

УДК 612.825.3

## ЭПИЛЕПТИЧЕСКИЙ СТАТУС ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС, СОПРОВОЖДАЮЩИЕСЯ ИЗМЕНЕНИЕМ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

© 2017 Т.Ю. Постникова<sup>1,2</sup>, О.Е. Зубарева<sup>1,3</sup>, А.А. Коваленко<sup>3</sup>,  
К.Х. Ким<sup>1</sup>, Л.Г. Магазаник<sup>1,4</sup>, А.В. Зайцев<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: [aleksey\\_zaitsev@mail.ru](mailto:aleksey_zaitsev@mail.ru)

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет  
Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины,  
197376 Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 01.11.16  
После доработки 14.11.16

У больных височной эпилепсией часто наблюдается нарушение когнитивных функций, в особенности памяти. Считается, что одним из важнейших нейронных механизмов памяти является синаптическая пластичность. Электрофизиологические исследования показывают, что после судорожных состояний характеристики кратковременной и долговременной синаптической пластичности в коре и гиппокампе могут существенно изменяться. Однако характер этих изменений и механизмы, лежащие в их основе, остаются во многом неясными. В данной работе исследовались особенности кратковременной и долговременной синаптической пластичности в срезах гиппокампа крыс через сутки после эпилептического статуса, индуцированного пентилентетразолом. Обнаружено, что в синапсах пирамидных клеток зоны CA1 индукция долговременной потенциации (ДВП) снижена по сравнению с контролем, тогда как кратковременная фасилитация увеличена. Результаты экспериментов не подтверждают гипотезу о том, что эпилептический статус приводит к фоновому потенцированию синапсов гиппокампа, и дальнейшая индукция ДВП ослаблена из-за окклюзии, т.к. зависимость величины синаптических ответов от силы стимуляции входов не различалась у животных контрольной и экспериментальной групп. Ослабление ДВП может быть обусловлено нарушениями молекулярных механизмов ее индукции, в т.ч. связанными с изменениями уровня экспрессии NMDA-рецепторов и/или их субъединичного состава. Методом ПЦР в реальном времени показано, что через 3 ч после индукции судорог происходит существенное усиление экспрессии генов, кодирующих субъединицы GluN1 и GluN2A. Повышенная экспрессия облигатной субъединицы GluN1 позволяет предполагать увеличение общего числа NMDA-рецепторов в гиппокампе. Через 24 ч наблюдается трехкратное увеличение продукции мРНК GluN2B-субъединицы, что может свидетельствовать об увеличении доли GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов. Поскольку преобладание NMDA-рецепторов определенного субъединичного состава оказывает влияние на характеристики долговременной синаптической пластичности, то увеличение экспрессии мРНК GluN2B-субъединицы может быть одной из причин уменьшения величины ДВП в синапсах гиппокампа после эпилептического статуса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** долговременная синаптическая потенция, CA1, эпилепсия, NMDA-рецепторы, GluN2B, GluN2A.

Эпилептические припадки у больных височной эпилепсией часто приводят к нарушению когнитивных функций, в особенности па-

Принятые сокращения: ДВП – долговременная синаптическая потенция; NMDA – N-метил-D-аспарат; ПТЗ – пентилентетразол; ИСМЖ – искусственная спинномозговая жидкость; пВПСП – полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы; СусА – циклофилин А.

\* Адресат для корреспонденции.

мяти [1]. В моделях на животных установлено, что даже одиночные эпизоды судорожных состояний могут приводить к подобным нарушениям [2, 3]. Считается, что одним из важнейших нейронных механизмов памяти является синаптическая пластичность [4]. Электрофизиологические исследования показывают, что после судорожных состояний характеристики кратковременной и долговременной синапти-

ческой пластичности в коре и гиппокампе могут существенно изменяться [5–7]. Однако характер этих изменений и механизмы, лежащие в их основе, остаются во многом неясными, т.к. результаты экспериментальных исследований противоречивы. Согласно одной из гипотез, эпилептическая активность может приводить к фоновой зависимой от NMDA-рецепторов долговременной синаптической потенциации (ДВП) всех возбуждающих синапсов [8]. Это в свою очередь ослабляет или даже делает невозможной выработку ДВП и усиливает долговременную синаптическую депрессию (или депотенциацию) в течение нескольких часов или суток после эпилептической активности. В пользу этой гипотезы свидетельствуют эксперименты на моделях *in vitro* [5, 9], однако данные, полученные на моделях *in vivo*, не всегда им соответствуют: наблюдается как уменьшение [7, 10, 11], так и увеличение величины ДВП [6, 12, 13] в зависимости от экспериментальных условий. Поэтому можно предположить, что изменения в выработке ДВП после судорожных состояний обусловлены также нарушениями механизмов индукции пластичности, например, изменениями уровня экспрессии NMDA-рецепторов и/или их субъединичного состава.

