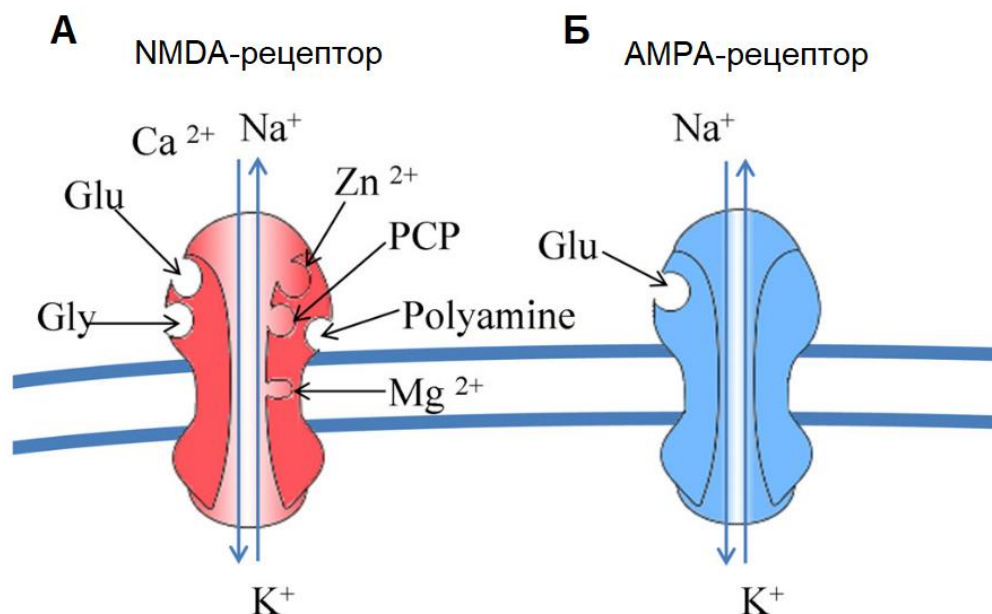


Рисунок 1.6. А – Схематическое изображение транспорта ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} через ионный канал NMDA-рецептора. На схеме также указаны сайты связывания глутамата (Glu), глицина (Gly), ионов Zn^{2+} и Mg^{2+} , полиаминов и фенциклидина (PCP). Б – Схематическое изображение транспорта ионов Na^+ и K^+ через ионный канал AMPA-рецептора [97].

Помимо основного агониста ионотропных глутаматных рецепторов (глутамата), AMPA-рецепторы могут активироваться AMPA и ее производными, виллардином и иботеновой кислотой [85]. Сайт связывания глутамата NMDA-рецептора может также связывать NMDA, L-аспаратат, гомоцистеин, хинолиновую и иботеновую кислоты, а сайт связывания глицина – D-серин и D-аланин [98].

Различные соединения способны блокировать работу NMDA- и AMPA-рецепторов. Фенциклидин и родственные ему соединения являются блокаторами ионного канала NMDA-рецепторов [98]. Кроме того, для NMDA-рецепторов характерна различная чувствительность к неконкурентным антагонистам, которая зависит от их субъединичного состава. Например, ифенпродил является селективным блокатором GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов [99]. К неконкурентным блокаторам AMPA-рецепторов относятся 2,3-бензодиазепины, гидрофталазины и тетрагидроизокиналины [100].

Функционирование iGluRs может аллостерически модулироваться различными соединениями. К положительным модуляторам AMPA-рецепторов относятся, например, анирацетам (замедляет инактивацию рецептора) и пирацетам (способствует предотвращению десенситизации рецептора) [101, 102]. Работа NMDA-рецепторов модулируется целым рядом эндогенных и экзогенных соединений. В частности, полиамины и некоторые нейростероиды

могут как положительно, так и отрицательно модулировать функционирование данного типа рецепторов [85]. Например, действие прегненолона сульфата приводит к различным эффектам в зависимости от типа субъединицы GluN2: при применении во время устойчивых ответов NMDA-рецепторов состава GluN1/GluN2a и GluN1/GluN2b происходит потенциация работы рецептора, тогда как рецепторы, состоящие из GluN1/GluN2c или GluN1/GluN2d, ингибируются [103].

1.4.4 Особенности субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов

Функциональная активность iGluRs зависит от их субъединичного состава [10, 92, 104].

Различные комбинации субъединиц NMDA-рецепторов обеспечивают разнообразие рецепторов, которые заметно различаются по своим электрофизиологическим свойствам и чувствительности к модуляции внутриклеточными мессенджерами [105]. Важнейшей субъединицей, определяющей функциональные характеристики NMDA-рецепторов, является GluN2 [85, 106]. Рецепторы, содержащие разные субъединицы GluN2, отличаются по проводимости и вероятности открытия канала, кинетики инактивации, чувствительности к агонистам и способности связывать различные внутриклеточные сигнальные белки [10, 85, 107]. В частности, временная константа инактивации рецепторного комплекса GluN1/GluN2a составляет меньше 100 мс, GluN1/GluN2b и GluN1/GluN2c – 200–400 мс, а GluN1/GluN2d – больше 1 с (Рис.1.7) [10, 108]. Рецепторные комплексы GluN1/GluN2a имеют более высокую вероятность открытия канала, чем GluN1/GluN2b или GluN1/GluN2c и GluN1/GluN2d; эти два последних подтипа имеют очень низкую вероятность открытия. Однако GluN2a-содержащие рецепторы имеют самую низкую чувствительность как к глутамату, так и к глицину [10]. GluN2a- и GluN2b-содержащие рецепторы характеризуются более высокой проводимостью, чем GluN2c- и GluN2d-содержащие [85]. NMDA-рецепторы, имеющие в своем составе GluN3 субъединицу, отличаются более низкой проводимостью в отличие от GluN2-содержащих [109]. Кроме того, рецепторы с различным субъединичным составом отличаются по степени блокирования канала ионами магния. В частности, GluN2a- или GluN2b-содержащие рецепторы более чувствительны, чем комплексы с GluN2c, GluN2d или GluN3 субъединицами [110].

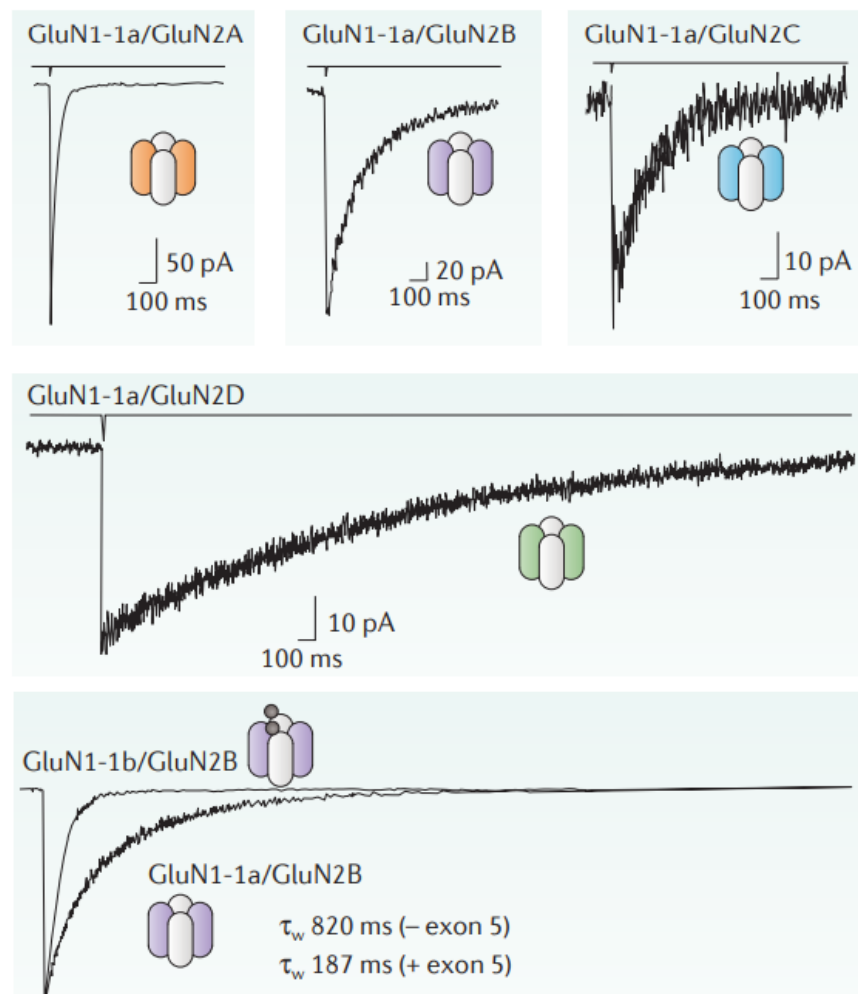


Рисунок 1.7. Влияние субъединичного состава NMDA-рецепторов на кинетику инактивации. Токи, опосредованные NMDA-рецепторами, регистрируемые у эмбриональных трансфецированных клеток почек человека, индуцировались короткой (< 5 мс) аппликацией глутамата (1 мМ). GluN2a-содержащие рецепторы инактивируются намного быстрее, чем другие подтипы рецепторов [10].

Субъединичный состав AMPA-рецепторов также определяет функциональные характеристики канала, в частности, от него зависит кинетика и ионная селективность канала [111]. Отредактированная GluA2 субъединица обеспечивает непроницаемость канала для ионов кальция и в большинстве случаев присутствует в AMPA-рецепторном комплексе [92]. AMPA-рецепторы, содержащие GluA2, имеют более низкую проводимость и вероятность открытия канала, в то время как AMPA-рецепторы без GluA2 имеют высокую проводимость и вероятность открытия канала, а также проницаемы для Ca^{2+} [13].

Функциональные свойства AMPA-рецепторов контролируют не только порообразующие субъединицы. Многие вспомогательные субъединицы определяют некоторые особенности открытия канала рецепторов, его проводимости и чувствительность к различным

фармакологическим агентам [112]. Например, для нативных AMPA-рецепторов характерно объединение с разнообразными семействами вспомогательных субъединиц, в частности, с TARP (Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Protein). Данные белки способствуют активации AMPA-рецепторов, уменьшают блокирование ионных каналов цитоплазматическими полиаминами и модулируют эффективность агонистов [113].

Помимо функциональных различий для описанных выше типов субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов характерна региональная специфичность [10].

Обязательная GluN1 субъединица широко экспрессируется в многих отделах мозга, особенно в регионах, ответственных за процессы обучения и памяти [114]. В ЦНС, в частности, в высших структурах мозга (таких как гиппокамп и кора), GluN2a и GluN2b являются преобладающими субъединицами [10]. Кроме того, что для разных областей мозга состав NMDA-рецепторного комплекса разный, он также меняется в ходе развития мозга [10, 104]. Для крыс основные изменения в паттернах экспрессии характерны для генов субъединиц GluN2, и они происходят в течение первых двух недель жизни. Экспрессия гена, кодирующего GluN2a субъединицу, начинается после рождения и неуклонно возрастает, в конечном итоге данная субъединица становится широко распространенной практически во всех областях взрослого мозга. Экспрессия гена, кодирующего GluN2b субъединицу, поддерживается на высоком уровне после рождения, достигает пика в течение первой недели жизни и постепенно его экспрессия снижается [10]. Подобные изменения паттерна экспрессии генов субъединиц NMDA-рецепторов могут свидетельствовать о различной роли популяций данных рецепторов в ходе онтогенеза.

AMPA-рецепторы широко представлены в мозге, хотя для них также характерны региональные различия в распределении типов рецепторов с разным субъединичным составом [92]. В гиппокампе мозга взрослых крыс преобладают AMPA-рецепторы состава GluA1/GluA2 и GluA2/GluA3 с небольшой фракцией гомомерных GluA1 рецепторов. В стриатуме, области мозга, которая играет основную роль в двигательных расстройствах, интернейроны, содержащие парвальбумин, экспрессируют AMPA-рецепторы с субъединичным составом GluA1, GluA2/GluA3 и GluA2/GluA3/GluA4 [13].

Профили экспрессии генов субъединиц AMPA-рецепторов также заметно изменяются во время развития. В частности, на ранних этапах развития мозга крыс многие синапсы содержат кальций-проницаемые AMPA-рецепторы, лишённые GluA2 субъединицы, которые сменяются кальций-непроницаемыми GluA2-содержащими AMPA-рецепторами после P14 [11]. Присутствие Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов сразу после рождения важно для обеспечения нормального функционирования синапсов. Кроме того, существует другой сдвиг в

составе AMPA-рецепторов на P21, при котором уровень GluA3 увеличивается, а уровень GluA1 снижается. Поскольку AMPA-рецепторы, которые содержат GluA3, медленнее инактивируются и десенсibiliзируются по сравнению с GluA1-содержащими AMPA-рецепторами, это, вероятно, объясняет увеличение продолжительности ответов AMPA-рецепторов, постсинаптическую возбудимость и снижение порога возникновения ЛТР в гиппокампе крыс [115].

Такая вариативность субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов, а также их гетерогенное распределение в мозге обуславливают важную роль данных рецепторов в процессах нейропластичности.

В данном исследовании были использованы крысы в возрасте 20–22 дней и старше, следовательно, согласно литературным данным основные перестройки субъединичного состава, характерные для созревания NMDA- и AMPA-рецепторов, уже завершены.

1.4.5 Строение метаболитных рецепторов глутамата

mGluRs являются членами семейства C суперсемейства рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR) [21]. Структурно они отличаются от других GPCR наличием большого внеклеточного LBD, который связан с 7-спиральным TMD через цистеин-богатый домен (CRD) (Рис. 1.8) [116]. LBD также называют доменом Venus FlyTrap (VFT), он похож на периплазматический бактериальный лейцин/изолейцин/валин-связывающий белок. Домен VFT состоит из двух долей, каждая из которых состоит из α -спиралей вокруг большого β -листа, а сайт связывания глутамата расположен в расщелине между двумя долями [23].

mGluRs существуют в виде конститутивных димеров. Димеризация полноразмерных mGluRs необходима для активации G-белков [117]. Подтипы одной группы mGluRs могут образовывать внутригрупповые гетеродимеры (например, mGluR1 с mGluR5 и mGluR2 с mGluR3) и mGluRs второй и третьей групп могут образовывать межгрупповые гетеродимеры (например, mGluR2 с mGluR4). Между mGluRs I и II/III групп (например, mGluR1 и mGluR2 или mGluR4) гетеродимеры не образуются, что говорит о том, что только подтипы mGluR, соединенные с одним и тем же вариантом G-белка, могут образовывать гетеродимеры [23].

mGluRs подразделяются на три группы на основе фармакологической селективности, гомологии последовательности, а также механизма трансдукции сигнала. Группа I включает mGluR1 и mGluR5, группа II включает mGluR2 и mGluR3, а группа III включает mGluR4, mGluR6, mGluR7 и mGluR8. Каждый рецептор кодируется отдельным геном. Несколько подтипов mGluRs подвергаются альтернативному сплайсингу; во многих случаях это приводит к

образованию различных С-концевых доменов [21]. Гены крыс, кодирующие mGluRs, обозначаются как *Grm1-8*.

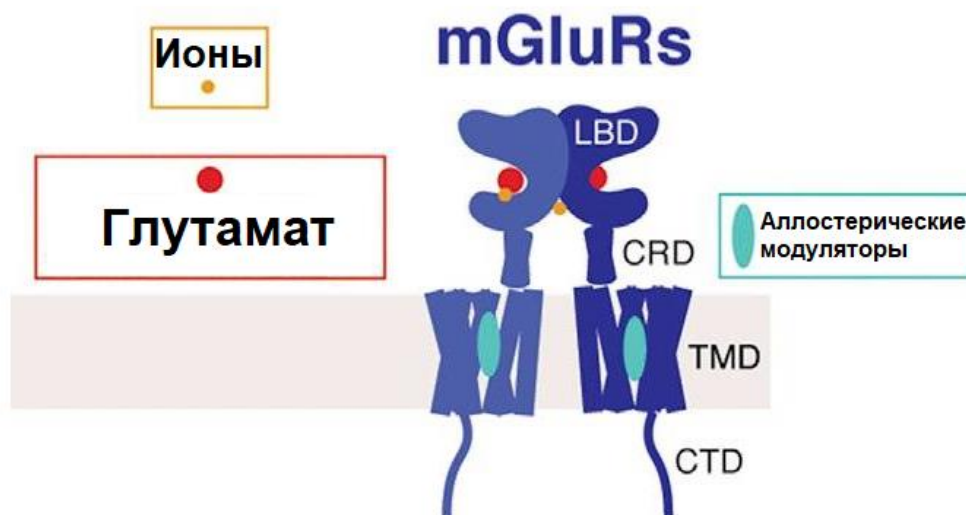


Рисунок 1.8. Схематическое изображение строения mGluRs. LBD – лиганд-связывающий домен; CRD – цистеин-богатый домен; TMD – трансмембранный домен; CTD – С-концевой домен [116].

Множество белков взаимодействуют непосредственно с С-концевыми доменами каждого из подтипов mGluRs и играют важную роль в регуляции сигналинга [21, 116]. Наиболее хорошо изученными являются белки Homer, взаимодействующие с mGluR1a, mGluR5a и mGluR5b и регулирующие их локализацию [118]. Белки Homer также участвуют в сборке белковых комплексов на С-концевых доменах mGluRs, которые являются критически важными для активности рецепторов. Например, длинная изоформа белка PIKE-L связывается с mGluR5 через взаимодействие с Homer, что позволяет агонисту mGluR5 предотвращать апоптоз при наличии определенных изоформ Homer [119]. Кроме того, появились доказательства прямого взаимодействия между iGluRs и mGluRs. На основе билюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) и функциональных измерений в клетках НЕК было сообщено о динамическом взаимодействии между CTDs mGluR5 и GluN1/2b рецепторов, которое приводит к реципрокному торможению [120], а последующее исследование показало перенос энергии между гетерологично экспрессированными mGluR5 и NMDARs в дендритных отростках нейронов гиппокампа [121].

1.4.6 Функционирование метаботропных рецепторов глутамата

Для активации mGluRs достаточно одного агониста на димер (т.е. одного VFT, стабилизированного в закрытом состоянии), хотя присутствие двух молекул агониста (т.е. обоих VFT, стабилизированных в закрытом состоянии) приводит к 3-кратному повышению

эффективности связывания (Рис 1.9) [122]. После взаимодействия с агонистом mGluRs, как и другие GPCRs, активируют внутриклеточные гетеротримерные G-белки путем обмена ГДФ, связанного с α -субъединицей G-белка, на ГТФ. Связывание с ГТФ позволяет α -субъединице диссоциировать от $\beta\gamma$ -димера, в результате чего обе части G-белка могут регулировать активность целевых ферментов или каналов, ответственных за клеточный ответ [123].

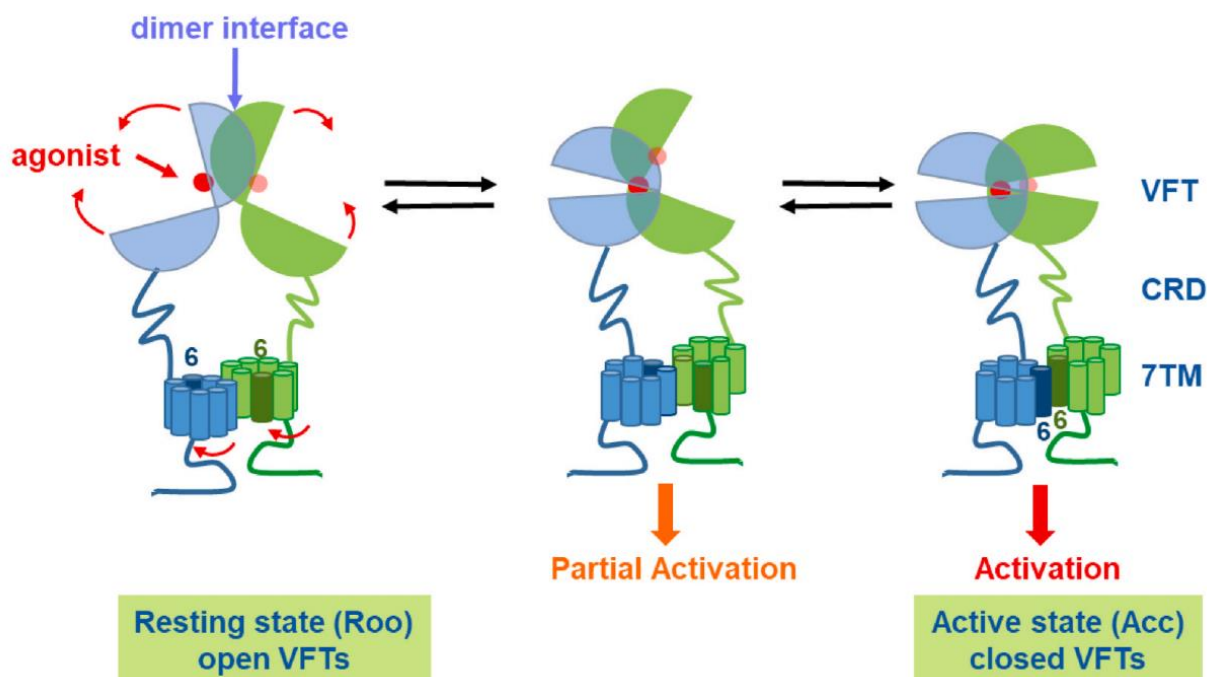


Рисунок 1.9. Схематическое изображение димера mGluR в различных состояниях. Димеры mGluR содержат два больших внеклеточных домена (VFTs), которые связывают глутамат и другие ортостерические лиганды. Цистеин-богатый домен связывает VFTs с трансмембранным доменом (7TM). Открытое состояние (слева) является неактивным состоянием и может быть стабилизировано антагонистами. Затем один или два VFT могут связывать глутамат, что приводит к активной конформации рецептора [124].

Множество фармакологических агентов способно активировать и ингибировать mGluRs (Таблица 1.1). Помимо глутамата mGluRs I группы могут активироваться 3,5-дигидроксифенилглицином (DHPG) и квисквалатом. Хотя квисквалат не так селективен, как DHPG, поскольку он также активирует AMPA-рецепторы, но mGluR1 и mGluR5 он активирует намного сильнее [124].

Таблица 1.1. Фармакологические агенты, действующие на mGluRs [124, 125]

Группа	Рецептор	Групповые/подтип-селективные фармакологические агенты
I	mGluR1	Агонисты: DHPG, 1S,3R-ACPD, квисквалат Антагонисты: LY393675

		Аллостерический антагонист: LY367385
	mGluR5	Агонисты: DHPG, 1S,3R-ACPD, квисквалат, CHPG Аллостерический антагонист: MPEP
II	mGluR2	Агонисты: DCG-IV, 2R,4R-APDC, 1S,3R-ACPD, LY354740, LY379268, LY2812223 Антагонисты: LY341495 Потенциаторы: 4-MPPTS (LY487379), 4-APPES, CBiPES
	mGluR3	Агонисты: DCG-IV, 2R,4R-APDC, 1S,3R-ACPD, LY354740, LY379268, LY2794193 Антагонисты: LY341495
III	mGluR4	Агонисты: L-SOP, ACPT-1, L-AP4, LSP4-2022 Антагонисты: MSOP, MAP4, CPPG
	mGluR6	Агонисты: L-SOP, ACPT-1, L-AP4 Антагонисты: MSOP, MAP4
	mGluR7	Агонисты: L-SOP, ACPT-1, L-AP4 Антагонисты: MSOP, MAP4, LY341495 (в 100 раз меньшее сродство, чем с группой II) Аллостерический антагонист: XAP044
	mGluR8	Агонисты: L-SOP, L-AP4, ACPT-1, 3,4-DCPG Антагонисты: MSOP, MAP4

1S,3R-ACPD был первым агонистом mGluRs, который был способен различать iGluRs и mGluRs. Он умеренно потенцирует рецепторы I и II групп [126]. Большинство агонистов mGluRs II группы активируют оба подтипа рецепторов, однако для mGluR2 был обнаружен селективный агонист LY2812223, а для mGluR3 – LY2794193 [124].

L-AP4 активирует все рецепторы III группы. mGluR7 активируется миллимолярной концентрацией глутамата и или L-AP4 в концентрации несколько десятых миллимоля. Было показано, что эта слабая активность является следствием более длинной петли $\beta_{10-\alpha 7}$, которая препятствует закрытию VFT [127]. ACPT-1 также активируют все типы mGluRs III группы [124]. LSP4-2022 селективен только для mGluR4 [128], а 3,4-DCPG – для mGluR8 [125].

Конкурентные антагонисты были изучены в меньшей степени, чем агонисты. Для всех известных конкурентных антагонистов ингибирование происходит за счет предотвращения закрытия VFT и стабилизации открытой конформации в состоянии покоя [129]. Это производные

агонистов mGluRs, сохраняющие свое взаимодействие с одним VFT, но имеющие дополнительный заместитель, который взаимодействует с остатками второго VFT. Многие из этих ортостерических антагонистов являются производными глутамата, у которых α -протон в α -аминокислотном мотиве заменен метильной группой или «громоздким» заместителем [124].

Аллостерические модуляторы также были описаны для некоторых подтипов mGluRs. ХАР044 – небольшая молекула, блокирующая активацию mGluR7 путем неконкурентного взаимодействия с VFT доменом [130].

1.5 Функции ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата

Обработка и хранение информации в мозге включает в себя изменение активности синаптической передачи между двумя нейронами, которое может сохраняться в течение длительных периодов времени. Это явление, известное как синаптическая пластичность, является одной из основ обучения и памяти [131]. К основным процессам синаптической пластичности относят долговременную потенциацию (LTP) и долговременную депрессию (LTD). LTP можно индуцировать кратковременной высокочастотной стимуляцией (например, 100 Гц), при этом глутаматергический синапс активируется и может после этого более эффективно передавать импульсы в течение длительного времени. Длительная низкочастотная стимуляция (1 Гц) глутаматергического синапса может привести к тому, что он будет менее эффективно передавать импульсы – произойдет индукция LTD. LTP опосредует различные типы ассоциативного обучения, пространственного обучения и адаптивное изменение поведения млекопитающих [132].

В большинстве синапсов индукция LTP и LTD связана с работой глутаматных NMDA- и AMPA-рецепторов [12]. Сигналинг mGluRs направлен на контроль возбудимости нейронов путем модуляции работы ионных каналов [116]. Схематически глутаматергический синапс изображен на рис. 1.10.

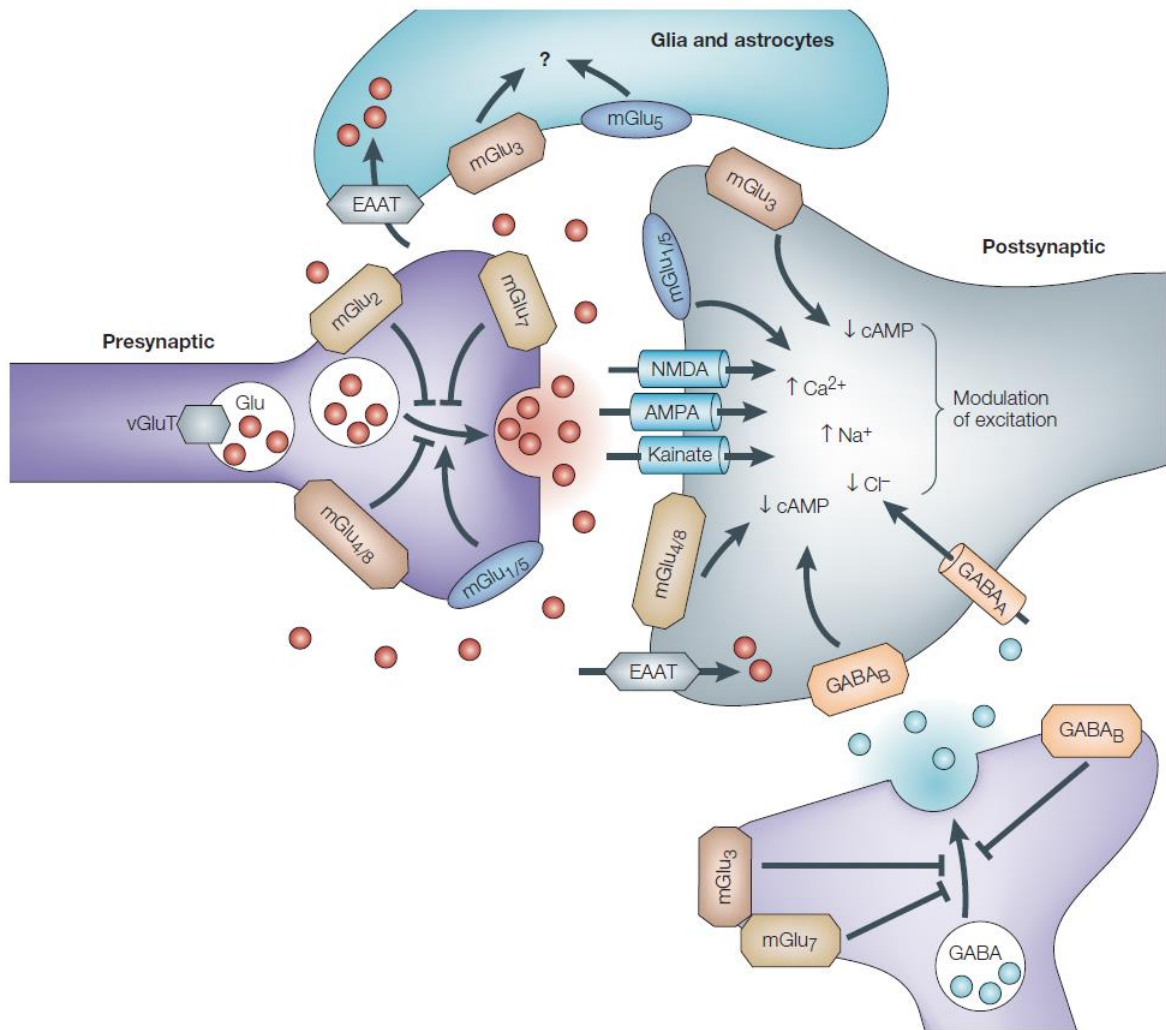


Рисунок 1.10. Схематическое изображение синапса, иллюстрирующее общую синаптическую локализацию и функцию глутаматергических рецепторов и транспортеров. Ионотропные глутаматные рецепторы (NMDA-, AMPA- и каинатные рецепторы) в основном выполняют функцию быстрой рецепторной передачи, а также опосредуют зависимые изменения, необходимые для пластичности нейронов. Везикулярные транспортеры (vGluT1 и vGluT2) загружают глутамат в везикулы в пресинапсе. Считается, что астроцитарные и постсинаптические транспортеры глутамата (транспортеры возбуждающих аминокислот, EAAT1-5) осуществляют поглощение глутамата из синаптической щели, что способствует прекращению синаптической передачи. mGluRs имеют разнообразную синаптическую локализацию и функционируют пре- и постсинаптически, модулируя высвобождение нейротрансмиттера и постсинаптическую возбудимость, соответственно. Например, агонисты II группы mGluRs (mGluR2/3), вероятно, стимулируют ауторецепторы mGlu на глутаматергических терминалях для подавления возбуждающей нейротрансмиссии в отдельных синапсах в центральной нервной системе. Антагонисты рецепторов mGlu5, напротив, могут ингибировать mGluR5-опосредованное потенцирование ионных токов NMDA-

рецепторов и потенциально нарушать формирование процессов памяти, связанных со стрессовыми событиями [125].

1.5.1 Функции NMDA- и AMPA-рецепторов

Индукция LTP начинается с активации AMPA-рецепторов, расположенных на постсинаптической мембране. После связывания с глутаматом канал AMPA-рецептора открывается, и происходит локальное изменение мембранного потенциала – деполяризация. Блок канала NMDA-рецептора ионом Mg^{2+} снимается, следом за AMPA-рецепторами открываются NMDA-рецепторы. Ионы кальция, которые попадают в постсинаптический нейрон через NMDA-рецептор, связываются с кальмодулином. Кальмодулин со связанным Ca^{2+} активирует различные ферменты, в первую очередь Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую киназу II (CaMKII). CaMKII является одним из самых распространенных белков в постсинаптической плотности. Активированная CaMKII может фосфорилировать множество других белков, а также автофосфорилироваться, что способствует поддержанию ее активности даже при возвращении концентрации ионов кальция к базовым значениям. В частности, CaMKII фосфорилирует субъединицу GluA1 AMPA-рецептора по остатку серина 831. Фосфорилирование GluA1 с помощью CaMKII повышает проводимость AMPA-рецептора, что является одним из механизмов, способствующих потенцированию глутаматергических синапсов. Кроме того, цАМФ-зависимая PKA фосфорилирует остаток серина 845 субъединицы GluA1 для стимуляции встраивания дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану [13, 132–135]. Схема индукции LTP изображена на рис. 1.11.

NMDA-рецепторы, по-видимому, присутствуют в большинстве или во всех глутаматергических синапсах, тогда как содержание AMPA-рецепторов варьируется – от 0 до 50 рецепторов на постсинаптической плотности [136]. Синапсы, которые не содержат AMPA-рецепторов, являются «молчащими» и не отвечают на выброс глутамата.

LTD глутаматергических синапсов, которая опосредуется активацией NMDA-рецепторов, включает Ca^{2+} -зависимую активацию фосфатазы кальцинейрина, которая вызывает дефосфорилирование GluA1 по остатку серина 845 [137]. Результатом этого дефосфорилирования является интернализация AMPA-рецепторов в цитоплазму клатрин-опосредованным эндоцитозом [13].

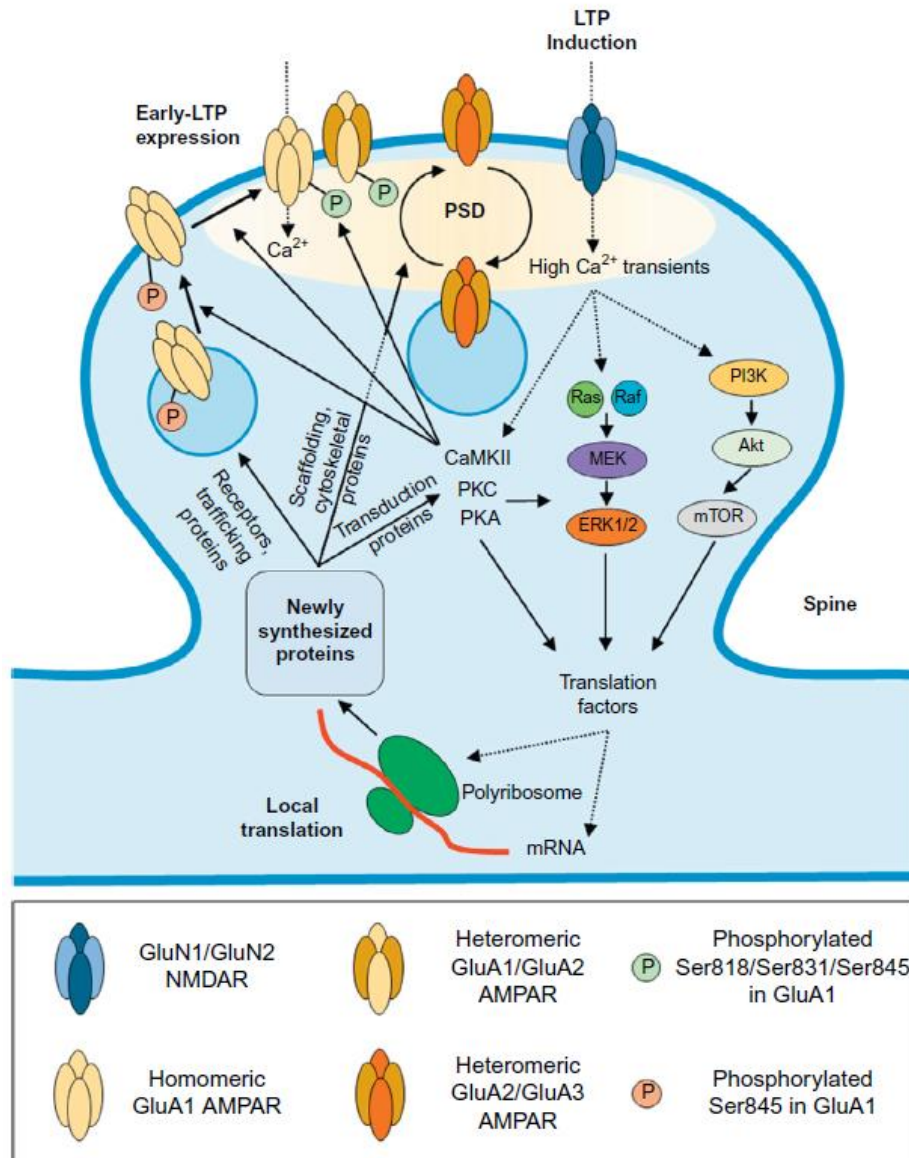


Рисунок 1.11. Пути индукции LTP. Активация NMDA-рецепторов приводит к притоку Ca^{2+} , который, в свою очередь, активирует множество протеинкиназ в дендритных шипиках. Эти киназы фосфорилируют AMPA-рецепторы в синапсе для изменения их свойств, или AMPA-рецепторы во внутриклеточном пуле, чтобы вызвать встраивание дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану. Кроме того, протеинкиназы активируют факторы трансляции, которые необходимы для стабилизации локальных мРНК и для инициации локальной трансляции мРНК. Локальный синтез белка обеспечивает механизм прямой связи для постоянного увеличения числа рецепторов, транспорта рецепторов, уровней белков скэффолдов и белков цитоскелета, а также латеральной диффузии и стабилизации AMPA-рецепторов [13].

Роль отдельных субъединиц NMDA-рецепторов в индукции LTP и LTD неоднозначна. Преобладание NMDA-рецепторов с определенным субъединичным составом может определять знак синаптической пластичности (LTP или LTD) [138]. Генетические и фармакологические

данные указывают на участие субъединиц GluN2a в индукции LTP и GluN2b в генерации LTD [10, 139, 140]. Нокаут GluN2a субъединицы у мышей вызывал снижение LTP в синапсах полей CA3–CA1 гиппокампа [140], тогда как нокаут GluN2b субъединицы приводил к тому, что LTD не генерировалась [141]. Применение селективных антагонистов GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов (ифенпродил и Ro25-6981) блокировало LTD, в то же время селективный блокатор GluN2a-содержащих NMDA-рецепторов (NVP-ААМ077) ингибировал LTP [139]. Однако другие исследования показали, что субъединицы GluN2a и GluN2b участвуют в формировании и LTP, и LTD [142, 143]. Было высказано предположение, что соотношение продукции субъединиц GluN2a и GluN2b является более значимым, чем любая из этих субъединиц в отдельности, при определении знака синаптической пластичности [144].

