

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГИППОКАМПА КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

© 2023 Г.П. Диеспиров, Т.Ю. Постникова, А.В. Грифлюк,
А.А. Коваленко, А.В. Зайцев*

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: aleksey_zaitsev@mail.ru*

Поступила в редакцию 09.11.2022

После доработки 07.01.2023

Принята к публикации 10.01.2023

Эпилептический статус (ЭС) запускает множество патологических изменений в нервной системе, которые еще не до конца изучены и могут вести к развитию эпилепсии. В этой работе мы изучили эффекты действия ЭС на характеристики возбуждающей глутаматергической передачи в гиппокампе у крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследования проводились через 1 день (острая фаза модели), 3 и 7 дней (латентная фаза) и 30–80 дней (хроническая фаза) после ЭС. Используя метод ОТ-ПЦР в реальном времени, мы обнаружили, что в латентную фазу происходит снижение экспрессии генов субъединиц GluA1 и GluA2 AMPA-рецепторов, что может также сопровождаться повышением доли кальций-проницаемых AMPA-рецепторов, играющих существенную роль в патогенезе многих заболеваний ЦНС. В переживающих срезах мозга при регистрации полевых ответов в области CA1 гиппокампа в ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера электрическим током разной силы мы выявили снижение эффективности возбуждающей синаптической нейротрансмиссии во всех фазах модели. Однако в хронической фазе обнаружили увеличение частоты спонтанных возбуждающих постсинаптических потенциалов, что свидетельствует о повышенной фоновой активности глутаматергической системы при эпилепсии. В пользу этого также указывает снижение порога экстензии задних конечностей в тесте максимального электрошока у крыс с височной эпилепсией по сравнению с контрольными животными. Полученные результаты свидетельствуют о наличии ряда функциональных изменений в глутаматергической системе, связанных с эпилептизацией мозга. Эти данные могут быть использованы для разработки антиэпилептогенной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: литий-пилокарпиновая модель эпилепсии, синапс, AMPA-рецептор, гиппокамп, полевой постсинаптический потенциал, возбуждающий постсинаптический потенциал, тест максимального электрошока.

DOI: 10.31857/S0320972523030053, EDN: QWLEGQ

ВВЕДЕНИЕ

Височная эпилепсия (ВЭ) является одним из распространенных неврологических расстройств, и почти в 30% от всех случаев ВЭ не поддается фармакологическому лечению [1], что ухудшает качество жизни пациентов [2]. ВЭ может развиваться после однократного повреждающего воздействия на мозг, такого как эпилептический статус (ЭС), черепномозговая

травма, длительные фебрильные судороги, инфекционное заболевание ЦНС, инсульт [3–5], запускающие эпилептогенез. Эпилептогенез представляет собой каскад функциональных и структурных изменений в ткани мозга, приводящий к развитию спонтанных рецидивирующих судорог (СРС) [6, 7]. Наиболее часто при ВЭ страдает гиппокамп [8], который играет важную роль в формировании памяти [9], поэтому для ВЭ характерны коморбидные

Принятые сокращения: ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал; ВЭ – височная эпилепсия; МЭШ – максимальный электрошок; пПСП – полевой постсинаптический потенциал; ПС – популяционный спайк; прПСП – пресинаптический популяционный спайк; СРС – спонтанные рецидивирующие судороги; ЭС – эпилептический статус.

* Адресат для корреспонденции.

когнитивные нарушения [10, 11]. Несмотря на то что механизмы эпилептогенеза активно изучаются, до сих пор полная последовательность событий остается неясной, а надежных терапевтических подходов, предотвращающих эпилептогенез, пока не разработано [6, 12].

Для изучения эпилептогенеза и приобретенной ВЭ используется моделирование на животных. Литий-пилокарпиновая модель ВЭ у крыс является общепринятой моделью, т.к. повторяет все особенности болезни человека [13]. Основными признаками этой модели являются: наличие длительного ЭС; острая фаза с судорожным состоянием длительностью до суток; латентная фаза длительностью 3–4 недели (фаза эпилептогенеза); хроническая фаза, в которой у животных развиваются СРС [13, 14].

При эпилептизации ткани мозга происходят морфологические и функциональные изменения в организации синаптических контактов [15]. Например, выявлено разрастание мшистых волокон и формирование абберантных синаптических контактов в зубчатой извилине и области СА3 гиппокампа [16, 17]. Ранее нами было показано снижение уровня долговременной синаптической потенциации в поле СА1 гиппокампа в латентную и хроническую фазы литий-пилокарпиновой модели [18–20].

После эпилептических судорог нередко нарушается синаптическая передача, включая изменение вероятности выброса медиатора [21], числа и плотности глутаматных рецепторов на постсинаптической мембране [22, 23], перестройку их субъединичного состава [24–27]. Данные, полученные в разных лабораториях и/или на разных моделях эпилепсии, и клинические данные часто являются противоречивыми (для обзора см. Zaitsev et al. [15]). Это свидетельствует о том, что ЭС может запускать различные компенсаторные механизмы в нервной системе. В некоторых случаях эти механизмы позволяют предотвратить развитие эпилепсии, а в других — болезнь прогрессирует. Понимание того, какие именно изменения в синапсах происходят после эпилептической активности, может лечь в основу рационально обоснованной терапии предотвращения эпилептогенеза и развития эпилепсии.

В данной работе мы изучили изменения свойств синаптической передачи нейронов поля СА1 гиппокампа, уровень экспрессии генов субъединиц АМРА-рецепторов в дорзальном гиппокампе, а также предрасположенность к формированию судорожных состояний у крыс в различные периоды времени после пилокарпин-индуцированного ЭС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследование проводили на самцах крыс Вистар. Животных содержали в виварии при комнатной температуре, 12-часовом цикле день/ночь и свободном доступе к пище и воде.

Литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии у крыс. Крысам в возрасте трех недель внутрибрюшинно (в/б) вводили раствор LiCl (127 мг/кг; «Sigma-Aldrich», США), через сутки в/б вводили раствор нитрата метилскополамина (0,5 мг/кг; «Sigma-Aldrich»), еще через 40–50 мин в/б вводили пилокарпин (30 мг/кг; «Sigma-Aldrich»), который приводил к ЭС. Контрольным крысам вводили те же препараты, за исключением пилокарпина, который заменяли на 0,9%-ный раствор NaCl.

Тяжесть судорог оценивали по модифицированной шкале лимбических судорог Расина [28]: 1 балл — подергивание челюстей и лицевых мышц; 2 балла — усиление лицевого клонуса с переходом на мышцы туловища; 3 балла — клонические сокращения передних лап; 4 балла — спячивание (подъем на задние лапы с опорой на лапы и хвост); 5 баллов — спячивание и падение на бок с клоническими судорогами конечностей, генерализацией приступа и переходом в тонические судороги с полной потерей позы. Судороги с оценкой 4 балла и выше, продолжающиеся более 15 мин, оценивали как ЭС. Как правило, через 30 мин после введения пилокарпина у большинства животных развивались судороги, достигающие 4 и более баллов. В эксперименты отбирались только крысы, у которых судороги от 4 баллов и выше продолжались не менее 90 мин. Тяжелые тонико-клонические судороги, вызванные пилокарпином, приводят к высокой смертности у животных, на уровне ~50%.

Литий-пилокарпиновая модель условно разделяется на 3 фазы, в каждую из которых были проведены экспериментальные исследования: острая фаза — 1-й день; латентная фаза (эпилептогенез без внешних проявлений) — 3-й и 7-й дни; хроническая фаза (появление СРС) наступает через 3–4 недели после ЭС. В ходе данной работы не проводилось отдельных экспериментов по регистрации СРС у крыс. Исследование свойств базовой нейротрансмиссии и кратковременной пластичности проводили через 30–35 дней после ЭС, регистрацию спонтанных синаптических событий — через 40–50 дней, биохимические исследования — через 60 дней, порог развития судорог у крыс — через 70–80 дней. Число крыс, использованных в экспериментах,

Таблица 1. Число животных, использованных в экспериментах

Фаза	Группа	ОТ-ПЦР	Электрофизиологические эксперименты		МЭШ
			Полевые отведения	Патч-кламп	
Острая фаза	Контроль	10	8	—	—
	ВЭ	9	14	—	—
Латентная фаза	Контроль	11	6	—	—
	ВЭ	6	23	—	—
Хроническая фаза	Контроль	12	10	6	15
	ВЭ	7	12	4	21

Примечание. МЭШ — метод максимального электрошока.