NMDA-рецепторы – это гетеромерные комплексы, состоящие из двух облигатных GluN1-субъединиц и двух GluN2- или GluN3-субъединиц. В коре и гиппокампе преобладают рецепторы, содержащие GluN2A- и GluN2B-субъединицы [14]. Функциональные свойства NMDA-рецепторов напрямую зависят от их субъединичного состава [15]. Известно, что эпилептический статус влияет как на общее число NMDA-рецепторов в синапсах [16], так и на соотношение NMDA-рецепторов с различным субъединичным составом [17]. Знак синаптической пластичности (потенциация или депрессия) часто зависит от субъединичного состава рецепторов [18, 19], поэтому данные изменения NMDA-рецепторов являются одним из потенциальных механизмов нарушений пластичности после судорожных состояний. Недавно в нашей лаборатории было выявлено, что у трехнедельных крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса происходит снижение ДВП, длящееся как минимум в течение недели [10]. Это может объясняться изменениями субъединичного состава NMDA-рецепторов.

В данной работе мы поставили задачу исследовать, изменяется ли ДВП после эпилептического статуса на модели пентилентетразоловых судорог у крыс Вистар, а также выяснить, как меняется экспрессия генов, кодирующих субъединицы глутаматных NMDA-рецепторов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 20–22-дневных крысах Вистар (35–40 г), которых содержали в стандартных условиях при комнатной температуре и свободном доступе к воде и пище. Все эксперименты выполнены в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными, действующими в ИЭФБ РАН, и отвечают положениям российского и международного законодательства. Всего в работе было использовано 26 животных для электрофизиологических экспериментов и 28 животных для биохимического анализа.

**Пентилентетразоловая модель эпилептического статуса.** Эпилептический статус у животных экспериментальной группы вызывали внутрибрюшинным введением пентилентетразола (ПТЗ, 70 мг/кг; «Sigma», США). Для эксперимента отбирали животных, у которых генерализованные клонико-тонические судороги продолжались не менее 15 мин, т.е. диагностировался эпилептический статус. Крысам контрольной группы вводили физиологический раствор. Определение уровня экспрессии генов осуществляли через 3 и 24 ч после введения ПТЗ либо физиологического раствора, исследование синаптической пластичности проводили через 24 ч.

**Определение уровня экспрессии генов субъединиц глутаматных NMDA-рецепторов.** Тотальную РНК из клеток гиппокампа выделяли методом кислой гуанидинизоцианат-фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента TRI (Molecular Research Center, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием олиго dT-праймеров («Медиген», Россия) и MMLV-обратной транскриптазы («Promega», США). Уровень экспрессии генов, кодирующих субъединицы GluN1, GluN2A и GluN2B NMDA-рецепторов, определяли методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX-96 «REAL TIME» C1000 Touch™ Thermal Cycler («Bio-Rad», США). В качестве референтного гена применяли ген циклофилина А (пептидилпролилизомеразы А, CypA), валидность использования которого в экспериментальных моделях судорожных состояний была доказана ранее [20]. Использована технология TaqMan. Последовательности праймеров и зондов для ПЦР, синтезированных компанией «ДНК-синтез» (Москва, Россия), представлены в таблице. Анализ каждой пробы проводили в двух параллелях. Относительную продукцию генов рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [21].

**Приготовление переживающих срезов гиппокампа.** Через сутки после эпилептического ста-

Последовательности праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени

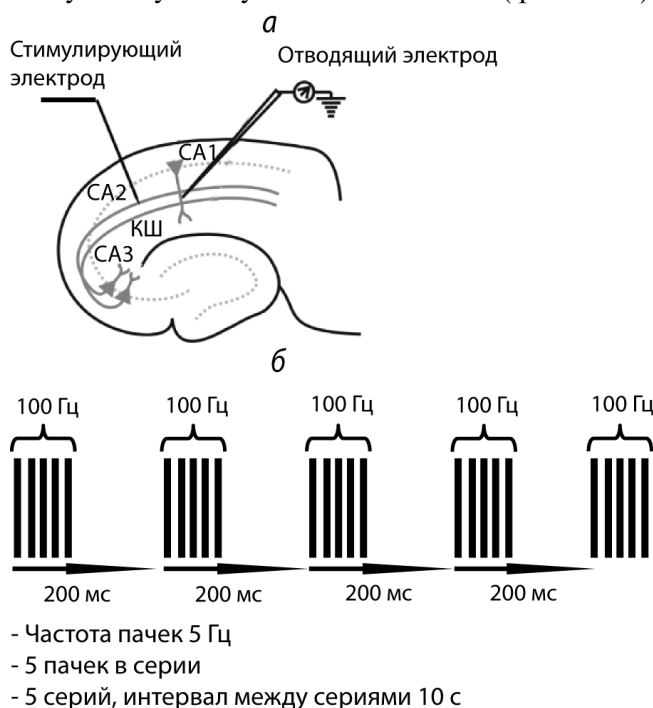
Ген	Номер кДНК в банке генов NCBI	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')	Зонд (5'→3')
<i>GluN1</i>	NM_017010	GTTCTTCCGCTCAGGC-TTTG	AGGGAAACGTTCTGCT-TCCA	CGGCATGCGCAAGGAC-AGCC
<i>GluN2A</i>	NM_012573	GCTACACACCCTGCAC-CAATT	CACCTGGTAACCTTCCCT-CAGTGA	TGGTCAATGTGACTTGG-GATGGCAA
<i>GluN2B</i>	NM_012574	CCCAACATGCTCTCTC-CCTTAA	CAGCTAGTCGGCTCTC-TTGGTT	AGACGCCAAACCTCTAG-GCGGACAG
<i>CycA</i>	NM_017101	AGGATTCATGTGCCAG-GGTG	CTCAGTCTTGGCAGTG-CAGA	ACACGCCATAATGGCAC-TGGTGGCA