Среди субъединиц AMPA-рецепторов важную роль в индукции LTP играет GluA1 субъединица [134]. Цитозольный домен именно этой субъединицы подвергается фосфорилированию CaMKII и другими протеинкиназами. Кроме того, в эксперименте с нокаутом гена GluA1 у мышей, в поле CA1 гиппокампа LTP не формировалась, а введение GFP-меченых GluA1-содержащих рецепторов способствовало восстановлению LTP [13].

Таким образом, изменение субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов, связанное с различными патологическими состояниями, в частности, с эпилепсией или SE, оказывает влияние на процессы синаптической пластичности.

1.5.2 Функции метаботропных рецепторов глутамата

В таблице 1.2 кратко приведены ключевые характеристики всех mGluRs. За исключением mGluR6, который экспрессируется в основном в биполярных клетках сетчатки, mGluRs широко представлены во всей нервной системе, с различными, но сильно пересекающимися паттернами для каждого подтипа [145].

Таблица 1.2. Основные характеристики mGluRs [21]

Группа	Рецептор	Экспрессия в ЦНС	Синаптическая локализация	Сигнальные пути
I	mGluR1	В нейронах	Преимущественно постсинаптически	Стимуляция PLC и аденилатциклазы
	mGluR5	В нейронах и астроцитах		
II	mGluR2	В нейронах	Пресинаптически, постсинаптически	Ингибирование аденилатциклазы и Ca ²⁺
	mGluR3	В нейронах и астроцитах		

				каналов Стимуляция K ⁺ каналов
III	mGluR4	В нейронах	Преимущественно пресинаптически	Ингибирование аденилатциклазы и Ca ²⁺ каналов
	mGluR7	В нейронах	Пресинаптически	
	mGluR8	В нейронах, но более ограничено, чем mGluR4/7	Преимущественно пресинаптически	Стимуляция K ⁺ каналов
	mGluR6	Сетчатка	Постсинаптически	Стимуляция цГМФ фосфодиэстеразы

Представители I группы mGluRs (mGluR1 и mGluR5) сопряжены с G_{q/11}-белками. mGluR1 активируют фосфолипазу C (PLC) и генерируют кальциевые сигналы внутри клеток. PLC расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат с последующим образованием внутриклеточных вторичных мессенджеров, инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG). IP3 высвобождает Ca²⁺ из внутриклеточных депо, а DAG активирует протеинкиназу C. Также сообщалось, что активация mGluR1 может стимулировать образование цАМФ и высвобождение арахидоновой кислоты [146]. mGluR1 также негативно модулирует различные K⁺ каналы. Активация mGluR5 стимулирует гидролиз полифосфоинозотида (PI).

Кроме того, большое количество данных свидетельствует о том, что mGluR5 повышают активность NMDA-рецепторов [23] и таким образом способствуют увеличению амплитуды LTP в зоне CA1 гиппокампа [116]. В формировании LTD, опосредованной mGluRs, также участвуют mGluRs I группы. Было установлено, что mGluR-опосредованная LTD является G_q-зависимой и вовлекает ряд киназных сигнальных путей. В отличие от совместной природы сигнализации mGluRs I группы и NMDARs в LTP, считается, что NMDAR-опосредованная LTD и mGluR-опосредованная LTD механистически различны. mGluR-LTD и NMDAR-LTD не перекрывают друг друга и вовлекают разные сигнальные каскады, для которых требуются кальциевые каналы T-типа и активность РКС или фосфатазы, соответственно. Примечательно, что различная роль mGluRs в индукции LTP и LTD предполагает, что активация mGluR5, по крайней мере в нейронах CA1, зависит от конкретной ситуации. Если NMDARs коактивированы, то может быть вызвана LTP, а если NMDARs не коактивированы, то может быть вызвана LTD, не зависящая от NMDARs. Это приводит к гипотезе, что в зависимости от степени активации NMDAR, mGluR5

может запускать активировать различные эффекторные пути, которые задействуют либо LTP-, либо LTD-связанные механизмы [116]. Привлечение кальцинеина и PKA требуется для регуляции GluA1 во время NMDAR-опосредованной LTD, но не mGluR-опосредованной LTD [147], тогда как ингибирование тирозинных фосфатаз выявило роль дефосфорилирования тирозина на GluA2 в mGluR-LTD, но не NMDAR-LTD [148]. В обеих формах LTD общим является снижение поверхностной экспрессии AMPARs [116].

Рецепторы II группы mGluRs (mGluR2 и mGluR3) сопряжены с $G_{i/o}$ -белками. mGluR2 и mGluR3 диффузно экспрессируются в ЦНС. mGluR2 локализованы в нейронах и особенно в претерминальной области аксонов, вдали от активной зоны высвобождения нейромедиатора [149], тогда как mGluR3 обнаруживаются как в пресинаптических, так и в постсинаптических участках, а также в глиальных клетках [145]. mGluR2/3 оказывают тормозное действие через подавление образования цАМФ, снижения активности потенциал-чувствительных Ca^{2+} каналов, а также активации K^+ каналов. Агонисты mGluR2/3 сами по себе не стимулируют гидролиз PI, но усиливают стимуляцию гидролиза PI, опосредованную рецепторами mGluR1/5 в срезах мозга [23]. Было также показано, что mGluRs II группы взаимодействуют с кальмодулином, протеинфосфатазой 2C и белком, связывающим Rap в микротрубочково-организующем центре [21]. Активация mGluR2/3 может запускать пути митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) и фосфоинозитид-3-киназы (PtdIns-3-K) [23]. mGluRs II группы опосредуют пресинаптические NMDAR-независимые LTD [116]. По сравнению с постсинаптическим LTD, о нижележащих сигнальных механизмах известно меньше, но снижение цАМФ/PKA-сигнализации вызывает стойкие изменения в вероятности высвобождения нейромедиатора [150].

Представители III группы mGluRs (mGluR4, mGluR7 и mGluR8) сопряжены с $G_{i/o}$ -белками. mGluR4, mGluR7 и mGluR8 локализованы пресинаптически в активной зоне высвобождения нейромедиатора. Поэтому синаптический глутамат может активировать все три подтипа рецепторов, тем самым негативно регулируя собственное высвобождение [21]. Однако глутамат связывается с относительно высоким сродством с mGluR4 и mGluR8, но проявляет очень низкое сродство к mGluR7. Это позволяет предположить, что mGluR7 могут быть рекрутированы только высокими концентрациями глутамата, высвобождаемого в условиях высокой синаптической активности [23]. Также была зарегистрирована активация путей МАРК и PtdIns-3-K, опосредованная mGluR4 [151]. mGluR6 локализован исключительно в дендритах ON-биполярных клеток сетчатки и отвечает на глутамат, высвобождаемый из палочковых и колбочковых фоторецепторных клеток в темноте [152].

1.6 Роль ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в формировании судорог и развитии эпилепсии

Эпилептические синдромы имеют очень разнообразные первичные причины, которые могут быть генетическими или приобретенными. Во время эпилептического припадка популяции нейронов в отдельных областях ЦНС прекращают свою нормальную деятельность и активируются при периодических синхронных разрядах. Эта патологическая синхронизированная активность передается от одного нейрона к другому, главным образом, через возбуждающую глутаматергическую передачу [92].

Эпилептогенез, а также формирование SE, могут быть связаны с усилением глутаматергической нейротрансмиссии [153]. Глутамат индуцирует повышение цитоплазматического уровня ионов Ca^{2+} , что увеличивает высвобождение глутамата нейронами и астроцитами. Внутриклеточное накопление Ca^{2+} также запускает молекулярные каскады с участием нескольких внутриклеточных систем мессенджеров, которые в конечном итоге вызывают гибель нейрона. Избыточная активация Ca^{2+} -проницаемых ионотропных рецепторов глутамата инициирует повреждение клеток и гибель нейронов [16, 116, 154].

Известно, что AMPA-рецепторы, не содержащие отредактированную изоформу GluA2 субъединицы, проницаемы для ионов кальция. Была высказана гипотеза, что Ca^{2+} -проницаемые AMPA-рецепторы отвечают за гибель клеток при судорожном приступе у экспериментальных животных, поскольку было обнаружено, что судороги, индуцированные каином, у взрослых крыс вызывали подавление продукции мРНК GluA2 субъединицы [155]. Регионально-специфические изменения фосфорилирования субъединицы GluA1 были также обнаружены у крыс в пилокарпиновой модели эпилепсии. В частности, пилокарпиновые судороги вызывали изменения фосфорилирования остатков серина 845 и серина 831 GluA1 субъединицы, а, как известно, дефосфорилирование данной субъединицы является ключевым сигналом для интернализации AMPA-рецепторов в цитоплазму [156]. С использованием электрофизиологических методов выявлено наличие Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов, не содержащих GluA2 субъединицу, в пирамидных нейронах животных после судорог [157]. Наличие Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов также было подтверждено на эпилептогенных человеческих гипоталамических гамартомах. У этих пациентов с опухолями развились характерные рефрактерные приступы, и электрофизиологическое исследование образцов опухолевой ткани при игольчатой биопсии подтвердило наличие Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов. Более того, анализ РНК ткани доказал, что патологические ткани не содержат аденозин-деаминазы, которая необходима для Q/R-редактирования мРНК GluA2 субъединицы [158].

Нарушение функционирования NMDA-рецепторов также характерно для эпилепсии [99]. Было показано, что мутации гена *GRIN2A* не редки у пациентов с эпилепсией [159, 160], и что мутации вызывают значительные функциональные изменения активности NMDA-рецепторов [159]. Обнаружено, что пилокарпин-индуцированные судороги вызывают значительное увеличение плотности NMDA-рецепторов в гранулярных клетках зубчатой извилины и пирамидных нейронах поля CA3 гиппокампа. Фармакологические эксперименты показали, что GluN2b субъединица была ответственна за увеличение возбуждающей активности у этих животных [18]. Увеличение отношения GluN2b/GluN2a было обнаружено в образцах мозга пациентов с эпилепсией [17]. Гипоксические судороги у молодых крыс значительно повышали экспрессию субъединицы GluN3 в гиппокампе через 2–4 дня после судорог [19]. Помимо изменения субъединичного состава фосфорилирование субъединицы GluN2 было повышено при эпилепсии животных [161].

Изменение субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов при судорожных состояниях может повлечь за собой нарушение формирования LTP и LTD, что в свою очередь может приводить к изменению синаптической пластичности и развитию постсудорожных нервно-психических расстройств [162]. При использовании модели хронической эпилепсии было обнаружено усиление LTP в гиппокампе, при чем данный эффект нивелировался при введении блокатора GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов (Ro 25-6981). В то же время введение антагониста GluN2a-содержащих NMDA-рецепторов (NVP-ААМ077) не оказывало влияния на формирование LTP [163]. В фармакологическом исследовании введение неконкурентного блокатора NMDA-рецепторов мемантина после судорог в литий-пилокарпиновой модели устраняло развитие нарушений памяти [164].

mGluRs вовлечены в модуляцию синаптической трансмиссии и также могут участвовать в поддержании судорожных состояний. Известно, что длительное нарушение экспрессии генов mGluRs может привести к нарушению синаптической пластичности, повышению концентрации глутамата и чрезмерному возбуждению при эпилепсии [9]. Продукция mGluRs I группы повышена в гиппокампе как у пациентов с эпилепсией, так и у крыс после судорог, вызванных электрической стимуляцией [25–27]. В исследовании Aronica с соавторами также обнаружено повышение экспрессии mGluR3 в астроцитах крыс в модели височной эпилепсии [26]. Было показано значительное снижение экспрессии mGluR2 и mGluR3 и функции обоих подтипов в зубчатой извилине гиппокампа и коре головного мозга в пилокарпиновой модели хронической эпилепсии через 24 часа после индукции припадков [28]. Данные об экспрессии mGluRs III группы в мозге крыс после судорог практически отсутствуют.

Фармакологическая блокада mGluR1 или mGluR5 оказывает защитный эффект в некоторых моделях судорог, однако не предотвращает развитие эпилепсии [9]. Модуляция mGluRs II и III групп изучена мало, но в единичных работах установлено, что агонисты mGluR7 имеют терапевтический потенциал для лечения эпилепсии [165, 166].

Таким образом, анализ литературных данных показал, что как iGluRs, так и mGluRs могут участвовать в формировании судорог и вносить вклад в эпилептогенез. Изменения экспрессии генов iGluRs и mGluRs и их роль в эпилептогенезе до сих пор остаются малоизученными, что ограничивает применение лигандов данных рецепторов в клинической практике. Наша работа посвящена анализу изменений экспрессии генов iGluRs и mGluRs после острых ПТЗ-индуцированных судорог и на разных стадиях эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии, что позволит расширить представление о роли данных рецепторов в эпилептизации мозга.

2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Работа выполнена на 192 самцах крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar в соответствии с Правилами Комитета по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН и Директивой ЕС 2010/63/EU по проведению экспериментов на животных. Животные содержались в стандартных условиях с неограниченным доступом к воде и корму, при естественной длине светового дня. Крысы были распределены по группам случайным образом. Животные из одного помета были помещены в разные группы, чтобы избежать влияния генетических факторов.

2.2 Экспериментальная процедура и использованные препараты

Настоящая работа включала в себя эксперименты на двух экспериментальных моделях.

Для моделирования **острого судорожного приступа** была выбрана пентилентетразоловая модель (Рис. 2.1). Пентилентетразол (ПТЗ) используется в качестве конвульсанта уже многие годы и разработаны различные методики индукции судорог с его помощью [167, 168]. В данной работе судороги были индуцированы согласно протоколу, использованному ранее в ИЭФБ РАН [169]. Экспериментальным животным в возрасте 20-22 дней внутрибрюшинно (в/б) вводили ПТЗ (70 мг/кг; Sigma, США). В дальнейшем в анализ включали только крыс, у которых генерализованные тонико-клонические судороги продолжались не менее 45 минут. Крысам контрольной группы вводили физиологический раствор.

Для моделирования **хронического эпилептогенеза** была выбрана литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии [30] (Рис. 2.2). За день до введения пилокарпина 7-8 недельным крысам вводили раствор хлорида лития (127 мг/кг, в/б; Sigma, США) для повышения чувствительности к конвульсанту. Затем, за час до введения пилокарпина, вводили метилскополамин (1 мг/кг, в/б; Sigma, США) для предотвращения избыточной активации периферических мускариновых рецепторов. Пилокарпин (20-40 мг/кг; в/б; Sigma, США) вводили 2-4 инъекциями (по 10 мг/кг с интервалом в 30 минут) с учетом индивидуальной чувствительности к конвульсанту до достижения судорог 4 стадии по шкале Расина [170]. Через 75 мин после достижения 4 стадии, судороги купировали диазепамом (10 мг/кг, в/б; Sigma, США). В течение первой недели после судорог крысам ежедневно вводили 5% раствор глюкозы (2 мл, подкожно). Животных кормили влажным кормом для повышения выживаемости.

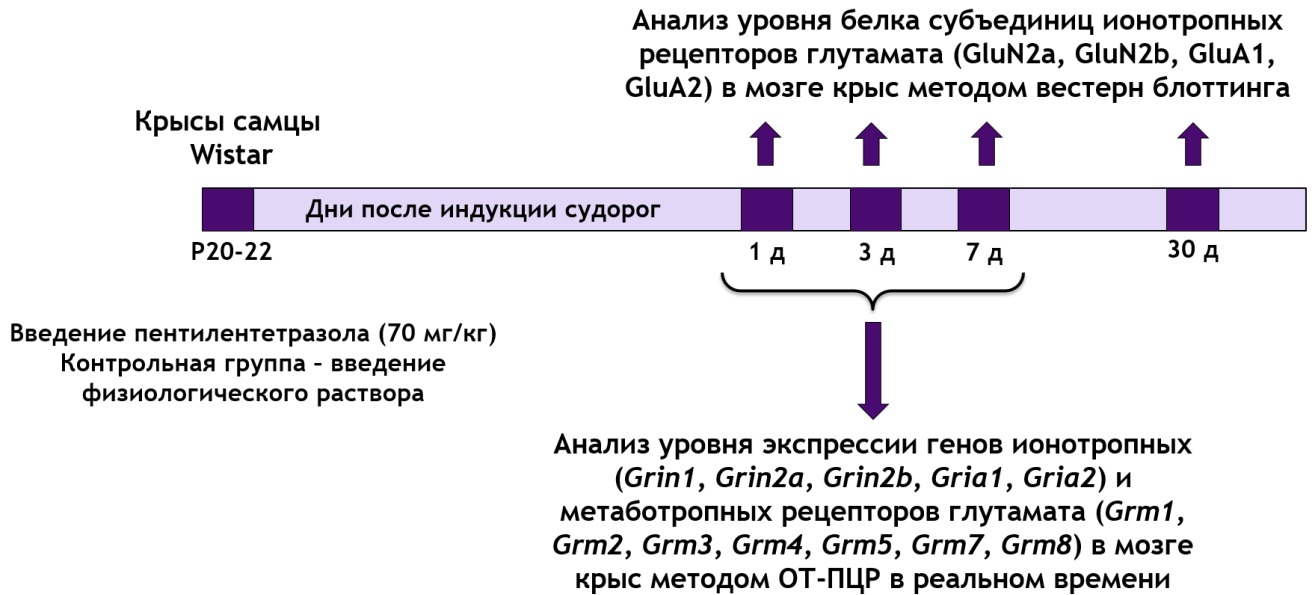


Рисунок 2.1. Схема эксперимента: пентилентетразоловая модель острых судорог.

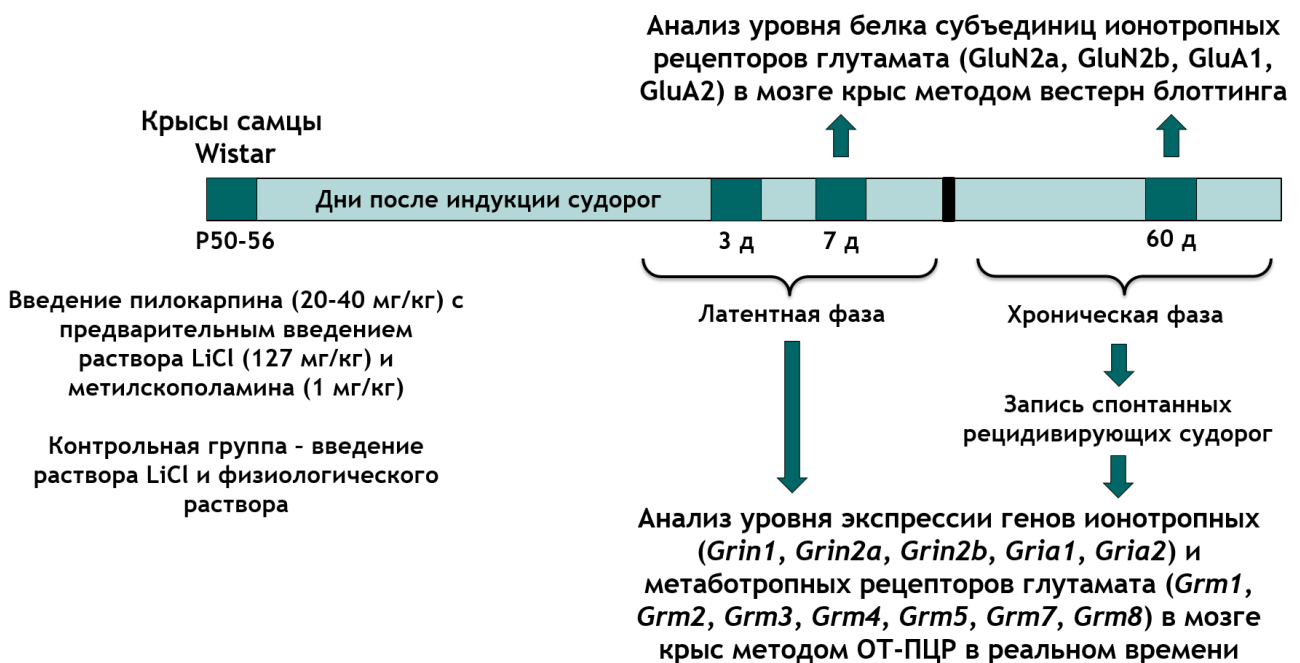


Рисунок 2.2. Схема эксперимента: литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии.

2.3 Регистрация спонтанных рецидивирующих судорог

Через два месяца после индукции судорог в литий-пилокарпиновой модели была сделана видеозапись свободного поведения крыс, чтобы оценить наличие спонтанных рецидивирующих судорог. Для этого каждую крысу помещали в прозрачную клетку (30 см × 30 см) с водой и пищей в течение 3 дней подряд и проводили видеосъемку каждый день в течение 12-16 ч (в общей

сложности 40 ч). В экспериментальную группу для анализа экспрессии генов рецепторов глутамата были включены только крысы, у которых был хотя бы один эпизод судорог ($n = 10$).

2.4 Определение уровня экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата

Относительную экспрессию генов отдельных субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также метаботропных рецепторов глутамата определяли с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) [171]. Для изучения динамики изменений экспрессии изучаемых генов крыс декапитировали через 1, 3 и 7 дней после введения ПТЗ, а также через 3, 7 и 60 дней после пилокарпин-индуцированных судорог. Головной мозг немедленно извлекали и замораживали при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранили до проведения биохимических исследований.

2.4.1 Выделение тотальной РНК

Выделение отдельных структур мозга (дорзальная и вентральная области гиппокампа, височная кора) осуществляли с помощью замораживающего микротомы OTF5000 (Bright Instrument, Великобритания) согласно атласу мозга [172] (Рис. 2.3). Экстракцию тотальной РНК производили с использованием ExtractRNA (Евроген, Россия). Данный метод является модификацией одношагового метода кислой гуанидинизотиоционат-фенол-хлороформной экстракции РНК из биологических образцов [173]. Гомогенизацию ткани мозга проводили в растворе ExtractRNA (с учетом пропорции 1 мл раствора на 50–100 мг образца), затем гомогенат центрифугировали 10 мин при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $14\ 000\text{ g}$, супернатант был перенесен в новый эппендорф. Для экстракции РНК добавили хлороформ (0,2 мл на 1 мл раствора ExtractRNA), инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 30 минут при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $14\ 000\text{ g}$, отбирали верхнюю фазу, содержащую РНК, и переносили ее в новый эппендорф. Затем в эппендорф добавляли изопропанол (0,5 мл на 1 мл раствора ExtractRNA), оставляли для преципитации при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение ночи, затем центрифугировали 30 минут при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $14\ 000\text{ g}$ и удаляли супернатант. Полученный осадок заливали 75 % этиловым спиртом и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Все работы проводились при комнатной температуре с использованием автоклавированных эппендорфов и наконечников для дозаторов.

Границы выделения структур мозга

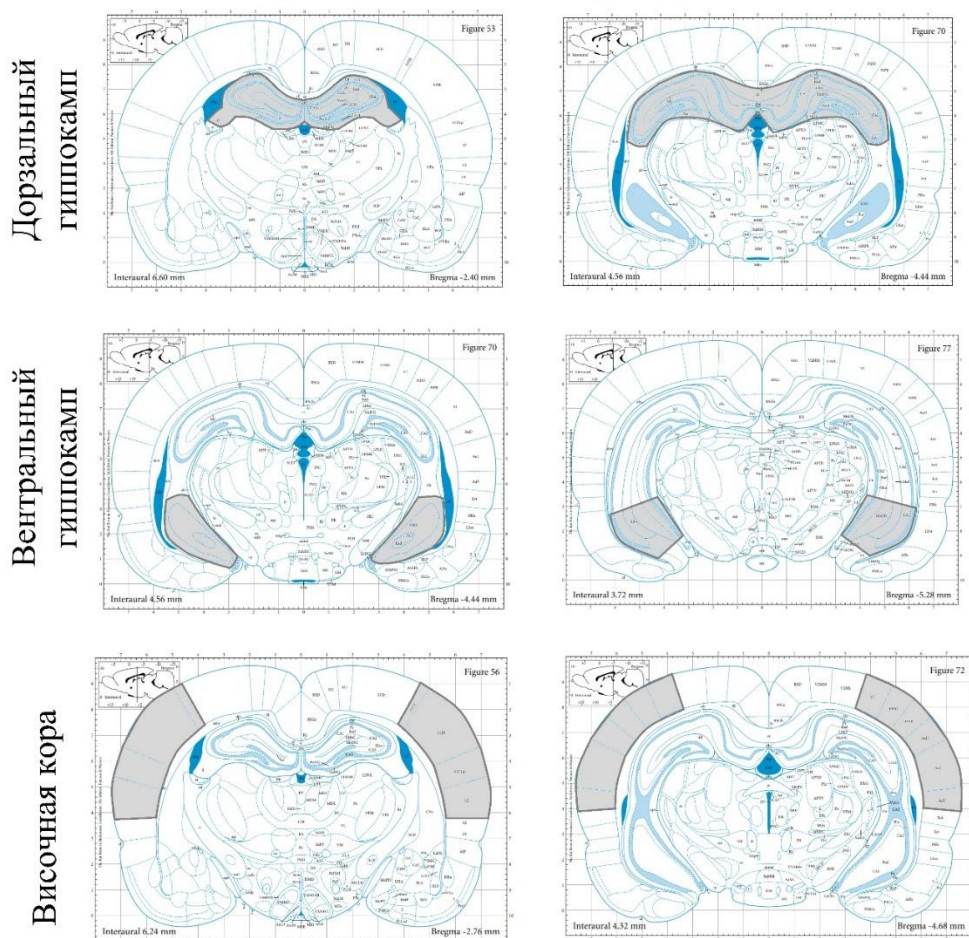


Рисунок 2.3. Схема извлечения структур мозга по [172] (отмечены областями серого цвета).

2.4.2 Обработка образцов РНК ДНКазой

Полученные образцы тотальной РНК обрабатывали дезоксирибонуклеазой, свободной от рибонуклеаз, чтобы избежать возможной контаминации геномной ДНК. Для этого пробирки с осадками тотальной РНК центрифугировали 30 минут при 0 °С и 14 000 g и удаляли супернатант. Затем открытые пробирки помещали в твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Латвия) на 5 мин при +50°С. Высушенный осадок растворяли в 7,5 мкл воды для инъекций и инкубировали при +50°С в течение 5 мин для лучшего растворения нуклеиновых кислот.

К полученному раствору добавляли реакционную смесь, содержащую в 2X реакционном буфере 1 единицу активности RQ1 ДНКазы свободной от рибонуклеаз (Promega, США) и 20 единиц активности рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз РНазина (Силекс, Россия). Полученную смесь инкубировали 15 мин при +37 °С в твердотельном термостате, затем добавляли 1,5 мкл стоп-реагента (20 мМ ЭГТА). После смешивания со стоп-реагентом пробирки инкубировали в термостате при +65 °С для инактивации фермента в течение 10 мин. Для очистки от реакционной смеси РНК пересаждали 8 М раствором LiCl в течение ночи при -20 °С. Затем

пробирки с образцами центрифугировали, удаляли супернатант и осадок РНК дважды промывали 75% этиловым спиртом.

2.4.3 Обратная транскрипция

Подготовку образцов РНК к обратной транскрипции (ОТ) проводили аналогично методике, описанной в пункте 2.4.2, однако высушенный осадок растворяли в 15 мкл воды для инъекций. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 260 нм. Дополнительно оценивали соотношение поглощения при длинах волн 260/280 нм для оценки качества очистки РНК.

кДНК синтезировали из 1 мкг (вентральный гиппокамп) или 2 мкг (дорзальный гиппокамп, височная кора) тотальной РНК с использованием олиго-dT праймеров (0,5 мкг на 1 мкг РНК), 9-мерных случайных (0,25 мкг на 1 мкг РНК) праймеров (ДНК-Синтез, Россия) и обратной транскриптазы М-MLV (100 единиц на 1 мкг РНК; Promega, США). Сначала смешивали раствор РНК и праймеры, затем инкубировали в течение 10 мин при +70 °С, после чего смесь быстро охлаждали до +4 °С для отжига праймеров. Затем добавляли реакционную смесь, содержащую М-MLV обратную транскриптазу, дезоксинуклеотидтрифосфаты (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, каждый в концентрации 25 мМ) и ингибитор рибонуклеаз РНазин (Силекс, Россия). Для проведения ОТ пробирки помещали на 1 ч в термостат при +42 °С, после чего в течение 10 мин проводили нагрев на +65 °С для остановки реакции. Полученный раствор кДНК разводили в 10 раз и хранили при -20°С для проведения ПЦР в реальном времени.

2.4.4 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для детекции накопления ПЦР-продукта использовали специфические флуоресцентные зонды по типу линейно-разрушаемых проб (технология TaqMan). Принцип их действия заключается в том, что олигонуклеотид, комплементарный части ПЦР-продукта, в районе 5'-конца помечен флуорофором, а с 3'-конца – гасителем флуоресценции. В отсутствие мишени флуорофор и гаситель сближены и флуоресценция не наблюдается. При гибридизации зонда и ПЦР-продукта происходит отщепление флуорофора за счет 5'→3'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы и уровень флуоресценции увеличивается пропорционально концентрации ПЦР-продукта [174]. В эксперименте использовали флуорофоры FAM, ROX и HEX, гасители флуоресценции BHQ-1 и BHQ-2.

Для разработки нового набора мультиплексных ПЦР мы выбрали 9 генов домашнего хозяйства, которые часто используются в качестве референсных для нормализации экспрессии генов у крыс [175]. Эти гены отвечают за разные функции клеток (таблица 2.1), что позволило нам избежать возможного эффекта совместной регуляции референсных генов-кандидатов.

Таблица 2.1. Референсные гены и функции кодируемых ими белков в клетке

Ген	Название белка, кодируемого указанным геном	Функция
<i>Actb</i>	Бета-актин (ActB)	Структурный белок цитоскелета, участвующий в процессах клеточной подвижности [176]
<i>Gapdh</i>	Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH)	Оксидоредуктаза, участвующая в гликолизе и глюконеогенезе [176]
<i>B2m</i>	Бета-2-микроглобулин (B2M)	Сборка и поверхностная экспрессия МНС класса I [177]
<i>Rpl13a</i>	Рибосомальный белок L13A (RPL13A)	Структурный компонент 60S рибосомальной субъединицы [36]
<i>Sdha</i>	Флавопротеиновая субъединица сукцинатдегидрогеназы, субъединица а (FP, SDHF)	Транспортер электронов в цикле трикарбоновых кислот и дыхательной цепи [178]
<i>Ppia</i>	Пептидилпролил изомеразы А, циклофилин А (CycA, CypA)	Ускоряет сворачивание белка благодаря своей активности пептидил-пролил цис-транс-изомеразы [176]
<i>Hprt1</i>	Гипоксантин фосфорибозилтрансфераза 1 (HGPRT)	Синтез пуринов [178]
<i>Pgk1</i>	Фосфоглицерат киназа 1 (PGK1)	Гликолитический фермент [178]
<i>Ywhaz</i>	Белок активации тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы, полипептид зета (KIP-1, 14-3-3-zeta)	Белок, участвующий в клеточной сигнализации, регуляции прогрессии клеточного цикла, цитоскелетной структуры и транскрипции [179]

Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 2.2 (синтезированы ДНК-Синтезом, Россия). Наборы праймеров подбирались на основе их специфичности, перекрывания экзон-экзонных соединений (чтобы избежать возможного сигнала от геномной ДНК, это было предпочтительно, но не во всех случаях возможно), длины продукта менее 200 пар оснований. Последовательности праймеров были получены с помощью программы Primer Blast [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] против последовательностей кДНК

референсных генов, а также некоторых генов интереса, полученных из базы данных RefSeq Национального центра биотехнологической информации. Зонды были разработаны с помощью программы Primer3Plus [<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>] с последующей нуклеотидной BLAST-специфичностью проверки [[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LO C=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)]. Основные требования к дизайну зонда были следующие: 1) длина 18-27 нуклеотидов, 2) температура плавления зонда превышала температура плавления праймеров на 5-10 °С, 3) содержание GC составляло 20-80%, 4) на 5' конце избегали нуклеотида G, так как он может гасить флуоресцентный сигнал.

Таблица 2.2. Последовательности праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность праймеров и зондов	Финальные концентрации, нМ	Ссылка
<i>Actb</i> NM_031144	TGTCACCAACTGGGACGATA GGGGTGTGAAGGTCTCAA FAM-CGTGTGGCCCTGAGGAGCAC- BHQ1	200 200	[180] (праймеры) [181] (зонд)
<i>Gapdh</i> NM_017008	TGCACCACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTTC R6G-ATCACGCCACAGCTTCCAGAGGG- BHQ2	200 100	[182]
<i>B2m</i> NM_012512	TGCCATTCAGAAACTCCCC GAGGAAGTTGGGCTTCCATT ROX- ATTCAAGTGTACTCTCGCCATCCACCG- BHQ1	200 100	[183]
<i>Rpl13a</i> NM_173340	GGATCCCTCCACCTATGACA CTGGTACTTCCACCCGACCTC FAM-CTGCCCTCAAGGTTGTGCGGCT- BHQ1	200 100	[36] (праймеры) [181] (зонд)
<i>Sdha</i> NM_130428	AGACGTTTGACAGGGGAATG TCATCAATCCGCACCTTGTA R6G-ACCTGGTGGAGACGCTGGAGCT- BHQ2	200 100	[184] (праймеры) [181] (зонд)
<i>Ppia</i> NM_017101	AGGATTCATGTGCCAGGGTG CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA ROX-CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA- BHQ1	200 100	[83]
<i>Hprt1</i> NM_012583	TCCTCAGACCGCTTTCCCGC TCATCATCACTAATCACGACGCTGG	200 100	[38] (праймеры)

	FAM- CCGACCGGTTCTGTCATGTCGACCCT- BHQ1		[181] (зонд)
<i>Pgk1</i> NM_053291	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTTTC R6G-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA- BHQ2	200 100	[178] (праймеры) [181] (зонд)
<i>Ywhaz</i> NM_013011	GATGAAGCCATTGCTGAACTTG GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC ROX- TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC- BHQ1	200 100	[178] (праймеры) [181] (зонд)
<i>Grm1</i> NM_001114330. 1	GGGAATGCCAAGAAGAGGCAG CTGCAGTGTGGGGGTTTTCAA FAM-GCCCAGCAGCCAGTGTCCGTCGGC- BHQ1	400 200	[185]
<i>Grm2</i> NM_001105711. 1	TCCAGTGATTATCGGGTGCCAG AACTGGGTGCAAAGAGGCA FAM- TGCGTGTCCGTCAGCCTCAGTGGCT- BHQ1	200 100	[185]
<i>Grm3</i> NM_001105712. 1	CAGGAGTTGACGGTGCCGAG GCCTGTCCTTCAGATAAGGGAG ROX- TCGGTGACGGGCTCTTTCAGCCCAA- BHQ2	200 200	[185]
<i>Grm4</i> NM_022666.1	GGCAGTGCCGAGCAGCTAAGG CCGGTCACTCCTACCAACCG FAM-CTCCCTGAGCTCCCCGGAGCAGC- BHQ1	200 150	[185]
<i>Grm5</i> NM_017012.1	ATGCATGTAGGAGACGGCAA TTTCCGTTGGAGCTTAGGGTTT HEX-CGTCCGCTGCCAGCAGATCCAGCA- BHQ2	400 200	[186] (праймеры) [185] (зонд)
<i>Grm7</i> NM_031040.1	CCAGACAACAACACAACCAACC GCGTTCCTTCTGTGTCTTCTTC HEX- TGCAGTGGGGCAAAGGAGTCCGAG- BHQ2	200 100	[187] (праймеры) [185] (зонд)
<i>Grm8</i> NM_022202.1	TCATCGGGCACTGGACAAAT CACGGTTTTCTTCCTCTCCCC ROX- TGTCTGCAGCCTGCCGTGCAAGCCC- BHQ2	300 100	[185]
<i>Grin1</i> NM_017010	GTTCTTCCGCTCAGGCTTTG AGGGAAACGTTCTGCTTCCA FAM-CGGCATGCGCAAGGACAGCC-BHQ1	200 100	[188]
<i>Grin2a</i> NM_012573	GCTACACACCCTGCACCAATT CACCTGGTAACCTTCCTCAGTGA	200 100	[189]

	FAM- TGGTCAATGTGACTTGGGATGGCAA- BHQ1		
<i>Grin2b</i> NM_012574	CCCAACATGCTCTCTCCCTTAA CAGCTAGTCGGCTCTCTTGGTT FAM- GACGCCAAACCTCTAGGCGGACAG- BHQ1	200 100	[189]
<i>Gria1</i> NM_031608	TCAGAACGCCTCAACGCC TGTAGTGGTACCCGATGCCA ROX- TCCTGGGCCAGATCGTGAAGCTAGAAAA -BHQ1	200 100	[190]
<i>Gria2</i> NM_017261	CAGTGCATTTTCGGGTAGGGA TGCGAAACTGTTGGCTACCT FAM-TCGGAGTTCAGACTGACACCCCA- BHQ1	200 100	[190]

ПЦР были выполнены в виде мультиплексов (*Grin1 + Grin2a*, *Grin2b + Gria1 + Gria2*, *Grm1 + Grm3 + Grm5*, *Grm2 + Grm7 + Grm8*, *Actb + Gapdh + B2m*, *Rpl13a + Ppia + Sdha* и *Hprt1 + Pgk1 + Ywhaz*). Только *Grm4* не входил ни в один мультиплекс. Эффективность ПЦР проверялась в отдельном эксперименте методом серийных разведений [191]. Наиболее концентрированный образец соответствовал 10-кратно разведенной кДНК, синтезированной из 1 мкг тотальной РНК, другие образцы были получены путем последующих 4-кратных разведений. Оптимизацию начинали с концентрации 200 нМ для прямого и обратного праймеров и 100 нМ для зонда. В случае получения нежелательных результатов (низкая эффективность, низкий R^2 , высокое стандартное отклонение C_q) тестировали более высокие концентрации (300 и 400 нМ для праймеров; 150 и 200 нМ для зондов). В случае более низкой эффективности мультиплексной ПЦР по сравнению с обычной ПЦР комбинации мишеней в реакциях меняли. После окончательного подбора состава систем эффективность условий ПЦР дополнительно проверялась и была оптимальной (Рис. П. 1-3).