указано в табл. 1. Одни и те же животные могли быть использованы в разных экспериментах, если это было методически возможно.

Электрофизиологические эксперименты и анализ результатов. Крысу анестезировали при помощи изофлурана («Laboratorios Karizoo», Испания), декапитировали, быстро извлекали мозг и изготавливали горизонтальные переживающие срезы мозга, содержащие дорзальный гиппокамп, толщиной 350 мкм на вибраторе Microm International HM 650V («Microm International», Германия) в охлажденной до 0 °C и аэрируемой карбогеном (95% O₂/5% CO₂) искусственной спинномозговой жидкости следующего состава (в mM): 126 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 1 MgSO₄, 2 CaCl₂, 24 NaHCO₃, 10 глюкоза. После изготовления срезы помещали в водяную баню при 35 °C на 60 мин. От одного животного в эксперименте использовали обычно 1–3 среза.

Эксперименты проводили при температуре 30 °C. Регистрацию полевых постсинаптических потенциалов (пПСП) осуществля-

ли от лучистого слоя поля CA1 гиппокампа крыс при помощи боросиликатного стеклянного микроэлектрода (0,2–1,0 Мом; «World Precision Instruments», США) (рис. 1, а).

Срезы стимулировали парными прямоугольными импульсами каждые 20 с (длительность импульса — 0,1 мс; межстимульный интервал — 50 мс) с помощью биполярного нихромового электрода на границе полей CA3–CA1 стимулятором А365 («World Precision Instruments»). Полевые ПСП регистрировали с помощью усилителя Model 1800 («AM Systems», США), оцифровывали на ЦАП/АЦП NI USB-6211 («National Instruments», США) с использованием программного обеспечения WinWCP v5.x («University of Strathclyde», Великобритания).

Для каждого среза рассчитывали амплитуду пресинаптического популяционного спайка (прПС, fiber volley) и пПСП (рис. 1, б). Измерение соотношения вход/выход (input/output) проводили при помощи стимуляции с возрастающей силой тока в диапазоне 25–200 мкА

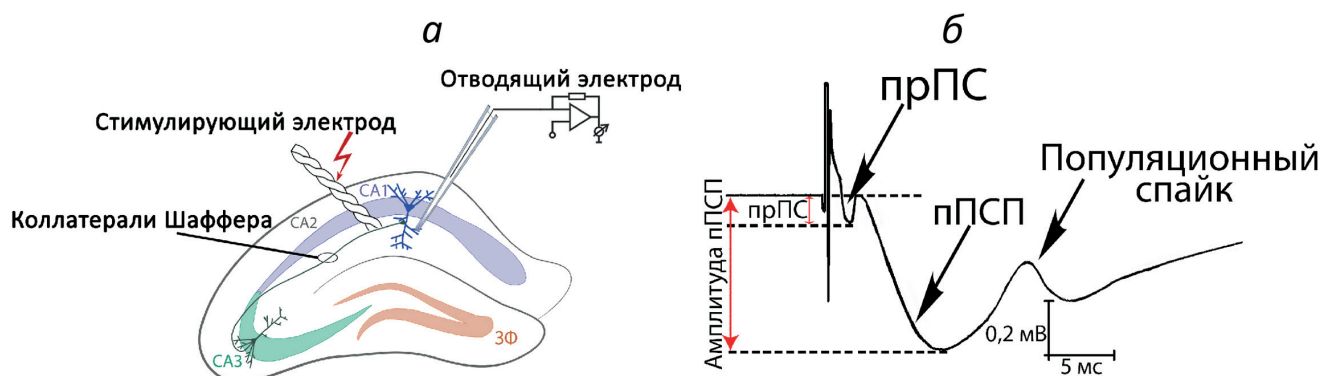


Рис. 1. Методика регистрации полевых потенциалов. а — Схема расположения электродов в срезах гиппокампа. б — Схема регистрируемого полевого ответа с указанием регистрируемых параметров; прПС — пресинаптический популяционный спайк; пПСП — полевой постсинаптический потенциал

с шагом в 25 мкА. Строили зависимость вход/выход, которая представляет собой передаточную функцию между пресинаптическими потенциалами действия и ответом на постсинаптических мембранах. Эффективность синаптической нейротрансмиссии определяли по максимальному наклону кривой вход/выход, который находили путем аппроксимации функцией Гомперца [29].

Оценку величины кратковременной синаптической пластичности проводили методом парной стимуляции с возрастающими межстимульными интервалами 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500 мс. Величину пластичности рассчитывали, как отношение амплитуды второго пПСП к первому для каждого интервала стимулов.

Запись спонтанных возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) на пирамидных нейронах гиппокампа производили методом патч-клампа в режиме «целая клетка» при потенциале покоя в течение 10 мин. Использовали стеклянные микроэлектроды с входным сопротивлением 3–5 МОм. Электрод заполняли раствором следующего состава (в мМ): 114 глюконат калия; 6 KCl; 10 NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота); 0,2 EGTA (этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота); 4 АТР-Mg; 0,3 GTP. Поиск и анализ ВПСП проводился автоматически при помощи предварительно созданного шаблона в программе Clampfit 10.4.2.0 (Molecular Devices), ошибочно отобранные программой ВПСП исключали при визуальной оценке результатов.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Индукцию судорог вызывали у крыс в возрасте 6–7 недель. Для анализа экспрессии генов, кодирующих GluA1 (*Gria1*) и GluA2 (*Gria2*) субъединицы AMPA-рецепторов, крыс декапитировали на 3, 7 и 60 день после индукции судорог. Выделение дорзальной области гиппокампа было выполнено при помощи замораживающего микроножа OTF5000 («Bright Instruments», Великобритания). Тотальную РНК из образцов выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Перед обратной транскрипцией образцы РНК обрабатывали RQ1 DNase («Promega», США). Затем РНК осаждали с помощью раствора LiCl. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop Lite («Thermo Fisher Scientific», США).

кДНК синтезировали из 2 мкг тотальной РНК с использованием олиго-dT (1 мкг), 9-мерных случайных (0,5 мкг) праймеров («ДНК-Синтез», Россия) и обратной транскриптазы М-MLV («Promega»). Реакцию проводили согласно инструкции производителя.

Полученные образцы кДНК разбавляли в 10 раз перед проведением ПЦР. ПЦР проводили в общем объеме 6 мкл с 0,8 мкл кДНК. Для реакции использовали 0,5 ед. TaqM-полимеразы («Алкор-Био», Россия). Специфические зонды, прямые и обратные праймеры («ДНК-Синтез») приведены в табл. 2. ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX384 Real-Time System («Bio-Rad», США).

ПЦР для генов домашнего хозяйства были проведены в мультиплексах (*Actb* + *Gapdh* + *B2m*, *Rpl13a* + *Ppia* + *Sdha* и *Hprt1* + *Pgk1* + *Ywhaz*) в соответствии с протоколом, описанным ранее [30]. Анализ, выполненный с использованием онлайн-инструмента RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>), выявил, что из перечисленных генов домашнего хозяйства *Pgk1*, *Ywhaz* и *Gapdh* экспрессируются наиболее стабильно. Относительная экспрессия генов *Gria1* и *Gria2* была подсчитана с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [31]. Нормализацию данных проводили с использованием среднего геометрического значений Ct генов *Pgk1*, *Ywhaz* и *Gapdh*.