туса крыс подвергали декапитации. Мозг быстро извлекали, удаляли мозжечок и лобные доли полушарий, срезали часть дорсальной поверхности мозга. Горизонтальные срезы мозга толщиной 400 мкм изготавливали на вибраторе («Microm International» НМ 650V; Германия) в ледяной (0° С) аэрируемой карбогеном (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) искусственной спинномозговой жидкости (ИСМЖ). Состав ИСМЖ: 126 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1,25 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 24 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 10 мМ глюкозы. Готовые срезы погружали в камеру с аэрируемой ИСМЖ, которую термостатировали на водяной бане в течение 1 ч при 35° С, после этого срезы находились при комнатной температуре. После инкубации срезы переносили в экспериментальную камеру, где их выдерживали 15–20 мин до начала электрофизиологического исследования. В камере при комнатной температуре поддерживали постоянный проток оксигенируемого раствора ИСМЖ (не менее 5 мл/мин). От одной крысы в эксперименте использовалось от одного до пяти срезов.

**Электрофизиологические эксперименты.** Полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) отводились от радиального слоя поля СА1 гиппокампа с помощью стеклянного микроэлектрода, заполненного ИСМЖ (0,2–1,0 МОм). Стимулирующий биполярный витой электрод, изготовленный из нихромовой проволоки в заводской изоляции диаметром 0,1 мм, помещали в радиальном слое в области хода коллатералей Шаффера на границе полей СА2 и СА1 гиппокампа крыс (рис. 1, а). Стимуляцию осуществляли прямоугольными парными электрическими импульсами (длительность 0,1 мс, межстимульный интервал 50 мс) каждые 20 с. Зависимость амплитуды полевого ответа от силы стимуляции определяли, увеличивая силу тока от 25 до 400 мкА с шагом 25 мкА. Интенсив-

ность стимула, используемую в эксперименте, подбирали таким образом, чтобы амплитуда пВПСП составляла 40–50% от амплитуды, на которой впервые появлялся популяционный спайк. В ходе экспериментов сила стимуляции не изменялась и обычно составляла 50–150 мкА, амплитуда пВПСП находилась в пределах 0,5–1 мВ. Краткосрочную синаптическую пластичность (фасилитацию) исследовали, сравнивая отношения амплитуд пВПСП при парной стимуляции.

Перед индукцией ДВП производили как минимум получасовую запись базового (фонового)



**Рис. 1.** Положение электродов в гиппокампе и параметры индукции ДВП. а – Схема среза гиппокампа, показывающая положение стимулирующего и отводящего электродов, КШ – коллатерали Шаффера; б – параметры тетанической стимуляции (ТС) для индукции ДВП

ответа. К индукции ДВП приступали только в случае регистрации стабильной амплитуды фонового пВПСП в течение 20 мин. ДВП вызывали тета-стимуляцией (пять пачек по пять импульсов частотой 100 Гц, с интервалом 200 мс между пачками, подававшиеся 5 раз каждые 10 с; рис. 1, б). Регистрацию потенцированных пВПСП после тетанизации производили в течение 40 мин.

Электрофизиологические данные анализировали с помощью программы Clampfit 10.2 («Axon Instruments», США). У каждого пВПСП измеряли амплитуду и величину наклона восходящей фазы на уровне 20–80% от пиковой амплитуды. Для определения ДВП в срезе отдельно усредняли фоновые пВПСП и потенцированные пВПСП, записанные через 30–40 мин после тета-стимуляции. Величину пластичности рассчитывали как отношение наклона восходящей фазы у усредненных потенцированных и фоновых пВПСП. Величину кратковременной синаптической фасилитации рассчитывали как отношение амплитуды второго к амплитуде первого пВПСП.