ПЦР проводили в общем объеме 6 мкл, содержащем 0,8 мкл кДНК. Для реакции использовали 0,5 единиц TaqM-полимеразы (Алкор Био, Россия) и 3,5 mM Mg^{2+} . Финальные концентрации праймеров и зондов представлены в таблице 2.1. Анализ проводили в 3-4 параллелях, полученные результаты на этапе обработки данных усредняли. Помимо исследуемых образцов кДНК использовали отрицательный контроль ПЦР (вместо кДНК добавляли 0,8 мкл воды) и отрицательный контроль ОТ (образцы, к которым при проведении ОТ не добавляли обратную транскриптазу). Амплификацию проводили на приборе CFX384 Real-Time System (Bio-Rad, США) по следующей программе: «горячий старт» – +95°C 15 мин для

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

Полученные результаты анализировали в программе Bio-Rad CFX Manager методом регрессии. Определение содержания мРНК (кДНК) производили относительно контрольной пробы с использованием $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода [192]. Данные нормировали относительно среднего геометрического Ct, определенного для трех стабильно экспрессирующихся генов домашнего хозяйства. Стабильные референсные гены были отобраны с помощью онлайн-инструмента RefFinder [<https://www.heartcure.com.au/reffinder>]. RefFinder использует четыре широко используемых алгоритма для валидации референсных генов (geNorm, NormFinder, BestKeeper и сравнительный метод Delta-Ct). Он создает рейтинг, основанный на геометрическом усреднении рангов, полученных четырьмя алгоритмами [193].

GeNorm основан на принципе, что соотношение экспрессии двух соответствующих референсных генов не должно зависеть от условий эксперимента. GeNorm рассчитывает значение стабильности (M) путем усреднения парных вариаций для каждого референсного гена, а затем сравнивает их с другими контрольными генами с поэтапным исключением наименее стабильного гена и пересчетом M. Наименьшее значение M указывает на наиболее стабильную пару генов в пределах тестируемой панели и условий эксперимента, в то время как наибольшее значение M указывает на наименее стабильный ген [41].

Сравнительный метод Delta-Ct противопоставляет относительную экспрессию пар генов в пределах каждого образца. Стабильность референсного гена-кандидата ранжируется в соответствии с повторяемостью разницы экспрессии генов; т.е. ген с наименьшим средним стандартным отклонением Delta-Ct считается наиболее стабильным [194].

BestKeeper использует попарные сравнения необработанных значений Cq каждого гена для определения наиболее стабильного референсного гена [195]. BestKeeper генерирует индекс, используя среднее геометрическое значение Cq каждого гена-кандидата. Этот индекс можно использовать для ранжирования, поскольку стабильная экспрессия референсного гена коррелирует с индексом BestKeeper. BestKeeper также рассчитывает коэффициент вариации, стандартное отклонение значений Cq и коэффициент корреляции. Стабильные эталонные гены показывают высокие значения коэффициента корреляции и низкие коэффициента вариации и стандартного отклонения.

Программа NormFinder основана на математической модели экспрессии генов для определения наиболее стабильного референсного гена и наилучшей комбинации двух референсных генов. Программное обеспечение NormFinder рассчитывает значение стабильности

генов-кандидатов на основе оценки общей вариации кандидатов в референсные гены и вариации между подгруппами набора образцов. Алгоритм показал, что он менее чувствителен к корегуляции. Таким образом, алгоритм не требует знания того, отвечают ли гены за разные функции в клетке [196].

2.5 Определение уровня белка субъединиц ионотропных рецепторов глутамата

Крыс декапитировали на 1, 3, 7 и 30 сутки после ПТЗ-индуцированных судорог и через неделю и 2 месяца после пилокарпин-индуцированных судорог. После декапитации мозг быстро извлекали, замораживали и хранили при -80°C до последующего выделения изучаемых областей мозга. Образцы гомогенизировали в 150-300 мкл буфера для лизиса [197], содержащего 100 мМ Трис-НСl pH 8,0, 140 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА, 5% SDS, 1X коктейль ингибиторов протеаз (Pierce Protease Inhibitor Tablets, Thermo Fisher Scientific), 1X коктейль ингибиторов фосфатаз (Phosphatase Inhibitor Cocktail II, Abcam), затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После центрифугирования (14 000 г в течение 10 мин) супернатант использовали для количественного определения белка и дальнейшего анализа. Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [198] с использованием БСА в качестве стандарта. Белковый супернатант смешивали 1:1 с 2X буфером для нанесения (125 мМ Трис-НСl pH 6,8, 40% глицерин, 4% SDS, 10% β -меркаптоэтанол, 0,02% бромфеноловый синий) и нагревали при $+70^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

Аликвоты по 6 мкг белка в равных объемах загружали на 7 % полиакриламидный гель и разделяли электрофорезом (125 В) в восстанавливающих и денатурирующих условиях [199] с использованием Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 кДа; Thermo Fisher Scientific) до тех пор, пока полоса 37 кДа не достигала границы геля. После электрофореза белки переносили на 45 мкм нитроцеллюлозную мембрану путем полусухого переноса с помощью 1X Power Blotter 1-Step Transfer Buffer (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. После переноса мембраны окрашивали 0,1 % Ponceau S (растворенным в 5 % уксусной кислоте) и визуализировали на приборе ChemiDoc MP imager (Bio-Rad, США) для последующей нормализации на общий белок. Затем их инкубировали (в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$) в растворе PBST, содержащем 0,05% NaN_3 и одни из следующих первичных антител: кроличьи анти-GluN2a (1:1000, ab169873, Abcam), кроличьи анти-GluN2b (1:1000, ab65783, Abcam), кроличьи анти-GluA1 (1:10000, ab109450, Abcam) или козьи анти-GluA2 (1:600, sc-7611, Santa Cruz Biotechnology). Затем мембраны промывали в PBST шесть раз по 5-10 мин и инкубировали (при комнатной температуре в течение 1 ч) в растворе PBST, содержащем 5% сухого молока и соответствующие вторичные антитела (1:60 000 козьи анти-кроличьи IgG-HRP, Pierce, 31460, Thermo Fisher Scientific или 1:5 000 ослиные анти-козьи IgG-HRP, sc-2020, Santa

Cruz Biotechnology). После трех промывок в PBST белки выявляли с помощью хемилюминесцентного субстрата SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific) и визуализировали с помощью ChemiDoc MP imager (Bio-Rad). Изображения анализировали с помощью программы Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad). Экспрессию белка нормировали на общий белок, окрашенный по Понсо [200], используя метод нормализации общего белка (Bio-Rad). Отношение оптической плотности специфической белковой полосы к общему белку рассчитывали и нормировали на среднее значение контрольной группы.

2.6 Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводился в программах IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США), и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Для проверки нормальности распределения был использован тест Шапиро-Уилка, а для проверки равенства дисперсий — тест Ливиня. Для нормализации результатов ПЦР анализа использовался перевод данных в логарифмическую шкалу с основанием 2. Данные, полученные методом ОТ-ПЦР, анализировали с помощью двухфакторного ANOVA с последующим апостериорным тестом Сидака (для нескольких сроков анализа) или *t*-критерия Стьюдента (для одного срока анализа). Данные, полученные методом вестерн блоттинга, анализировали при помощи непарного *t*-теста.

Результаты считались значимыми при $p < 0,05$. Все данные, полученные методом ОТ-ПЦР, представлены в виде индивидуальных значений с минимальным и максимальным значениями, медианой выборки, а также первым и третьим квартилями. Данные, полученные методом вестерн блоттинга, представлены в виде среднего со стандартными ошибками.

3. Результаты

3.1 Оценка стабильности экспрессии генов домашнего хозяйства в мозге крыс в моделях острых судорог и эпилепсии

При помощи онлайн-инструмента RefFinder были отобраны стабильные референсные гены для каждой исследованной структуры мозга в моделях острых судорог и эпилепсии.

Экспрессия 9 генов домашнего хозяйства (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) была проанализирована в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также височной коре крыс через 1, 3 и 7 дней после ПТЗ-индуцированных судорог. Рейтинг, составленный инструментом RefFinder на основе четырех алгоритмов, представлен на рисунке 3.1. *Pgk1* показал высокую стабильность во всех исследованных структурах. В височной коре также стабильно экспрессировались *Ppia* и *Gapdh*, в дорзальной области гиппокампа — *Rpl13a* и *Ppia*, а в вентральной области гиппокампа — *B2m* и *Gapdh*.

Из полученных результатов видно, что набор стабильных генов для дорзальной и вентральной областей гиппокампа различен. Кроме того, стабильный *Rpl13a* в дорзальном гиппокампе показывает самую низкую стабильность из всех изученных нами 9 генов для вентральной области гиппокампа. Аналогично самый стабильный для вентрального гиппокампа *B2m* является самым нестабильным в дорзальной области гиппокампа. Следует отметить, что дорзальная и вентральная области гиппокампа значительно различаются по функциональным свойствам и профилям экспрессии генов [32]. Наши данные также указывают на необходимость дифференцированного отбора референсных генов для двух областей гиппокампа.

Мы проанализировали рейтинги стабильности референсных генов для каждой анализируемой области мозга отдельно в латентную (3 и 7 дней) и хроническую (60 дней) фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии (Рис. 3.2). Профили экспрессии для латентной и хронической фаз были различными.

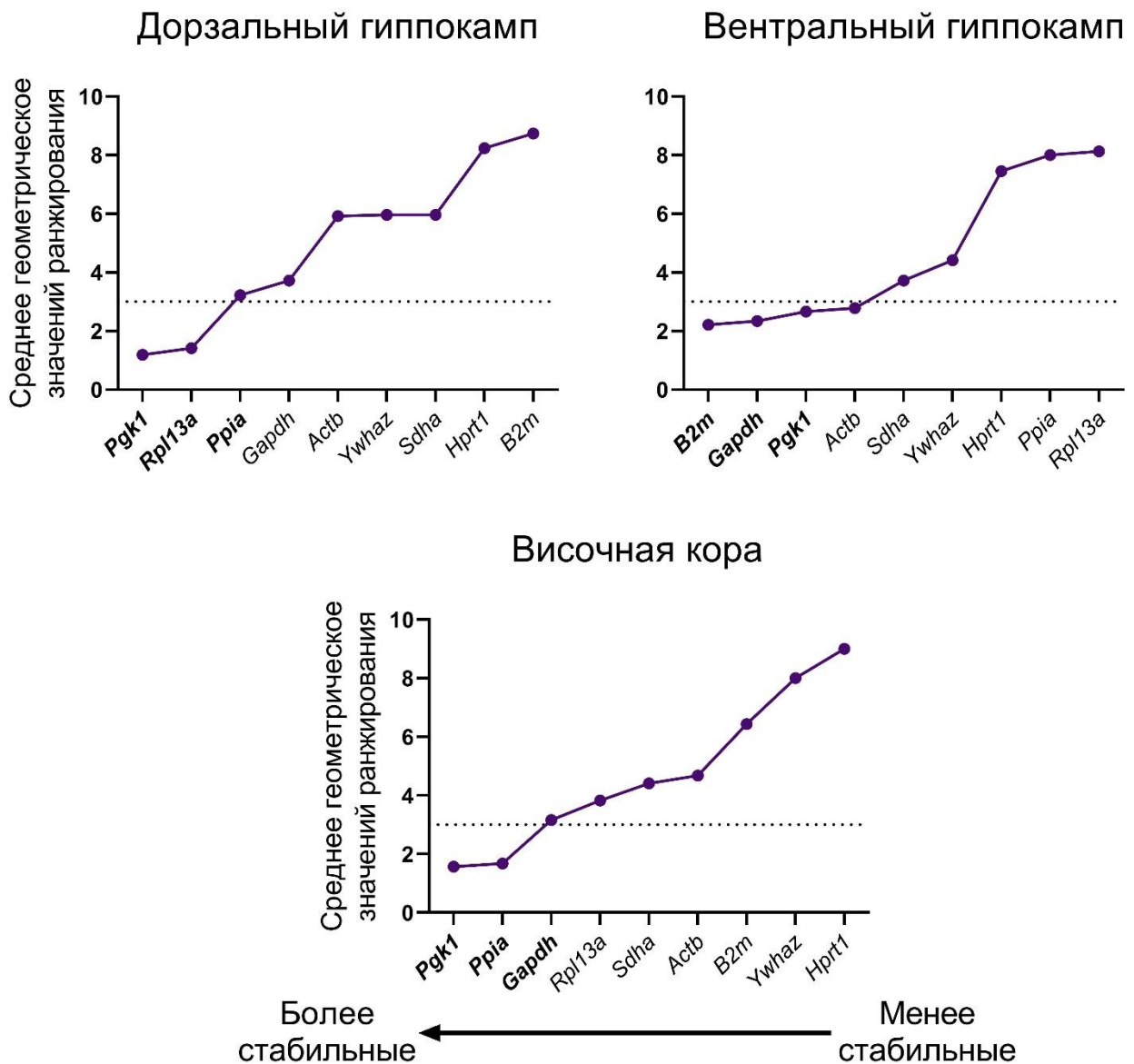


Рисунок 3.1. Рейтинг стабильности референсных генов в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в пентилентетразоловой модели острых судорог. Стабильность экспрессии референсных генов оценивали с помощью онлайн-инструмента RefFinder на основе геометрического усреднения рангов, полученных четырьмя распространенными алгоритмами (*geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* и сравнительный метод *Delta-Ct*). Жирным шрифтом выделены 3 самых стабильных гена для каждой структуры.

В дорзальной области гиппокампа в латентную фазу стабильно экспрессировались *Pgk1*, *Gapdh* и *Ywhaz*, а в хроническую — *Gapdh*, *Pgk1* и *Hprt1*. Для вентрального гиппокампа самыми стабильными были *Gapdh*, *Ywhaz* и *Ppia* через 3 и 7 дней после судорог, и *Pgk1*, *Hprt1* и *Actb* через 60 дней. В данной модели профили экспрессии генов домашнего хозяйства в дорзальном и вентральном гиппокампе вновь были не идентичны, но различия выражены в меньшей мере. В

височной коре самыми стабильными генами были *Pgk1*, *Hprt1* и *Gapdh* в латентную фазу и *Actb*, *Pgk1* и *Ywhaz* в хроническую.

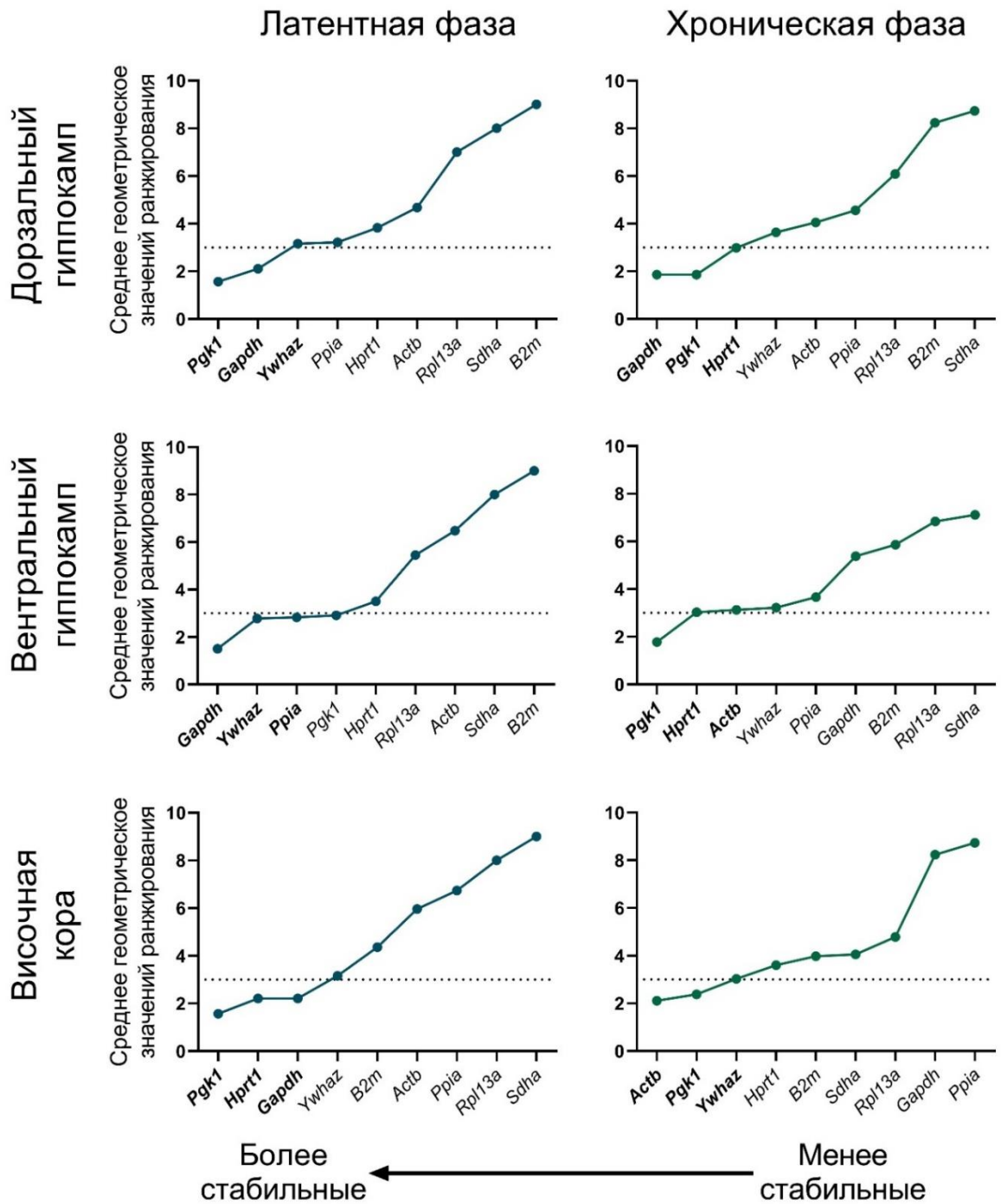


Рисунок 3.2. Рейтинг стабильности референсных генов в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в латентную (3 и 7 дней) и хроническую (60 дней) фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Стабильность экспрессии референсных генов оценивали с помощью онлайн-инструмента RefFinder на основе геометрического усреднения рангов, полученных четырьмя распространенными алгоритмами (*geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* и

сравнительный метод *Delta-Ct*). Жирным шрифтом выделены 3 самых стабильных гена для каждой структуры и срока анализа.

Рейтинг, составленный инструментом RefFinder на основе четырех алгоритмов, для литий-пилокарпиновой модели также, как и для пентилентетразоловой, показал, что ген *Pgk1* является высоко стабильным во всех исследованных структурах. *Sdha* и *B2m* в обеих областях гиппокампа были нестабильны, хотя *B2m* имел высокую стабильность в вентральной области гиппокампа после ПТЗ-индуцированных судорог. *Gapdh* также стабильно экспрессировался в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели во всех исследованных структурах, однако в хроническую фазу остался стабильным только в дорзальном гиппокампе. В вентральной области гиппокампа и височной коре в хронической фазе *Gapdh* был одним из самых нестабильных.

Таким образом, в таблице 3.1 представлены наиболее стабильно экспрессирующиеся гены в моделях острых судорог и эпилепсии. В дальнейшем для нормализации данных в каждом случае использовалось среднее геометрическое значений *Ct* для трех самых стабильных референсных генов.

Таблица 3.1. Наиболее стабильно экспрессирующиеся гены в моделях острых судорог и эпилепсии

Область Модель	Дорзальный гиппокамп	Вентральный гиппокамп	Височная кора
Пентилентетразоловая модель острых судорог	<i>Pgk1, Ppia, Rpl13a</i>	<i>Pgk1, B2m, Gapdh</i>	<i>Pgk1, Ppia, Gapdh</i>
Литий- пилокарпиновая модель (латентная фаза)	<i>Pgk1, Ywhaz, Gapdh</i>	<i>Gapdh, Ppia, Ywhaz</i>	<i>Gapdh, Pgk1, Hprt1</i>
Литий- пилокарпиновая модель (хроническая фаза)	<i>Gapdh, Pgk1, Hprt1</i>	<i>Pgk1, Actb, Hprt1</i>	<i>Actb, Pgk1, Ywhaz</i>

3.2 Изменение продукции мРНК и белка ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс после острых судорог

Мы изучили изменения экспрессии генов субъединиц NMDA- (*Grin1*, *Grin2a* и *Grin2b*) (Рис. 3.3) и AMPA- (*Gria1* и *Gria2*) (Рис. 3.4) рецепторов в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также височной коре крыс после судорог, вызванных ПТЗ. Анализ проводился на 1 (острый период после судорог), 3 и 7 (дни, соответствующие латентной фазе литий-пилокарпиновой модели) сутки после индукции судорог.

В височной коре было обнаружено снижение экспрессии гена *Grin1* NMDA-рецепторов на 3 и 7 сутки после введения ПТЗ. Этот результат предполагает возможное уменьшение общего количества NMDA-рецепторов, поскольку субъединица GluN1, кодируемая геном *Grin1*, является облигатной для данного типа рецепторов. Вероятно, данное изменение направлено на снижение избыточного возбуждения, и соответственно, является компенсаторным.

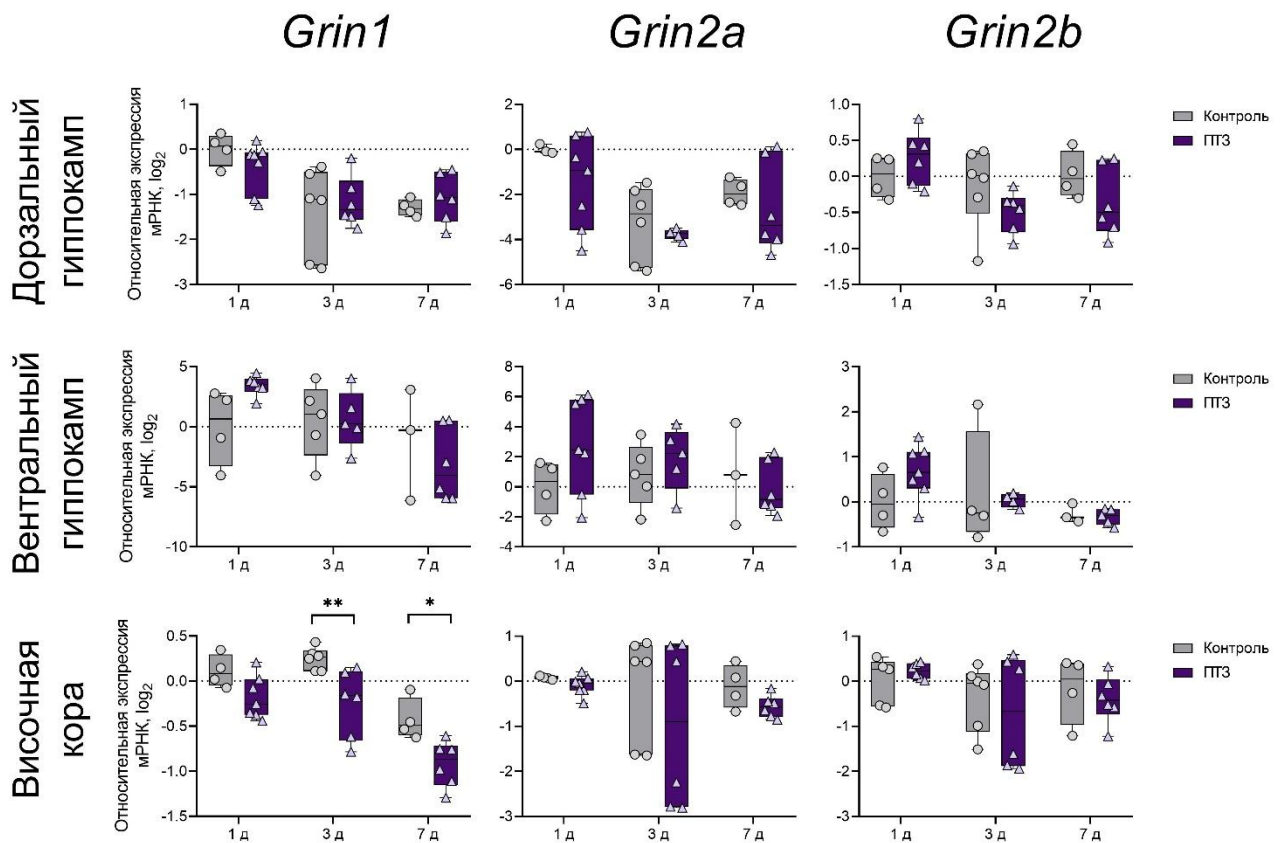


Рисунок 3.3. Относительная экспрессия генов субъединиц NMDA-рецепторов глутамата *Grin1*, *Grin2a* и *Grin2b* в височной коре (TC), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе в пентилентетразоловой модели острых судорог. Исследование проводилось на 1, (1 д), 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог. Контроль – контрольная группа, ПТЗ – экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA, приведены только статистически значимые эффекты

($p < 0,05$): *Grin1*: $TC - F_{1,27}$ (судороги) = 22,3, $p < 0,0001$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 4-7$.

Изменений экспрессии генов *Grin2a* и *Grin2b* в данной модели не выявлено. Ранее в исследовании, проведенном на мышах, была обнаружена повышенная экспрессия субъединицы *Grin2a* в гиппокампе через 1 ч после ПТЗ-индуцированных судорог [201]. Вероятно, и в наших опытах на крысах через 1 час могли происходить подобные изменения, однако через сутки после судорог это изменение уже не достигало достоверной значимости.

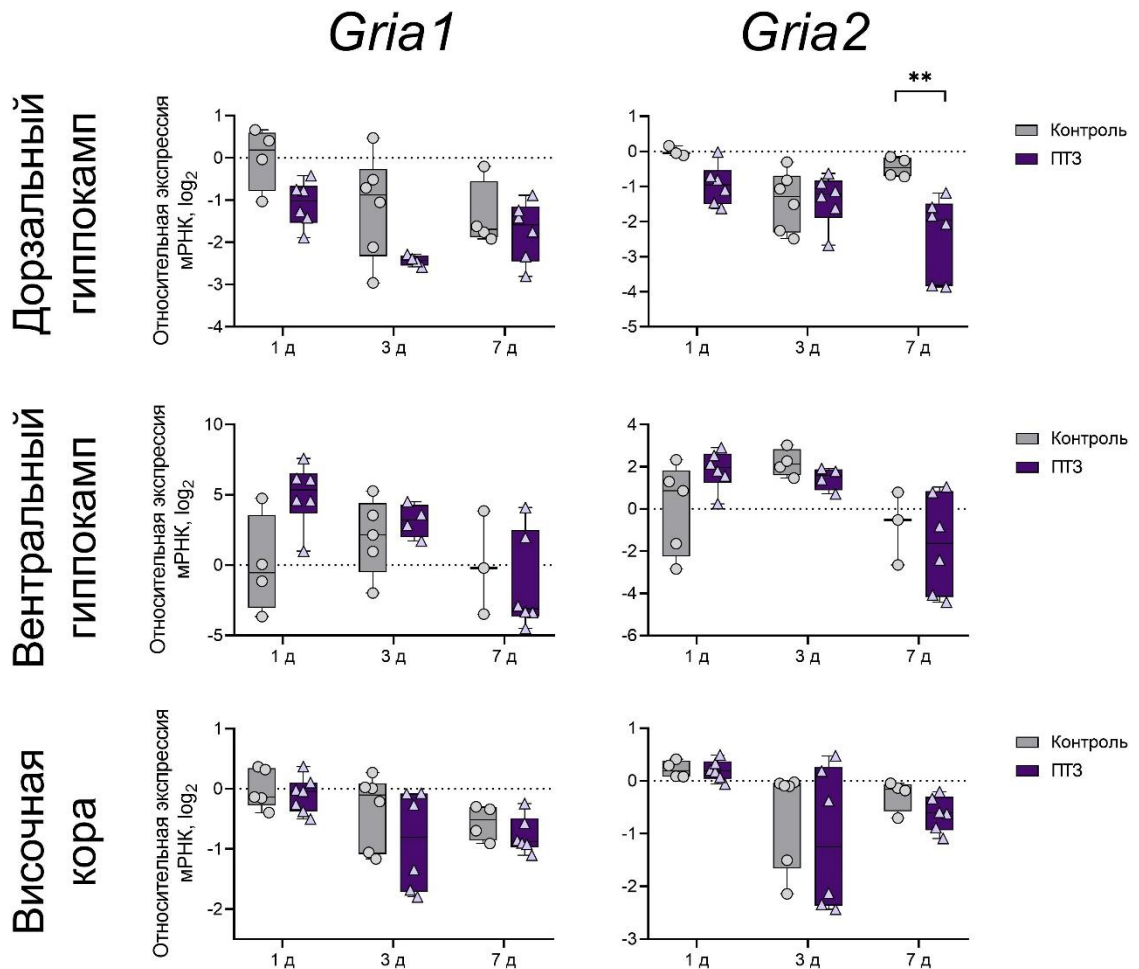


Рисунок 3.4. Относительная экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов глутамата *Gria1* и *Gria2* в височной коре (TC), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе в пентилентетразоловой модели острых судорог. Исследование проводилось на 1, (1 д), 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог. Контроль – контрольная группа, ПТЗ – экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA, приведены только статистически значимые эффекты

($p < 0,05$): *Gria2*: $DH - F_{2,25}$ (судороги \times день анализа) = 4,4, $p = 0,02$, $F_{1,25}$ (судороги) = 11,04, $p = 0,003$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: ** – $p < 0,01$. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 4-7$.

Изменения экспрессии генов субъединиц AMPA-рецепторов наблюдались только в дорзальной области гиппокампа. В частности, выявлено снижение продукции мРНК *Gria2* через неделю после ПТЗ-индуцированных судорог. Снижение экспрессии гена *Gria2* может в дальнейшем привести к увеличению доли Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов.

Затем мы проанализировали изменения уровня белка различных субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов через 1 (Рис. 3.5–3.6), 3 (Рис. 3.7–3.8) и 7 (3.9–3.10) сутки после ПТЗ-индуцированных судорог. Изменений на уровне белка ни на одном сроке анализа обнаружено не было, что свидетельствует о том, что ПТЗ-индуцированные судороги не приводят к существенным изменениям субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов.

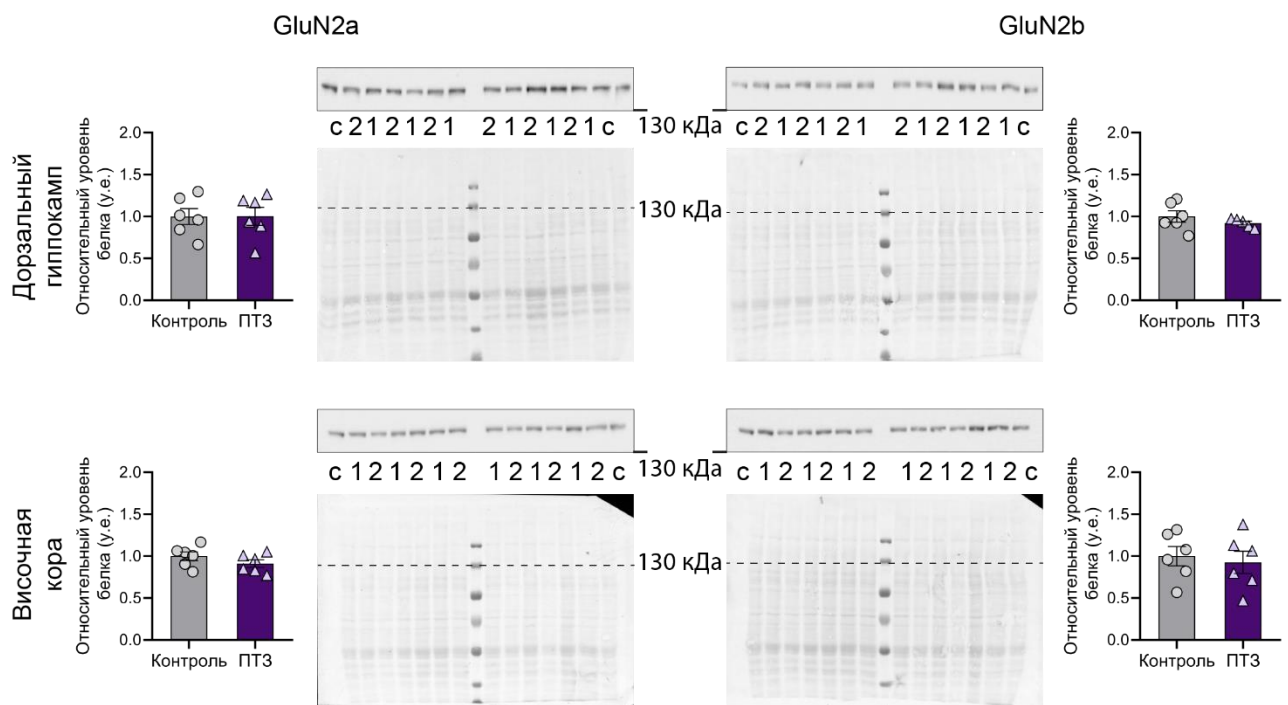


Рисунок 3.5. Относительный уровень белка субъединиц NMDA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и височной коре через 1 день после ПТЗ-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа, с – калибратор. Количество животных в группах – $n = 6$.

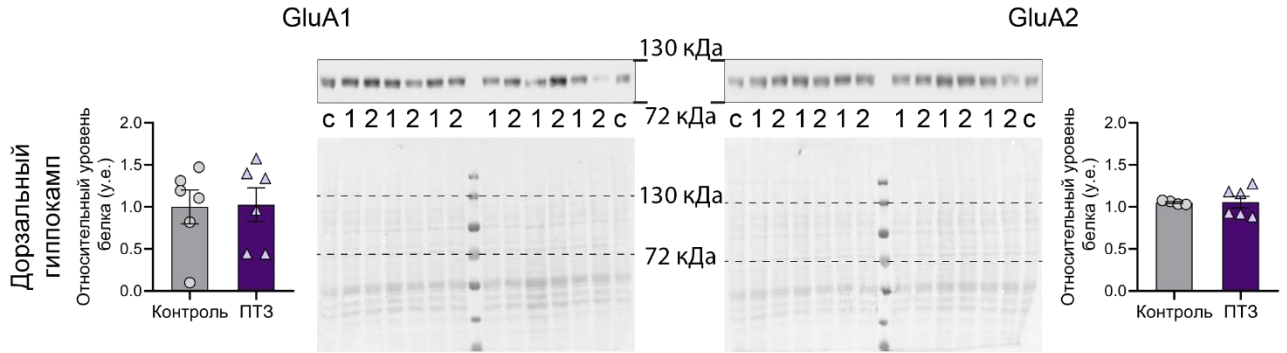


Рисунок 3.6. Относительный уровень белка субъединиц AMPA-рецепторов в дорзальном гиппокампе крыс через 1 день после ПТЗ-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа, с – калибратор. Количество животных в группах – $n = 6$.

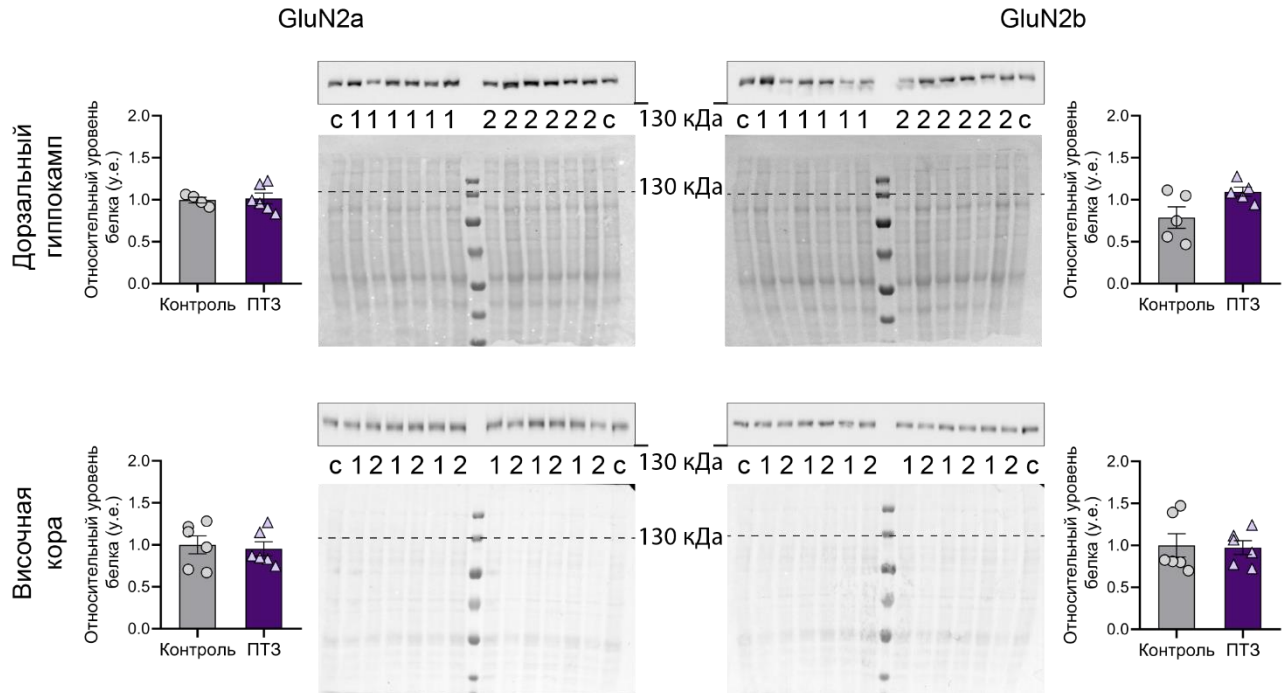


Рисунок 3.7. Относительный уровень белка субъединиц NMDA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и височной коре крыс через 3 дня после ПТЗ-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа, с – калибратор. Количество животных в группах – $n = 5-6$.