Метод максимального электрошока (МЭШ). Предрасположенность к судорогам у животных исследовали с помощью МЭШ через 2,5 месяца после ЭС. Ток подавался через ушные электроды с использованием генератора импульсов ECT Unit 57800 («Ugo Basile», Италия). Использовали силу тока в диапазоне 12–100 мА с интервалами 0,1 логарифмической шкалы, частота импульсов – 200 Гц, длительность одиночного импульса – 0,9 мс, длительность подачи тока – 0,8 с. У каждого животного определяли минимальное значение тока, при котором наблюдались тонические судороги с экстензией задних конечностей. В первый день животное получало электрошок средней силы (40 мА). Если тонические судороги с экстензией задних конечностей не развивались, то силу тока увеличивали. Если при 40 мА тонические судороги развивались, то силу тока уменьшали. Повторные эксперименты проводили через 2–3 дня.

Статистическая обработка данных. Достоверность различий средних в двух выборках оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Влияние силы стимулирующего тока на величину полевых ответов, а также сравнение пПСП в разных группах проверяли с помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями с последующим использованием апостериорного критерия Тьюки. Для сравнения относительной экспрессии генов использовали двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака. Данные в тексте

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов для ОТ-ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательности праймеров и зондов (5'→3')	Ссылка
<i>Actb</i> NM_031144	F: TGTCACCAACTGGGACGATA R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA Зонд: FAM-CGTGTGGCCCCTGAGGAGCAC-BHQ1	[32] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Gapdh</i> NM_017008	F: TGCACCACCAACTGCTTAG R: GGATGCAGGGATGATGTTT Зонд: R6G-ATCACGCCACAGCTTTCCAGAGGG-BHQ2	[33]
<i>B2m</i> NM_012512	F: TGCCATTCAGAAAACCTCCCC R: GAGGAAGTTGGGCTTCCCAT Зонд: ROX-ATTCAAGTGTACTCTCGCCATCCACCG-BHQ1	[34]
<i>Rpl13a</i> NM_173340	F: GGATCCCTCCACCCTATGACA R: CTGGTACTTCCACCCGACCTC Зонд: FAM-CTGCCCTCAAGGTTGTGCGGCT-BHQ1	[35] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Sdha</i> NM_130428	F: AGACGTTTGACAGGGGAATG R: TCATCAATCCGCACCTTGTA Зонд: R6G-ACCTGGTGGAGACGCTGGAGCT-BHQ2	[36] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Ppia</i> NM_017101	F: AGGATTCATGTGCCAGGGTG R: CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA Зонд: ROX-CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA-BHQ1	[26]
<i>Hprt1</i> NM_012583	F: TCCTCAGACCGCTTTTCCCGC R: TCATCATCACTAATCACGACGCTGG Зонд: FAM-CCGACCGGTTCTGTCTATGTCGACCCT-BHQ1	[37] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Pgk1</i> NM_053291	F: ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC R: AGCCACAGCCTCAGCATATTC Зонд: R6G-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA-BHQ2	[38] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Ywhaz</i> NM_013011	F: GATGAAGCCATTGCTGAACCTG R: GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC Зонд: ROX-TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC-BHQ1	[38] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Gria1</i> NM_031608	F: TCAGAACGCCTCAACGCC R: TGTAGTGGTACCCGATGCCA Зонд: ROX-TCCTGGGCCAGATCGTGAAGCTAGAAAA-BHQ1	[39]
<i>Gria2</i> NM_017261	F: CAGTGCATTTCCGGGTAGGGA R: TGCGAAACTGTTGGCTACCT Зонд: FAM-TCGGAGTTCAGACTGACACCCCA-BHQ1	[39]

и на рисунках приведены как среднее со стандартной ошибкой среднего, если не указано обратного.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Возможные изменения характеристик глутаматергической передачи в гиппокампе крыс были проанализированы на нескольких структурных уровнях: молекулярном (экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов), клеточном (исследование синаптической нейротрансмиссии и вероятности выброса глутамата клетками) и на целом животном (МЭШ-тест).

Относительная экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов снижена в латентной, но не в хронической фазе. Так как амплитуда синаптических возбуждающих ответов в основном определяется AMPA-рецепторами, то мы проанализировали, изменяется ли уровень экспрессии генов, кодирующих GluA1 (*Gria1*) и GluA2 (*Gria2*) субъединицы AMPA-рецепторов (рис. 2).

Мы выявили снижение экспрессии обоих генов на 3-й день после ЭС. Продукция мРНК *Gria2* остается сниженной до 7-го дня после пилокарпин-индуцированных судорог, но не отличается от контрольных значений в хроническую фазу (рис. 2, б). Изменений

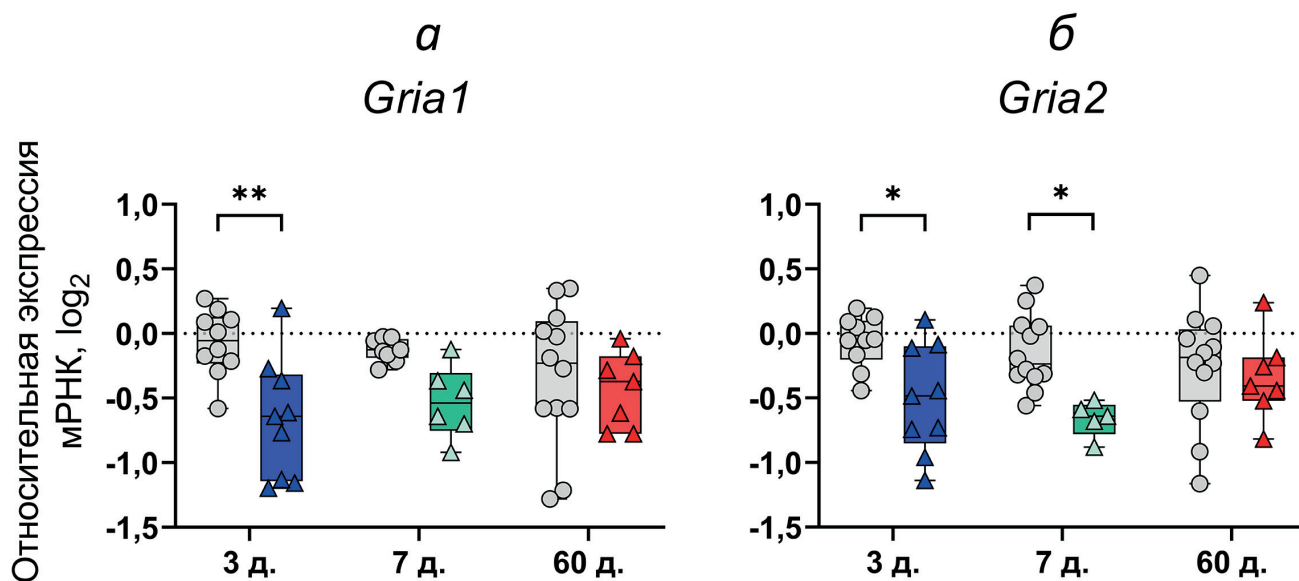


Рис. 2. Относительная экспрессия генов *Gria1* (а) и *Gria2* (б) в дорзальной области гиппокампа крыс. Исследования проводились на 3-й и 7-й дни после индукции ЭС (латентная фаза модели), а также на 60-й день (хроническая фаза модели). Контрольная группа показана серым цветом. Данные представлены в виде индивидуальных значений (кружки и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (планки ошибок), медианой выборки (горизонтальная линия), а также первым и третьим квартилями (прямоугольники). Число животных в группах: 1) эпилептическая группа: 3-й день ($n = 9$), 7-й день ($n = 6$), 60-й день ($n = 7$); 2) контрольная группа: 3-й день ($n = 10$), 7-й день ($n = 11$), 60-й день ($n = 12$); д. — количество дней после ЭС. Двухфакторный дисперсионный анализ: *Gria1* — $F_{1,47}$ (фактор судорог) = 12,4, $p = 0,001$; *Gria2* — $F_{1,49}$ (фактор судорог) = 13,4, $p < 0,001$. Значимые различия между группами рассчитаны с помощью апостериорного теста Сидака — * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

экспрессии *Gria1* не выявлено ни на 7-й день, ни в хроническую фазу (рис. 2, а).