**Статистическая обработка.** Все данные приведены как среднее со стандартной ошибкой среднего, в скобках указано количество срезов (для электрофизиологических опытов) или число животных (при анализе экспрессии генов). Обработка данных выполнена с помощью статистических пакетов SPSS Statistics 20 и OriginPro 8. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий в двух несвязанных выборках проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Влияние силы стимулирующего тока на величину полевых ответов у животных контрольной и экспериментальной групп проверяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

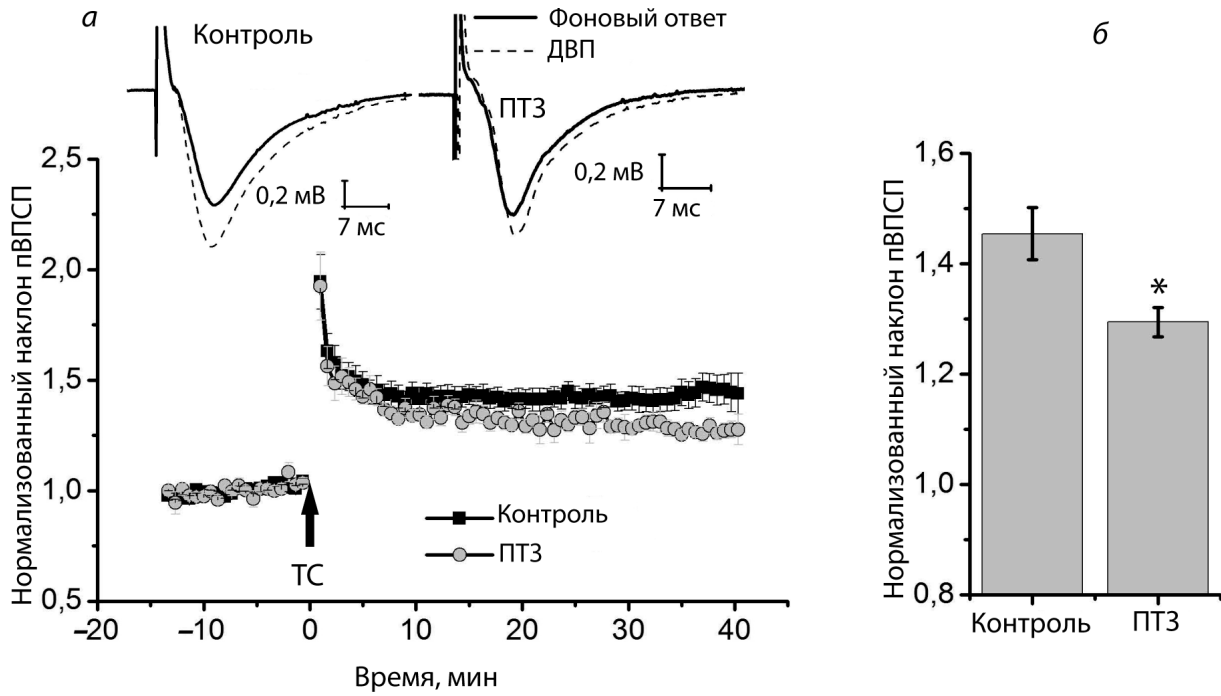
**Эпилептический статус приводит к уменьшению долговременной синаптической потенциации в гиппокампе.** Мы сравнили величину долговременной синаптической потенциации у контрольных и экспериментальных крыс через сутки после эпилептического статуса, вызванного ПТЗ (рис. 2). У контрольных животных тета-стимуляция коллатералей Шаффера в срезах гиппокампа приводила к выраженной долговременной потенциации пВПСП, наклон восходящей фазы пВПСП увеличивался в  $1,45 \pm 0,05$  раза по сравнению с фоновым уровнем ( $n = 14$ ). У крыс экспериментальной группы такой же протокол

вызывал увеличение пВПСП только в  $1,29 \pm 0,02$  раза ( $n = 10$ ), что достоверно меньше, чем у контрольных животных ( $t = 2,55$ ;  $p < 0,05$ ).