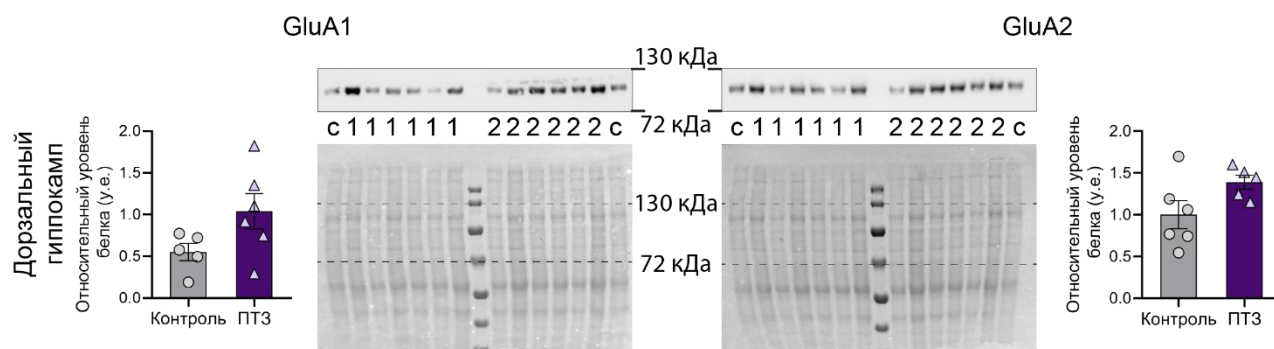


Рисунок 3.8. Относительный уровень белка субъединиц AMPA-рецепторов в дорзальном гиппокампе крыс через 3 дня после ПТЗ-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа, с – калибратор. Количество животных в группах – $n = 5-6$.

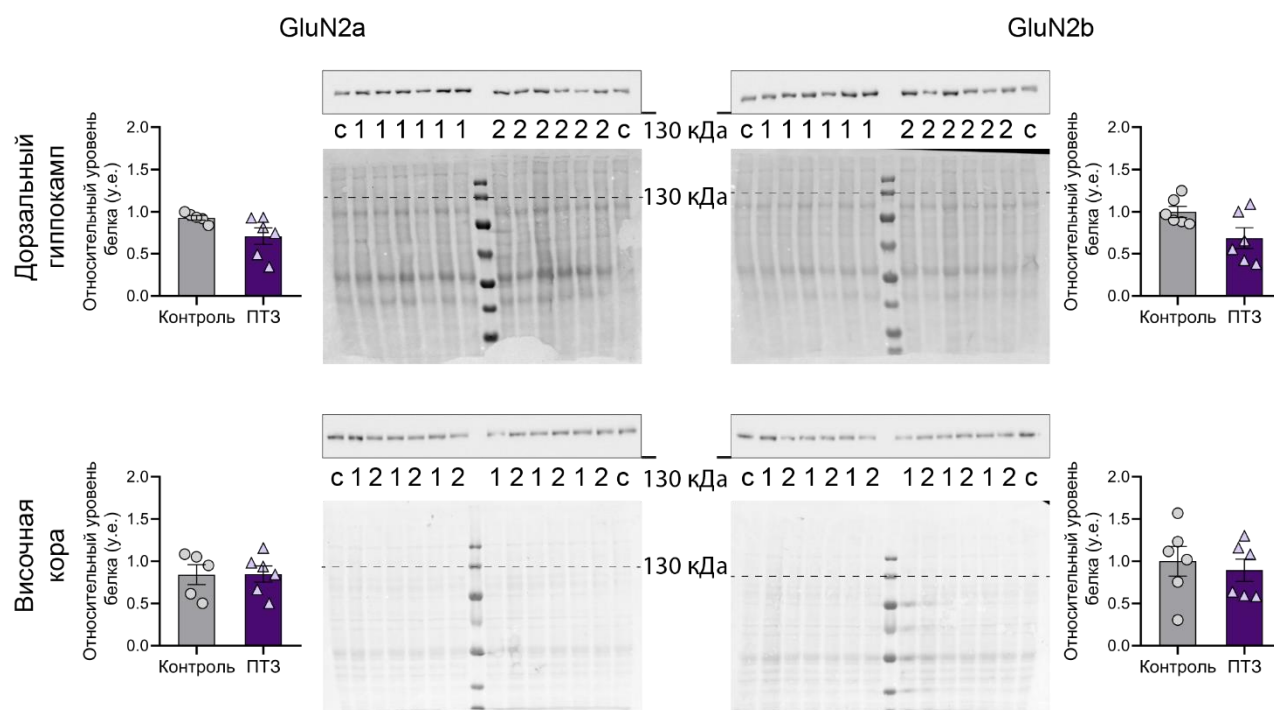


Рисунок 3.9. Относительный уровень белка субъединиц NMDA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и височной коре крыс через 7 дней после ПТЗ-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа, с – калибратор. Количество животных в группах – $n = 6$.

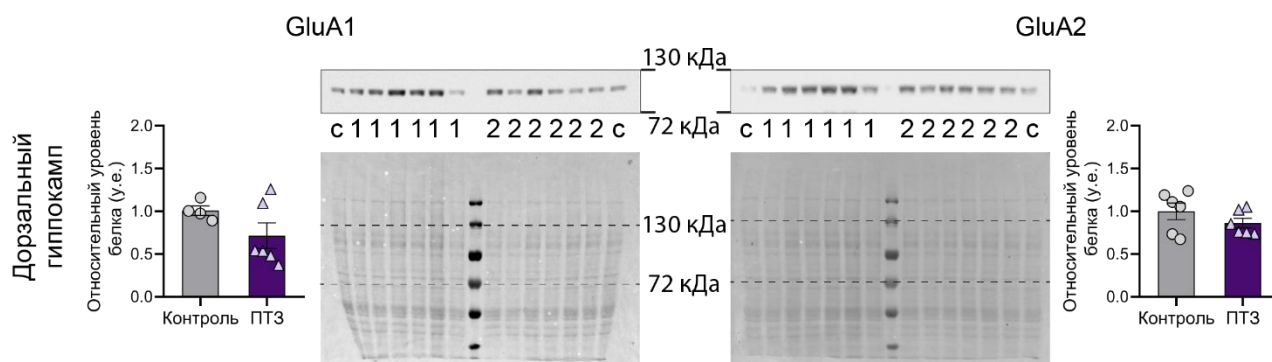


Рисунок 3.10. Относительный уровень белка субъединиц AMPA-рецепторов в дорзальном гиппокампе крыс через 7 дней после ПТЗ-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа, с – калибратор. Количество животных в группах – $n = 4-6$.

Также были проанализированы образцы дорзальной области гиппокампа на 30 день после ПТЗ-индуцированных судорог (Рис. 3.11), чтобы проверить, не проявляются ли отсроченные изменения. Проведенный анализ подтвердил, что и через месяц после судорог уровень белка субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов не меняется.

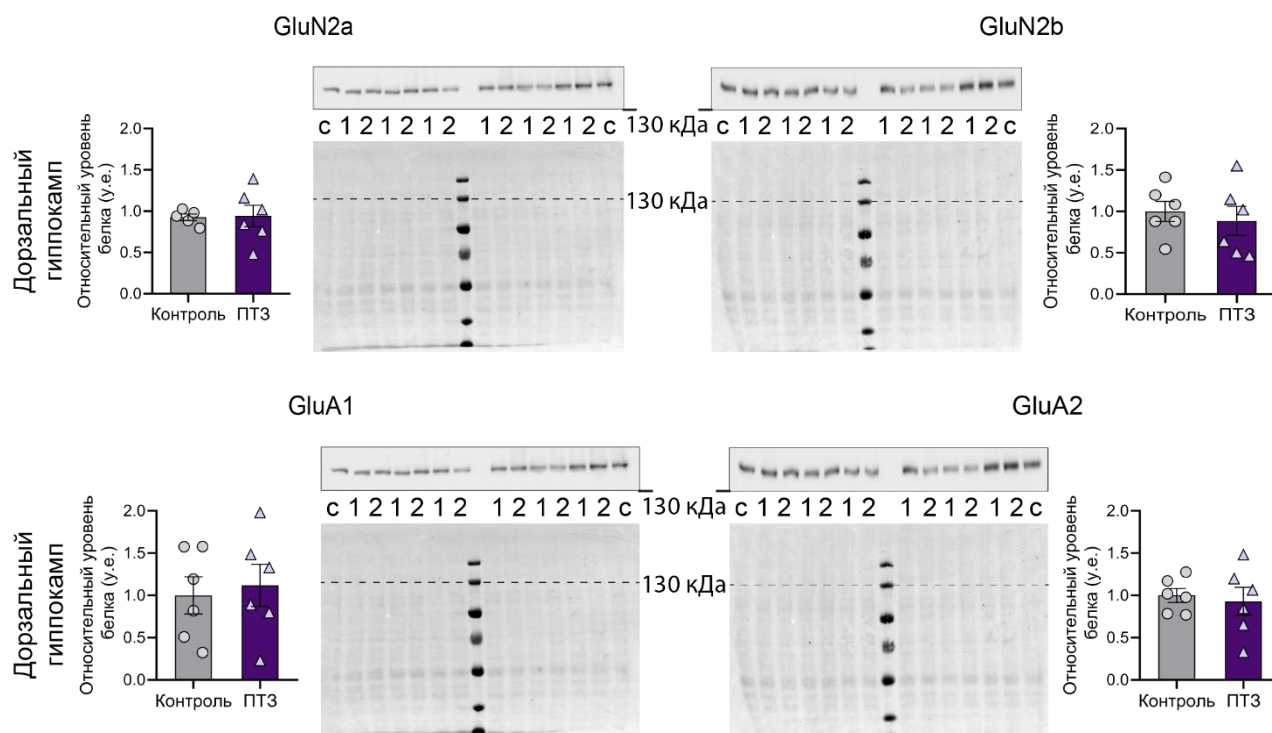


Рисунок 3.11. Относительный уровень белка субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в дорзальном гиппокампе крыс через 30 дней после ПТЗ-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа, с – калибратор. Количество животных в группах – $n = 6$.

3.3 Изменение продукции мРНК и белка ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс в модели эпилепсии

Мы проанализировали изменения продукции мРНК и белка генов субъединиц NMDA- (*Grin1*, *Grin2a* и *Grin2b*) и AMPA- (*Gria1* и *Gria2*) рецепторов в дорзальном и вентральном гиппокампе, а также височной коре в латентную (3 и 7 сутки после пилокарпин-индуцированных судорог) и хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели (60 дней).

3.3.1 Изменение экспрессии генов на уровнях мРНК и белка ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии

В отличие от модели острых судорог, в литий-пилокарпиновой модели в латентную фазу изменялась экспрессия всех исследованных генов субъединиц NMDA-рецепторов (Рис. 3.12). В дорзальной области гиппокампа и височной коре было выявлено снижение продукции мРНК *Grin1*, *Grin2a* и *Grin2b*. В вентральном гиппокампе на 3 и 7 сутки после индукции судорог уменьшалась экспрессия только *Grin1* и *Grin2b*.

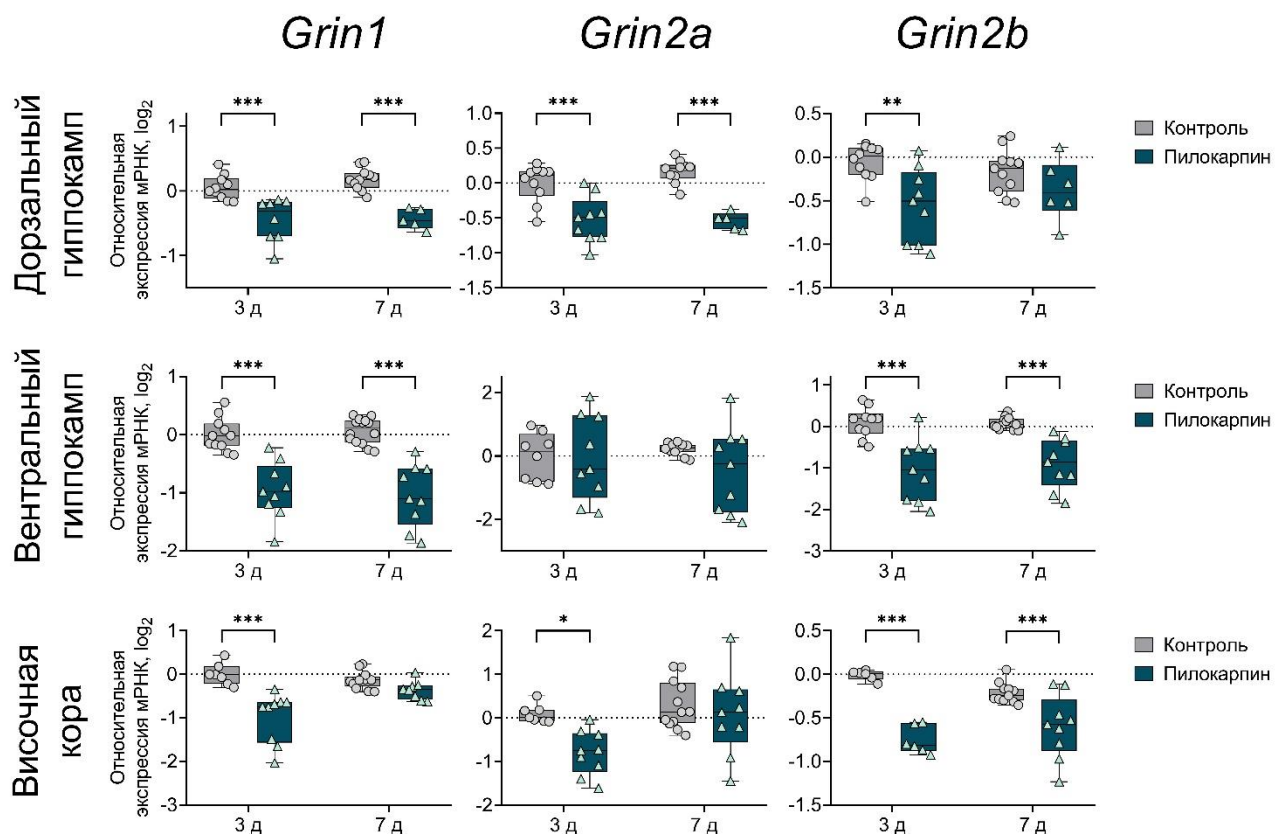


Рисунок 3.12. Относительная экспрессия генов субъединиц NMDA-рецепторов глутамата *Grin1*, *Grin2a* и *Grin2b* в височной коре (TC), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось на 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог (латентная фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA, приведены только статистически

значимые эффекты ($p < 0,05$): *Grin1*: DH – $F_{1,30}$ (судороги) = 48,5, $p < 0,0001$; VH – $F_{(1, 39)}$ (судороги) = 76,08, $p < 0,0001$; TC – $F_{(1, 33)}$ (судороги × день анализа) = 11,23, $p = 0,002$, $F_{(1, 33)}$ (судороги) = 29,27, $p < 0,0001$; *Grin2a*: DH – $F_{(1, 30)}$ (судороги) = 48,34, $p < 0,0001$; TC – $F_{1,33}$ (судороги) = 7,0, $p = 0,01$; *Grin2b*: DH – $F_{1,32}$ (судороги) = 11,3, $p = 0,002$; VH – $F_{(1, 37)}$ (судороги) = 47,1, $p < 0,0001$; TC – $F_{(1, 28)}$ (судороги × день анализа) = 4,9, $p = 0,03$, $F_{(1, 28)}$ (судороги) = 50,2, $p < 0,0001$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 6-11$.

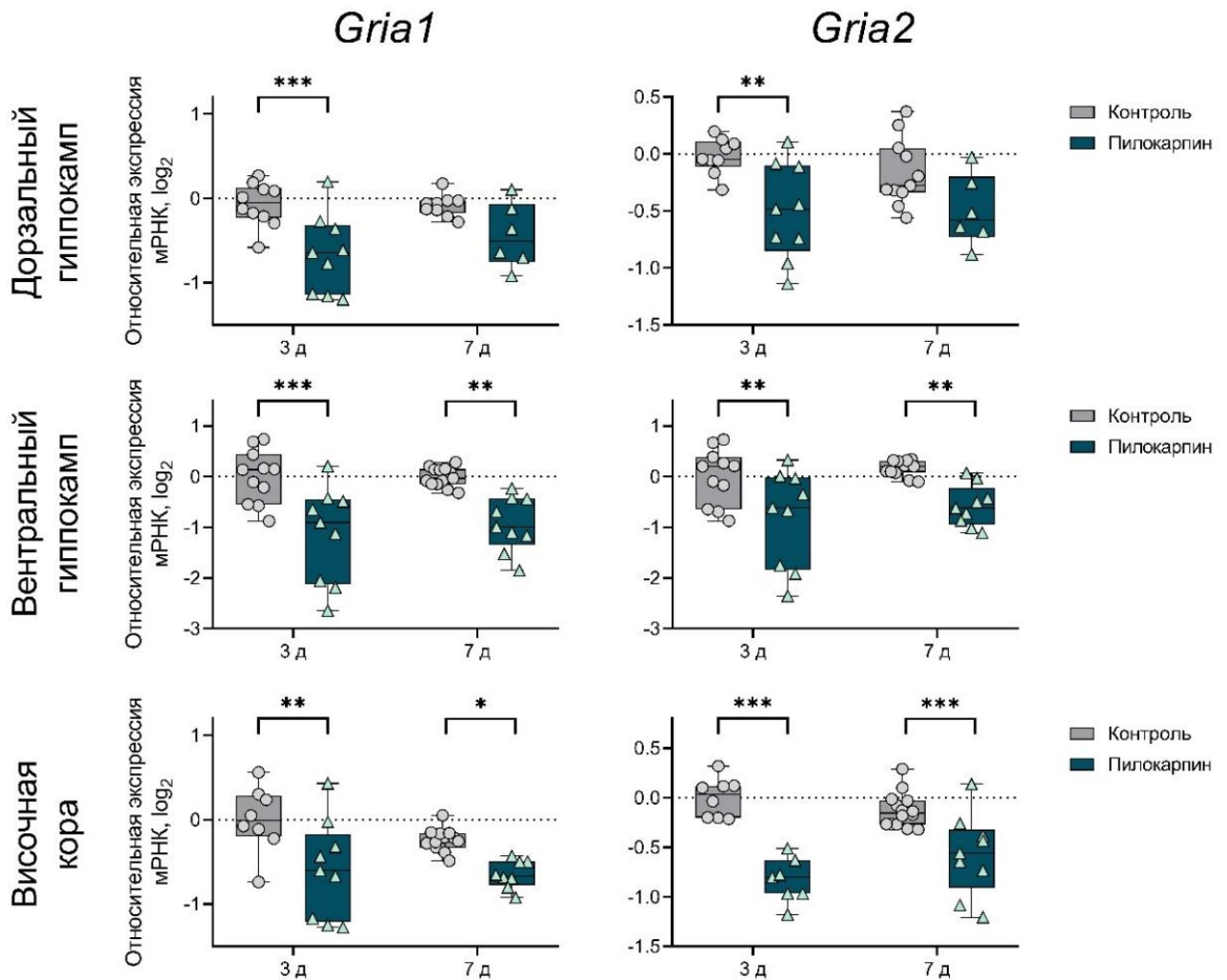


Рисунок 3.13. Относительная экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов глутамата *Gria1* и *Gria2* в височной коре (TC), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось на 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог (латентная фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин

– экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA, приведены только статистически значимые эффекты ($p < 0,05$): *Gria1*: DH – $F_{1,30}$ (судороги) = 17,1, $p = 0,0003$; VH – $F_{(1, 38)}$ (судороги) = 32,8, $p < 0,0001$; TC – $F_{(1, 34)}$ (судороги) = 18,3, $p < 0,0001$; *Gria2*: DH – $F_{(1, 30)}$ (судороги) = 48,34, $p < 0,0001$; TC – $F_{1,33}$ (судороги) = 7,0, $p = 0,0001$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 6-11$.

Снижение продукции мРНК субъединиц AMPA-рецепторов также наблюдалось во всех исследованных структурах мозга (Рис. 3.13). В дорзальном гиппокампе изменения были краткосрочными: экспрессия генов *Gria1* и *Gria2* была снижена только на 3 сутки после судорог.

Для проверки того, отражаются ли изменения экспрессии исследованных генов на уровне белка данных субъединиц, через неделю после пилокарпин-индуцированных судорог был проанализирован уровень белка субъединиц NMDA- (Рис. 3.14) и AMPA-рецепторов (Рис. 3.15) в дорзальном гиппокампе и височной коре. Было выявлено снижение уровня белка GluN2a в дорзальном гиппокампе, а также GluN2b в височной коре, что полностью соответствует полученным нами данным по продукции мРНК генов данных субъединиц.

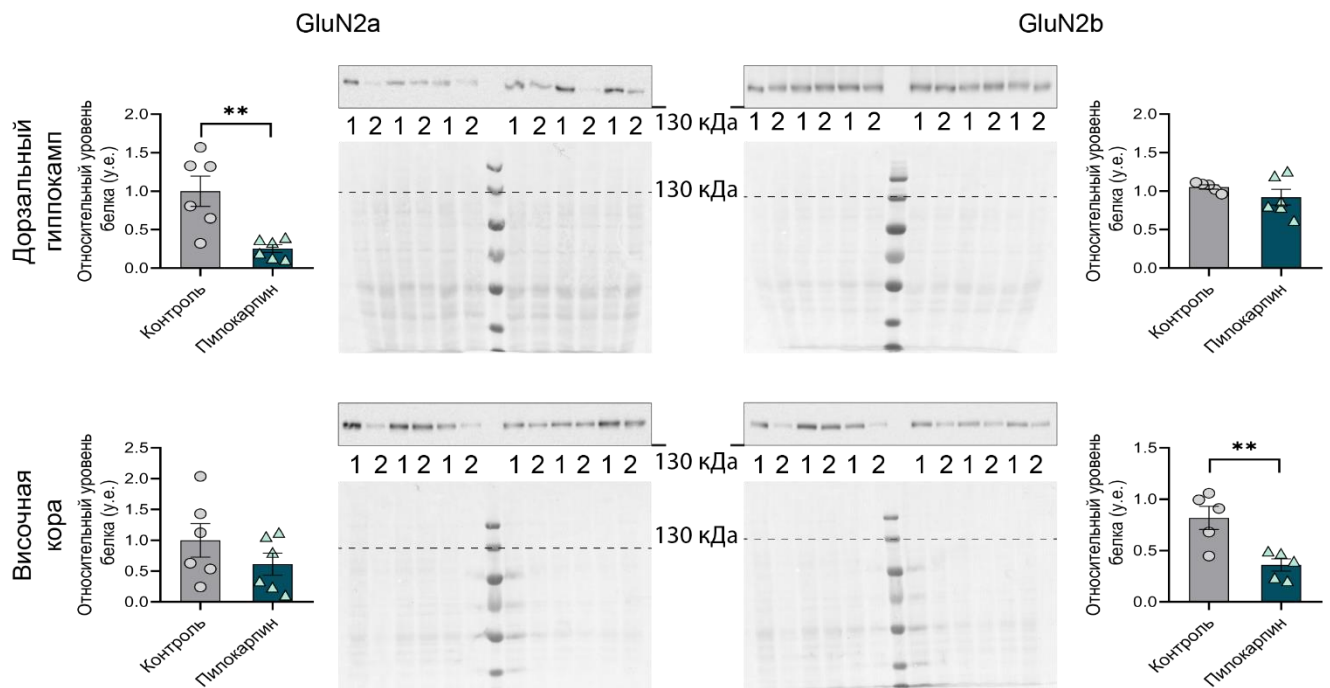


Рисунок 3.14. Относительный уровень белка субъединиц NMDA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и височной коре крыс через 7 дней после пилокарпин-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. Непарный t -

тест, $** - p < 0,01$. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа. Количество животных в группах – $n = 6$.

GluN2 подтипы имеют решающее значение для определения свойств NMDA-рецепторов. Кинетика деактивации рецептора после распада лиганд-рецепторного комплекса у GluN2a-содержащих NMDA-рецепторов быстрее, чем у GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов [10]. Кроме того, активация GluN2a-содержащих NMDA-рецепторов способствует выживанию нейронов и оказывает нейропротекторное действие [105, 202], тогда как снижение экспрессии *Grin2a* на уровне мРНК и белка может вызывать неврологические нарушения (ухудшение памяти, ослабление LTP), описанные в различных исследованиях [138, 203]. Активация GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов может приводить к эксайтотоксичности и усилению апоптоза [204, 205]. Исходя из этих данных, выявленное нами снижение экспрессии генов *Grin1* и *Grin2b*, вероятно, носит компенсаторный характер, в то время как снижение продукции мРНК *Grin2a*, напротив, является патологическим. Изменение экспрессии генов *Grin2a* и *Grin2b* в височной коре и дорзальной области гиппокампа подтверждалось на уровне белка.

В отношении уровня белка субъединиц AMPA-рецепторов подтвердилось только снижение экспрессии GluA1, оно наблюдается как в дорзальной области гиппокампа, так и в височной коре.

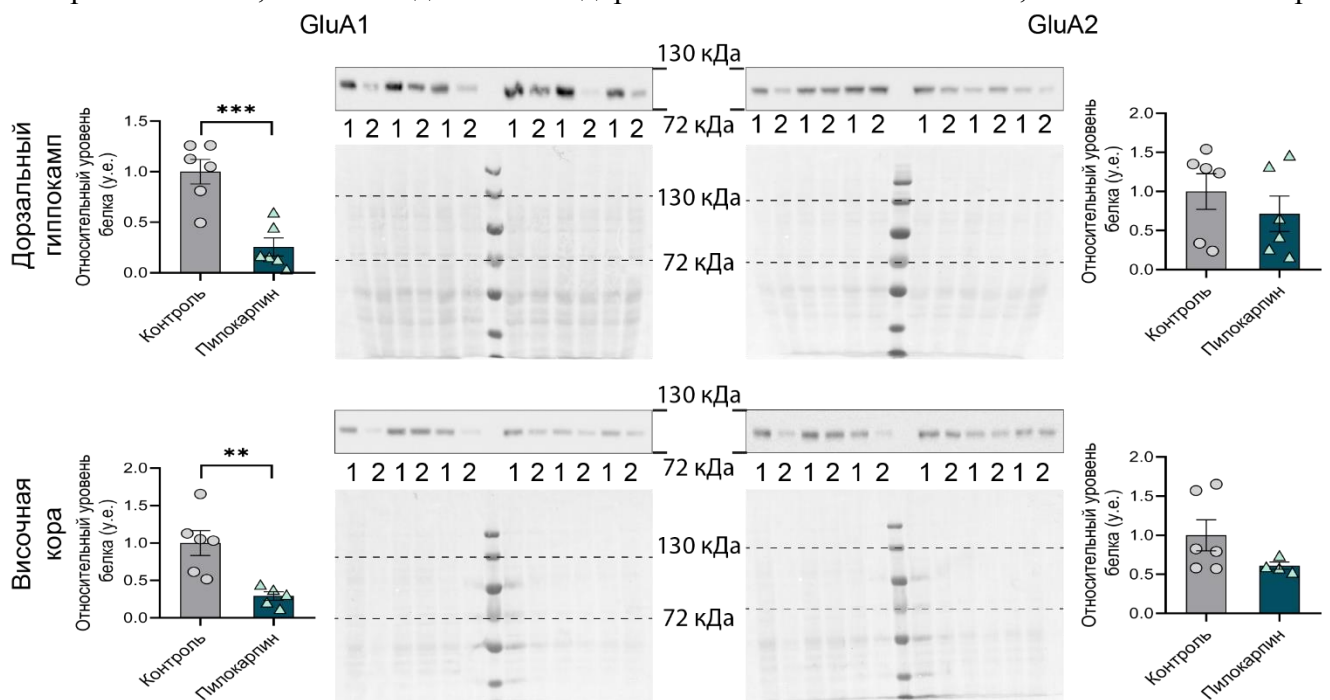


Рисунок 3.15. Относительный уровень белка субъединиц AMPA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и височной коре крыс через 7 дней после пилокарпин-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. Непарный *t*-тест, $** - p < 0,01$, $*** - p < 0,001$. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа. Количество животных в группах – $n = 4-6$.

Изменения экспрессии генов, кодирующих GluA1 и GluA2 субъединицы AMPA-рецепторов, могут приводить к нарушению таких процессов, как формирование долговременных потенциации и депрессии (LTP и LTD). Известно, что GluA1 субъединица играет ключевую роль в формировании LTP [13], поэтому можно предположить, что снижение ее продукции, выявленное в нашем исследовании на уровнях мРНК и белка, является одним из молекулярных механизмов когнитивной дисфункции, которая развивается в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии [74].

GluA2 субъединица отвечает за непроницаемость AMPA-рецептора для ионов кальция. Снижение продукции мРНК субъединицы GluA2 позволяет предполагать увеличение доли кальций-проницаемых AMPA-рецепторов, что способствует увеличению входа ионов кальция в клетку и является одним из механизмов повреждения нейронов [206, 207]. Однако, через неделю после судорог на уровне белка данное изменение не наблюдается. Для дорзальной области гиппокампа это соответствует полученным нами данным по экспрессии гена *Gria2*, однако в височной коре продукция мРНК *Gria2* остается сниженной.

3.3.2 Изменение экспрессии генов на уровнях мРНК и белка ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии

Для исследования изменений экспрессии генов рецепторов глутамата в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели в экспериментальную группу были включены только крысы-эпилептики с зарегистрированными спонтанными рецидивирующими судорогами ($n = 10$).

Через 2 месяца после индукции судорог большинство изменений экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, найденные нами в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели, нивелировались. Однако, у крыс-эпилептиков в височной коре продукция мРНК *Grin2b* (Рис. 3.16) и *Gria2* (Рис. 3.17) остается сниженной. Кроме того, экспрессия гена *Gria2* также снижена в вентральной области гиппокампа в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели.

Аналогично исследованию в латентную фазу, через 2 месяца после пилокарпин-индуцированных судорог был проанализирован уровень белка субъединиц NMDA- (Рис. 3.18) и AMPA-рецепторов (Рис. 3.19) в дорзальном гиппокампе и височной коре. Экспрессия GluN2b на уровне белка не была снижена в височной коре, но при этом снижалась в дорзальной области гиппокампа. Вероятно, данное изменение является компенсаторным, направленным на снижение возбуждения.

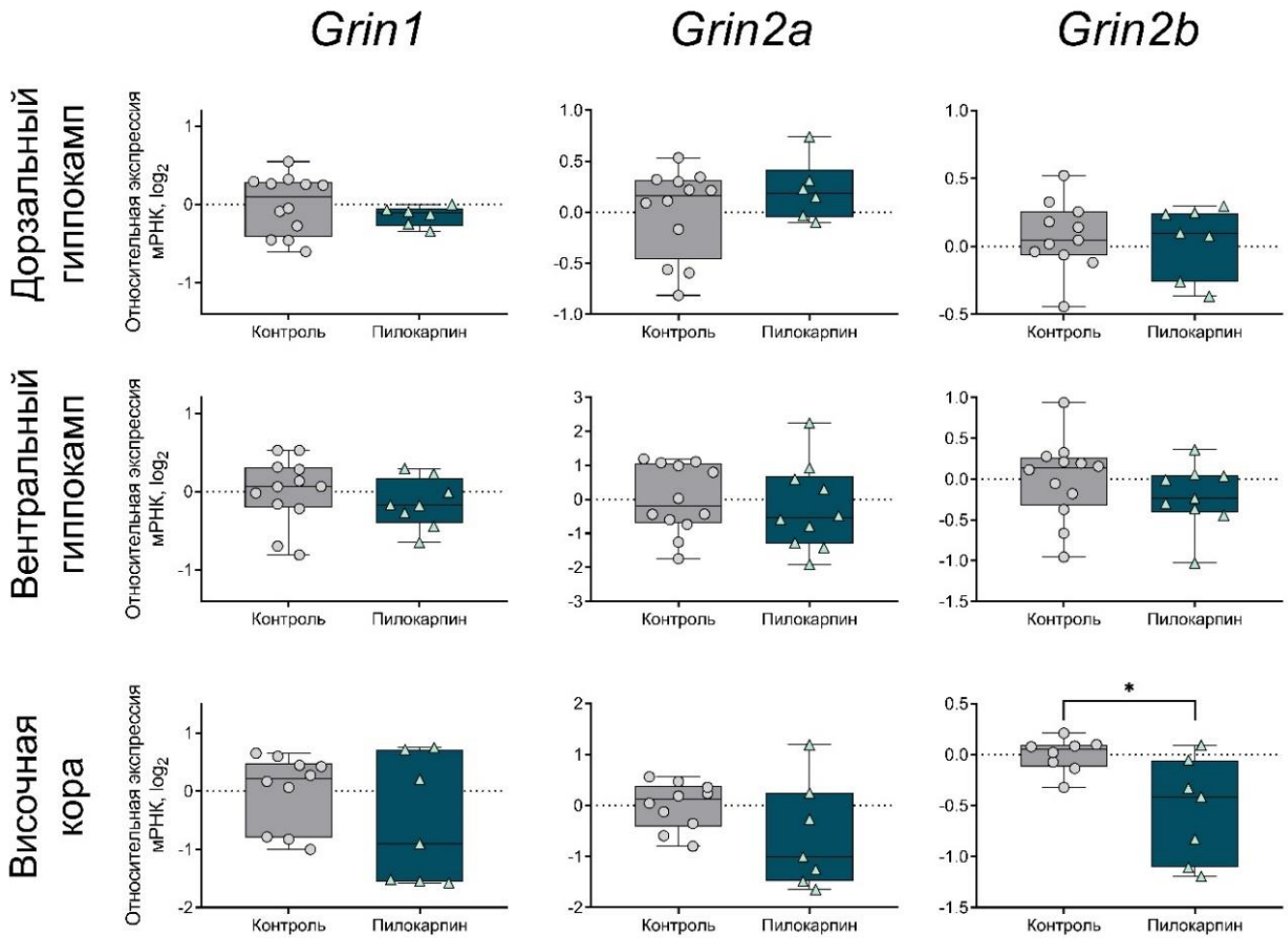


Рисунок 3.16. Относительная экспрессия генов субъединиц NMDA-рецепторов глутамата *Grin1*, *Grin2a* и *Grin2b* в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось через два месяца после индукции судорог (хроническая фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – крысы-эпилептики. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Непарный *t*-тест, * – $p < 0,05$. Количество животных в группах – $n = 7-12$.

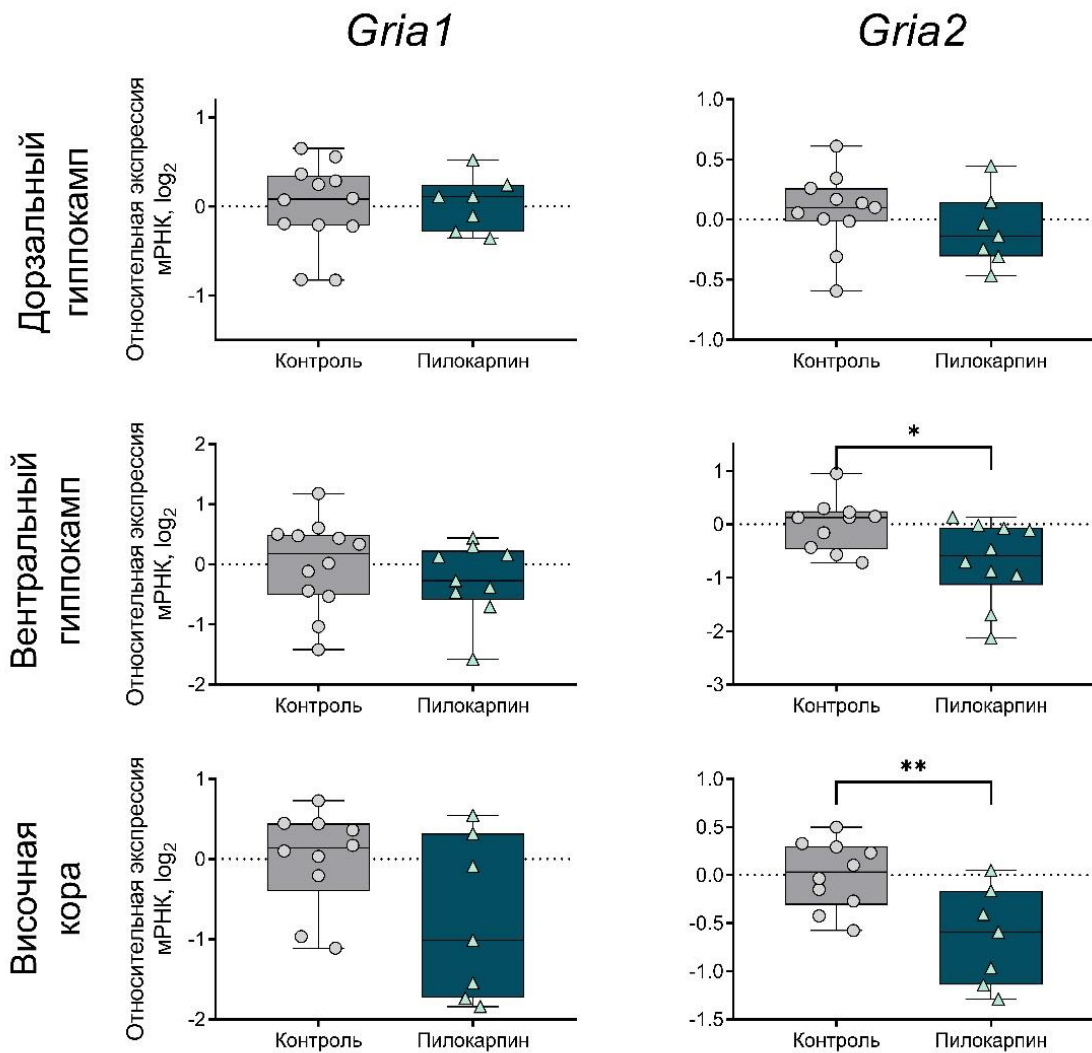


Рисунок 3.17. Относительная экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов глутамата *Gria1* и *Gria2* в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось через два месяца после индукции судорог (хроническая фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – крысы-эпилептики. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Непарный *t*-тест, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$. Количество животных в группах – $n = 7-12$.

Изменение экспрессии GluA2 на уровне мРНК подтверждалось и на уровне белка в височной коре. Снижение продукции мРНК субъединицы GluA2 позволяет предположить увеличение доли кальций-проницаемых AMPA-рецепторов, что, по-видимому, наблюдается в височной коре крыс-эпилептиков в хронической фазе литий-пилокарпиновой модели.