Глутаматергическая синаптическая нейротрансмиссия снижена в разные периоды литий-пилоккарпиновой модели. Патологические изменения в нейронных связях гиппокампа ведут к изменениям базовой синаптической трансмиссии. Поэтому мы исследовали, как изменяется базовый уровень возбуждающей (глутаматергической) синаптической нейротрансмиссии в синапсах СА3–СА1 пирамидных нейронов гиппокампа у крыс в острую, латентную и хроническую фазы литий-пилоккарпиновой модели ВЭ. Для этого мы построили зависимость амплитуды пПСП и прПС от силы внеклеточной стимуляции, а также вход/выход-зависимости (рис. 3). Из-за повышенной возбудимости нейронных сетей у крыс в различные фазы после ЭС может изменяться не только амплитуда, но и форма пПСП, что согласуется с результатами, полученными в модели эпилептических судорог, вызванных пентилентетразолом [29].

В острой фазе модели амплитуда пПСП снижена по сравнению с контролем, особенно при большой силе стимуляции ($F_{1,448} = 7,5$; $p < 0,01$; рис. 3, а). Изменений амплитуды прПС не было выявлено ($F_{1,441} = 0,67$; $p = 0,42$; рис. 3, а). Анализ вход/выход-зависимости показал значительное снижение уровня синаптической

нейротрансмиссии на 1-й день после ЭС ($t = 2,77$; $p < 0,01$; рис. 3, з).

В латентной фазе модели не было выявлено отличий амплитуд пПСП ни на 3-й, ни на 7-й день ($F_{2,602} = 1,70$; $p = 0,18$; рис. 3, б). Однако было обнаружено снижение прПС на 3-й день в интервале стимуляции 125–200 мкА по сравнению с контрольной группой ($F_{2,567} = 8,3$; $p < 0,001$; рис. 3, б). Соотношение вход/выход статистически значимо снижается только к 7-му дню после перенесенного ЭС ($F_{2,76} = 3,58$; $p < 0,05$; рис. 3, д).

В хронической фазе наблюдается значительное снижение амплитуды пПСП ($F_{1,707} = 17,0$; $p < 0,001$; рис. 3, в) в широком диапазоне интервалов стимуляции (75–200 мкА), однако изменения амплитуды прПС, выявленные с помощью дисперсионного анализа ($F_{1,637} = 4,2$; $p < 0,05$; рис. 3, в), не достигали уровня значимости при проверке апостериорными тестами. Также в этот период происходит значительное ослабление синаптической нейротрансмиссии ($t = 2,19$; $p < 0,05$; рис. 3, е).

Вероятность выброса глутамата в синапсах области СА1 гиппокампа изменена в хронической фазе модели эпилепсии. Изменение величины синаптической нейротрансмиссии может быть связано с изменением вероятности выброса глутамата в коллатералиях Шаффера. Для оценки возможных изменений вероятности

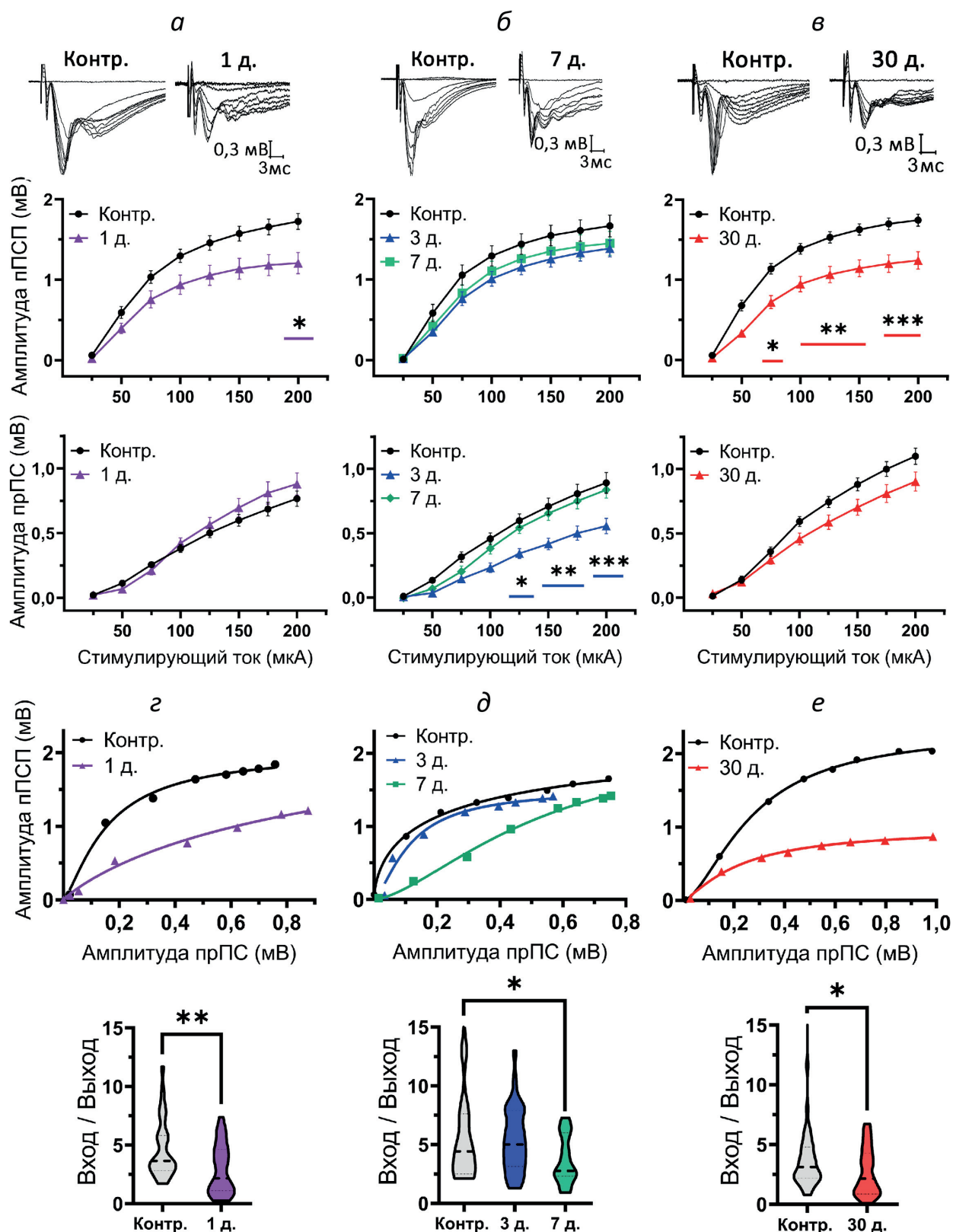


Рис. 3. Репрезентативные примеры записей (сверху), амплитуды пПСП и амплитуды прПС в ответ на стимуляцию (снизу) (а–е). Примеры вход/выход-отношений между амплитудами пПСП и прПС, аппроксимированные сигмоидальной функцией Гомперца (сверху), и сравнение их максимальных наклонов (снизу) (г–е). На графиках сравнения соотношения вход/выход толстой пунктирной линией указаны медианы, тонкой пунктирной линией – квартили. Число срезов в группах: 1) эпилептическая группа: 1-й день ($n = 39$), 3-й день ($n = 41$), 7-й день ($n = 39$), 30-й день ($n = 41$); 2) контрольная группа: 1-й день ($n = 35$), 7-й день ($n = 24$), 30-й день ($n = 41$). прПС – пресинаптический популяционный спайк; Контр. – контроль; д. – количество дней после ЭС. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (апостериорный критерий Тьюки – для панелей а, б, в, д; t-тест – для панелей г и е)