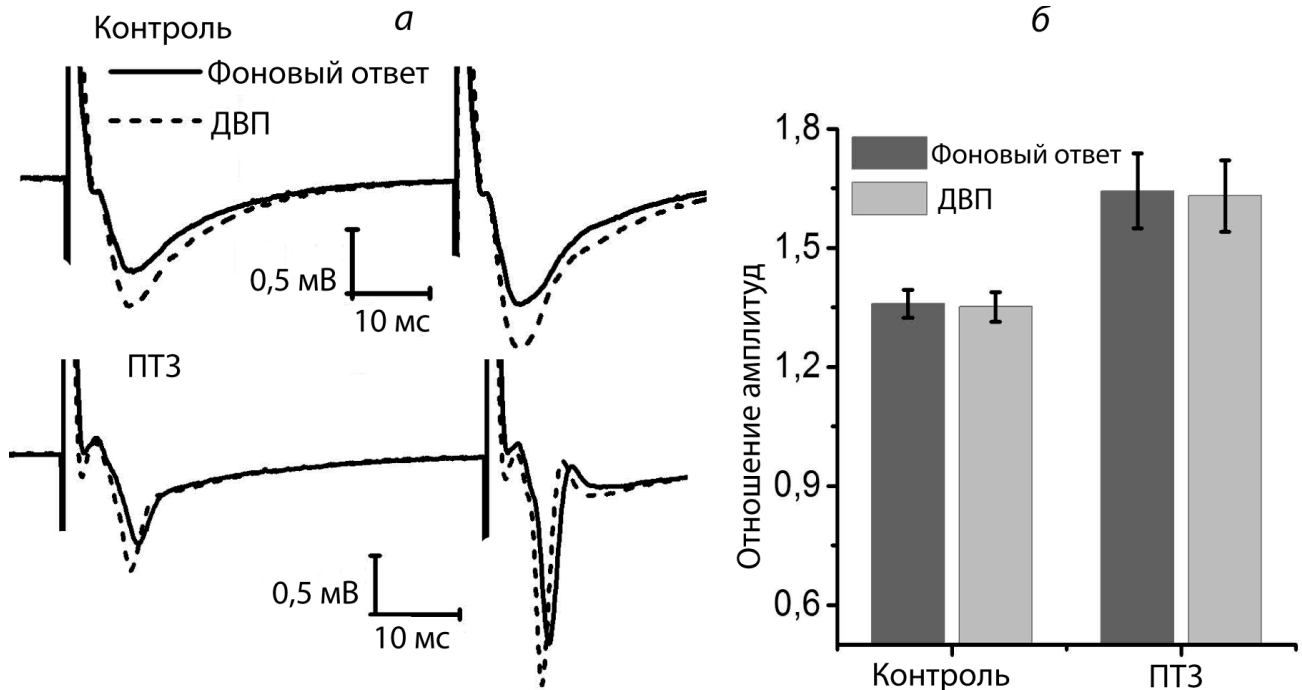
Чтобы определить локус индукции синаптической потенциации, мы проверили, изменяется ли парное отношение амплитуд у фоновых и потенцированных полевых ответов (рис. 3). Считается, что отсутствие изменений свидетельствует в пользу постсинаптического локуса индукции [22, 23]. У контрольных животных соотношение амплитуд не изменялось после потенциации ответов ( $1,36 \pm 0,04$  – фоновый уровень,  $1,35 \pm 0,04$  – после потенцирования;  $n = 14$ ). Следует отметить, что у экспериментальных животных парная фасилитация ответов была изначально выше ( $1,62 \pm 0,10$ ;  $n = 10$ ), однако и в этой группе тета-стимуляция не оказывала влияния на парную фасилитацию ( $1,63 \pm 0,10$ ). Таким образом, в обеих группах индукция пластичности происходит на постсинаптической мембране.

Поскольку эпилептический статус в некоторых случаях может вызывать потенцию синаптических ответов в гиппокампе, дальнейшее потенцирование синапсов будет затруднено в результате окклюзии. Если предположить, что в использованной модели синапсы гиппокампа после эпилептического статуса изначально потенцированы, то при прочих равных условиях та же сила стимуляции будет вызывать больший по амплитуде ответ. Чтобы проверить эту гипотезу, мы построили кривую зависимости величины наклона восходящей фазы пВПСП от силы стимуляционного внеклеточного тока (рис. 4) и обнаружили, что достоверных различий между группами контрольных и экспериментальных животных нет (фактор группы  $F_{1,18} = 1,01$ ;  $p = 0,33$ ), а ход двух кривых также не отличается (фактор группы  $\times$  фактор силы тока  $F_{12,216} = 0,05$ ;  $p = 0,999$ ). Таким образом, полученные данные не позволяют утверждать, что синаптические ответы пирамидных нейронов области CA1 на стимуляцию коллатералей Шаффера потенцированы после эпилептического статуса.

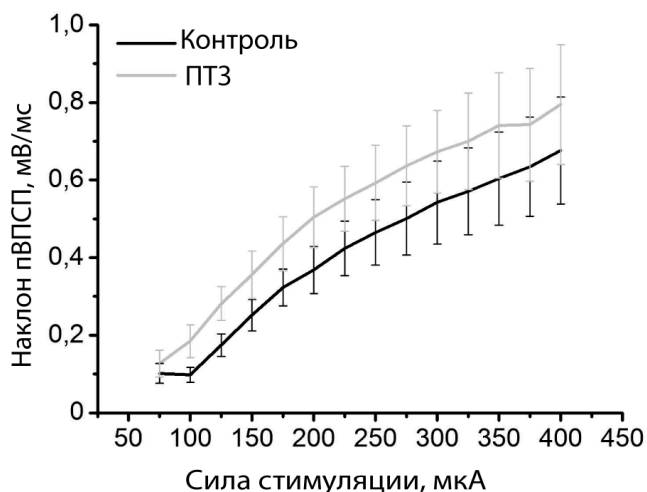
В то же время мы выявили, что форма ответа пВПСП в большинстве срезов мозга, полученных от экспериментальных животных, изменилась. Типичные пВПСП при различной силе внеклеточной стимуляции у контрольных и экспериментальных животных представлены на рис. 5. В срезах мозга у животных экспериментальной группы в ответ на относительно небольшую силу тока начинают появляться популяционные спайки ( $131 \pm 14$  мкА,  $n = 17$ ), тогда как у контрольных животных они впервые регистрируются при большей силе тока ( $245 \pm 26$  мкА,  $n = 10$ ,  $t = 4,21$ ;  $p < 0,001$ ; рис. 5 и 6). Только в срезах мозга экспериментальных животных мы