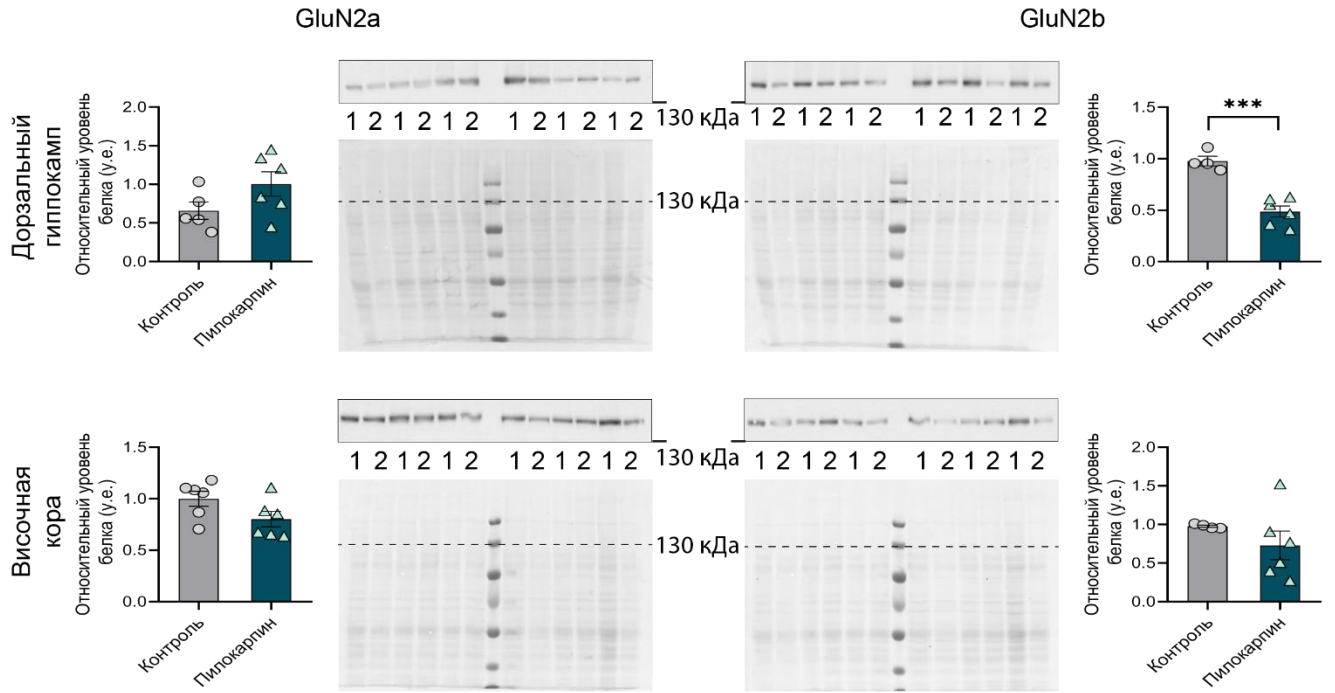


Рисунок 3.18. Относительный уровень белка субъединиц NMDA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и височной коре крыс через 60 дней после пилокарпин-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. Непарный *t*-тест, *** – $p < 0,001$. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа. Количество животных в группах – $n = 4-6$.

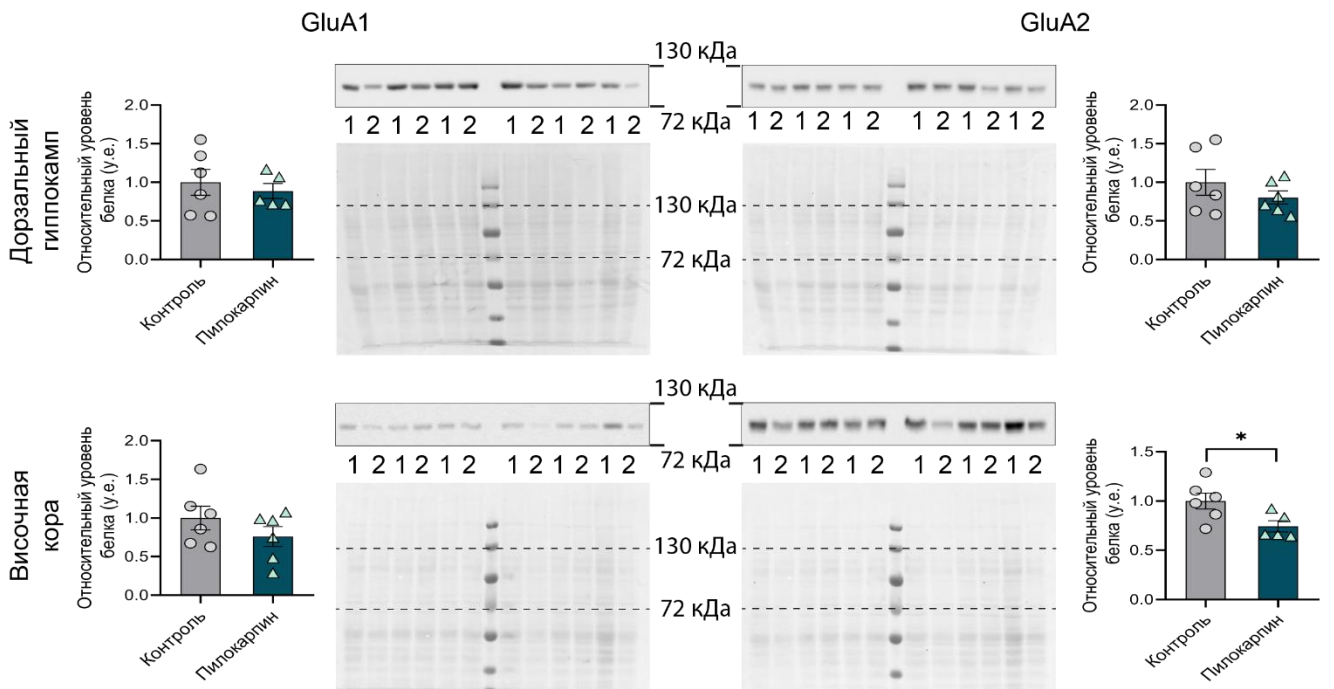


Рисунок 3.19. Относительный уровень белка субъединиц AMPA-рецепторов в дорзальном гиппокампе и височной коре крыс через 60 дней после пилокарпин-индуцированных судорог. Данные на графиках представлены в виде среднего со стандартными ошибками. Непарный *t*-

тест, * – $p < 0,05$. 1 – контрольная группа, 2 – экспериментальная группа. Количество животных в группах – $n = 5-6$.

3.4 Изменение экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс после острых судорог

Мы исследовали изменения экспрессии генов mGluRs I (*Grm1*, *Grm5*), II (*Grm2*, *Grm3*) и III (*Grm7*, *Grm8*) групп в дорзальном и вентральном гиппокампе, а также височной коре на 1, 3 и 7 сутки после ПТЗ-индуцированных судорог.

Острые судороги, вызванные ПТЗ, не привели к выраженным изменениям экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата (Рис. 3.20–3.21). Исключением является ген *Grm1* (Рис. 3.20). Было обнаружено волнообразное изменение его экспрессии: на 3 день после индукции судорог продукция мРНК *Grm1* повышена, а на 7 сутки снижена.

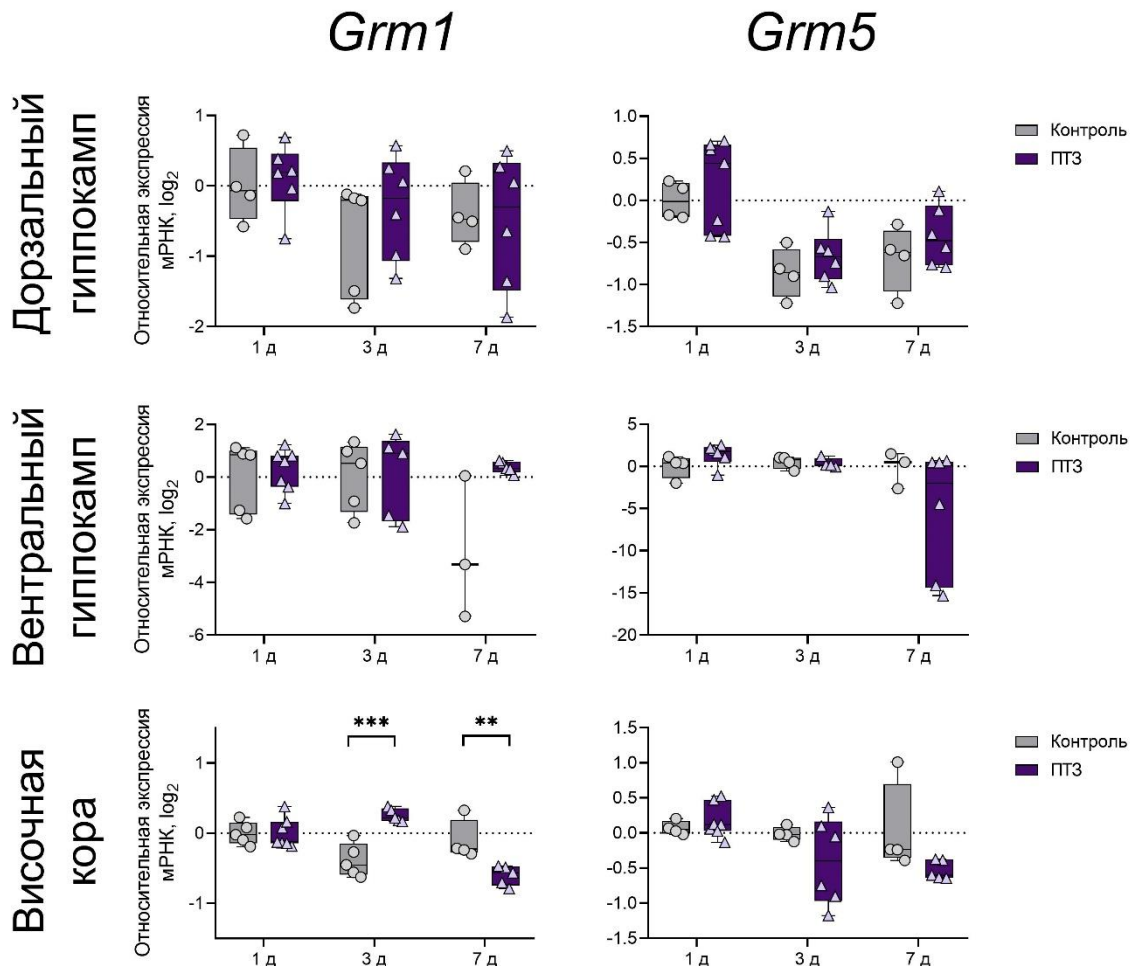


Рисунок 3.20. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов I группы *Grm1* и *Grm5* в височной коре (ТС), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе в пентилентетразоловой модели острых судорог. Исследование проводилось на 1, (1 д), 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог. Контроль – контрольная группа, ПТЗ – экспериментальная

группа. Двухфакторный ANOVA, приведены только статистически значимые эффекты ($p < 0,05$): $Grm1: TC - F_{2,25}$ (судороги \times день анализа) = 20,1, $p < 0,0001$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 4-7$.

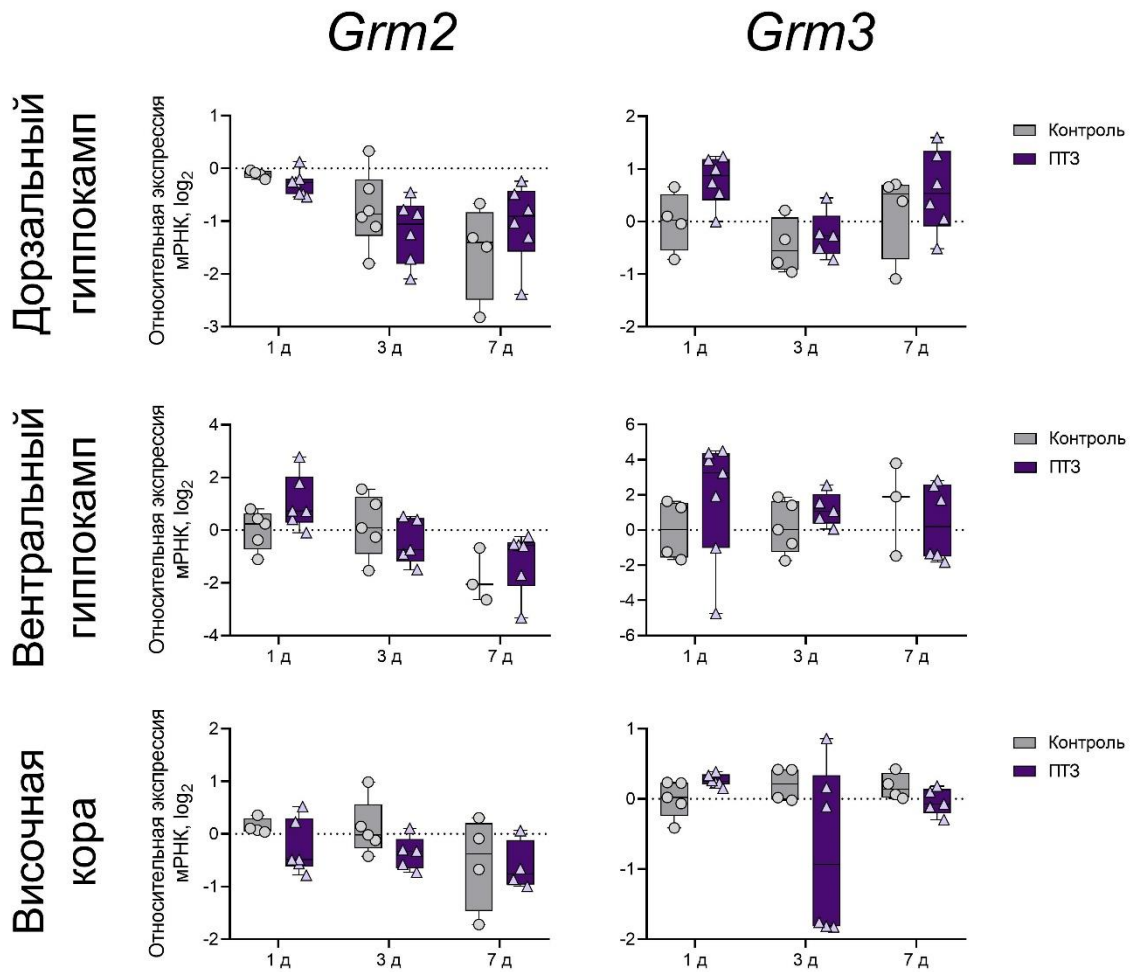


Рисунок 3.21. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов II группы $Grm2$ и $Grm3$ в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в пентилентетразоловой модели острых судорог. Исследование проводилось на 1, (1 д), 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог. Контроль – контрольная группа, ПТЗ – экспериментальная группа. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 4-7$.

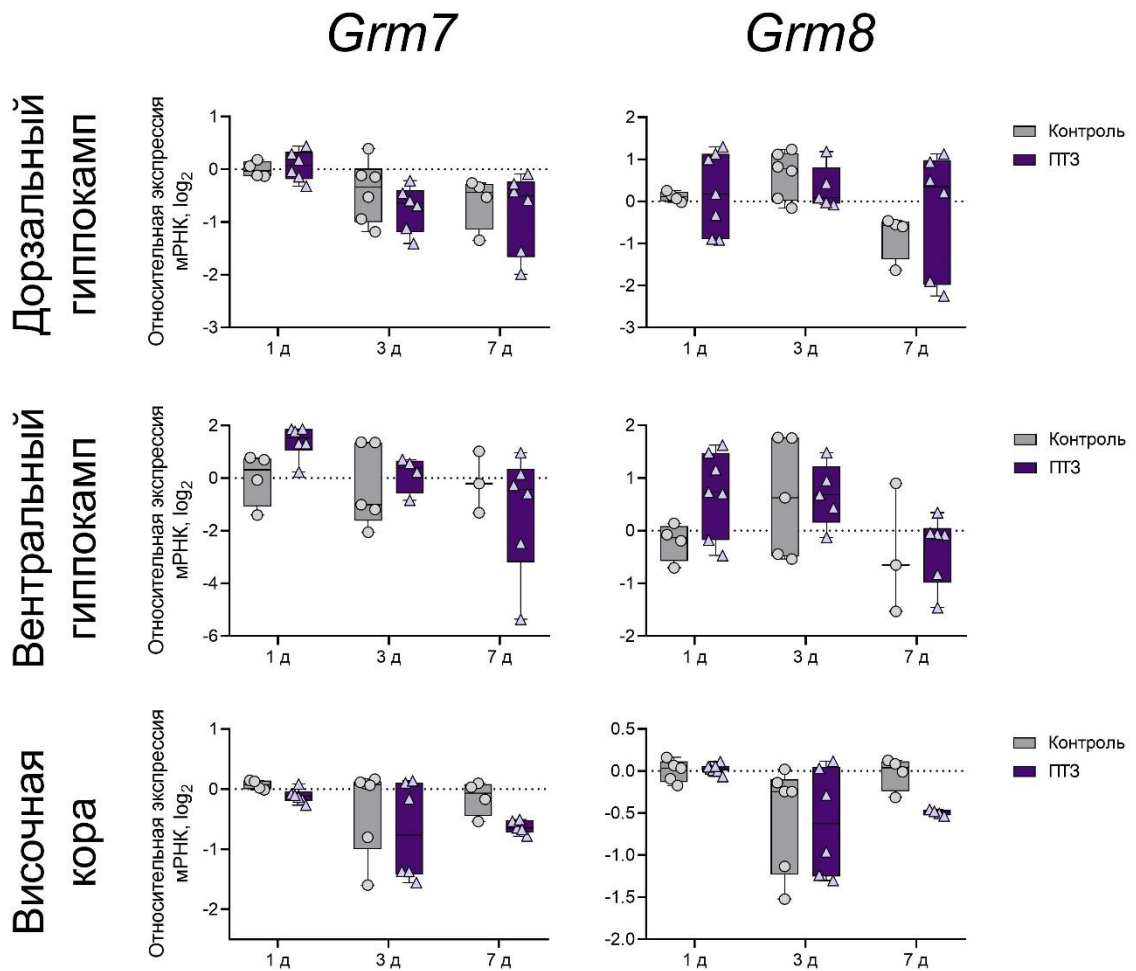


Рисунок 3.22. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов III группы *Grm7* и *Grm8* в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в пентилентетразоловой модели острых судорог. Исследование проводилось на 1, (1 д), 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог. Контроль – контрольная группа, ПТЗ – экспериментальная группа. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 4-7$.

3.5 Изменение экспрессии генов metabotropic receptors glutamate в мозге крыс в модели эпилепсии

Мы проанализировали изменения экспрессии генов mGluRs I (*Grm1*, *Grm5*), II (*Grm2*, *Grm3*) и III (*Grm4*, *Grm7*, *Grm8*) групп в дорзальном и вентральном гиппокампе, а также височной коре в латентную (3 и 7 дни после пилокарпин-индуцированных судорог) и хроническую (60 дней после судорог) фазы литий-пилокарпиновой модели.

3.5.1 Изменение экспрессии генов metabotropic receptors glutamate в мозге крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии

Было обнаружено, что в латентной фазе модели изменения экспрессии генов mGluRs I и III групп были более выражены, чем изменения экспрессии mGluRs II группы (Рис. 3.23–3.25).

В частности, снижение продукции мРНК гена *Grm1* в вентральной области гиппокампа наблюдалось на 3 и 7 дни после судорог (Рис. 3.23). Уровень мРНК гена *Grm5* был повышен в обеих областях гиппокампа на 3 день и только в вентральном гиппокампе на 7 день после индукции судорог.

Судороги, вызванные пилокарпином, повлияли на экспрессию генов *Grm2* и *Grm3* в вентральном гиппокампе и височной коре, однако статистически значимых межгрупповых различий не было выявлено (Рис. 3.24).

Снижение экспрессии генов *Grm4*, *Grm7* и *Grm8* выявлено в височной коре, но только на 3-й день (Рис. 3.25). Снижение уровня мРНК *Grm7* и *Grm8* в дорзальном гиппокампе было обнаружено в обеих временных точках, в то время как в вентральном гиппокампе наблюдалось только снижение экспрессии *Grm7*.

Обнаруженное увеличение продукции мРНК *Grm5* и снижение экспрессии генов mGluRs III группы, вероятно, способствуют эпилептогенезу в латентную фазу модели. В физиологических условиях *Grm5* повышает активность NMDA-рецепторов, и его повышенная экспрессия может способствовать развитию эксайтотоксичности [9]. mGluRs III группы ингибируют выброс нейромедиаторов [9], и значительное снижение их экспрессии в латентной фазе также может способствовать гипервозбуждению. В то же время снижение экспрессии *Grm1* можно рассматривать как компенсаторный механизм.

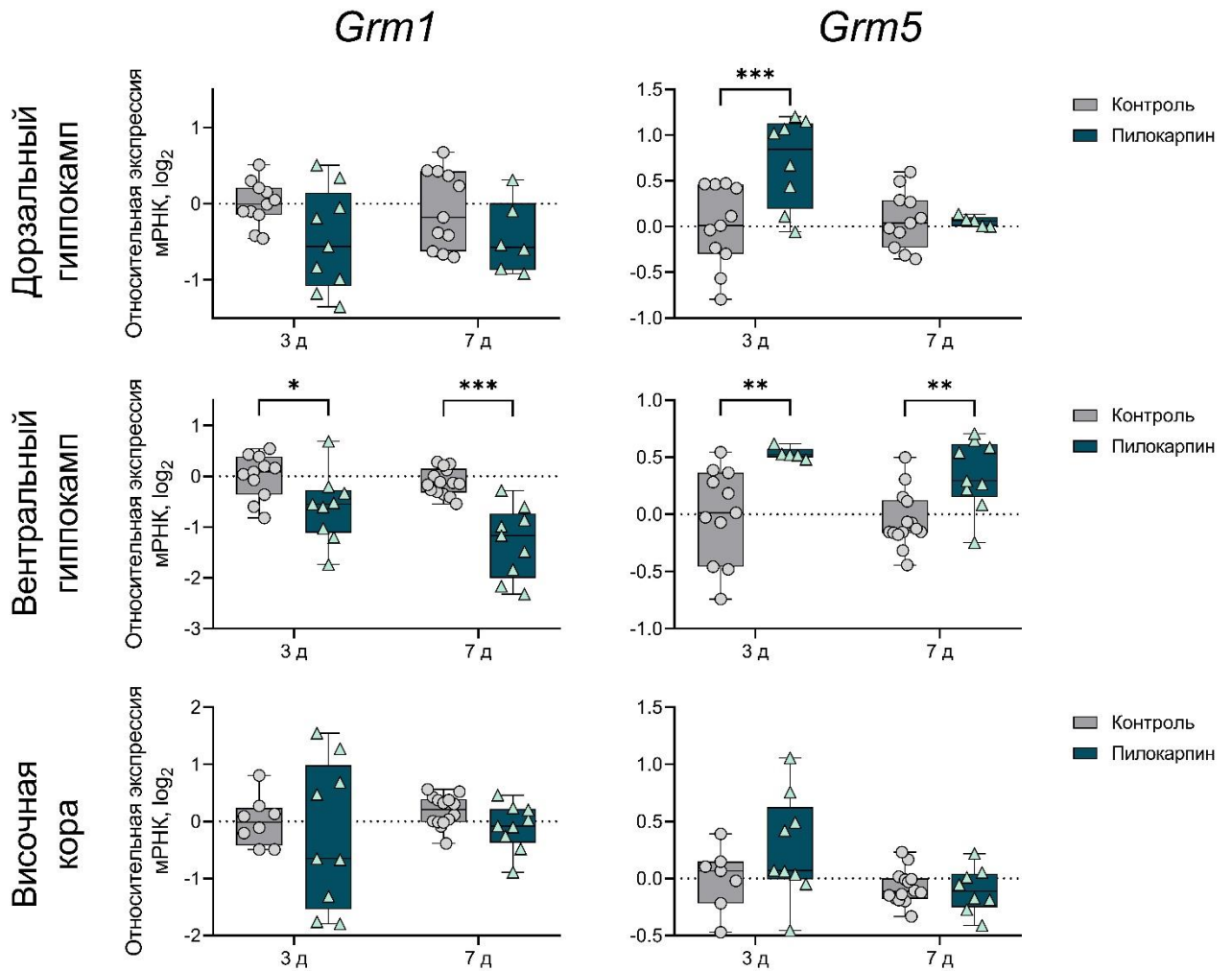


Рисунок 3.23. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов I группы *Grm1* и *Grm5* в височной коре (ТС), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось на 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог (латентная фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA, приведены только статистически значимые эффекты ($p < 0,05$): *Grm1*: VH – $F_{1,39}$ (судороги) = 31,6, $p < 0,001$; *Grm5*: DH – $F_{1,31}$ (судороги × день анализа) = 6,8, $p = 0,01$, $F_{1,31}$ (день анализа) = 4,3, $p = 0,04$, $F_{1,31}$ (судороги) = 6,2, $p = 0,02$; VH – $F_{1,35}$ (приступ) = 19,7, $p < 0,001$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 6-11$.

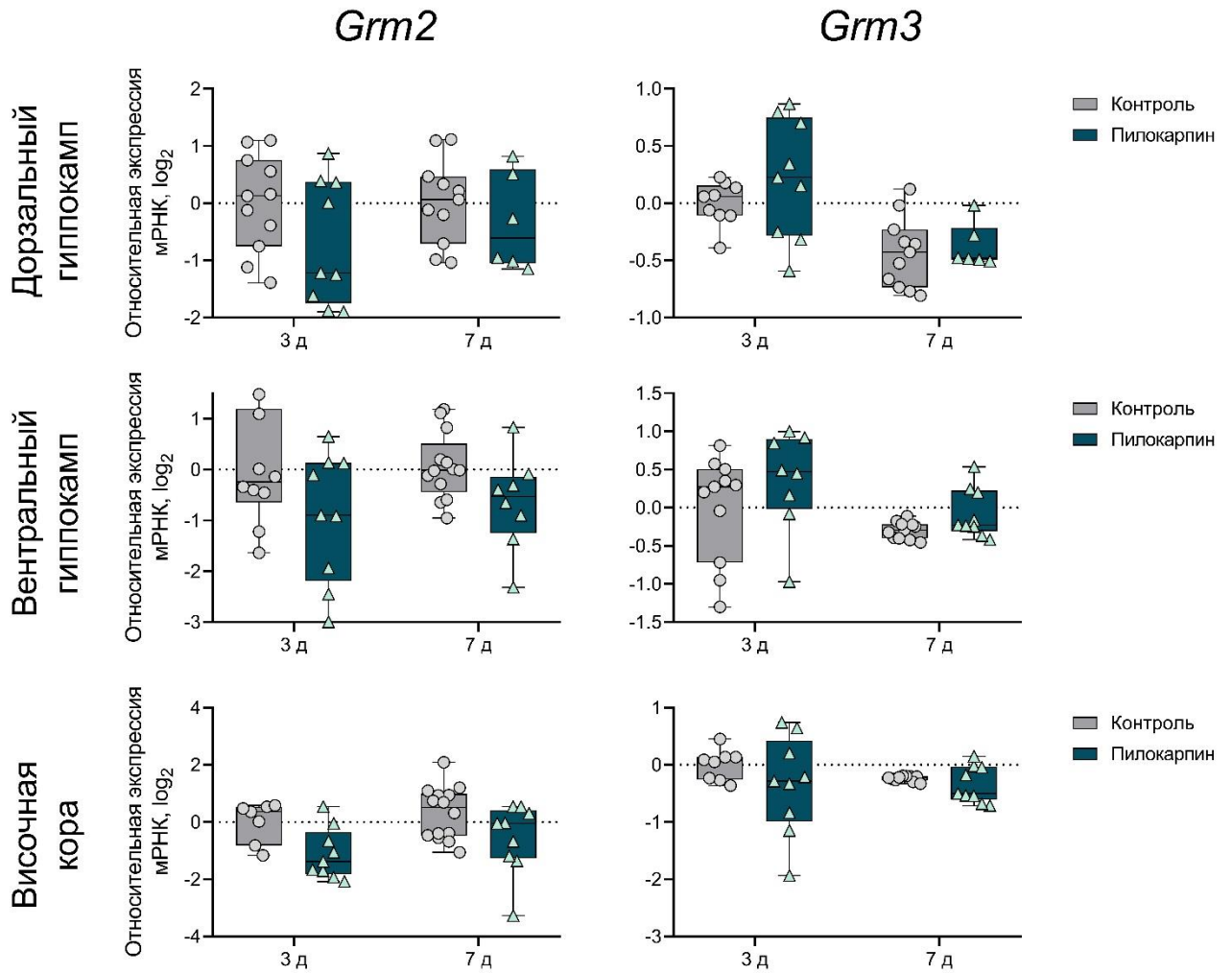


Рисунок 3.24. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов II группы *Grm2* и *Grm3* в височной коре (ТС), дорзальном (ДН) и вентральном (ВН) гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось на 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог (латентная фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA, приведены только статистически значимые эффекты ($p < 0,05$): *Grm2*: ВН – $F_{1,36}$ (судороги) = 6,8, $p = 0,01$; *Grm3*: ДН – $F_{1,31}$ (день анализа) = 18,8, $p < 0,001$; ВН – $F_{1,35}$ (день анализа) = 5,1, $p = 0,03$; ТС – $F_{1,35}$ (судороги) = 9,9, $p = 0,003$. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квантилями. Количество животных в группах – $n = 6-11$.

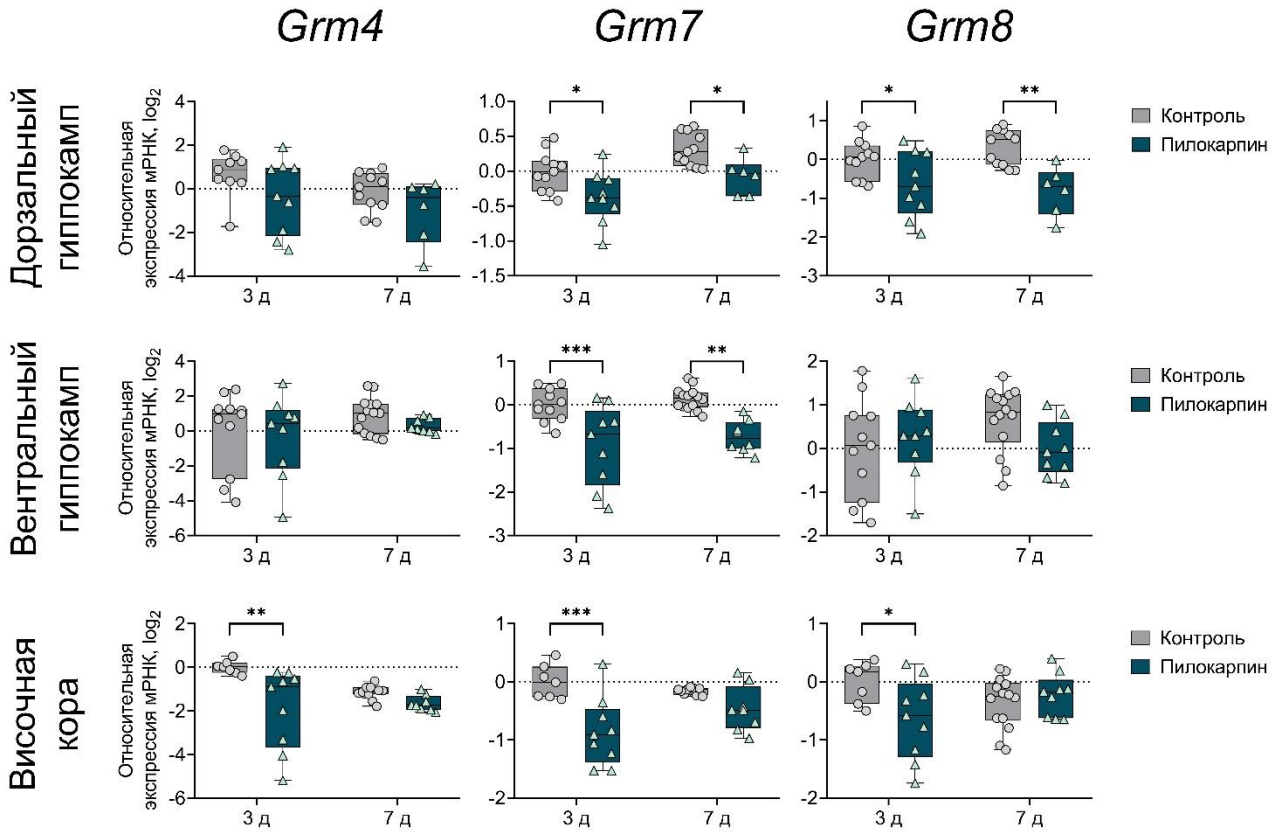


Рисунок 3.25. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов III группы *Grm4*, *Grm7* и *Grm8* в височной коре (TC), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось на 3 (3 д) и 7 (7 д) дни после индукции судорог (латентная фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – экспериментальная группа. Двухфакторный ANOVA, приведены только статистически значимые эффекты ($p < 0,05$): *Grm4*: DH – $F_{1,31}$ (судороги) = 4,8, $p = 0,04$; TC – $F_{1,31}$ (судороги × день анализа) = 4,4, $p = 0,04$, $F_{1,31}$ (судороги) = 12,7, $p = 0,001$; *Grm7*: DH – $F_{1,33}$ (день анализа) = 9,5, $p = 0,004$, $F_{1,33}$ (судороги) = 14,6, $p < 0,001$; VH – $F_{1,38}$ (судороги) = 30,8, $p < 0,001$; TC – $F_{1,29}$ (судороги) = 18,3, $p < 0,001$; *Grm8*: DH – $F_{1,33}$ (судороги) = 18,6, $p < 0,001$; TC – $F_{1,35}$ (судороги × день анализа) = 5,8, $p = 0,02$. Звездочки указывают на значимые различия между группами по данным апостериорного теста Сидака: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Количество животных в группах – $n = 6-11$.

3.5.2 Изменение экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии

Далее мы проанализировали экспрессию генов mGluRs через два месяца после введения пилокарпина. Изменения экспрессии некоторых генов mGluRs наблюдались у животных-эпилептиков как в гиппокампе, так и в височной коре. Однако изменения в экспрессии изученных генов были менее выражены в хронической фазе модели, чем в латентной. Большинство изменений экспрессии, обнаруженных в латентную фазу, отсутствовали на хронической стадии, за исключением *Grm1* и *Grm8*. Более того, мы обнаружили, что экспрессия генов mGluRs II группы изменялась только в хронической фазе.

В частности, снижение экспрессии *Grm1* было отмечено в вентральном гиппокампе и височной коре (Рис. 3.26). Кроме того, в височной коре было обнаружено снижение продукции мРНК гена *Grm5*. Наблюдаемое снижение экспрессии mGluRs I группы может быть компенсаторным механизмом, снижающим возбуждение.

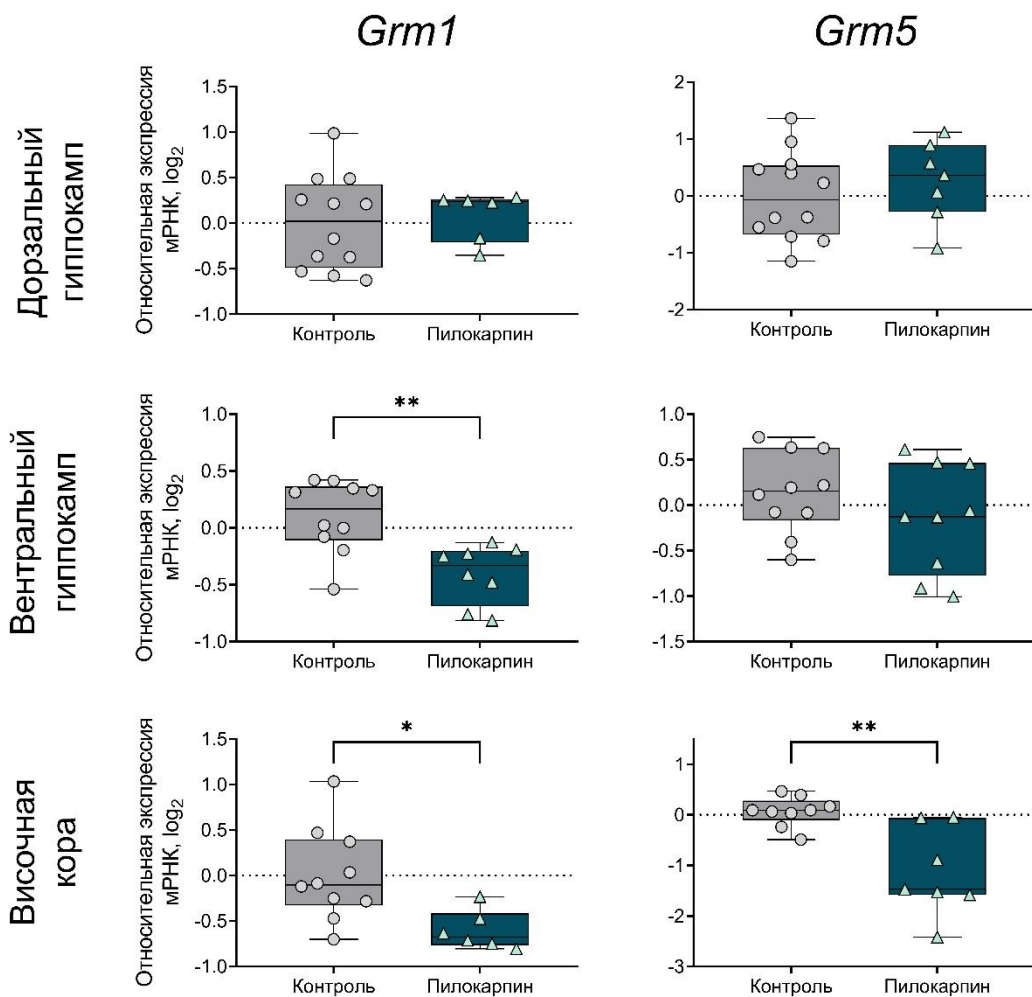


Рисунок 3.26. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов I группы *Grm1* и *Grm5* в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в литий-

пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось через два месяца после индукции судорог (хроническая фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – крысы-эпилептики. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Непарный *t*-тест, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$. Количество животных в группах – $n = 7-12$.

Уровень мРНК *Grm2* в дорзальном гиппокампе был повышен у крыс-эпилептиков (Рис. 3.27). Это изменение, вероятно, является одним из компенсаторных механизмов, которые не проявлялись в латентную фазу (Рис. 3.24). Однако экспрессия гена *Grm3* снижалась в височной коре.

Что касается III группы mGluRs, то в дорзальном и вентральном гиппокампе сохранялась сниженная экспрессия гена *Grm8*, тогда как другие изменения, обнаруженные в латентной фазе, не наблюдались у животных-эпилептиков (Рис. 3.28).