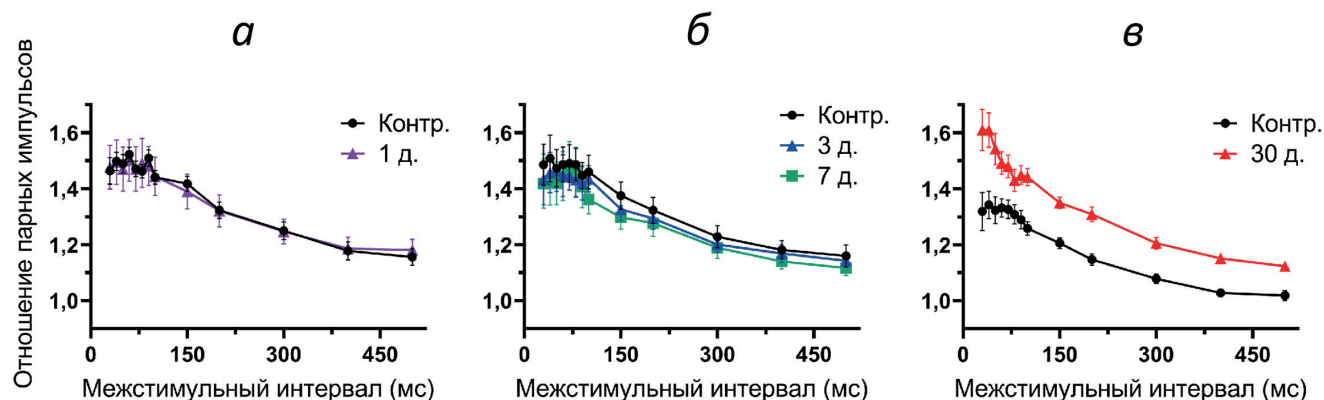


Рис. 4. Кратковременная синаптическая пластичность не изменяется в срезах гиппокампа крыс, перенесших ЭС. а–в – Графики зависимости отношения парных импульсов от величины межстимульного интервала в острую, латентную и хроническую фазы соответственно. Число срезов в группах: 1) эпилептическая группа: острая фаза – 1-й день ($n = 10$); латентная фаза – 3-й день ($n = 6$), 7-й день ($n = 10$); хроническая фаза – 30-й день ($n = 20$); 2) контрольная группа: 1-й день ($n = 9$), 7-й день ($n = 7$), 30-й день ($n = 9$); д. – количество дней после ЭС

выброса медиатора часто используют сравнение отношений амплитуд синаптических ответов при подаче парных стимулов [40]. Поэтому мы измерили отношения амплитуд ответов (величину кратковременной фасилитации) при подаче парных стимулов с разным интервалом в диапазоне 30–500 мс.

В острой и латентной фазах достоверных различий выявлено не было (острая фаза – $F_{1,204} = 0,47$; $p = 0,93$; рис. 4, а; латентная фаза – $F_{2,240} = 0,18$; $p = 0,84$; рис. 4, б). В хронической фазе дисперсионный анализ выявляет различия между контрольной и ВЭ-группами ($F_{1,324} = 13,1$; $p < 0,01$; рис. 4, в), однако апостериорный тест Тьюки не подтвердил значимость различий ни для одного из временных интервалов.

При эпилепсии могут происходить изменения в работе пресинапса [15], включая увеличение числа везикул, готовых к выбросу в пресинаптических терминалях [21], что может проявляться в увеличении вероятности спонтанного выброса медиатора и увеличении коэффициента фасилитации. Поэтому мы проанализировали частоту и амплитуду спонтанных ВПСР в СА1 пирамидных нейронах гиппокампа в хронической фазе модели. Мы регистрировали спонтанную активность пирамидных нейронов поля СА1 при потенциале покоя. На рис. 5, а представлены репрезентативные примеры регистраций, на которых отмечены ВПСР. У нейронов гиппокампа крыс с ВЭ частота ВПСР была выше на 118%, чем в контрольной группе ($t = 2,5$; $p = 0,02$; рис. 5, б), однако амплитуда ВПСР не различалась ($t = 0,60$; $p = 0,56$; рис. 5, в) и составляла $0,72 \pm 0,20$ мВ у контрольных животных и $0,79 \pm 0,21$ мВ – у крыс с ВЭ. Следует отметить, что на рис. 5, б для крыс экспериментальной группы 4 точки на частоте больше 2 Гц получены от разных животных.

Результаты этого эксперимента показывают, что вероятность выброса медиатора выше в эпилептической группе, и это согласуется с данными, полученными другими авторами в каинатной модели эпилепсии [21]. Однако в пилокарпиновой модели Owen et al. [41] наблюдали увеличение частоты миниатюрных ВПСР

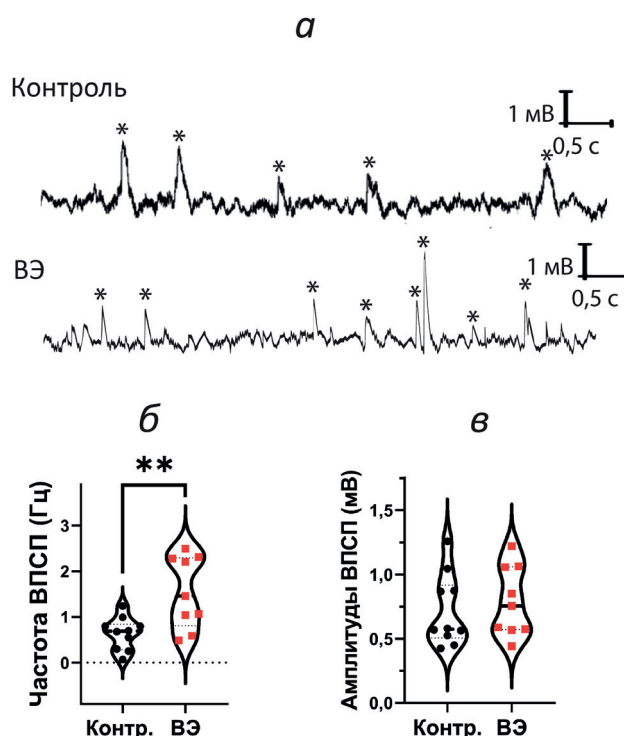


Рис. 5. Частота ВПСР снижена, а амплитуда остается неизменной в пирамидных нейронах гиппокампа крыс с ВЭ. а – Репрезентативные записи ответов нейронов при потенциале покоя, ВПСР отмечены звездочками. Частота (б) и амплитуда (в) спонтанных ВПСР в двух группах. Число срезов в группах: 1) эпилептическая группа: 35-й день ($n = 9$); 2) контрольная группа: 35-й день ($n = 10$); Контр. – контроль; ВЭ – группа крыс с височной эпилепсией; t -тест – ** $p < 0,01$