**Рис. 2.** Индукция ДВП ослаблена у животных после epileптического статуса, вызванного введением ПТЗ. *a* – График, показывающий величину нормализованного наклона пВПСП у животных контрольной и экспериментальной групп до и после тета-стимуляции. Нормализация проводилась по усредненным фоновым пВПСП. На вставке сверху показаны примеры пВПСП до индукции (фонový ответ) и через 40 мин после тета-стимуляции (ДВП) в поле СА1 гиппокампа крыс контрольной группы (контроль) и экспериментальной группы после ПТЗ-индуцированного epileптического статуса (ПТЗ). Стрелка ТС показывает момент индукции ДВП; *б* – диаграмма, иллюстрирующая различия в величине ДВП между группами. Результаты получены на 14 контрольных и 10 экспериментальных срезах. Все данные на этом и последующих рисунках представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего; \*  $p < 0,05$



**Рис. 3.** Отношение амплитуд ответов до и после индукционного протокола. *a* – Примеры ответов пВПСП до индукции (фонový ответ) и через 40 мин после тета-стимуляции (ДВП) в поле СА1 гиппокампа крыс контрольной группы (контроль) и экспериментальной группы после ПТЗ-индуцированного epileптического статуса (ПТЗ); *б* – диаграмма, показывающая, что отношение амплитуд не изменяется после индукционного протокола ни в одной из групп



**Рис. 4.** Динамика изменений величины наклона восходящей фазы пВПСП у контрольной группы (черная кривая) и животных после ПТЗ-индуцированного эпилептического статуса (серая кривая) в ответ на увеличение интенсивности электрической стимуляции коллатералей Шаффера

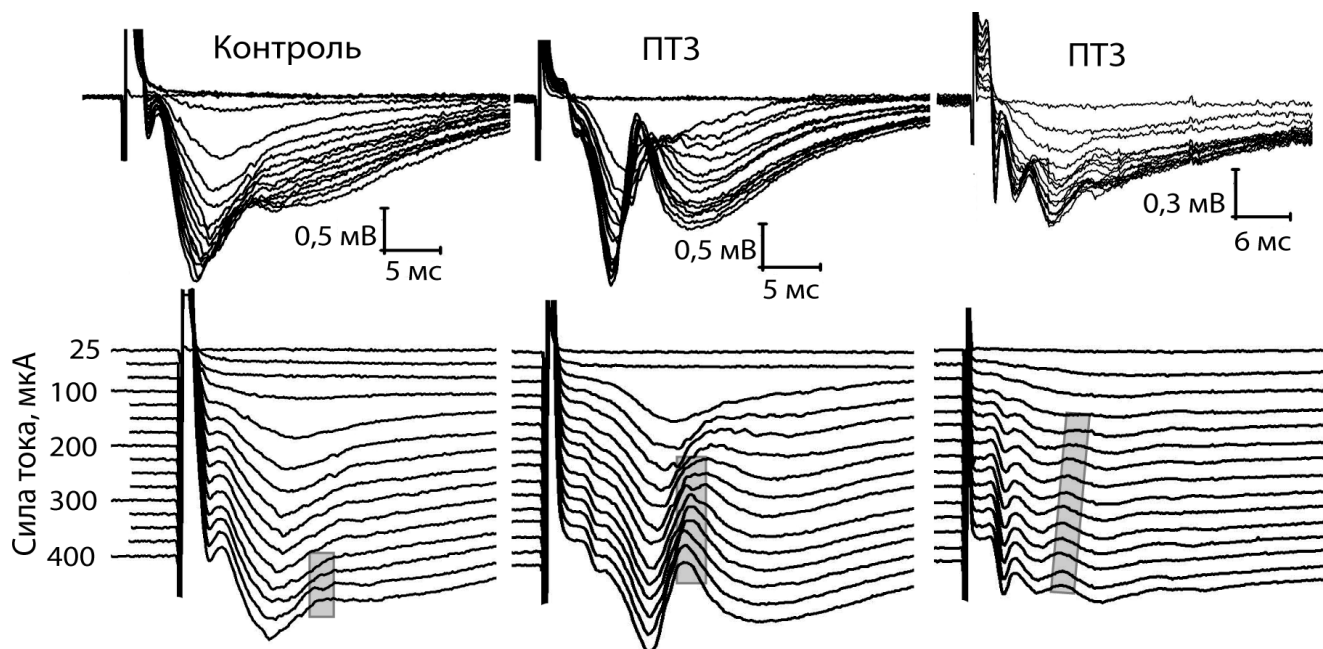
изменение индукции ДВП может быть обусловлено изменением субъединичного состава NMDA-рецепторов [18, 19], мы исследовали эффект ПТЗ-индуцированного эпилептического статуса на продукцию мРНК субъединиц NMDA-рецепторов в гиппокампе методом ПЦР в режиме реального времени (рис. 7). Исследование проводили через 3 ч после введения ПТЗ, т.е. практически сразу же после окончания поведенческих проявлений эпилептического статуса и через 24 ч. Через 3 ч после индукции судорог отмечалось существенное усиление экспрессии генов, кодирующих субъединицы GluN1 ( $t = 3,9$ ;  $p < 0,01$ ) и GluN2A ( $t = 2,5$ ;  $p < 0,05$ ). Повышенная экспрессия облигатной субъединицы GluN1 позволяет предполагать увеличение общего числа NMDA-рецепторов в гиппокампе. Через 24 ч наблюдается трехкратное увеличение продукции мРНК GluN2B-субъединицы ( $t = 2,7$ ;  $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать об увеличении доли GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов.