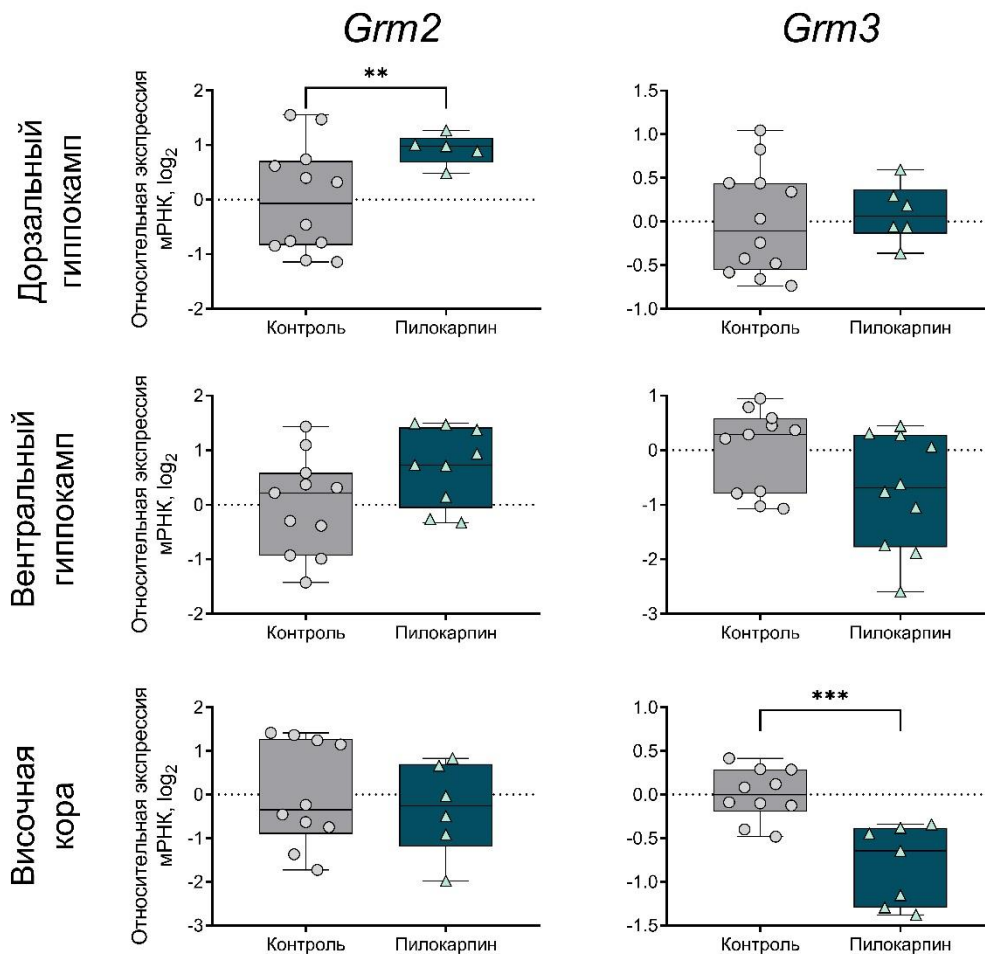


Рисунок 3.27. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов II группы *Grm2* и *Grm3* в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось через два месяца после

индукции судорог (хроническая фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – крысы-эпилептики. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Непарный *t*-тест, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. Количество животных в группах – $n = 7-12$.

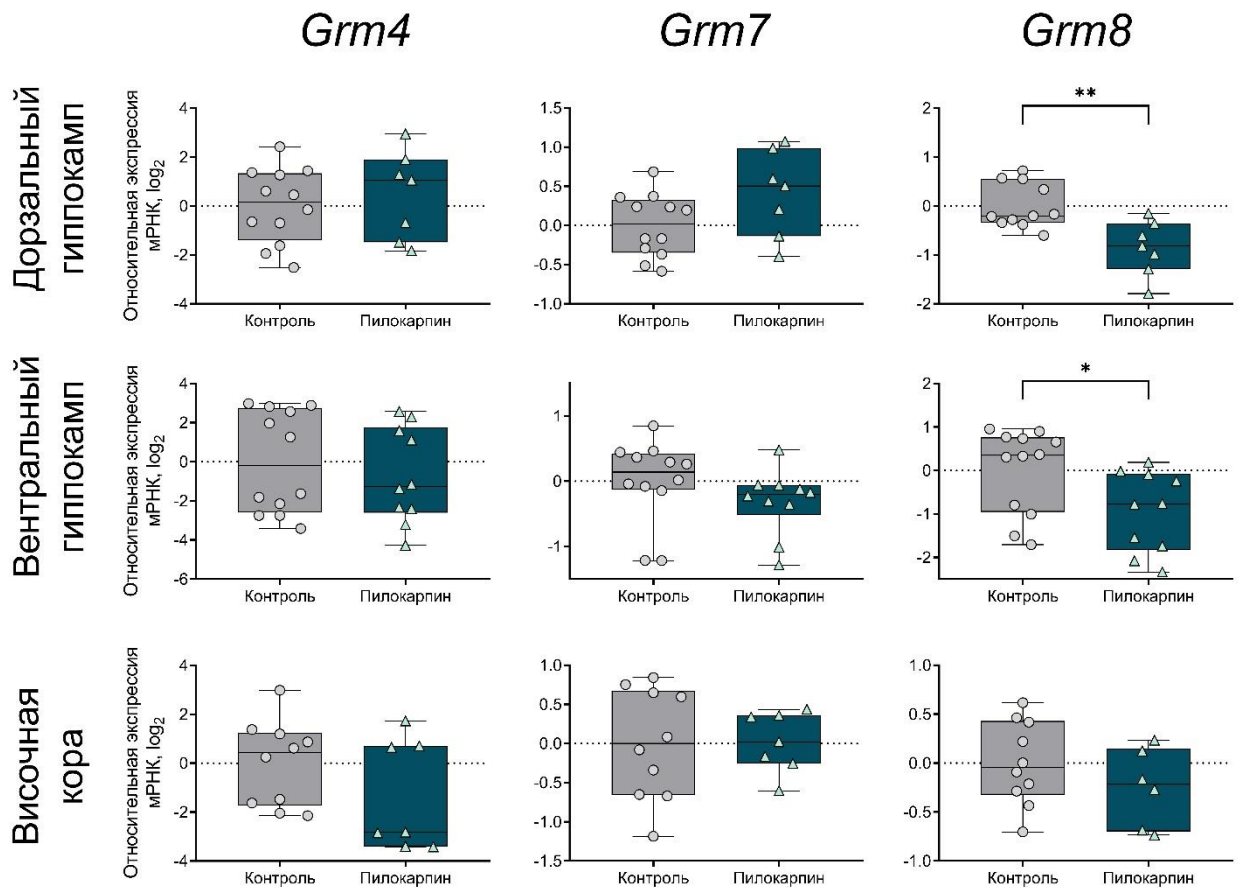


Рисунок 3.28. Относительная экспрессия генов метаботропных глутаматных рецепторов III группы *Grm4*, *Grm7* и *Grm8* в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследование проводилось через два месяца после индукции судорог (хроническая фаза модели). Контроль – контрольная группа, Пилокарпин – крысы-эпилептики. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (усы), медианой выборки (горизонтальная линия) и первым и третьим квартилями. Непарный *t*-тест, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$. Количество животных в группах – $n = 7-12$.

4. Обсуждение

Эпилептические приступы возникают хотя бы один раз у 8-10 % населения, хотя только у 1-2 % пациентов впоследствии развивается эпилепсия [208]. Разработка новых методов лечения эпилепсии и предотвращения развития приобретенной эпилепсии затруднена в связи со слабой изученностью молекулярных механизмов эпилептизации мозга. Предполагается, что нарушение функционирования глутаматергической системы является одним из основных патогенетических механизмов развития эпилепсии [52], поэтому в данной работе мы проанализировали экспрессию генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также височной коре крыс после одного эпизода острых судорог и в модели эпилепсии.

В качестве модели острых судорог была выбрана пентилентетразоловая модель. Пентилентетразол (ПТЗ) является антагонистом ионотропных ГАМК-рецепторов, и его введение смещает баланс между возбуждением и торможением в сторону возбуждения [62]. Внеклеточная концентрация эндогенного глутамата увеличивается в коре и гиппокампе после введения ПТЗ [209, 210]. Отличительной особенностью данной модели является тот факт, что введение пентилентетразола вызывает развитие одиночного эпилептического статуса, который не сопровождается хроническими изменениями в мозге [29, 168].

В качестве модели хронических судорог была использована литий-пилокарпиновая модель. Данная модель наиболее точно воспроизводит патологические изменения, происходящие при развитии хронических эпилептических процессов в мозге у пациентов с височной эпилепсией. Пилокарпин, агонист M1 мускариновых холинергических рецепторов, способствует нарушению баланса между возбуждающей и тормозной нейротрансмиссией, что приводит к эпилептическому статусу (острая фаза модели) [30]. Известно, что после этого механизм поддержания судорог меняется, так как антагонист мускариновых рецепторов атропин не предотвращает дальнейшее развитие судорог [70]. Было установлено, что глутаматергическая система, в частности NMDA-рецепторы, участвует в поддержании судорожных приступов [30, 71, 72]. Это утверждение согласуется с данными о повышении уровня глутамата в гиппокампе после начала судорог [72]. Затем наступает латентная фаза модели, когда судороги не проявляются. После латентного периода, длящегося несколько дней или недель, у животных развиваются спонтанные рецидивирующие судороги (хроническая фаза модели) [30]. Впоследствии у подопытных животных наблюдаются нарушения памяти и поведения [73, 74], которые сопровождаются нейродегенеративными процессами в височной коре, миндалине, гиппокампе и некоторых других областях мозга [30], аналогичными поражениям у пациентов с височной эпилепсией [75].

Впервые в одном исследовании проведен комплексный анализ экспрессии генов ионотропных и метаболитных рецепторов глутамата на моделях острых судорог и эпилепсии. Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР) является важным инструментом для измерения относительной экспрессии генов в различных исследованиях. Для более точной и корректной нормализации данных, полученных этим методом, требуется выбирать стабильно экспрессирующиеся референсные гены [34]. Выбор нестабильных генов домашнего хозяйства в качестве референсных может повлиять на точность количественного определения и привести к противоречивым результатам. Нормализация данных с использованием нестабильно экспрессирующихся референсных генов может скрыть изменения продукции мРНК генов интереса или показать ложные изменения [35–40].

Ранее в нескольких работах исследовалась стабильность экспрессии генов домашнего хозяйства на других животных моделях судорог или эпилепсии: после неонатальных (P10) фебрильных судорог [36]; после короткой (30 мин) и длительной (8 ч) электрической стимуляции перфорантных путей [45]; после системного/интрагиппокампального введения пилокарпина [211]; и в модели височной эпилепсии с использованием каиновой кислоты в качестве конвульсанта [40, 45]. Ни в пентилентетразоловой, ни в литий-пилокарпиновой моделях оценка стабильности генов домашнего хозяйства не проводилась, поэтому в ходе выполнения данного исследования была поставлена задача решить эту проблему. Кроме того, в рамках выполнения данной работы были разработаны мультиплексные системы ПЦР в реальном времени для 9 генов домашнего хозяйства (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*), а также были подобраны и оптимизированы системы для генов интереса.

Следует также отметить, что в ранее проведенных исследованиях при подборе референсных генов анализировали только целый гиппокамп [45, 211] или зубчатую извилину гиппокампа [36]; исключением стало исследование Crans с соавторами (2019) [40], где стабильность экспрессии ряда генов домашнего хозяйства (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*, *Tbp*, *Pgk1*, *Hprt1*, *Gusb*, *Ywhaz*) оценивали в гиппокампальной ткани и неокортексе. Однако точные области коры, которые были проанализированы, в статье не были указаны. Между тем, известно, что судороги поражают различные области мозга [83, 212]. Потеря нейронов и глиоз происходят в определенных областях мозга в зависимости от используемой модели [213–216]. Для каждой использованной нами модели мы анализировали височную кору, дорзальный и вентральный гиппокамп. Эпилептизация также, вероятно, может приводить к изменению временного паттерна экспрессии не только генов интереса, но и референсных генов, в связи с чем в литий-

пилокарпиновой модели мы проводили анализ стабильности экспрессии референсных генов отдельно для латентной и хронической фазы.

Мы обнаружили, что стабильность экспрессии генов домашнего хозяйства менялась в различных структурах. *Actb*, который широко используется в качестве референсного гена согласно обзору Chapman и Waldenström (2015) [175], по нашим данным, нестабилен в обеих областях гиппокампа и височной коре крыс после ПТЗ-индуцированных судорог. В литий-пилокарпиновой модели эпилепсии в латентную фазу *Actb* также демонстрирует низкую стабильность, однако он оказывается высоко стабилен в хроническую фазу в вентральном гиппокампе и височной коре. Другими авторами показано, что на модели эпилепсии с использованием каиновой кислоты, напротив, *Actb* являлся стабильным в период эпилептогенеза и нестабильным в хроническую фазу [45]. Следует отметить, что в данной работе изучался гиппокамп целиком. В модели аутизма, связанной с введением вальпроевой кислоты, *Actb* был одним из самых нестабильных [37]. Аналогичный результат был получен и для модели фебрильных судорог [36].

Gapdh также является часто используемым геном домашнего хозяйства [175]. В нашем исследовании он оказался достаточно стабильным во всех исследованных структурах после ПТЗ-индуцированных судорог. В литий-пилокарпиновой модели эпилепсии в латентную фазу *Gapdh* также стабильно экспрессировался, при этом он оказался нестабильным в хроническую фазу, но только в вентральном гиппокампе и височной коре. Некоторые исследования подтверждают его нестабильную экспрессию в гиппокампе [37, 45]. Поэтому следует избегать использования *Gapdh* и *Actb* для нормализации экспрессии мРНК в качестве отдельных референсных генов в моделях судорог.

Наиболее стабильно экспрессирующимся референсным геном во всех областях мозга, исследованных в нашей работе, для обеих моделей был *Pgk1*. Ранее сообщалось, что продукция мРНК *Pgk1* в гиппокампе также была стабильной в каинатной модели эпилепсии [40]. Несмотря на то, что гены *Gapdh* и *Pgk1* связаны с гликолизом, они демонстрируют различную стабильность экспрессии в вентральной области гиппокампа и височной коре в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели. Значительные различия между стабильностью экспрессии *Gapdh* и *Pgk1* были обнаружены в культуре ткани межпозвоночного диска крысы [217]. Стоит упомянуть, что оба фермента имеют множество неканонических функций помимо гликолиза. Известно, что PGK1 действует как протеинкиназа [218]; GAPDH участвует в апоптозе, репарации ДНК, регуляции транскрипции и сборке ядерных мембран [219]. В гиппокампе мыши после судорог, вызванных каинатом, отмечается повышенная экспрессия белка GAPDH [220]. Поскольку продукты генов *Gapdh* и *Pgk1* различаются по множеству неканонических функций, можно

предположить различие в путях регуляции их экспрессии. Возможно, менее стабильная экспрессия гена *Gapdh* в вентральном гиппокампе и височной коре в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели связана с особенностями изменений, происходящими в мозге при эпилептогенезе. При этом в дорзальной области гиппокампа по-видимому подобных изменений не происходит, так как *Gapdh* в хроническую фазу является самым стабильным в данной структуре.

Ppia, *Hprt1* и *Ywhaz* были довольно стабильны в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии, но не в пентилентетразоловой модели судорог. После ПТЗ-индуцированных судорог только *Ppia* был стабилен в височной коре и дорзальной области гиппокампа, но не в вентральной. Продукция мРНК *Ppia* была стабильной в гиппокампе в модели фебрильных судорог [36] и каинатной модели эпилепсии [45]. Однако экспрессия *Ppia* была нестабильной в гиппокампе после судорог, вызванных стимуляцией перфорантного пути [45], и в пилокарпиновой модели височной эпилепсии [211]. Bonefeld с соавторами изучили стабильность 8 генов домашнего хозяйства и обнаружили, что *Ywhaz* является наиболее стабильным в гиппокампе крыс [180]. В модели аутизма на основе вальпроевой кислоты *Hprt1* был одним из самых стабильных генов [37]. При этом в нашем исследовании *Hprt1* и *Ywhaz* были одними из самых нестабильных во всех областях мозга крыс после ПТЗ-индуцированных судорог.

По итогам проведенного исследования стабильности экспрессии референсных генов были отобраны по 3 самых стабильно экспрессирующихся гена для каждой изучаемой нами структуры мозга в пентилентетразоловой модели, а также в латентную и хроническую фазы литий-пилокарпиновой модели (Таблица 3.1, стр. 57). Полученные нами результаты подчеркивают важность выбора правильной стратегии нормализации при анализе экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР. Эта стратегия должна быть объективной и осуществляться в каждом конкретном эксперименте. Стабильность экспрессии референсных генов следует проверять при проведении экспериментов в новых условиях. Предпочтительно использовать несколько референсных генов для нормализации. Для корректной проверки стабильности требуется не менее 8 референсных генов [41].

Следующим этапом нашей работы было изучение экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата. С использованием стабильно экспрессирующихся генов для каждой структуры мозга в моделях острых судорог и эпилепсии нами были выявлены изменения экспрессии генов рецепторов глутамата, которые могут являться одним из факторов эпилептогенеза, а также были обнаружены специфичные для эпилептического мозга изменения. Полученные данные представлены на сводных таблицах 4.1 и 4.2.

Таблица 4.1. Изменения продукции мРНК и белка ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс после ПТЗ-индуцированных судорог

Метод	Область Ген	Дорзальный гиппокамп			Вентральный гиппокамп			Височная кора		
		1 д	3 д	7 д	1 д	3 д	7 д	1 д	3 д	7 д
ОТ-ПЦР	<i>Grin1</i>								↓	↓
ОТ-ПЦР	<i>Grin2a</i>									
WB	(<i>GluN2a</i>)									
ОТ-ПЦР	<i>Grin2b</i>									
WB	(<i>GluN2b</i>)									
ОТ-ПЦР	<i>Gria1</i>									
WB	(<i>GluA1</i>)									
ОТ-ПЦР	<i>Gria2</i>			↓						
WB	(<i>GluA2</i>)									
ОТ-ПЦР	<i>Grm1</i>		↑	↓						
ОТ-ПЦР	<i>Grm2</i>									
ОТ-ПЦР	<i>Grm3</i>									
ОТ-ПЦР	<i>Grm5</i>									
ОТ-ПЦР	<i>Grm7</i>									
ОТ-ПЦР	<i>Grm8</i>									

Таблица 4.2. Изменения продукции мРНК и белка ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс после пилокарпин-индуцированных судорог

Метод	Область Ген	Дорзальный гиппокамп			Вентральный гиппокамп			Височная кора		
		3 д	7 д	60 д	3 д	7 д	60 д	3 д	7 д	60 д
ОТ-ПЦР	<i>Grin1</i>	↓	↓		↓	↓		↓		
ОТ-ПЦР	<i>Grin2a</i>	↓	↓		↓	↓		↓		
WB	(<i>GluN2a</i>)		↓							
ОТ-ПЦР	<i>Grin2b</i>	↓			↓	↓		↓	↓	↓
WB	(<i>GluN2b</i>)			↓					↓	
ОТ-ПЦР	<i>Gria1</i>	↓			↓	↓		↓	↓	
WB	(<i>GluA1</i>)		↓						↓	
ОТ-ПЦР	<i>Gria2</i>	↓			↓	↓	↓	↓	↓	↓
WB	(<i>GluA2</i>)									↓
ОТ-ПЦР	<i>Grm1</i>				↓	↓	↓			↓
ОТ-ПЦР	<i>Grm2</i>			↑						
ОТ-ПЦР	<i>Grm3</i>									↓
ОТ-ПЦР	<i>Grm4</i>							↓		
ОТ-ПЦР	<i>Grm5</i>	↑			↑	↑				↓
ОТ-ПЦР	<i>Grm7</i>	↓	↓		↓	↓		↓		
ОТ-ПЦР	<i>Grm8</i>	↓	↓	↓			↓	↓		

В нашем исследовании отмечалось снижение экспрессии гена *Grin1* в дорзальном и вентральном гиппокампе в литий-пилокарпиновой модели, а также в височной коре в обеих использованных моделях. Аналогичные данные были получены на образцах гиппокампа больных височной эпилепсией [221]. Изменение экспрессии гена, кодирующего GluN1 субъединицу NMDA-рецепторов, может свидетельствовать об изменении общего числа рецепторов, так как данная субъединица является облигатной [10]. Вероятно, данное изменение является компенсаторным и направлено на уменьшение возбуждения за счет снижения общего количества NMDA-рецепторов.

Подтипы GluN2 субъединиц определяют свойства NMDA-рецепторов. Было показано, что активация GluN2a-содержащих NMDA-рецепторов может способствовать выживанию нейронов и оказывать нейропротекторное действие [202, 222]. Активация GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов, напротив, может приводить к эксайтотоксичности и усилению апоптоза [204, 205].

В нашем исследовании изменения экспрессии генов, кодирующих данные субъединицы, выявлены только в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии (Рис. 3.12). Снижение экспрессии гена *Grin2a* на уровне мРНК и белка было обнаружено в латентную фазу в дорзальной области гиппокампа (Рис. 3.12 и 3.14). Снижение продукции мРНК гена *Grin2a* также наблюдалось в височной коре через 3 дня после индукции судорог. При использовании в качестве конвульсанта 3-меркаптопропионовой кислоты (вводимой однократно в течение 4 дней в дозе 45 мг/кг) в гиппокампе взрослых крыс, напротив, было выявлено увеличение экспрессии гена, кодирующего субъединицу GluN2a [223]. В нашем исследовании анализ в острый период после пилокарпин-индуцированных судорог не проводился, а ПТЗ-индуцированные судороги не приводили к статистически значимым изменениям экспрессии *Grin2a*. Однако, у мышей была обнаружена повышенная экспрессия субъединицы GluN2a в гиппокампе через 1 ч после ПТЗ-индуцированных судорог [201], вероятно, через сутки после судорог эти изменения уже проходят. Кроме того, ранее было показано, что у крыс со сниженной экспрессией субъединицы GluN2a наблюдалась повышенная восприимчивость к судорогам и ухудшение контекстуальной памяти, обусловленной страхом [224]. Вероятно, выявленное нами снижение продукции мРНК *Grin2a* изменение может вносить вклад в эпилептогенез и способствовать развитию неврологических нарушений (ухудшение памяти, ослабление LTP), описанных в различных исследованиях, в том числе выполненных в нашей лаборатории [74, 138, 225, 226].

Уменьшение экспрессии гена *Grin2b* выявлено нами во всех исследованных структурах мозга в латентную фазу и в височной коре в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии (Рис. 3.12 и 3.16). Данное изменение, вероятно, может представлять собой один из компенсаторных механизмов, направленных на снижение эксайтотоксичности. Однако, следует

отметить, что при развитии хронических эпилептических процессов наблюдается увеличение экспрессии субъединицы GluN2b в клетках головного мозга. Так, для пациентов с хронической эпилепсией характерно повышение уровня мРНК этой субъединицы в головном мозге [17]. В пилокарпиновой модели без введения лития в хронической фазе также выявлено повышение уровня мРНК GluN2b субъединицы в гиппокампе крыс [163].

Изменения экспрессии генов, кодирующих GluA1 и GluA2 субъединицы AMPA-рецепторов, могут приводить к нарушению таких процессов, как формирование долговременных потенциации и депрессии (LTP и LTD). В нашем исследовании выявлено снижение продукции мРНК GluA1 в обеих областях гиппокампа и височной коре в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели (Рис. 3.13). В височной коре данное изменение подтверждалось на уровне белка (Рис. 3.15). Ранее Sears с соавторами (2019) в модели ПТЗ-киндлинга на мышах в коре также показали уменьшение уровня мРНК данной субъединицы [227]. Схожие результаты были получены другими исследователями в острую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии [83, 228]. Так как GluA1 субъединица играет важную роль в индукции LTP [134], снижение экспрессии *Gria1* может являться одним из факторов нарушений памяти и поведения крыс в моделях эпилепсии [74].

Изменения экспрессии гена GluA2 субъединицы в литий-пилокарпиновой модели наблюдались в латентную фазу во всех исследованных структурах мозга (Рис. 3.13), а в хроническую фазу — в вентральной области гиппокампа и височной коре (Рис. 3.17). Анализ методом вестерн блоттинга также показал снижение уровня белка GluA2 субъединицы в височной коре в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели (Рис. 3.19). Продукция мРНК *Gria2* также была снижена через 7 дней после ПТЗ-индуцированных судорог в дорзальной области гиппокампа, однако это не сопровождалось изменением на уровне белка. Дополнительно проведенное нами исследование уровня белка GluA2 в дорзальной области гиппокампа через 30 дней после ПТЗ-индуцированных судорог изменений не выявило. Литературные данные об экспрессии GluA2 в моделях судорожных состояний противоречивы. Снижение экспрессии гена субъединицы GluA2 в различных областях мозга также наблюдалось в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии у крыс [83]. Напротив, Russo с соавторами (2013) продемонстрировали усиленную продукцию белка субъединицы GluA2 в гиппокампе через 3 ч после введения пилокарпина [228]. Противоречия в этих данных можно объяснить разными сроками тестирования и разным возрастом использованных животных. Кроме того, известно, что роль GluA2-содержащих AMPA-рецепторов в индукции судорожных состояний меняется в ходе онтогенеза [229]. Выявленное нами снижение экспрессии данной субъединицы позволяет предполагать увеличение доли Ca²⁺-проницаемых AMPA-рецепторов, которые способствуют

повышенному поступлению ионов Ca^{2+} в клетку, что является одним из механизмов повреждения нейронов [206, 207].

При использовании моделей судорог без введения химических конвульсантов, например, в модели гипоксических судорог было показано увеличение фосфорилирования GluN2a в гиппокампе [19]. Неонатальные судороги, вызванные гипоксией, также изменяют экспрессию субъединицы GluA2 в гиппокампе крыс [230]. В частности, они приводят к снижению экспрессии субъединицы GluA2, что соответствует полученным нами данным. В генетической животной модели абсансной эпилепсии (крысы WAG/Rij) снижение уровня субъединицы GluN2b было показано в различных областях мозга, включая гиппокамп [231]. В случае другой генетической модели с двигательными нарушениями (модель кататонии) экспрессия генов рецепторов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов не изменилась [232]. Учитывая эти литературные данные, мы предполагаем, что изменения экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, полученные в нашем исследовании не связаны со специфичным действием определенных конвульсантов, а скорее являются результатом эпилептической активности.

В данной работе мы также проанализировали экспрессию генов I (*Grm1*, *Grm5*), II (*Grm2*, *Grm3*) и III (*Grm4*, *Grm7*, *Grm8*) групп метаботропных рецепторов глутамата (mGluRs) в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также височной коре через 3, 7 и 60 дней после пилокарпин-индуцированных судорог и через 1, 3 и 7 дней после ПТЗ-индуцированных судорог.

Острые судороги, вызванные ПТЗ, приводили к волнообразному изменению экспрессии гена *Grm1*: на 3 день после индукции судорог продукция мРНК *Grm1* повышена, а на 7 сутки снижена (Рис. 3.20). Ранее Постниковой с соавторами (2019) была выявлена схожая волнообразная динамика при изучении роли mGluR1 при формировании долговременной потенциации (LTP) у животных, перенесших ПТЗ-индуцированные судороги. Авторы показали, что после ПТЗ-индуцированных судорог происходит переключение LTP на mGluR1-зависимую форму. Восстановление NMDA-зависимого типа LTP произошло через 7 дней после индукции судорог [138]. Экспрессия остальных генов mGluRs после ПТЗ-индуцированных судорог оставалась неизменной.

Изменения экспрессии генов mGluRs различаются в латентной и хронической фазах литий-пилокарпиновой модели эпилепсии (Рис. 3.23–3.28). Изменения продукции мРНК генов I и III групп mGluRs, выявленные в латентную фазу, могут способствовать эпилептогенезу. В частности, было обнаружено, что экспрессия гена *Grm5* повышена в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, но не в височной коре. Этот результат соответствует данным, полученным. Этот результат совпадает с данными, полученными Aronica с соавторами с помощью

иммуногистохимических методов у крыс после судорог, вызванных электрической стимуляцией [26]. Клинические исследования также показывают, что пациенты с височной эпилепсией также имеют повышенную иммунореактивность к mGluR5 [233] и увеличенный уровень белка данного рецептора [234] в гиппокампе. Напротив, в другом исследовании, проведенном на крысах Вистар с использованием пилокарпина, вызвавшего эпилептический статус, было обнаружено снижение экспрессии mGluR5 на уровнях мРНК и белка [235]. Различия в полученных результатах могут быть обусловлены разным возрастом животных и протоколом индукции судорог.

В хронической фазе модели показатели экспрессии генов mGluRs I группы вернулись к контрольным значениям в гиппокампе, в то время как экспрессия генов данной группы (*Grm1* и *Grm5*) была снижена в височной коре. Вероятно, это один из компенсаторных механизмов, направленных на снижение возбуждения в хронической фазе данной модели.

Мы не обнаружили изменений в экспрессии генов mGluRs II группы во время латентной фазы. Исследование Garrido-Sanabria с соавторами показало снижение экспрессии mGluR2 и mGluR3 в гиппокампе и коре головного мозга в пилокарпиновой модели через 24 ч после индукции судорог [28]. Мы не анализировали экспрессию генов mGluRs в острой фазе; возможно, к третьему дню эти изменения уже не выявляются. В исследовании на крысах, в котором судороги вызывались электрической стимуляцией, было обнаружено повышение уровня белка mGluR2/3 в гиппокампе через неделю после судорог, которое сохранялось до 3 месяцев [26]. Хотя мы не обнаружили подобных изменений в уровне мРНК во время латентной фазы, увеличение экспрессии гена *Grm2* было выявлено в дорзальном гиппокампе во время хронической фазы у эпилептических животных. Напротив, в височной коре в хронической фазе модели наблюдалось снижение экспрессии гена, кодирующего mGluR3.

Экспрессия генов mGluRs III группы (*Grm4*, *Grm7*, *Grm8*) была значительно снижена во всех исследованных областях мозга в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели (Рис. 3.25). На пилокарпиновой модели было показано снижение уровня мРНК *Grm4* в гиппокампе крыс [236], однако в нашей работе снижение экспрессии гена *Grm4* было обнаружено только в височной коре. У мышей с нокаутом mGluR4 показано значительное увеличение тяжести пилокарпин-индуцированных судорог [237]. Возможно, снижение экспрессии гена *Grm4*, которое мы выявили во время латентной фазы в височной коре, является значимым фактором, способствующим эпилептогенезу. Основной функцией всех представителей III группы mGluRs является ингибирование высвобождения нейротрансмиттеров [9], в связи с чем уменьшение продукции мРНК данных рецепторов может приводить к недостаточности тормозных процессов. Поэтому, вероятно, снижение экспрессии генов *Grm7* и *Grm8*, которое было обнаружено во всех исследованных областях в латентную фазу, также может способствовать эпилептизации мозга. В

хроническую фазу отмечается снижение экспрессии только гена *Grm8* в обеих областях гиппокампа.

Изменения экспрессии генов играют существенную роль в определении большинства изменений уровней белка [238]. Несоответствие между изменениями уровней мРНК и белка может быть обнаружено при различных патологических состояниях, в зависимости как от времени анализа, так и от метода определения [239]. Для mGluRs в данной работе анализ был проведен только на уровне мРНК. Сравнение наших данных о продукции мРНК mGluRs с данными, полученными другими авторами, показало, что уровни мРНК и белка меняются однонаправленно, однако временной паттерн экспрессии может быть различным. Например, в работе Agonics с соавторами уровень белка mGluR2/3 был повышен через неделю после судорог и оставался повышенным через 3 месяца [26]. В нашем исследовании увеличение экспрессии гена mGluR2 наблюдалось только в хронической фазе. Это указывает на важность дополнительных исследований по оценке экспрессии белков для лучшего понимания изменений, происходящих с mGluRs во время эпилептогенеза.

Таким образом, эпилептогенез связан с нарушениями в глутаматергической системе [240], что подтверждается и в настоящей работе. Несмотря на важную роль, которую эта система играет в патогенезе эпилепсии, лиганды ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата редко используются в клинике. Только один препарат, снижающий возбуждение путем специфического воздействия на AMPA-рецепторы (перампанел) в настоящее время применяется для лечения фокальной эпилепсии [8]. Это связано с тем, что длительная фармакологическая блокада NMDA-рецепторов может вызвать устойчивое угнетение синаптической передачи и нарушение синаптической пластичности, что в свою очередь может привести к когнитивным дисфункциям [9].

Использование лигандов mGluRs для лечения эпилепсии может быть более перспективным подходом, однако, изменения, происходящие с mGluRs в процессе эпилептогенеза, мало изучены. Наше исследование позволило раскрыть некоторые ранее неизученные аспекты изменения экспрессии генов mGluRs в период эпилептизации мозга. Полученные данные могут быть использованы для выбора наиболее эффективной терапии [241] и профилактики эпилепсии у людей с повышенным риском развития этого заболевания. Применение лигандов mGluRs давно рассматривается как перспективное направление терапии эпилепсии [242]. Так, в моделях эпилепсии было показано, что антагонисты mGluRs I группы МРЕР и МТЕР обладают нейропротекторным эффектом [243, 244]. Исследование, ранее выполненное в нашей лаборатории, также продемонстрировало аналогичный эффект МТЕР, но использование данного антагониста не предотвращало эпилептизацию мозга [245]. Другими авторами показано, что

применение агониста mGluR5 способствовало функциональному восстановлению после травмы мозга и снижению нейровоспаления при эпилепсии [246, 247].

Эффекты модуляции mGluRs II и III групп изучены в меньшей степени. В культуре корковых нейронов мыши было показано, что положительная модуляция mGluR4 с помощью РНССС оказывает нейропротекторный эффект при токсическом воздействии бета-амилоидного пептида и NMDA, особенно при одновременном использовании антагониста mGluR1 [248]. Однако тот же позитивный аллостерический модулятор продемонстрировал проконвульсивный эффект в моделях ПТЗ-индуцированных судорог [249].

Сверхэкспрессия mGluR7 уменьшала тяжесть припадков при эпилепсии, вызванной каинатом, в то время как антагонист mGluR7 усилил судороги в данной модели [250]. Кроме того, AMN082, аллостерический агонист mGluR7, оказывал нейропротекторное и глиопротекторное действие в культурах клеток глии, нейронов и нейронов-глии после различных вредных стимулов (воздействие таких веществ, как стауроспорин и доксорубицин) [165]. Положительный эффект от использования агониста этого рецептора, LSP2-9166, также был подтвержден Girard с коллегами (2019) на модели пентилентетразолового kindlinga [166]. Так как в нашем исследовании отмечается сниженная экспрессия гена, кодирующего mGluR7, в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели, применение агониста данного рецептора может быть перспективным для предотвращения эпилептизации мозга.

Таким образом, проведенное исследование расширяет наши знания об изменениях, происходящих с ионотропными и метаботропными рецепторами глутамата, после острых ПТЗ-индуцированных судорог и на разных стадиях эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Изменения экспрессии исследованных генов в этих моделях различались, что свидетельствует о разных молекулярно-клеточных механизмах развития этих патологических состояний. Согласно нашим результатам, применение агонистов mGluRs III группы в сочетании с другими фармакологическими агентами может быть перспективным подходом к профилактике эпилепсии.

Выводы

1. С помощью разработанных мультиплексных тест-систем была проверена стабильность экспрессии 9 генов домашнего хозяйства (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) в височной коре, дорзальной и вентральной областях гиппокампа крыс в пентилентетразоловой модели острых судорог и литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Показатели стабильности экспрессии референсных генов зависели от вида модели, области мозга, а также различались в латентную и хроническую фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Наиболее стабильно экспрессирующимся геном во всех областях мозга, исследованных в нашей работе, для обеих моделей был ген *Pgk1*.

2. Впервые на модели острых судорог проведено комплексное исследование изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата. Экспрессия гена *Grm1* I группы метаботропных рецепторов глутамата в височной коре изменялась волнообразно: она повышалась на 3-й день и снижалась на 7-й день после судорог. Снижение экспрессии генов субъединиц GluN1 NMDA-рецепторов в височной коре и GluA2 AMPA-рецепторов в дорзальной области гиппокампа выявлено на уровне мРНК, но не белка. Изменения носили краткосрочный характер и не выявлялись через месяц после пентилентетразол-индуцированных судорог.

3. В литий-пилокарпиновой модели изменения носили более выраженный характер. В период эпилептогенеза (латентная фаза модели) экспрессия генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата снижалась на уровнях мРНК и белка во всех исследованных структурах мозга. Экспрессия генов метаботропных рецепторов глутамата III группы была понижена, а изменения продукции мРНК различных представителей метаботропных рецепторов I группы (*Grm1* и *Grm5*) в вентральном гиппокампе носили разнонаправленный характер.

4. При височной эпилепсии (хроническая фаза литий-пилокарпиновой модели) продукция мРНК и белка субъединиц ионотропных рецепторов GluN2b и GluA2 оставалась пониженной в височной коре и в вентральном, но не дорзальном, гиппокампе. При этом, сохранялось снижение экспрессии генов *Grm1* (I группа) и *Grm8* (III группа), и появлялись разнонаправленные изменения экспрессии генов рецепторов II группы: *Grm2* (повышение) и *Grm3* (понижение).

Заключение

В ходе выполнения диссертационной работы разработан набор тест-систем для мультиплексного определения относительного уровня мРНК нескольких генов домашнего хозяйства (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*), который может быть использован для поиска стабильно экспрессируемых генов в тканях/клеточных линиях крыс в любых экспериментальных условиях. Основными преимуществами данной системы перед широко используемыми одиночными системами (одна мишень в одной реакции) являются более высокая производительность при экономии времени, образцов и расходных материалов для ПЦР. Данная система может быть применена при решении широкого диапазона исследовательских задач с использованием количественной ОТ-ПЦР в фундаментальных и поисковых биомедицинских исследованиях. Кроме того, были разработаны и оптимизированы мультиплексные системы для анализа экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также метаботропных рецепторов глутамата, которые могут применяться другими исследователями при изучении нарушений функционирования глутаматергической системы.