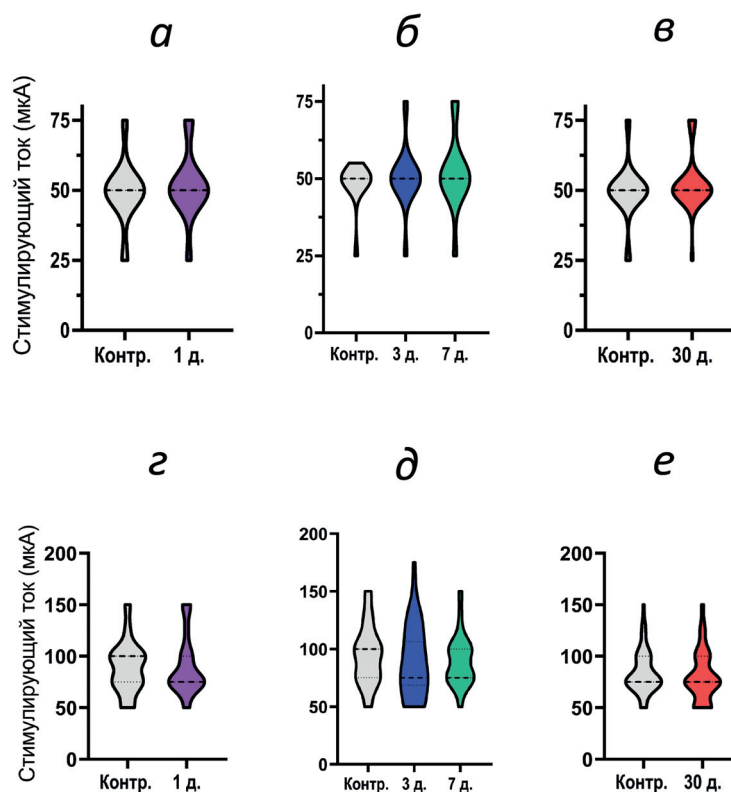


Рис. 6. Пороговые токи, вызывающие пПСП (*a–в*) и ПС (*г–е*) не изменяются в острой (*a, г*), латентной (*б, д*) и хронической (*в, е*) фазах литий-пилокарпиновой модели ВЭ. Число срезов в группах: 1) epileptическая группа: острая фаза – 1-й день ($n = 39$); латентная фаза – 3-й день ($n = 42$), 7-й день ($n = 39$); хроническая фаза – 30-й день ($n = 74$); 2) контрольная группа: 1-й день ($n = 35$), 7-й день ($n = 25$), 30-й день ($n = 59$). Контр. – контроль; д. – число дней после ЭС. Апостериорный критерий Тьюки использован для сравнения данных на панелях *б, д*; t -тест – для *a, в, г* и *е*

в более поздние сроки модели (через 80–110 дней), тогда как через 20–60 дней частота событий между контрольной и epileptической группой еще не различалась. Пороги полевых постсинаптических потенциалов (пПСП) и популяционных спайков (ПС) не изменены у крыс с ВЭ.

При epilepsии вероятность синхронизации и реверберации нервных импульсов в нейронных сетях возрастает. Соответственно, более слабое синаптическое возбуждение может приводить к генерации потенциалов действия. Так как мы выявили ослабление возбуждающей синаптической передачи в гиппокампе экспериментальных крыс (рис. 3), то решили проверить изменяются ли пороги возникновения пПСП и ПС в нейронах CA1. Мы не выявили достоверных различий для порогов возникновения пПСП ни в одном из исследуемых периодов (острая фаза – $t = 0,97$; $p = 0,34$; рис. 6, *a*; латентная фаза – $F_{2,102} = 1,11$; $p = 0,33$; рис. 6, *б*; хроническая фаза – $t = 1,83$; $p = 0,07$; рис. 6, *в*); ни для порогов генерации ПС (острая фаза – $t = -0,19$; $p = 0,85$; рис. 6, *г*; латентная фаза – $F_{2,102} = 0,48$; $p = 0,62$; рис. 6, *д*; хроническая фаза – $t = 0,9$; $p = 0,37$; рис. 6, *е*).

Таким образом, несмотря на снижение эффективности возбуждающей синаптической передачи, сила внеклеточной стимуляции, необходимая для генерации потенциалов действия в пирамидных нейронах области CA1, осталась прежней.

У крыс с височной epilepsией снижен порог развития экстензии задних конечностей в МЭШ-тесте. Для исследования предрасположенности к судорогам провели тестирование МЭШ у крыс в хронической фазе модели и у контрольных животных того же возраста (рис. 7, *a*). У крыс с ВЭ выявили значительное снижение порога появления экстензии задних конечностей ($t = 2,4$; $p < 0,05$; рис. 7, *б*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты наших экспериментов выявили ряд особенностей в функционировании глутаматергической передачи в гиппокампе крыс в разные фазы литий-пилокарпиновой модели ВЭ по сравнению с контролем. Часть изменений носит компенсаторный характер и направлена на снижение уровня возбуждения

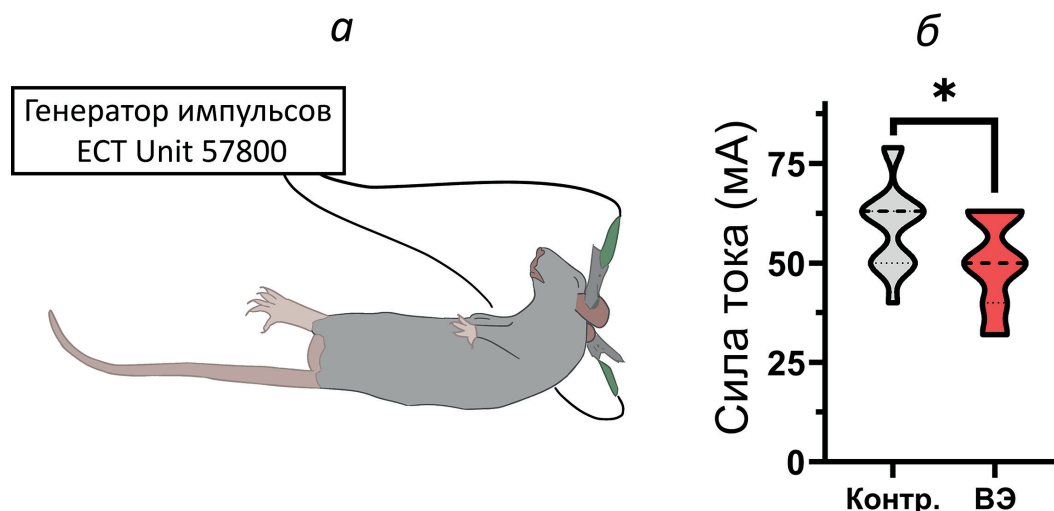


Рис. 7. Метод МЭШ. *а* – Схематическое изображение крысы с экстензией задних конечностей (тонические судороги), вызванные подачей электрического тока через ушные электроды. *б* – Пороговые токи, необходимые для экстензии задних конечностей у крысы. Число животных в группах: 1) эпилептическая группа: 50-й день ($n = 21$); 2) контрольная группа: 50-й день ($n = 15$). Контр. – контроль; ВЭ – группа крыс с ВЭ. Непарный t -тест – * $p < 0,05$

нейронных сетей. В частности, мы выявили ослабление базового уровня синаптической передачи в срезах гиппокампа крыс. Однако другие изменения, такие как повышение частоты спонтанных ВПСР, могут свидетельствовать о патологически высокой фоновой активации глутаматергической системы. На уровне целого организма это проявляется в снижении порога возникновения судорог, вызванных МЭШ.

В острую фазу модели нарушения синаптической передачи могут быть связаны с тем, что после ЭС у части животных наблюдается почти полная гибель нейронов области СА1 гиппокампа [18], и, скорее всего, именно эти животные часто погибают в первые несколько суток после ЭС. С этим может быть связано почти бимодальное распределение значений наклона функции вход/выход (рис. 3, *г*). При развитии эпилепсии (начиная с 7-го дня) эффективность возбуждающей синаптической передачи снижена, что может являться компенсаторной реакцией, направленной на ослабление передачи возбуждения в нейронных сетях гиппокампа, либо это может быть проявлением продолжающейся нейродегенерации в гиппокампе [19]. В предыдущих наших работах мы обнаружили снижение уровня долговременной потенциации в поле СА1 в латентную и хроническую фазы, что также может быть вызвано выявленным снижением возбуждающей нейротрансмиссии [18, 20].

Другим важным фактором, определяющим свойства возбуждающей синаптической передачи, является число и субъединичный состав АМРА-рецепторов. Известно, что уменьшение экспрессии GluA2-субъединицы может вести к

увеличению доли АМРА-рецепторов, лишенных этой субъединицы и имеющих особые биофизические свойства и кальциевую проницаемость [42]. В данной работе мы выявили снижение продукции мРНК генов субъединиц АМРА-рецепторов *Gria1* и *Gria2* в дорзальной области гиппокампа крыс в латентной фазе литий-пилокарпиновой модели, что согласуется с ранее полученными нами результатами в коре мозга с помощью электрофизиологических методов [26]. Ослабление экспрессии GluA2-субъединицы в гиппокампе и височной коре ведет к увеличению глутамат-опосредованного проникновения ионов Ca^{2+} в клетку и эксайтотоксичности, что, в свою очередь, может быть одним из факторов нейродегенерации и эпилептогенеза [24].