регистровали ответы с несколькими последовательными популяционными спайками (рис. 5), что свидетельствует о гипервозбудимости нейронов и нарушениях в работе нейронных сетей после эпилептического статуса.

**Изменение уровня экспрессии генов, кодирующих субъединицы NMDA-рецепторов.** Поскольку

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы выявили, что индукция ДВП в синапсах CA3–CA1 гиппокампа крыс снижена, тогда как кратковременная синаптическая фасилитация увеличена через сутки после эпилептического статуса, вызванного введе-



**Рис. 5.** Изменение формы пВПСП в поле CA1 гиппокампа у крыс контрольной группы и двух крыс экспериментальной группы (ПТЗ) после перенесенного эпилептического статуса в ответ на увеличение интенсивности электрической стимуляции коллатералей Шаффера. В нижнем ряду те же ответы представлены со смещением по вертикали. Серая рамка показывает формирование популяционного спайка в срезах

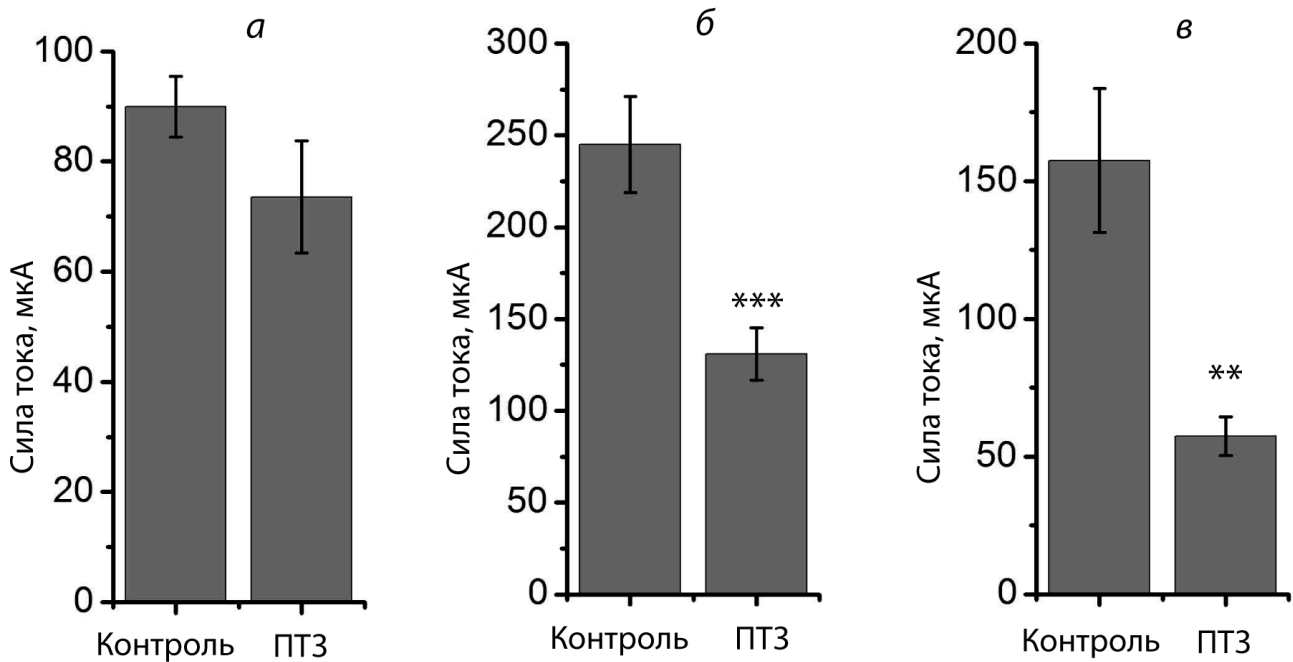


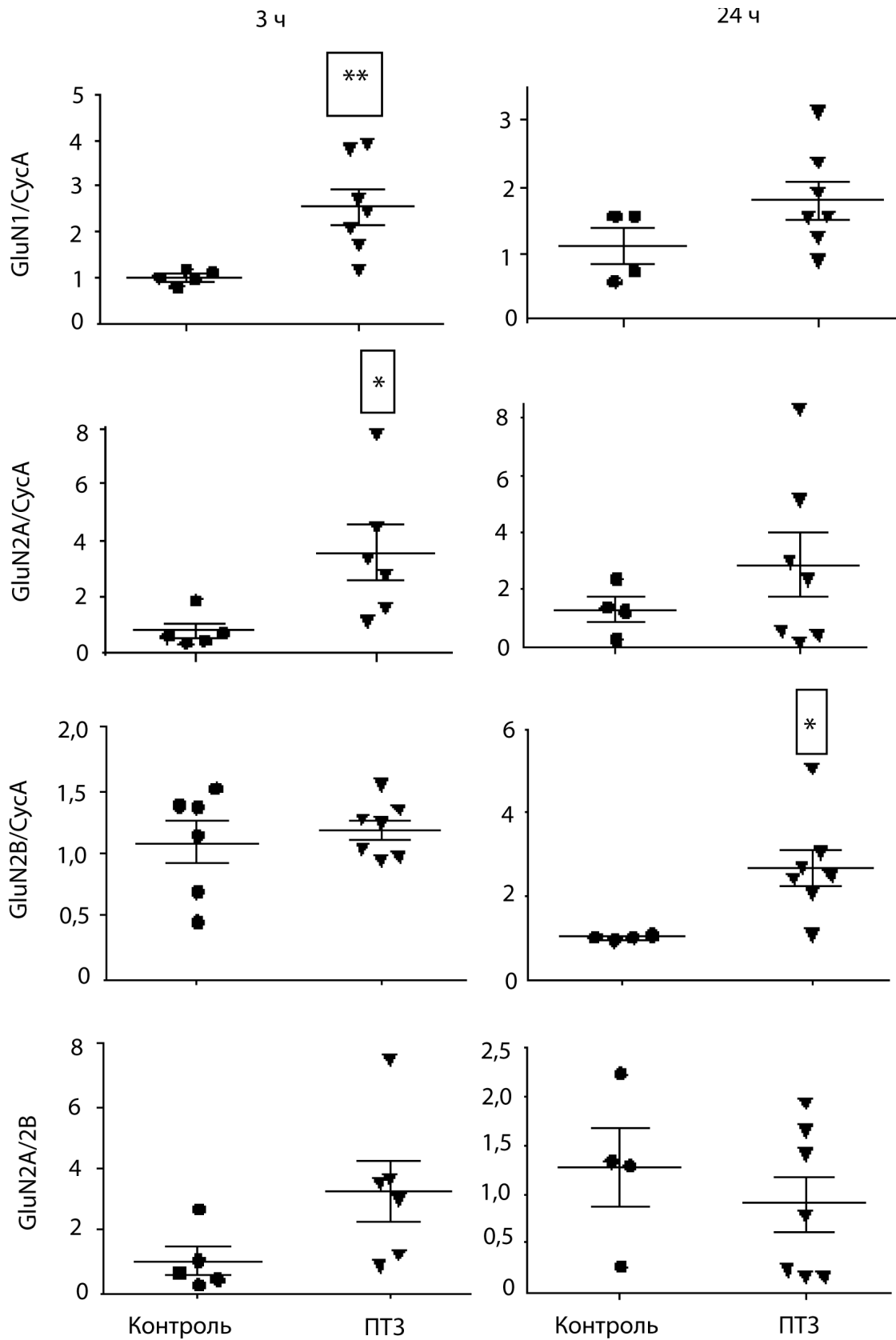
Рис. 6. Сравнение возбудимости срезов, полученных от животных контрольной (контроль) и экспериментальной (ПТЗ) групп. Диаграммы, показывающие пороговую величину внеклеточного тока, необходимого, чтобы вызвать пВПСП (а) и популяционные спайки (б). На диаграмме в представлена разница между этими пороговыми токами. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