Впервые в одном исследовании проведен комплексный анализ изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата на моделях острых судорог и эпилепсии. Обнаружено, что в модели острых судорог изменения экспрессии генов рецепторов глутамата были выражены значительно слабее, чем в литий-пилокарпиновой модели. Существенные изменения, выявленные в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели, могут вносить вклад в эпилептогенез. В частности, обнаруженное в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели снижение экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата III группы в височной коре наряду с увеличением продукции мРНК *Grm5* I группы и подавлением экспрессии генов *Grm7* и *Grm8* III группы в гиппокампе могут вносить существенный вклад в эпилептизацию мозга. Снижение экспрессии гена *Grin2a* NMDA-рецепторов также может являться одним из факторов эпилептогенеза, в то время как уменьшение экспрессии генов *Grin1* и *Grin2b* NMDA-рецепторов и *Grm1* I группы метаботропных рецепторов глутамата носит компенсаторный характер.

В хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии у крыс с выраженными спонтанными судорогами сохраняются некоторые наблюдаемые в латентную фазу изменения экспрессии генов глутаматных рецепторов, кроме того, развиваются специфические нарушения, характерные только для хронического периода модели. В частности, только в хроническую фазу было обнаружено разнонаправленное изменение экспрессии метаботропных рецепторов глутамата II группы (*Grm2*, *Grm3*) и снижение продукции мРНК рецепторов I (*Grm1*, *Grm5*) и III (*Grm8*) групп. Эти изменения затрагивали все исследованные структуры мозга. Выявленное повышение экспрессии гена *Grm2* и снижение продукции мРНК метаботропных рецепторов I

группы, вероятно, направлены на снижение избыточного возбуждения и являются компенсаторными, в то время как снижение экспрессии генов *Grm3* и *Grm8* может быть одной из характерных особенностей эпилептического мозга.

Данные, полученные в настоящем исследовании, углубляют понимание патологических изменений, происходящих в глутаматергической системе мозга, в процессе эпилептогенеза. Они могут быть использованы для разработки новых методов лечения эпилепсии, в частности, использование агонистов метаботропных рецепторов III группы в сочетании с другими фармакологическими агентами может быть перспективным подходом к предотвращению развития эпилепсии.

Список сокращений

АТФ	Аденозинтрифосфат	
БСА	Бычий сывороточный альбумин	
ГАМК	Гамма-аминомасляная кислота	
ГДФ	Гуанозидифосфат	
ГТФ	Гуанозинтрифосфат	
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота	
кДНК	комплементарная ДНК	
мРНК	матричная РНК	
ОТ	Обратная транскрипция	
ПТЗ	Пентилентетразол	
ПЦР	Полимеразная цепная реакция	
РНК	Рибонуклеиновая кислота	
СРС	Спонтанные рецидивизирующие судороги	
цАМФ	Циклический аденозинмонофосфат	
цГМФ	Циклический гуанозинмонофосфат	
ЦНС	Центральная нервная система	
ABD	Agonist-binding domain	Агонист-связывающий домен
ACPD	1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid	1-аминоциклопентан-1,3- дикарбоновая кислота
ACPT-1	1-aminocyclopentane-1,3,4-tricarboxylic acid	1-аминоциклопентан-1,3,4- трикарбоновая кислота
<i>Actb</i>	Actin beta	Бета-актин
AMN082	N,N'-dibenzhydriethane-1,2-diamine	N,N'-дибензгидрилэтан-1,2-диамин
АМРА	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic acid	α -амино-3-гидрокси-5-метил-4- изоксазолпропионовая кислота
APDC	(2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid	(2R,4R)-4-аминопирролидин-2,4- дикарбоновая кислота
4-APPEP	N-[4-(4-carboxamidophenoxy)phenyl]-N-(3- pyridinylmethyl)-ethanesulphonamide hydrochloride monohydrate	N-[4-(4- карбоксамидофенокси)фенил]-N-(3- пиридинилметил)- этансульфонамид гидрохлорид моногидрат
<i>B2m</i>	Beta-2-microglobulin	Бета-2-микроглобулин

BRET	Bioluminescence resonance energy transfer	Биолюминесцентный резонансный перенос энергии
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase	Ca ²⁺ /кальмодулин-зависимая протеинкиназа II
CBiPES	N-[4'-cyanobiphenyl-3-yl)-N-(3-pyridylmethyl)-ethanesulphonamide hydrochloride	N-[4'-цианобифенил-3-ил)-N-(3-пиридилметил)-этансульфонамид гидрохлорид
CHPG	2-chloro-5-hydroxyphenylglycine	2-хлор-5-гидроксифенилглицин
CPPG	2-amino-2-cyclopropyl-2-(4-phosphonophenyl)acetic acid	2-амино-2-циклопропил-2-(4-фосфонофенил)уксусная кислота
CTD	Carboxyl-terminal domain	C-концевой домен
CRD	Cysteine-rich domain	Цистеин-богатый домен
DAG	Diacylglycerol	Диацилглицерол
DCG-IV	(1R,2R)-3-[(S)-amino(carboxy)methyl]cyclopropane-1,2-dicarboxylic acid	(1R,2R)-3-[(S)-амино(карбоксиметил)циклопропан-1,2-дикарбоновая кислота
3,4-	3,4-dicarboxyphenylglycine	3,4-дикарбоксифенилглицин
DCPG		
DHPG	Dihydroxyphenylglycine	Дигидроксифенилглицин
FVT	Venus flytrap domain	
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
GPCR	G-protein-coupled receptor	Рецептор, сопряженный с G-белком
<i>Grin1</i> (GluN1)	Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1	1 субъединица ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов
<i>Grin2a</i> (GluN2a)	Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2a	2a субъединица ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов
<i>Grin2b</i> (GluN2b)	Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2b	2b субъединица ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов
<i>Gria1</i> (GluA1)	Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1	1 субъединица ионотропных глутаматных AMPA-рецепторов
<i>Gria2</i> (GluA2)	Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2	2 субъединица ионотропных глутаматных AMPA-рецепторов

<i>Grm(1-8)</i> (mGluR1-8)	Glutamate metabotropic receptor (1-8)	Метаботропный глутаматный рецептор (1-8)
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза 1
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphate	Инозитол-1,4,5-трифосфат
L-AP4	(2S)-2-amino-4-phosphonobutanoic acid	(2S)-2-амино-4-фосфонобутановая кислота
L-SOP	O-phospho-L-serine	О-фосфо-L-серин
LSP2-9166	(2S)-2-amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-(trifluoromethoxy)phenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl) butanoic acid	(2S)-2-амино-4-(((4-(карбоксиметокси)-3-(трифторметокси)фенил)(гидрокси)метил)(гидрокси)фосфорил)бутаноиновая кислота
LSP4-2022	[((3S)-3-amino-3-carboxy)propyl][(4-(carboxymethoxy)phenyl)hydroxymethyl]phosphinic acid	[((3S)-3-амино-3-карбоксии)пропил][(4-(карбоксиметокси)фенил)гидроксиметил] фосфиновая кислота
LTD	Long-term depression	Долговременная депрессия
LTP	Long-term potentiation	Долговременная потенция
LY2794193	(1S,2S,4S,5R,6S)-2-amino-4-[(3-methoxybenzoyl)amino]bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid	(1S,2S,4S,5R,6S)-2-амино-4-[(3-метоксибензоил)амино]бицикло[3.1.0]гексан-2,6-дикарбоновая кислота
LY2812223	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ylsulfanyl)-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-амино-4-(1H-1,2,4-триазол-3-илсульфанил)-бицикло[3.1.0]гексан-2,6-дикарбоновая кислота
LY341495	(2S)-2-amino-2-[(1S,2S)-2-carboxycycloprop-1-yl]-3-(xanth-9-yl) propanoic acid	(2S)-2-амино-2-[(1S,2S)-2-карбоксиициклопроп-1-ил]-3-(ксант-9-ил) пропановая кислота
LY354740	(1S,2S,5R,6S)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate	(1S,2S,5R,6S)-2-аминобицикло[3.1.0]гексан-2,6-дикарбоксилат

LY36738	(+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine	(+)-2-метил-4-
5		карбоксифенилглицин
LY37926	(1R,4R,5S,6R)-4-amino-2-	(1R,4R,5S,6R)-4-амино-2-
8	oxabicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic acid	аксабицикло[3.1.0]гексан-4,6-дикарбоновая кислота
LY39367	2-(S)-amino-2-(3-cis-carboxycyclobutyl)-3-	2-(S)-амино-2-(3-дис-
5	(9H-thioxanthen-9-yl) propionic acid	карбоксихциклобутил)-3-(9H-тиоксантен-9-ил) пропионовая кислота
MAP4	(S)-2-amino-2-methyl-4-phosphonobutanoic acid	(S)-2-амино-2-метил-4-фосфонобутановая кислота
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Митоген-активированная протеинкиназа
MPEP	2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride	2-метил-6-(фенилэтинил)пиридин гидрохлорид
4-MPPTS	2,2,2-trifluoro-N-[4-(2-methoxyphenoxy)phenyl]-N-(3-pyridinylmethyl)-ethanesulphonamide	2,2,2-трифлуоро-N-[4-(2-метоксифеноксифенил]-N-(3-пиридинилметил)-этансульфонамид
MSOP	2-amino-2-methyl-3-phosphonooxypropanoic acid	2-амино-2-метил-3-фосфонооксипропановая кислота
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-метил-D-аспартат
NTD	N-terminal domain	N-концевой домен
<i>Pgk1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	Фосфоглицераткиназа 1
PHCCC	N-phenyl-7-(hydroxyimino)cycloproпа[b]chromen-1acarboxamide	N-фенил-7-(гидроксиимино)циклопропа[b]хромен-1акарбоксамид
PI	Polyphosphoinositide	Полифосфоинозитид
PIKE-L	Phosphoinositide-3 kinase enhancer L	Усилитель фосфоинозитид-3 киназы L
PKA	Protein kinase A	Протеинкиназа A
PKC	Protein kinase C	Протеинкиназа C
PLC	Phospholipase C	Фосфолипаза C
<i>Ppia</i>	Peptidylprolyl isomerase A	Пептидилпролил изомераза A

PtdIns-3- K	Phosphoinositide 3-kinase	Фосфоинозитид-3-киназа
<i>Rpl13a</i>	Ribosomal protein L13a	Рибосомальный белок L13a
<i>Sdha</i>	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	Субъединица A комплекса сукцинатдегидрогеназы,
SE	<i>Status epilepticus</i>	Эпилептический статус
TMD	Transmembrane domain	Трансмембранный домен
VFT	Venus Fly Trap	
WB	Western blotting	Вестерн блоттинг
XAP044	7-hydroxy-3-(4-iodophenoxy)-4H-chromen-4- one	7-гидрокси-3-(4-йодофенокси)-4H- хромен-4-он

Список использованной литературы

1. Falco-Walter J. (2020). Epilepsy-Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Semin Neurol* 40:617–623. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718719>
2. Banerjee P.N., Filippi D., Allen Hauser W. (2009). The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res* 85:31–45. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.03.003>
3. Fisher R.S., Acevedo C., Arzimanoglou A., Bogacz A., Helen Cross J., Elger C.E., Engel Jr. J., Forsgren L., French J.A., Glynn M., Hesdorffer D.C., Lee B., Mathern G.W., Mosh S.L., Perucca E., Scheffer I.E., Tomson orn, Watanabe M., Wiebe S. (2014). A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55:475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
4. Löscher W. (2020). The holy grail of epilepsy prevention: Preclinical approaches to antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology* 167:107605. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.011>
5. Moshé S.L., Perucca E., Ryvlin P., Tomson T. (2015). Epilepsy: new advances. *Lancet* 385:884–898. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60456-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60456-6)
6. Lasoń W., Chlebicka M., Rejdak K. (2013). Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep* 65:787–801. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71060-0](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71060-0)
7. Meldrum B.S., Rogawski M.A. (2007). Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* 4:18–61. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2006.11.010>
8. Tsai J.-J., Wu T., Leung H., Desudchit T., Tiamkao S., Lim K.-S., Dash A. (2018). Perampanel, an AMPA receptor antagonist: From clinical research to practice in clinical settings. *Acta Neurol Scand* 137:378–391. <https://doi.org/10.1111/ane.12879>
9. Celli R., Santolini I., Van Luijtelaaar G., Ngomba R.T., Bruno V., Nicoletti F. (2019). Targeting metabotropic glutamate receptors in the treatment of epilepsy: rationale and current status. *Expert Opin Ther Targets* 23(4):341-351. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1586885>
10. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14:383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
11. Henley J.M., Wilkinson K.A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 17:337–350. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.37>

12. Volianskis A., France G., Jensen M.S., Bortolotto Z.A., Jane D.E., Collingridge G.L. (2015). Long-term potentiation and the role of N-methyl-d-aspartate receptors. *Brain Res* 1621:5. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2015.01.016>
13. Lee K., Goodman L., Fourie C., Schenk S., Leitch B., Montgomery J.M. (2016). AMPA Receptors as Therapeutic Targets for Neurological Disorders. In: *Advances in protein chemistry and structural biology* 103:203–261. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.10.004>
14. Szczurowska E., Mareš P. (2013). NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiol Res* 62 Suppl 1:S21-38. <https://doi.org/0.33549/physiolres.932662>
15. Mihály A. (2019). The Reactive Plasticity of Hippocampal Ionotropic Glutamate Receptors in Animal Epilepsies. *Int J Mol Sci* 20:1030. <https://doi.org/10.3390/ijms20051030>
16. Walker M.C. (2018). Pathophysiology of status epilepticus. *Neurosci Lett* 667:84–91. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.044>
17. Loddenkemper T., Talos D.M., Cleary R.T., Joseph A., Sánchez Fernández I., Alexopoulos A., Kotagal P., Najm I., Jensen F.E. (2014). Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus. *Epilepsy Res* 108:605–615. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2014.01.015>
18. Naylor D.E., Liu H., Niquet J., Wasterlain C.G. (2013). Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiol Dis* 54:225–238. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.015>
19. Zhou C., Sun H., Klein P.M., Jensen F.E. (2015). Neonatal seizures alter NMDA glutamate receptor GluN2A and 3A subunit expression and function in hippocampal CA1 neurons. *Front Cell Neurosci* 9:362. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00362>
20. Anwyl R. (2009). Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology* 56:735–740. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.01.002>
21. Niswender C.M., Conn P.J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:295. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.011008.145533>
22. Di Menna L., Joffe M.E., Iacovelli L., Orlando R., Lindsley C.W., Mairesse J., Gressens P., Cannella M., Caraci F., Copani A., Bruno V., Battaglia G., Conn P.J., Nicoletti F. (2018). Functional partnership between mGlu3 and mGlu5 metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Neuropharmacology* 128:301–313.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.026>

23. Nicoletti F., Bockaert J., Collingridge G.L., Conn P.J., Ferraguti F., Schoepp D.D., Wroblewski J.T., Pin J.P. (2011). Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60:1017–1041. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.022>
24. Tang F., Bradford H., Ling E.-A. (2009). Metabotropic Glutamate Receptors in the Control of Neuronal Activity and as Targets for Development of Anti-Epileptogenic Drugs. *Curr Med Chem* 16:2189–2204. <https://doi.org/10.2174/092986709788612710>
25. Blümcke I., Becker A.J., Klein C., Scheiwe C., Lie A.A., Beck H., Waha A., Friedl M.G., Kuhn R., Emson P., Elger C., Wiestler O.D. (2000). Temporal Lobe Epilepsy Associated Up-Regulation of Metabotropic Glutamate Receptors: Correlated Changes in mGluR1 mRNA and Protein Expression in Experimental Animals and Human Patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:1–10. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.1.1>
26. Aronica E., van Vliet E.A., Mayboroda O.A., Troost D., da Silva F.H., Gorter J.A. (2000). Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 12:2333–2344. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00131.x>
27. Tang F.-R., Lee W.-L., Yeo T.T. (2002). Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurocytol* 30:403–411. <https://doi.org/10.1023/A:1015065626262>
28. Garrido-Sanabria E.R., Otalora L.F.P., Arshadmansab M.F., Herrera B., Francisco S., Ermolinsky B.S. (2008). Impaired expression and function of group II metabotropic glutamate receptors in pilocarpine-treated chronically epileptic rats. *Brain Res* 1240:165–176. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.084>
29. Löscher W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20:359–368. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>
30. Curia G., Longo D., Biagini G., Jones R.S.G., Avoli M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172:143–157. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2008.04.019>
31. Alhusaini S., Whelan C.D., Doherty C.P., Delanty N., Fitzsimons M., Cavalleri G.L. (2016). Temporal Cortex Morphology in Mesial Temporal Lobe Epilepsy Patients and Their

- Asymptomatic Siblings. *Cereb Cortex* 26:1234–1241. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu315>
32. Fanselow M.S., Dong H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
33. Floriou-Servou A., von Ziegler L., Stalder L., Sturman O., Privitera M., Rassi A., Cremonesi A., Thöny B., Bohacek J. (2018). Distinct Proteomic, Transcriptomic, and Epigenetic Stress Responses in Dorsal and Ventral Hippocampus. *Biol Psychiatry* 84:531–541. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.02.003>
34. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
35. Santos B.P. Dos, da Costa Diesel L.F., da Silva Meirelles L., Nardi N.B., Camassola M. (2016). Identification of suitable reference genes for quantitative gene expression analysis in rat adipose stromal cells induced to trilineage differentiation. *Gene* 594:211–219. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.002>
36. Swijssen A., Nelissen K., Janssen D., Rigo J.-M., Hoogland G. (2012). Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res Notes* 5:685. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-685>
37. Zhou J., Zhang X., Ren J., Wang P., Zhang J., Wei Z., Tian Y. (2016). Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in valproic acid rat models of autism. *Mol Biol Rep* 43:837–847. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4015-x>
38. Cook N.L., Vink R., Donkin J.J., van den Heuvel C. (2009). Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 87:34–41. <https://doi.org/10.1002/jnr.21846>
39. Nair A.R., Smeets K., Keunen E., Lee W.-K., Thévenod F., Van Kerkhove E., Cuypers A. (2015). Renal cells exposed to cadmium in vitro and in vivo: normalizing gene expression data. *J Appl Toxicol* 35:478–484. <https://doi.org/10.1002/jat.3047>
40. Crans R.A.J., Janssens J., Daelemans S., Wouters E., Raedt R., Van Dam D., De Deyn P.P., Van Craenenbroeck K., Stove C.P. (2019). The validation of Short Interspersed Nuclear Elements (SINEs) as a RT-qPCR normalization strategy in a rodent model for temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 14:e0210567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210567>

41. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
42. De Spiegelaere W., Dern-Wieloch J., Weigel R., Schumacher V., Schorle H., Nettersheim D., Bergmann M., Brehm R., Kliesch S., Vandekerckhove L., Fink C. (2015). Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS One* 10:e0122515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515>
43. Janssens J., Crans R.A.J., Van Craenenbroeck K., Vandesompele J., Stove C.P., Van Dam D., De Deyn P.P. (2019). Evaluating the applicability of mouse SINEs as an alternative normalization approach for RT-qPCR in brain tissue of the APP23 model for Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods* 320:128–137. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.03.005>
44. Augustyniak J., Lenart J., Lipka G., Stepień P.P., Buzanska L. (2019). Reference Gene Validation via RT-qPCR for Human iPSC-Derived Neural Stem Cells and Neural Progenitors. *Mol Neurobiol* 56:6820–6832. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1538-x>
45. Sadangi C., Rosenow F., Norwood B.A. (2017). Validation of reference genes for quantitative gene expression analysis in experimental epilepsy. *J Neurosci Res* 95:2357–2366. <https://doi.org/10.1002/jnr.24089>
46. Jacob F., Guertler R., Naim S., Nixdorf S., Fedier A., Hacker N.F., Heinzelmann-Schwarz V. (2013). Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS One* 8:e59180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059180>
47. Pack A.M. (2019). Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 25:306–321. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000707>
48. Scorza F.A., Arida R.M., Naffah-Mazzacoratti M. da G., Scerni D.A., Calderazzo L., Cavalheiro E.A. (2009). The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc* 81:345–365. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652009000300003>
49. Thijs R.D., Surges R., O'Brien T.J., Sander J.W. (2019). Epilepsy in adults. *Lancet* 393:689–701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
50. Trinká E., Höfler J., Zerbs A. (2012). Causes of status epilepticus. *Epilepsia* 53:127–138. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03622.x>

51. Stafstrom C.E., Carmant L. (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(6):a022426. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022426>
52. Lasoñ W., Chlebicka M., Rejdak K. (2013). Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Reports* 65:787–801. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71060-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71060-0)
53. Manford M. (2017). Recent advances in epilepsy. *J Neurol* 264:1811–1824. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8394-2>
54. Ramesh Yasam V., Senthil V., Lavanya Jakki S., Jawahar N. (2017). Status Epilepticus: An Overview. *Curr Drug Metab* 18:174–185. <https://doi.org/10.2174/1389200218666170106091705>
55. Goldberg E.M., Coulter D.A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 14:337–49. <https://doi.org/10.1038/nrn3482>
56. Devinsky O., Vezzani A., O’Brien T.J., Jette N., Scheffer I.E., De Curtis M., Perucca P. (2018). Epilepsy. *Nat Rev Dis Prim* 4:18024. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2018.24>
57. Pitkänen A., Lukasiuk K., Edward Dudek F., Staley K.J. (2015). Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(10):a022822. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A022822>
58. Dudek F.E., Staley K.J. (2011). The time course of acquired epilepsy: implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis. *Neurosci Lett* 497:240–246. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.03.071>
59. Janmohamed M., Brodie M.J., Kwan P. (2020). Pharmacoresistance – Epidemiology, mechanisms, and impact on epilepsy treatment. *Neuropharmacology* 168:107790. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107790>
60. Becker A.J. (2018). Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 44:112–129. <https://doi.org/10.1111/NAN.12451>
61. Lévesque M., Avoli M., Bernard C. (2016). Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *J Neurosci Methods* 260:45–52. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2015.03.009>
62. Shimada T., Yamagata K. (2018). Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *J Vis Exp* 136:56573. <https://doi.org/10.3791/56573>

63. Samokhina E., Samokhin A. (2018). Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model. *Int J Neurosci* 128:1086–1096. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1481064>
64. Chen X., van Gerven J., Cohen A., Jacobs G. (2018). Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. *Acta Pharmacol Sin* 40(5):571-582. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0185-5>
65. Coppola A., Moshé S.L. (2012). Animal models. In: *Handbook of clinical neurology* 107:63–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52898-8.00004-5>
66. Ben-Ari Y., Lagowska J. (1978). [Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 287:813–816.
67. Ben-Ari Y., Lagowska J., Tremblay E., Le Gal La Salle G. (1979). A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* 163:176–9. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90163-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90163-x)
68. Cavalheiro E.A., Riche D.A., Le Gal La Salle G. (1982). Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 53:581–589. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(82\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0013-4694(82)90134-1)
69. Turski L., Ikonomidou C., Turski W.A., Bortolotto Z.A., Cavalheiro E.A. (1989). Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* 3:154–171. <https://doi.org/10.1002/syn.890030207>
70. Clifford D.B., Olney J.W., Maniotis A., Collins R.C., Zorumski C.F. (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23:953–968. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90171-0)
71. Nagao T., Alonso A., Avoli M. (1996). Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience* 72:399–408. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00534-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00534-x)
72. Smolders I., Khan G.M., Manil J., Ebinger G., Michotte Y. (1997). NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol* 121:1171–9. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701231>
73. Inostroza M., Cid E., Menendez de la Prida L., Sandi C. (2012). Different emotional disturbances in two experimental models of temporal Lobe Epilepsy in rats. *PLoS One* 7:14–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038959>

74. Smolensky I.V., Zubareva O.E., Kalemenev S.V., Lavrentyeva V.V., Dyomina A.V., Karepanov A.A., Zaitsev A.V. (2019). Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Behav Brain Res* 372:112044. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112044>
75. De Lanerolle N.C., Kim J.H., Williamson A., Spencer S.S., Zaveri H.P., Eid T., Spencer D.D. (2003). A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia* 44:677–687. <https://doi.org/10.1046/J.1528-1157.2003.32701.X>
76. Varvel N.H., Jiang J., Dingledine R. (2015). Candidate drug targets for prevention or modification of epilepsy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:229–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124607>
77. Vezzani A., Moneta D., Conti M., Richichi C., Ravizza T., De Luigi A., De Simoni M.G., Sperk G., Andell-Jonsson S., Lundkvist J., Iverfeldt K., Bartfai T. (2000). Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci* 97:11534–11539. <https://doi.org/10.1073/pnas.190206797>
78. Balosso S., Maroso M., Sanchez-Alavez M., Ravizza T., Frasca A., Bartfai T., Vezzani A. (2008). A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1 β . *Brain* 131:3256–3265. <https://doi.org/10.1093/brain/awn271>
79. Xiong Z.-Q., Qian W., Suzuki K., McNamara J.O. (2003). Formation of complement membrane attack complex in mammalian cerebral cortex evokes seizures and neurodegeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23:955–960. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-03-00955.2003>
80. Oliveira M.S., Furian A.F., Royes L.F.F., Figuera M.R., Fiorenza N.G., Castelli M., Machado P., Bohrer D., Veiga M., Ferreira J., Cavalheiro E.A., Mello C.F. (2008). Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 79:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.12.008>
81. Galic M.A., Riazi K., Pittman Q.J. (2012). Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol* 33:116–125. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.12.002>
82. Peng W.-F., Ding J., Li X., Fan F., Zhang Q.-Q., Wang X. (2016). N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunit involved in depression-like behaviours in lithium chloride-pilocarpine

- chronic rat epilepsy model. *Epilepsy Res* 119:77–85.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.09.013>
83. Malkin S.L., Amakhin D.V., Veniaminova E.A., Kim K.K., Zubareva O.E., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. (2016). Changes of AMPA receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuroscience* 327:146–155.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.024>
 84. Mishra A., Bandopadhyay R., Singh P.K., Mishra P.S., Sharma N., Khurana N. (2021). Neuroinflammation in neurological disorders: pharmacotherapeutic targets from bench to bedside. *Metab Brain Dis* 36:1591–1626. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00806-4>
 85. 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. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 62:405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
 86. Tao W., Díaz-Alonso J., Sheng N., Nicoll R.A. (2018). Postsynaptic $\delta 1$ glutamate receptor assembles and maintains hippocampal synapses via Cbln2 and neurexin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E5373–E5381. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802737115>
 87. Skowrońska K., Obara-Michlewska M., Zielińska M., Albrecht J. (2019). NMDA Receptors in Astrocytes: In Search for Roles in Neurotransmission and Astrocytic Homeostasis. *Int J Mol Sci* 20:309. <https://doi.org/10.3390/ijms20020309>
 88. Willard S.S., Koochekpour S. (2013). Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci* 9:948–59. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6426>
 89. Vance K.M., Hansen K.B., Traynelis S.F. (2012). GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *J Physiol* 590:3857–3875.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234062>
 90. Bretin S., Louis C., Seguin L., Wagner S., Thomas J.-Y., Challal S., Rogez N., Albinet K., Iop F., Villain N., Bertrand S., Krazem A., Bérachochéa D., Billiald S., Tordjman C., Cordi A., Bertrand D., Lestage P., Danober L. (2017). Pharmacological characterisation of S 47445, a novel positive allosteric modulator of AMPA receptors. *PLoS One* 12:e0184429.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184429>
 91. Wright A., Vissel B. (2012). The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front Mol Neurosci* 5:34.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00034>

92. Platt S.R. (2007). The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review. *Vet J* 173:278–286. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.11.007>
93. Meyerson J.R., Kumar J., Chittori S., Rao P., Pierson J., Bartesaghi A., Mayer M.L., Subramaniam S. (2014). Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. *Nature* 514:328–334. <https://doi.org/10.1038/nature13603>
94. Guo C., Ma Y.-Y. (2021). Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. *Front Neural Circuits* 15:711564. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.711564>
95. Huganir R.L., Nicoll R.A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 80:704–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025>
96. Hansen K.B., Wollmuth L.P., Bowie D., Furukawa H., Menniti F.S., Sobolevsky A.I., Swanson G.T., Swanger S.A., Greger I.H., Nakagawa T., McBain C.J., Jayaraman V., Low C.-M., Dell'Acqua M.L., Diamond J.S., Camp C.R., Perszyk R.E., Yuan H., Traynelis S.F. (2021). Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol Rev* 73:298–487. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000131>
97. Kritis A.A., Stamoula E.G., Paniskaki K.A., Vavilis T.D. (2015). Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci* 9:91. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00091>
98. Tomek S., Lacrosse A., Nemirovsky N., Olive M. (2013). NMDA Receptor Modulators in the Treatment of Drug Addiction. *Pharmaceuticals* 6:251–268. <https://doi.org/10.3390/ph6020251>
99. Tajima N., Karakas E., Grant T., Simorowski N., Diaz-Avalos R., Grigorieff N., Furukawa H. (2016). Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature* 534:63–68. <https://doi.org/10.1038/nature17679>
100. Gitto R., Barreca M.L., De Luca L., De Sarro G., Ferreri G., Quartarone S., Russo E., Constanti A., Chimirri A. (2003). Discovery of a novel and highly potent noncompetitive AMPA receptor antagonist. *J Med Chem* 46:197–200. <https://doi.org/10.1021/jm0210008>
101. Ahmed A.H., Oswald R.E. (2010). Piracetam defines a new binding site for allosteric modulators of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) receptors. *J Med Chem* 53:2197–203. <https://doi.org/10.1021/jm901905j>
102. Arai A.C., Kessler M. (2007). Pharmacology of ampakine modulators: from AMPA receptors to synapses and behavior. *Curr Drug Targets* 8:583–602.

<https://doi.org/10.2174/138945007780618490>

103. Hansen K.B., Yi F., Perszyk R.E., Furukawa H., Wollmuth L.P., Gibb A.J., Traynelis S.F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J Gen Physiol* 150:1081–1105. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812032>
104. Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529–540. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90210-0)
105. Chen Q., He S., Hu X.-L., Yu J., Zhou Y., Zheng J., Zhang S., Zhang C., Duan W.-H., Xiong Z.-Q. (2007). Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Activity-Dependent Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Regulation and Limbic Epileptogenesis. *J Neurosci* 27:542–552. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-06.2007>
106. Yao L., Zhou Q. (2017). Enhancing NMDA Receptor Function: Recent Progress on Allosteric Modulators. *Neural Plast* 2017:2875904. <https://doi.org/10.1155/2017/2875904>
107. Monaghan D.T., Irvine M.W., Costa B.M., Fang G., Jane D.E. (2012). Pharmacological modulation of NMDA receptor activity and the advent of negative and positive allosteric modulators. *Neurochem Int* 61:581–592. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.01.004>
108. Hackos D.H., Hanson J.E. (2017). Diverse modes of NMDA receptor positive allosteric modulation: Mechanisms and consequences. *Neuropharmacology* 112:34–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.037>
109. Henson M.A., Roberts A.C., Pérez-Otaño I., Philpot B.D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol* 91:23–37. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.004>
110. Spitzer S., Volbracht K., Lundgaard I., Káradóttir R.T. (2016). Glutamate signalling: A multifaceted modulator of oligodendrocyte lineage cells in health and disease. *Neuropharmacology* 110:574–585. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.014>
111. Greger I.H., Watson J.F., Cull-Candy S.G. (2017). Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* 94:713–730. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.009>
112. Haering S.C., Tapken D., Pahl S., Hollmann M. (2014). Auxiliary subunits: shepherding AMPA receptors to the plasma membrane. *Membranes (Basel)* 4:469–490. <https://doi.org/10.3390/membranes4030469>

113. Mayer M.L. (2016). Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. *Curr Opin Struct Biol* 41:119–127. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.002>
114. Mothet J.-P., Le Bail M., Billard J.-M. (2015). Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *J Neurochem* 135:210–25. <https://doi.org/10.1111/jnc.13204>
115. Blair M.G., Nguyen N.N.-Q., Albani S.H., L'Etoile M.M., Andrawis M.M., Owen L.M., Oliveira R.F., Johnson M.W., Purvis D.L., Sanders E.M., Stoneham E.T., Xu H., Dumas T.C. (2013). Developmental changes in structural and functional properties of hippocampal AMPARs parallels the emergence of deliberative spatial navigation in juvenile rats. *J Neurosci* 33:12218–12228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4827-12.2013>
116. Reiner A., Levitz J. (2018). Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* 98:1080–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.018>
117. Levitz J., Habrian C., Bharill S., Fu Z., Vafabakhsh R., Isacoff E.Y. (2016). Mechanism of Assembly and Cooperativity of Homomeric and Heteromeric Metabotropic Glutamate Receptors. *Neuron* 92:143–159. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.036>
118. Ehrengruber M.U., Kato A., Inokuchi K., Hennou S. (2004). Homer/Vesl proteins and their roles in CNS neurons. *Mol Neurobiol* 29:213–227. <https://doi.org/10.1385/MN:29:3:213>
119. Mao L., Yang L., Tang Q., Samdani S., Zhang G., Wang J.Q. (2005). The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 25:2741–2752. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4360-04.2005>
120. Perroy J., Raynaud F., Homburger V., Rousset M.-C., Telley L., Bockaert J., Fagni L. (2008). Direct interaction enables cross-talk between ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 283:6799–6805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705661200>
121. Moutin E., Raynaud F., Roger J., Pellegrino E., Homburger V., Bertaso F., Ollendorff V., Bockaert J., Fagni L., Perroy J. (2012). Dynamic remodeling of scaffold interactions in dendritic spines controls synaptic excitability. *J Cell Biol* 198:251–263. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110101>
122. Kniazeff J., Bessis A.-S., Maurel D., Ansanay H., Prézeau L., Pin J.-P. (2004). Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol* 11:706–713. <https://doi.org/10.1038/nsmb794>

123. Pin J.-P., Galvez T., Prézeau L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98:325–354.
[https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(03\)00038-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(03)00038-x)
124. Acher F.C., Cabayé A., Eshak F., Goupil-Lamy A., Pin J.-P. (2022). Metabotropic glutamate receptor orthosteric ligands and their binding sites. *Neuropharmacology* 204:108886.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108886>
125. Swanson C.J., Bures M., Johnson M.P., Linden A.-M., Monn J.A., Schoepp D.D. (2005). Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov* 4:131–144. <https://doi.org/10.1038/nrd1630>
126. Pin J.-P., Acher F. (2002). The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:297–317.
<https://doi.org/10.2174/1568007023339328>
127. Rosemond E., Wang M., Yao Y., Storjohann L., Stormann T., Johnson E.C., Hampson D.R. (2004). Molecular basis for the differential agonist affinities of group III metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 66:834–842. <https://doi.org/10.1124/mol.104.002956>
128. Selvam C., Lemasson I.A., Brabet I., Oueslati N., Karaman B., Cabaye A., Tora A.S., Commare B., Courtiol T., Cesarini S., McCort-Tranchepain I., Rigault D., Mony L., Bessiron T., McLean H., Leroux F.R., Colobert F., Daniel H., Goupil-Lamy A., Bertrand H.-O., Goudet C., Pin J.-P., Acher F.C. (2018). Increased Potency and Selectivity for Group III Metabotropic Glutamate Receptor Agonists Binding at Dual sites. *J Med Chem* 61:1969–1989.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01438>
129. Bessis A.-S., Rondard P., Gaven F., Brabet I., Triballeau N., Prezeau L., Acher F., Pin J.-P. (2002). Closure of the Venus flytrap module of mGlu8 receptor and the activation process: Insights from mutations converting antagonists into agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11097–11102. <https://doi.org/10.1073/pnas.162138699>
130. Gee C.E., Peterlik D., Neuhäuser C., Bouhelal R., Kaupmann K., Laue G., Uschold-Schmidt N., Feuerbach D., Zimmermann K., Ofner S., Cryan J.F., van der Putten H., Fendt M., Vranesic I., Glatthar R., Flor P.J. (2014). Blocking metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGlu7) via the Venus flytrap domain (VFTD) inhibits amygdala plasticity, stress, and anxiety-related behavior. *J Biol Chem* 289:10975–10987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542654>
131. Kneussel M., Hausrat T.J. (2016). Postsynaptic Neurotransmitter Receptor Reserve Pools for Synaptic Potentiation. *Trends Neurosci* 39:170–182. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.002>

132. Sweatt J.D. (2016). Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *J Neurochem* 139:179–199. <https://doi.org/10.1111/jnc.13580>
133. Болдырев А.А., Ещенко Н.Д., Илюха В.А., Кяйвяряйнен Е.И. (2010). *Нейрохимия*. М.: Дрофа, 400 с.
134. Herring B.E., Nicoll R.A. (2016). Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu Rev Physiol* 78:351–365. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071753>
135. Nicoll R.A., Roche K.W. (2013). Long-term potentiation: Peeling the onion. *Neuropharmacology* 74:18–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.02.010>
136. Kennedy M.B., Beale H.C., Carlisle H.J., Washburn L.R. (2005). Integration of biochemical signalling in spines. *Nat Rev Neurosci* 6:423–434. <https://doi.org/10.1038/nrn1685>
137. Collingridge G.L., Peineau S., Howland J.G., Wang Y.T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 11:459–473. <https://doi.org/10.1038/nrn2867>
138. Postnikova T.Y., Trofimova A.M., Ergina J.L., Zubareva O.E., Kalemenev S.V., Zaitsev A.V. (2019). Transient Switching of NMDA-Dependent Long-Term Synaptic Potentiation in CA3-CA1 Hippocampal Synapses to mGluR1-Dependent Potentiation After Pentylentetrazole-Induced Acute Seizures in Young Rats. *Cell Mol Neurobiol* 39:287–300. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-00647-3>
139. Liu L., Wong T.P., Pozza M.F., Lingenhoehl K., Wang Y.T., Sheng M., Auberson Y.P., Wang Y.T. (2004). Role of NMDA Receptor Subtypes in Governing the Direction of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science* 304:1021–1024. <https://doi.org/10.1126/science.1096615>
140. Sakimura K., Kutsuwada T., Ito I., Manabe T., Takayama C., Kushiya E., Yagi T., Aizawa S., Inoue Y., Sugiyama H., Mishina M. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373:151–155. <https://doi.org/10.1038/373151a0>
141. Brigman J.L., Wright T., Talani G., Prasad-Mulcare S., Jinde S., Seabold G.K., Mathur P., Davis M.I., Bock R., Gustin R.M., Colbran R.J., Alvarez V.A., Nakazawa K., Delpire E., Lovinger D.M., Holmes A. (2010). Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J Neurosci* 30:4590–4600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0640-10.2010>
142. Bartlett T.E., Bannister N.J., Collett V.J., Dargan S.L., Massey P.V., Bortolotto Z.A., Fitzjohn