Другой причиной снижения эффективности синаптической передачи могут быть изменения в пресинапсе. Для оценки вероятности выброса медиатора изучают кратковременную синаптическую пластичность и частоту спонтанных ВПСР [40]. В острой и латентной фазах свойства кратковременной синаптической пластичности экспериментальных животных практически не отличались от контроля. В хронической фазе литий-пилокарпиновой модели мы выявили тенденцию к ослаблению фасилитации и увеличение частоты ВПСР, что может быть связано с увеличением числа везикул, готовых к выбросу в пресинаптических терминалах, как было показано в каинатной модели эпилепсии [21]. Интересно, что в пентилентетразоловой модели, в которой, в отличие от пилокарпиновой и каинатной модели, хронической эпилепсии не развивается, наблюдается

снижение вероятности выброса глутамата пресинапсами, что может оказывать противоэпилептогенный эффект [29].

В ходе данной работы при использовании полевых отведений на переживающих срезах гиппокампа не было выявлено изменений в порогах генерации пПСП и ПС у экспериментальной группы животных. Однако у крыс с ВЭ в тесте МЭШ порог генерации тонических судорог был значительно снижен по сравнению с контрольными животными. Этот результат противоположен тому, что было получено нами ранее в пентилентетразоловой модели, где, наоборот, происходило увеличение порога тока в тесте МЭШ [29]. Следует подчеркнуть, что после ЭС, вызванного пентилентетразолом, эпилепсия не развивается, в отличие от литий-пилокарпиновой модели.

Снижение порога генерации судорожной активности, вероятно, также обусловлено нейродегенерацией в гиппокампе как в острую, так и хроническую фазы модели ВЭ [18, 19]. В эти периоды выявлена потеря не только возбуждающих нейронов, но и избирательная гибель интернейронов определенных классов в разных областях гиппокампа [43]. Например, в области СА1 гиппокампа наблюдается избирательная гибель парвальбуминовых и кальретициновых интернейронов, а в области СА3 — глобальное снижение ГАМКергической нейротрансмиссии, что ведет к нарушению баланса торможения и возбуждения [43]. В данной работе мы сфокусировались на патологических изменениях только в гиппокампе, как наиболее уязвимой структуре мозга в данной модели ВЭ, однако в литий-пилокарпиновой модели различные гистопатологические изменения выявлены также в ряде областей коры больших полушарий, амигдале, таламусе, черной субстанции и др. [13]. Эти струк-

туры мозга вовлечены в формирование и поддержание судорог, поэтому нельзя исключать их вклад в снижение порога генерации судорог.

Полученные нами результаты свидетельствуют о комплексе изменений в глутаматергической системе гиппокампа после ЭС, которые включают в себя изменения субъединичного состава AMPA-рецепторов в латентный период модели, высокую фоновую активацию глутаматергической системы при снижении эффективности синаптической передачи в хроническую фазу модели. Эти данные позволяют лучше понять механизмы генерации спонтанных рецидивирующих судорог и могут помочь в разработке рационально обоснованной терапии предотвращения эпилептогенеза и развития эпилепсии.

Вклад авторов. Т.Ю. Постникова, А.В. Зайцев — концепция и руководство работой; Т.Ю. Постникова, Г.П. Диеспилов, А.А. Коваленко, А.В. Грифлюк — обработка и проведение экспериментов; Т.Ю. Постникова, А.А. Коваленко — анализ результатов и статистическая обработка данных; Г.П. Диеспилов, А.В. Грифлюк, А.А. Коваленко — написание текста; Т.Ю. Постникова, А.В. Зайцев — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00131).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все проводимые исследования выполнялись в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными, действующими в ИЭФБ РАН и утвержденными правовыми актами РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fattorusso, A., Matricardi, S., Mencaroni, E., Dell'Isola, G. B., Di Cara, G., Striano, P., and Verrotti, A. (2021) The pharmaco-resistant epilepsy: an overview on existent and new emerging therapies, *Front. Neurol.*, **12**, 1030, doi: 10.3389/FNEUR.2021.674483.
2. Chin, J. H., and Vora, N. (2014) The global burden of neurologic diseases, *J. Neurol.*, **83**, 349-351, doi: 10.1212/WNL.0000000000000610.
3. Fordington, S., and Manford, M. (2020) A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury, *J. Neurol.*, **267**, 3105-3111, doi: 10.1007/s00415-020-09926-w.
4. Engel, J. J. (2001) Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*, **7**, 340-352, doi: 10.1177/107385840100700410.
5. Herman, S. T. (2002) Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis, *J. Neurol.*, **59**, S21-S26, doi: 10.1212/wnl.59.9_suppl_5.s21.
6. Pitkänen, A., and Lukasiuk, K. (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets, *Lancet Neurol.*, **10**, 173-186, doi: 10.1016/S1474-4422(10)70310-0.
7. Goldberg, E. M., and Coulter, D. A. (2013) Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural

- circuit dysfunction, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 337-349, doi: 10.1038/nrn3482.
8. Thom, M. (2014) Review: hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **40**, 520-543, doi: 10.1111/nan.12150.
9. Bliss, T. V. P., and Collingridge, G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, **361**, 31-39, doi: 10.1038/361031a0.
10. Titiz, A. S., Mahoney, J. M., Testorf, M. E., Holmes, G. L., and Scott, R. C. (2014) Cognitive impairment in temporal lobe epilepsy: role of online and offline processing of single cell information, *Hippocampus*, **24**, 1129-1145, doi: 10.1002/hipo.22297.
11. Vlooswijk, M. C. G., Jansen, J. F. A., de Krom, M. C. F. T. M., Majoie, H. M., Hofman, P. A. M., Backes, W. H., and Aldenkamp, A. P. (2010) Functional MRI in chronic epilepsy: associations with cognitive impairment, *Lancet Neurol.*, **9**, 1018-1027, doi: 10.1016/S1474-4422(10)70180-0.
12. Zavala-Tecuapetla, C., Cuellar-Herrera, M., and Luna-Munguia, H. (2020) Insights into potential targets for therapeutic intervention in epilepsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8573, doi: 10.3390/ijms21228573.
13. Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S. G., and Avoli, M. (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *J. Neurosci. Methods*, **172**, 143-157, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.
14. Curia, G., Lucchi, C., Vinet, J., Gualtieri, F., Marinelli, C., Torsello, A., Costantino, L., and Biagini, G. (2014) Pathophysiogenesis of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr. Med. Chem.*, **21**, 663-688, doi: 10.2174/0929867320666131119152201.
15. Zaitsev, A. V., Amakhin, D. V., Dyomina, A. V., Zakharova, M. V., Ergina, J. L., Postnikova, T. Y., Diespirov, G. P., and Magazanik, L. G. (2021) Synaptic dysfunction in epilepsy, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **57**, 542-563, doi: 10.1134/S002209302103008X.
16. De Oliveira, D. L., Fischer, A., Jorge, R. S., Da Silva, M. C., Leite, M., Gonçalves, C. A., Quillfeldt, J. A., Souza, D. O., E Souza, T. M., and Wofchuk, S. (2008) Effects of early-life LiCl-Pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein, *Epilepsia*, **49**, 842-852, doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01484.x.
17. Morimoto, K., Fahnestock, M., and Racine, R. J. (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain, *Prog. Neurobiol.*, **73**, 1-60, doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.03.009.
18. Postnikova, T. Y., Diespirov, G. P., Amakhin, D. V., Vylekzhanina, E. N., Soboleva, E. B., and Zaitsev, A. V. (2021) Impairments of long-term synaptic plasticity in the hippocampus of young rats during the latent phase of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13355, doi: 10.3390/ijms222413355.
19. Plata, A., Lebedeva, A., Denisov, P., Nosova, O., Postnikova, T. Y., Pimashkin, A., Brazhe, A., Zaitsev, A. V., Rusakov, D. A., and Semyanov, A. (2018) Astrocytic atrophy following status epilepticus parallels reduced Ca²⁺ activity and impaired synaptic plasticity in the rat hippocampus, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 215, doi: 10.3389/fnmol.2018.00215.
20. Kryukov, K. A., Kim, K. K., Magazanik, L. G., and Zaitsev, A. V. (2016) Status epilepticus alters hippocampal long-term synaptic potentiation in a rat lithium-pilocarpine model, *NeuroReport*, **27**, 1191-1195, doi: 10.1097/WNR.0000000000000656.
21. Clarkson, C., Smeal, R. M., Hasenoehrl, M. G., White, J. A., Rubio, M. E., and Wilcox, K. S. (2020) Ultrastructural and functional changes at the tripartite synapse during epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy, *Exp. Neurol.*, **326**, 113196, doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113196.
22. Naylor, D. E., Liu, H., Niquet, J., and Wasterlain, C. G. (2013) Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus, *Neurobiol. Dis.*, **54**, 225-238, doi: 10.1016/j.nbd.2012.12.015.
23. Amakhin, D. V., Soboleva, E. B., Ergina, J. L., Malkin, S. L., Chizhov, A. V., and Zaitsev, A. V. (2018) Seizure-induced potentiation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission in the entorhinal cortex, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 486, doi: 10.3389/fncel.2018.00486.
24. Rajasekaran, K., Todorovic, M., and Kapur, J. (2012) Calcium-permeable AMPA receptors are expressed in a rodent model of status epilepticus, *Ann. Neurol.*, **72**, 91-102, doi: 10.1002/ana.23570.
25. Amakhin, D. V., Malkin, S. L., Ergina, J. L., Kryukov, K. A., Veniaminova, E. A., Zubareva, O. E., and Zaitsev, A. V. (2017) Alterations in properties of glutamatergic transmission in the temporal cortex and hippocampus following pilocarpine-induced acute seizures in wistar rats, *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 264, doi: 10.3389/fncel.2017.00264.
26. Malkin, S. L., Amakhin, D. V., Veniaminova, E. A., Kim, K. K., Zubareva, O. E., Magazanik, L. G., and 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, doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.04.024.
27. Zubareva, O. E., Kovalenko, A. A., Kalemenev, S. V., Schwarz, A. P., Karyakin, V. B., and Zaitsev, A. V. (2018) Alterations in mRNA expression of glutamate receptor subunits and excitatory amino acid transporters following pilocarpine-induced seizures in rats, *Neurosci. Lett.*, **686**, 94-100, doi: 10.1016/j.neulet.2018.08.047.
28. Racine, R. J. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **32**, 281-294, doi: 10.1016/0013-4694(72)90177-0.

29. Postnikova, T. Y., Amakhin, D. V., Trofimova, A. M., Smolensky, I. V., and Zaitsev, A. V. (2019) Changes in functional properties of rat hippocampal neurons following pentylenetetrazole-induced status epilepticus, *Neuroscience*, **399**, 103-116, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.029.
30. Schwarz, A. P., Malygina, D. A., Kovalenko, A. A., Trofimov, A. N., and Zaitsev, A. V. (2020) Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples, *Mol. Cell. Probes*, **53**, 101611, doi: 10.1016/j.mcp.2020.101611.
31. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, *Methods*, **25**, 402-428, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
32. Bonefeld, B. E., Elfving, B., and Wegener, G. (2008) Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue, *Synapse*, **62**, 302-309, doi: 10.1002/syn.20496.
33. Lin, W., Burks, C. A., Hansen, D. R., Kinnamon, S. C., and Gilbertson, T. A. (2004) Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels, *J. Neurophysiol.*, **92**, 2909-2919, doi: 10.1152/jn.01198.2003.
34. Yamaguchi, M., Yamauchi, A., Nishimura, M., Ueda, N., and 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, doi: 10.1248/bpb.28.143.
35. Swijsen, A., Nelissen, K., Janssen, D., Rigo, J. M., and 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, doi: 10.1186/1756-0500-5-685.
36. Pohjanvirta, R., Niittynen, M., Lindén, J., Boutros, P. C., Moffat, I. D., and 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, doi: 10.1016/j.cbi.2006.01.001.
37. Cook, N. L., Vink, R., Donkin, J. J., and 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, doi: 10.1002/jnr.21846.
38. Langnaese, K., John, R., Schweizer, H., Ebmeyer, U., and Keilhoff, G. (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model, *BMC Mol. Biol.*, **9**, 53, doi: 10.1186/1471-2199-9-53.
39. Proudnikov, D., Yuferov, V., Zhou, Y., LaForge, K. S., Ho, A., and Kreek, M. J. (2003) Optimizing primer-probe design for fluorescent PCR, *J. Neurosci. Methods*, **123**, 31-45, doi: 10.1016/S0165-0270(02)00325-4.
40. Zucker, R. S., and Regehr, W. G. (2002) Short-term synaptic plasticity, *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 355-405, doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.
41. Owen, B., Bichler, E., and Benveniste, M. (2021) Excitatory synaptic transmission in hippocampal area CA1 is enhanced then reduced as chronic epilepsy progresses, *Neurobiol. Dis.*, **154**, 105343, doi: 10.1016/j.nbd.2021.105343.
42. Cull-Candy, S. G., and Farrant, M. (2021) Ca²⁺-permeable AMPA receptors and their auxiliary subunits in synaptic plasticity and disease, *J. Physiol.*, **599**, 2655-2671, doi: 10.1113/jp279029.
43. Andre, V., Marescaux, C., Nehlig, A., and Fritschy, J. M. (2001) Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the at lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Hippocampus*, **11**, 452-468, doi: 10.1002/hipo.1060.

ALTERATIONS IN THE PROPERTIES OF THE GLUTAMATERGIC SYSTEM OF THE RAT HIPPOCAMPUS IN A LITHIUM-PILOCARPINE MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

G. P. Diespirov, T. Y. Postnikova, A. V. Griflyuk, A. A. Kovalenko, and A. V. Zaitsev*

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
194223 St. Petersburg, Russia; e-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru*

Status epilepticus (SE) triggers many pathological changes in the nervous system that are not yet fully understood and may lead to the development of epilepsy. In this work, we studied the effects of SE on the properties of excitatory glutamatergic transmission in the hippocampus in a rat model of lithium-pilocarpine temporal lobe epilepsy. Studies were performed 1 day (acute phase of the model), 3 and 7 days (latent phase), and 30 to 80 days (chronic phase) after SE. Using real-time PCR, we found that in the latent phase there is a decrease in gene expression of GluA1 and GluA2 AMPA receptor subunits, which may also be accompanied by an increased proportion of calcium-permeable AMPA receptors, which play an essential role in the pathogenesis of many CNS diseases. In acute brain slices we found a decrease in the efficiency of

excitatory synaptic neurotransmission in all phases of the model when recording field responses in the CA1 region of the hippocampus in response to stimulation of Schaffer collaterals by electric currents of different intensities. However, in the chronic phase we found an increase in the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic potentials, indicating an increased background activity of the glutamatergic system in epilepsy.

This is also supported by a decrease in the threshold of hind limb extension in the test of maximal electroshock seizure in rats with temporal lobe epilepsy compared to control animals. The results obtained indicate the presence of a number of functional alterations in the glutamatergic system related to epilepsy. These findings can be used to develop antiepileptogenic therapy.

Keywords: lithium-pilocarpine model of epilepsy, synapse, AMPA receptor, hippocampus, field postsynaptic potential, excitatory postsynaptic potential, maximal electroshock seizure