- S.M., Bashir Z.I., Collingridge G.L., Lodge D. (2007). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology* 52:60–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.013>
143. Fox C.J., Russell K.I., Wang Y.T., Christie B.R. (2006). Contribution of NR2A and NR2B NMDA subunits to bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus in vivo. *Hippocampus* 16:907–915. <https://doi.org/10.1002/hipo.20230>
144. Xu Z., Chen R.-Q., Gu Q.-H., Yan J.-Z., Wang S.-H., Liu S.-Y., Lu W. (2009). Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *J Neurosci* 29:8764–8773. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1014-09.2009>
145. Ferraguti F., Shigemoto R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 326:483–504. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0266-5>
146. Ferraguti F., Crepaldi L., Nicoletti F. (2008). Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol Rev* 60:536–581. <https://doi.org/10.1124/PR.108.000166>
147. Sanderson J.L., Gorski J.A., Dell’Acqua M.L. (2016). NMDA Receptor-Dependent LTD Requires Transient Synaptic Incorporation of Ca²⁺-Permeable AMPARs Mediated by AKAP150-Anchored PKA and Calcineurin. *Neuron* 89:1000–1015. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.043>
148. Moulton P.R., Gladding C.M., Sanderson T.M., Fitzjohn S.M., Bashir Z.I., Molnar E., Collingridge G.L. (2006). Tyrosine phosphatases regulate AMPA receptor trafficking during metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:2544–2554. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4322-05.2006>
149. Tamaru Y., Nomura S., Mizuno N., Shigemoto R. (2001). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience* 106:481–503. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00305-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00305-0)
150. Monday H.R., Castillo P.E. (2017). Closing the gap: long-term presynaptic plasticity in brain function and disease. *Curr Opin Neurobiol* 45:106–112. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.011>
151. Iacovelli L., Bruno V., Salvatore L., Melchiorri D., Gradini R., Caricasole A., Barletta E., De Blasi A., Nicoletti F. (2002). Native group-III metabotropic glutamate receptors are coupled to the mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J Neurochem*

- 82:216–223. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00929.x>
152. Vardi N., Duvoisin R., Wu G., Sterling P. (2000). Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J Comp Neurol* 423:402–412. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000731\)423:3<402::aid-cne4>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000731)423:3<402::aid-cne4>3.0.co;2-e)
 153. Scimemi A., Schorge S., Kullmann D.M., Walker M.C. (2006). Epileptogenesis is associated with enhanced glutamatergic transmission in the perforant path. *J Neurophysiol* 95:1213–1220. <https://doi.org/10.1152/jn.00680.2005>
 154. Jakaria M., Park S.-Y., Haque M.E., Karthivashan G., Kim I.-S., Ganesan P., Choi D.-K. (2018). Neurotoxic Agent-Induced Injury in Neurodegenerative Disease Model: Focus on Involvement of Glutamate Receptors. *Front Mol Neurosci* 11:307. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00307>
 155. Pellegrini-Giampietro D.E., Gorter J.A., Bennett M.V., Zukin R.S. (1997). The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20:464–470. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01100-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01100-4)
 156. Lopes M.W., Lopes S.C., Costa A.P., Gonçalves F.M., Rieger D.K., Peres T.V., Eyng H., Prediger R.D., Diaz A.P., Nunes J.C., Walz R., Leal R.B. (2015). Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int* 87:22–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.05.003>
 157. Pollard H., Héron A., Moreau J., Ben-Ari Y., Khrestchatisky M. (1993). Alterations of the GluR-B AMPA receptor subunit flip/flop expression in kainate-induced epilepsy and ischemia. *Neuroscience* 57:545–554. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90004-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90004-y)
 158. Kitaura H., Sonoda M., Teramoto S., Shirozu H., Shimizu H., Kimura T., Masuda H., Ito Y., Takahashi H., Kwak S., Kameyama S., Kakita A. (2017). Ca²⁺-permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma. *Epilepsia* 58:e59–e63. <https://doi.org/10.1111/epi.13700>
 159. Sibarov D.A., Bruneau N., Antonov S.M., Szepetowski P., Burnashev N., Giniatullin R. (2017). Functional Properties of Human NMDA Receptors Associated with Epilepsy-Related Mutations of GluN2A Subunit. *Front Cell Neurosci* 11:155. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00155>
 160. Xu X.-X., Luo J.-H. (2018). Mutations of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits in Epilepsy. *Neurosci Bull* 34:549–565. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0191-5>
 161. Punnakkal P., Dominic D. (2018). NMDA Receptor GluN2 Subtypes Control Epileptiform

- Events in the Hippocampus. *Neuromolecular Med* 20:90–96. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8477-y>
162. Celli R., Fornai F. (2021). Targeting Ionotropic Glutamate Receptors in the Treatment of Epilepsy. *Curr Neuropharmacol* 19:747–765. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200831154658>
163. Müller L., Tokay T., Porath K., Köhling R., Kirschstein T. (2013). Enhanced NMDA receptor-dependent LTP in the epileptic CA1 area via upregulation of NR2B. *Neurobiol Dis* 54:183–193. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.011>
164. Калеманев С.В., Зубарева О.Е., Сизов В.В., Лаврентьева В.В., Лукомская Н.Я., Ким К.Х., Зайцев А.В., Магазаник Л.Г. (2016). Мемантин ослабляет когнитивные нарушения у крыс, обусловленные эпилептическим статусом в условиях литий-пилокарпиновой модели. Доклады Академии наук 470:732–735. <https://doi.org/10.7868/S0869565216300290>
165. Jantas D., Lech T., Gołda S., Pilc A., Lasoń W. (2018). New evidences for a role of mGluR7 in astrocyte survival: Possible implications for neuroprotection. *Neuropharmacology* 141:223–237. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2018.08.035>
166. Girard B., Tuduri P., Moreno M.P., Sakkaki S., Barboux C., Bouschet T., Varrault A., Vitre J., McCort-Tranchepain I., Dairou J., Acher F., Fagni L., Marchi N., Perroy J., Bertaso F. (2019). The mGlu7 receptor provides protective effects against epileptogenesis and epileptic seizures. *Neurobiol Dis* 129:13–28. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2019.04.016>
167. Arushanian E.B., Avakian R.M. (1978). Metrazol-induced petit mal: the role played by monoaminergic mechanisms and striatum. *Pharmacol Biochem Behav* 8:113–117. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(78\)90325-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(78)90325-8)
168. Fanselow E.E., Reid A.P., Nicoletis M.A. (2000). Reduction of pentylenetetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation. *J Neurosci* 20:8160–8168. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-21-08160.2000>
169. Postnikova T.Y., Zubareva O.E., Kovalenko A.A., Kim K.K., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. (2017). Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors. *Biochem* 82(3):282-290. <https://doi.org/10.1134/S0006297917030063>
170. Racine R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281–294.

4694(72)90177-0

171. Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *Biotechniques* 26:112–125. <https://doi.org/10.2144/99261rv01>
172. Paxinos G., Watson C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.
173. Chomczynski P., Sacchi N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1:581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
174. Ребриков Д.В., Саматов Г.А. Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. (2009). ПЦР в реальном времени. Бином. 224 с.
175. Chapman J.R., Waldenström J. (2015). With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One* 10:e0141853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853>
176. Melgar-Rojas P., Alvarado J.C., Fuentes-Santamaría V., Gabaldón-Ull M.C., Juiz J.M. (2015). Validation of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in Noise-Induced Hearing Loss: A Study in Wistar Rat. *PLoS One* 10:e0138027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138027>
177. Li B., Matter E.K., Hoppert H.T., Grayson B.E., Seeley R.J., Sandoval D.A. (2014). Identification of optimal reference genes for RT-qPCR in the rat hypothalamus and intestine for the study of obesity. *Int J Obes (Lond)* 38:192–197. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.86>
178. Langnaese K., John R., Schweizer H., Ebmeyer U., Keilhoff G. (2008). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol* 9:53. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-53>
179. Aitken A. (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* 16:162–172. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.005>
180. Bonfeld B.E., Elfving B., Wegener G. (2008). Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse* 62:302–309. <https://doi.org/10.1002/syn.20496>
181. Schwarz A.P., Malygina D.A., Kovalenko A.A., Trofimov A.N., Zaitsev A.V. (2020). Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol Cell Probes* 53:101611. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101611>
182. Lin W., Burks C.A., Hansen D.R., Kinnamon S.C., Gilbertson T.A. (2004). Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *J Neurophysiol* 92:2909–2919.

<https://doi.org/10.1152/jn.01198.2003>

183. Yamaguchi M., Yamauchi A., Nishimura M., Ueda N., Naito S. (2005). Soybean Oil Fat Emulsion Prevents Cytochrome P450 mRNA Down-Regulation Induced by Fat-Free Overdose Total Parenteral Nutrition in Infant Rats. *Biol Pharm Bull* 28:143–147.
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.143>
184. Pohjanvirta R., Niittynen M., Lindén J., Boutros P.C., Moffat I.D., Okey A.B. (2006). Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chem Biol Interact* 160:134–149.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.01.001>
185. Kovalenko A.A., Zakharova M.V., Schwarz A.P., Dyomina A.V., Zubareva O.E., Zaitsev A.V. (2022). Changes in Metabotropic Glutamate Receptor Gene Expression in Rat Brain in a Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Int J Mol Sci* 23(5):2752.
<https://doi.org/10.3390/IJMS23052752>
186. Dulman R.S., Auta J., Teppen T., Pandey S.C. (2019). Acute Ethanol Produces Ataxia and Induces *Fmr1* Expression via Histone Modifications in the Rat Cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res* 43:1191–1198. <https://doi.org/10.1111/acer.14044>
187. Xu J., Yan C.-H., Wu S.-H., Yu X.-D., Yu X.-G., Shen X.-M. (2007). Developmental lead exposure alters gene expression of metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 413:222–226. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.10.070>
188. Giza C.C., Maria N.S.S., Hovda D.A. (2006). N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. *J Neurotrauma* 23:950–961.
<https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.950>
189. Floyd D.W., Jung K.-Y., McCool B.A. (2003). Chronic ethanol ingestion facilitates N-methyl-D-aspartate receptor function and expression in rat lateral/basolateral amygdala neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 307:1020–1029. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.057505>
190. Proudnikov D., Yuferov V., Zhou Y., LaForge K.S., Ho A., Kreek M.J. (2003). Optimizing primer--probe design for fluorescent PCR. *J Neurosci Methods* 123:31–45.
[https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(02\)00325-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(02)00325-4)
191. Svec D., Tichopad A., Novosadova V., Pfaffl M.W., Kubista M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif* 3:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>

192. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
193. Xie F., Xiao P., Chen D., Xu L., Zhang B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* 80:75–84.
<https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
194. Silver N., Best S., Jiang J., Thein S.L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 7:33.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
195. Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000019559.84305.47>
196. Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245–5250.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
197. Kopec A.M., Rivera P.D., Lacagnina M.J., Hanamsagar R., Bilbo S.D. (2017). Optimized solubilization of TRIzol-precipitated protein permits Western blotting analysis to maximize data available from brain tissue. *J Neurosci Methods* 280:64–76.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.02.002>
198. Harrington C.R. (1990). Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulfate in microtiter plates for protein determinations on fractions from brain tissue. *Anal Biochem* 186:285–287.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90081-J](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90081-J)
199. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
200. Thacker J.S., Yeung D.H., Staines W.R., Mielke J.G. (2016). Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting? *Anal Biochem* 496:76–78.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.11.022>
201. Ahmadirad N., Shojaei A., Javan M., Pourgholami M.H., Mirnajafi-Zadeh J. (2014). Effect of minocycline on pentylenetetrazol-induced chemical kindled seizures in mice. *Neurol Sci*

35:571–576. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1552-0>

202. Hanson J.E., Ma K., Elstrott J., Weber M., SAILLET S., Khan A.S., Simms J., Liu B., Kim T.A., Yu G.-Q., Chen Y., Wang T.-M., Jiang Z., Liederer B.M., Deshmukh G., Solanoy H., Chan C., Sellers B.D., Volgraf M., Schwarz J.B., Hackos D.H., Weimer R.M., Sheng M., Gill T.M., Scearce-Levie K., Palop J.J. (2020). GluN2A NMDA Receptor Enhancement Improves Brain Oscillations, Synchrony, and Cognitive Functions in Dravet Syndrome and Alzheimer's Disease Models. *Cell Rep* 30:381-396.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.030>
203. Aniol V.A., Ivanova-Dyatlova A.Y., Keren O., Guekht A.B., Sarne Y., Gulyaeva N.V. (2013). A single pentylenetetrazole-induced clonic-tonic seizure episode is accompanied by a slowly developing cognitive decline in rats. *Epilepsy Behav* 26:196–202. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.12.006>
204. Liu Y., Tak P.W., Aarts M., Rooyakkers A., Liu L., Ted W.L., Dong C.W., Lu J., Tymianski M., Craig A.M., Yu T.W. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27:2846–2857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007>
205. Lujan B., Liu X., Qi W. (2012). Differential roles of gluN2A- and GluN2B-containing NMDA receptors in neuronal survival and death. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 4:211–218.
206. Jaskova K., Pavlovicova M., Jurkovicova D. (2012). Calcium transporters and their role in the development of neuronal disease and neuronal damage. *Gen. Physiol. Biophys.* 31:375–382. https://doi.org/10.4149/gpb_2012_053
207. Tang X.-J., Xing F. (2013). Calcium-permeable AMPA receptors in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (Review). *Biomed Reports* 1:828–832. <https://doi.org/10.3892/br.2013.154>
208. Gavvala J.R., Schuele S.U. (2016). New-onset seizure in adults and adolescents: A review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 316:2657–2668. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.18625>
209. Szyndler J., Maciejak P., Turzyńska D., Sobolewska A., Lehner M., Taracha E., Walkowiak J., Skórzewska A., Wisłowska-Stanek A., Hamed A., Bidziński A., Płaźnik A. (2008). Changes in the concentration of amino acids in the hippocampus of pentylenetetrazole-kindled rats. *Neurosci Lett* 439:245–249. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.002>
210. Feng Y., LeBlanc M.H., Regunathan S. (2005). Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylenetetrazole-induced seizures in rat brain: A potential mechanism for the anticonvulsive effects. *Neurosci Lett* 390:129–133. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.008>

211. Marques T.E.B.S., de Mendonça L.R., Pereira M.G., de Andrade T.G., Garcia-Cairasco N., Paçó-Larson M.L., Gitaí D.L.G. (2013). Validation of suitable reference genes for expression studies in different pilocarpine-induced models of mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 8:e71892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071892>
212. Nehlig A., Pereira de Vasconcelos A. (1996). The model of pentylenetetrazol-induced status epilepticus in the immature rat: short- and long-term effects. *Epilepsy Res* 26:93–103. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(96\)00045-9](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(96)00045-9)
213. Vizuite A.F.K., Hennemann M.M., Gonçalves C.A., de Oliveira D.L. (2017). Phase-Dependent Astroglial Alterations in Li–Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Young Rats. *Neurochem Res* 42:2730–2742. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2276-y>
214. Cilio M.R., Sogawa Y., Cha B.-H., Liu X., Huang L.-T., Holmes G.L. (2003). Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model. *Epilepsia* 44:518–528. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.48802.x>
215. Vasilev D.S., Tumanova N.L., Kim K.K., Lavrentyeva V.V., Lukomskaya N.Y., Zhuravin I.A., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. (2018). Transient Morphological Alterations in the Hippocampus After Pentylentetrazole-Induced Seizures in Rats. *Neurochem Res* 43:1671–1682. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2583-y>
216. Zaitsev A.V., Kim K.K., Vasilev D.S., Lukomskaya N.Y., Lavrentyeva V.V., Tumanova N.L., Zhuravin I.A., Magazanik L.G. (2015). N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers prevent pentylentetrazole-induced convulsions and morphological changes in rat brain neurons. *J Neurosci Res* 93:454–465. <https://doi.org/10.1002/jnr.23500>
217. Seol D., Choe H., Zheng H., Jang K., Ramakrishnan P.S., Lim T.-H., Martin J.A. (2011). Selection of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in organ culture of the rat and rabbit intervertebral disc. *BMC Res Notes* 4:162. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-162>
218. Lu Z., Hunter T. (2018). Metabolic Kinases Moonlighting as Protein Kinases. *Trends Biochem Sci* 43:301–310. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.01.006>
219. Nicholls C., Li H., Liu J.-P. (2012). GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39:674–679. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x>
220. Lin G.-W., Lu P., Zeng T., Tang H.-L., Chen Y.-H., Liu S.-J., Gao M.-M., Zhao Q.-H., Yi Y.-H., Long Y.-S. (2017). GAPDH-mediated posttranscriptional regulations of sodium channel

- Scn1a and Scn3a genes under seizure and ketogenic diet conditions. *Neuropharmacology* 113:480–489. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.002>
221. Neder L., Valente V., Carlotti C.G., Leite J.P., Assirati J.A., Paçó-Larson M.L., Moreira J.E. (2002). Glutamate NMDA receptor subunit R1 and GAD mRNA expression in human temporal lobe epilepsy. *Cell Mol Neurobiol* 22:689–698. <https://doi.org/10.1023/a:1021852907068>
222. Chen Q., He S., Hu X.L., Yu J., Zhou Y., Zheng J., Zhang S., Zhang C., Duan W.H., Xiong Z.Q. (2007). Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis. *J Neurosci* 27:542–552. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-06.2007>
223. Gori M.B., Girardi E. (2013). 3-Mercaptopropionic acid-induced repetitive seizures increase GluN2A expression in rat hippocampus: a potential neuroprotective role of cyclopentyladenosine. *Cell Mol Neurobiol* 33:803–813. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9947-2>
224. Acutain M.F., Griebler Luft J., Vazquez C.A., Popik B., Cercato M.C., Epstein A., Salvetti A., Jerusalinsky D.A., de Oliveira Alvares L., Baez M.V. (2021). Reduced Expression of Hippocampal GluN2A-NMDAR Increases Seizure Susceptibility and Causes Deficits in Contextual Memory. *Front Neurosci* 15:644100. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.644100>
225. Dos Santos J.G.J., Longo B.M., Blanco M.M., Menezes de Oliveira M.G., Mello L.E. (2005). Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 1066:37–48. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.09.037>
226. Detour J., Schroeder H., Desor D., Nehlig A. (2005). A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. *Epilepsia* 46:499–508. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.38704.x>
227. Sears S.M.S., Hewett J.A., Hewett S.J. (2019). Decreased epileptogenesis in mice lacking the System x_c⁻ transporter occurs in association with a reduction in AMPA receptor subunit GluA1. *Epilepsia Open* 4:133–143. <https://doi.org/10.1002/epi4.12307>
228. Russo I., Bonini D., Via L. La, Barlati S., Barbon A. (2013). AMPA receptor properties are modulated in the early stages following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuromolecular Med* 15:324–338. <https://doi.org/10.1007/s12017-013-8221-6>
229. Szczurowska E., Mareš P. (2015). An antagonist of calcium permeable AMPA receptors, IEM1460: Anticonvulsant action in immature rats? *Epilepsy Res* 109:106–113.

<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.10.020>

230. Lippman-Bell J.J., Zhou C., Sun H., Feske J.S., Jensen F.E. (2016). Early-life seizures alter synaptic calcium-permeable AMPA receptor function and plasticity. *Mol Cell Neurosci* 76:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.08.002>
231. Karimzadeh F., Soleimani M., Mehdizadeh M., Jafarian M., Mohamadpour M., Kazemi H., Joghataei M.T., Gorji A. (2013). Diminution of the NMDA receptor NR2B subunit in cortical and subcortical areas of WAG/Rij rats. *Synapse* 67:839–846. <https://doi.org/10.1002/syn.21687>
232. Plekanchuk V.S., Ryazanova M.A. (2020). Expression of Glutamate Receptor Genes in the Hippocampus and Frontal Cortex in GC Rat Strain with Genetic Catatonia. *J Evol Biochem Physiol* 57:156–163. <https://doi.org/10.1134/s0022093021010154>
233. Tang F.R., Lee W.L., Yeo T.T. (2001). Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurocytol* 30:403–411. <https://doi.org/10.1023/a:1015065626262>
234. Das A., Wallace G.C., Holmes C., McDowell M.L., Smith J.A., Marshall J.D., Bonilha L., Edwards J.C., Glazier S.S., Ray S.K., Banik N.L. (2012). Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience* 220:237–246. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.06.002>
235. Kirschstein T., Bauer M., Müller L., Rüschemschmidt C., Reitze M., Becker A.J., Schoch S., Beck H. (2007). Loss of metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression via downregulation of mGluR5 after status epilepticus. *J Neurosci* 27:7696–7704. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4572-06.2007>
236. Dammann F., Kirschstein T., Guli X., Müller S., Porath K., Rohde M., Tokay T., Köhling R. (2018). Bidirectional shift of group III metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic depression in the epileptic hippocampus. *Epilepsy Res* 139:157–163. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2017.12.002>
237. Pitsch J., Schoch S., Gueler N., Flor P.J., van der Putten H., Becker A.J. (2007). Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 26:623–633. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2007.03.003>
238. Jovanovic M., Rooney M.S., Mertins P., Przybylski D., Chevrier N., Satija R., Rodriguez E.H., Fields A.P., Schwartz S., Raychowdhury R., Mumbach M.R., Eisenhaure T., Rabani M.,

- Gennert D., Lu D., Delorey T., Weissman J.S., Carr S.A., Hacoheh N., Regev A. (2015). Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science* 347(6226):1259038. <https://doi.org/10.1126/science.1259038>
239. Liu Y., Beyer A., Aebersold R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165:535–550. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>
240. Zaitsev A.V., Amakhin D.V., Dyomina A.V., Zakharova M.V., Ergina J.L., Postnikova T.Y., Diespirov G.P., Magazanik L.G. (2021). Synaptic Dysfunction in Epilepsy. *J Evol Biochem Physiol* 57:542–563. <https://doi.org/10.1134/S002209302103008X>
241. Ure J., Baudry M., Perassolo M. (2006). Metabotropic glutamate receptors and epilepsy. *J Neurol Sci* 247:1–9. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2006.03.018>
242. Moldrich R.X., Chapman A.G., De Sarro G., Meldrum B.S. (2003). Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *Eur J Pharmacol* 476:3–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)02149-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)02149-6)
243. Jesse C.R., Savegnago L., Rocha J.B.T., Nogueira C.W. (2008). Neuroprotective effect caused by MPEP, an antagonist of metabotropic glutamate receptor mGluR5, on seizures induced by pilocarpine in 21-day-old rats. *Brain Res* 1198:197–203. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.01.005>
244. Domin H., Szewczyk B., Woźniak M., Wawrzak-Wleciał A., Śmiałowska M. (2014). Antidepressant-like effect of the mGluR5 antagonist MTEP in an astroglial degeneration model of depression. *Behav Brain Res* 273:23–33. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2014.07.019>
245. Dyomina A.V., Kovalenko A.A., Zakharova M.V., Postnikova T.Y., Griflyuk A.V., Smolensky I.V., Antonova I.V., Zaitsev A.V. (2022). MTEP, a Selective mGluR5 Antagonist, Had a Neuroprotective Effect but Did Not Prevent the Development of Spontaneous Recurrent Seizures and Behavioral Comorbidities in the Rat Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy. *Int J Mol Sci* 23:497. <https://doi.org/10.3390/IJMS23010497>
246. Hanak T.J., Libbey J.E., Doty D.J., Sim J.T., DePaula-Silva A.B., Fujinami R.S. (2019). Positive modulation of mGluR5 attenuates seizures and reduces TNF- α + macrophages and microglia in the brain in a murine model of virus-induced temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 311:194–204. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2018.10.006>
247. Loane D.J., Stoica B.A., Byrnes K.R., Jeong W., Faden A.I. (2013). Activation of mGluR5 and Inhibition of NADPH Oxidase Improves Functional Recovery after Traumatic Brain Injury.

<https://home.liebertpub.com/neu> 30:403–412. <https://doi.org/10.1089/NEU.2012.2589>

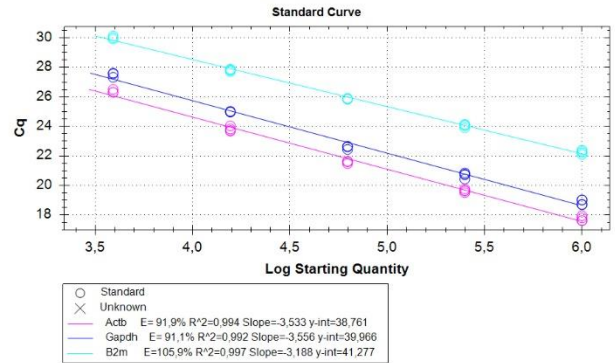
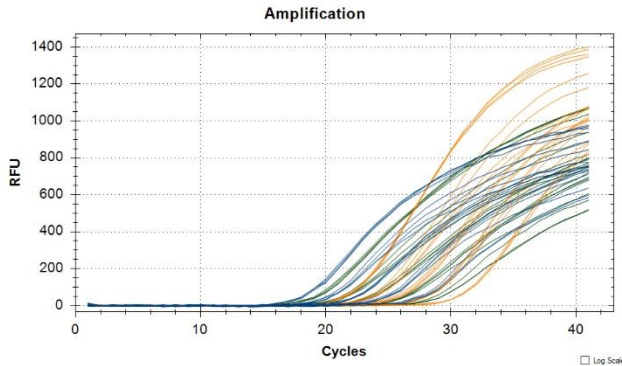
248. Maj M., Bruno V., Dragic Z., Yamamoto R., Battaglia G., Inderbitzin W., Stoehr N., Stein T., Gasparini F., Vranesic I., Kuhn R., Nicoletti F., Flor P.J. (2003). (–)-PHCCC, a positive allosteric modulator of mGluR4: characterization, mechanism of action, and neuroprotection. *Neuropharmacology* 45:895–906. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00271-5](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00271-5)
249. Szczurowska E., Mareš P. (2012). Positive Allosteric Modulator of mGluR4 PHCCC Exhibits Proconvulsant Action in Three Models of Epileptic Seizures in Immature Rats. *Physiol Res* 61(6):619-628. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932336>
250. Liu Y., Wang Y., Yang J., Xu T., Tan C., Zhang P., Liu Q., Chen Y. (2022). G-alpha interacting protein interacting protein, C terminus 1 regulates epileptogenesis by increasing the expression of metabotropic glutamate receptor 7. *CNS Neurosci Ther* 28:126–138. <https://doi.org/10.1111/CNS.13746>

Приложение

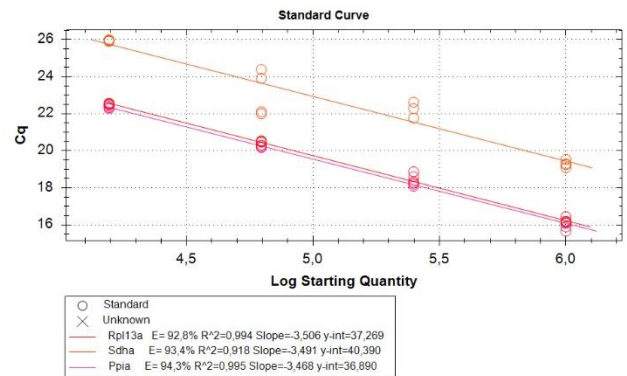
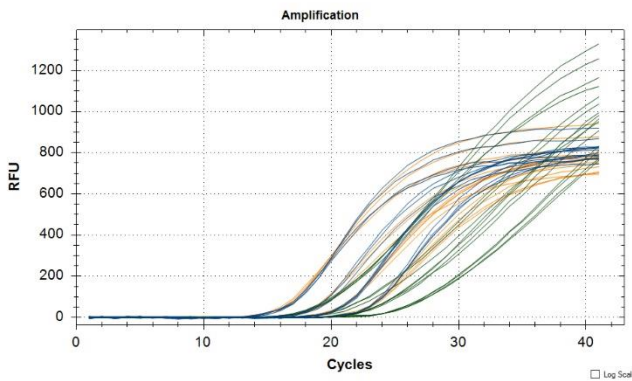
Кривые амплификации

Стандартные кривые

Actb + Gapdh + B2m



Rpl13a + Sdha + Ppia



Hprt1 + Pgk1 + Ywhaz

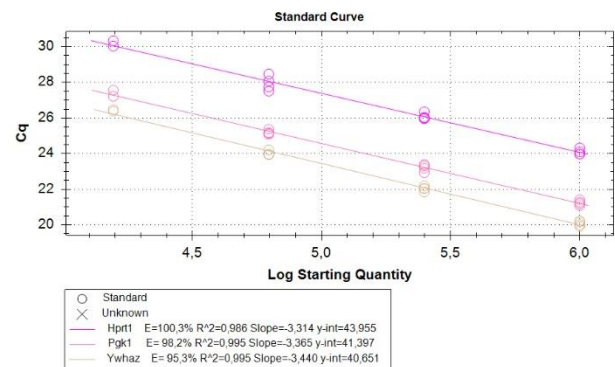
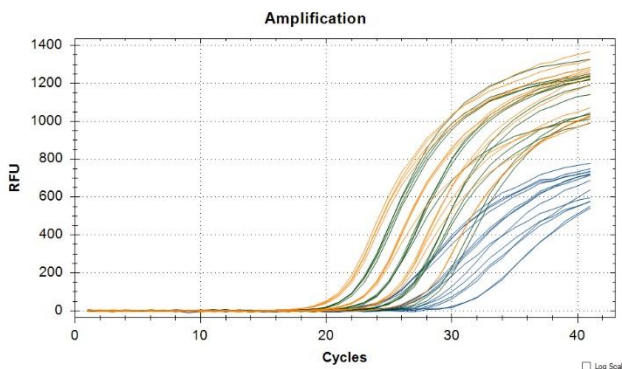


Рисунок П.1. Репрезентативный эксперимент по проверке эффективности выбранных в данной работе систем ПЦР для генов домашнего хозяйства методом серийного разведения (серия 4-кратных разведений). Наиболее концентрированный образец соответствует 10-кратно разведенной кДНК, синтезированной из 1 мкг тотальной РНК височной коры крысы. Цвета кривых амплификации указывают на канал детекции (синий для FAM (*Actb*, *Rpl13a*, *Hprt1*), зеленый для HEX (*Gapdh*, *Sdha*, *Pgk1*), оранжевый для ROX (*B2m*, *Ppia*, *Ywhaz*)).

Кривые амплификации

Стандартные кривые

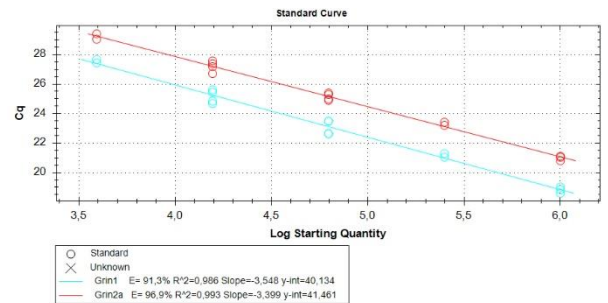
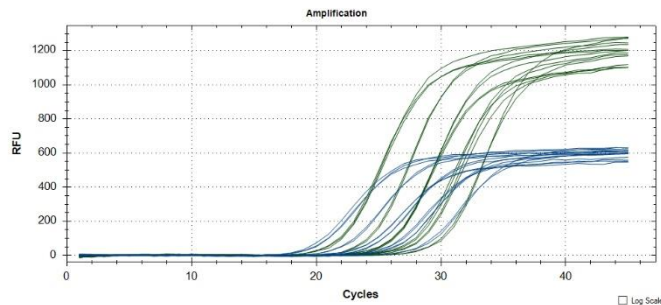
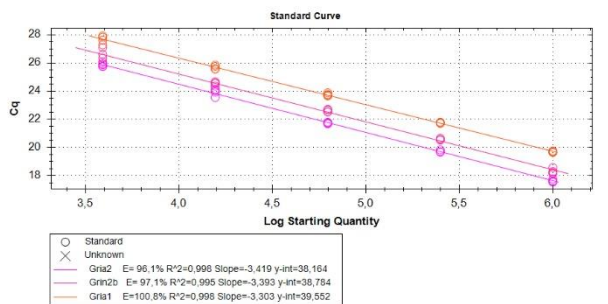
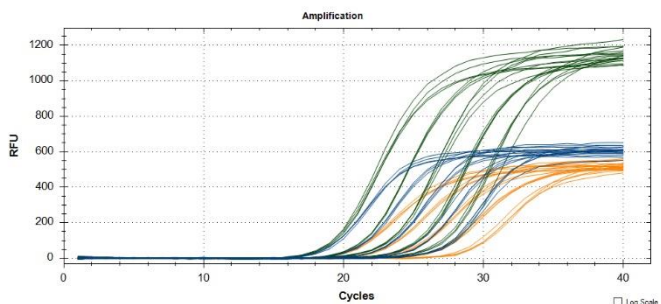
Grin1 + Grin2a*Grin2b + Gria1 + Gria2*

Рисунок П.2. Репрезентативный эксперимент по проверке эффективности выбранных в данной работе систем ПЦР для генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов методом серийного разведения (серия 4-кратных разведений). Наиболее концентрированный образец соответствует 10-кратно разведенной кДНК, синтезированной из 1 мкг тотальной РНК височной коры крысы. Цвета кривых амплификации указывают на канал детекции (синий для FAM (*Grin1*, *Gria2*), зеленый для HEX (*Grin2a*, *Grin2b*), оранжевый для ROX (*Gria1*)).

Кривые амплификации

Стандартные кривые

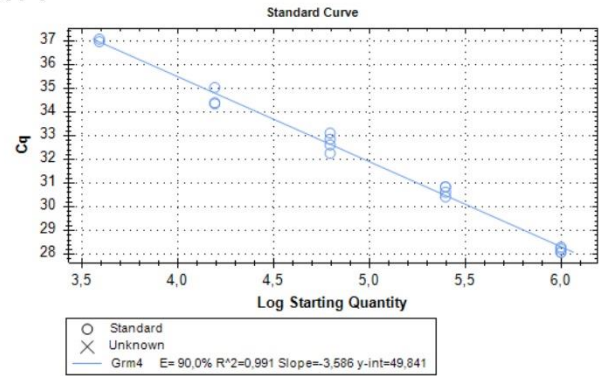
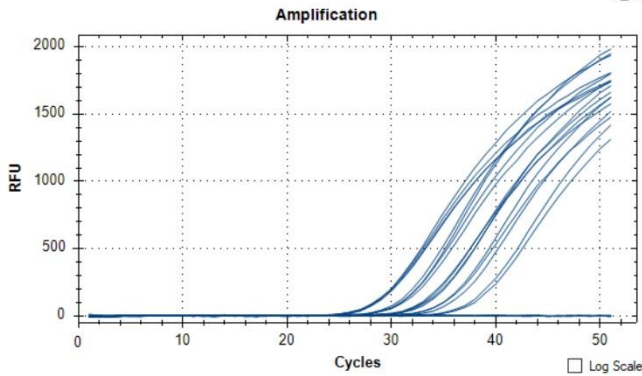
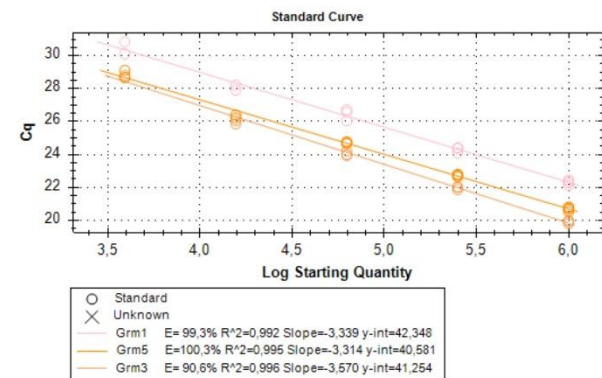
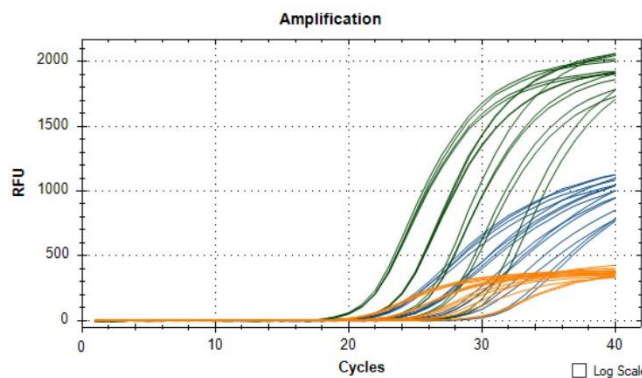
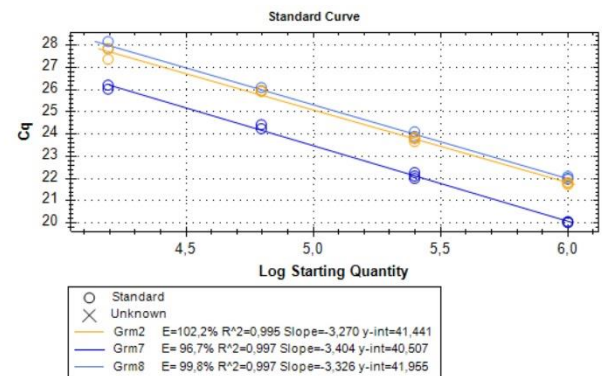
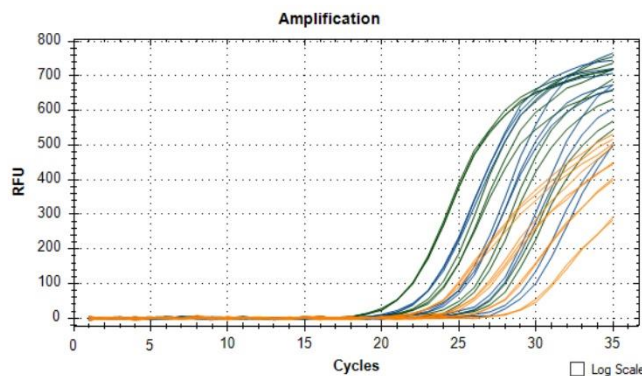
Grm4*Grm1 + Grm3 + Grm5**Grm2 + Grm7 + Grm8*

Рисунок П.3. Репрезентативный эксперимент по проверке эффективности выбранных в данной работе систем ПЦР для генов метаболитных рецепторов глутамата методом серийного разведения (серия 4-кратных разведений). Наиболее концентрированный образец соответствует 10-кратно разведенной кДНК, синтезированной из 1 мкг тотальной РНК височной коры крысы. Цвета кривых амплификации указывают на канал детекции (синий для FAM (*Grm4*, *Grm2*, *Grm1*), зеленый для HEX (*Grm5*, *Grm7*), оранжевый для ROX (*Grm3*, *Grm8*)).