нием ПТЗ. Аналогичное уменьшение величины ДВП было обнаружено после эпилептического статуса в литий-пилокарпиновой модели [10]. Было показано, что кратковременные судороги, вызванные аппликацией каината, потенцируют синаптическую передачу в области СА3 гиппокампа [24]. Потенциация возбуждающих синапсов между пирамидными клетками СА3–СА1 и СА3–СА3 в органотипической культуре гиппокампа наблюдалась как после многочасовой [5], так и после очень короткой эпилептиформной активности (0,5–3 мин) [9], вызванной аппликацией бикикуллина. Эта потенциация являлась NMDA-зависимой, а высокая вовлеченность NMDA-рецепторов в реализацию эпилептической активности была выявлена на различных моделях [17, 25]. Потенцирование синапсов при судорожной активности в дальнейшем приводит к ослаблению выработки ДВП в этих синапсах в результате окклюзии [5, 9, 24]. Однако в наших экспериментах уменьшение величины ДВП не может быть объяснено только эффектом окклюзии из-за потенцирования синапсов во время эпилептического статуса, т.к. зависимость величины синаптических ответов от силы стимуляции входов не различалась у контрольных и экспериментальных животных.

Ослабление индукции ДВП может быть обусловлено нарушениями молекулярных механизмов ее индукции, вызванными эпилептичес-

ким статусом. Известно, что ПТЗ-индуцированные судороги ведут к разнообразным нарушениям в гиппокампе и коре, включающим в т.ч. появление морфологических изменений, уменьшение клеточной пролиферации, изменение активности целого ряда ферментов и работы различных метаболических путей и рецепторов [26–29]. Изменение функциональных свойств NMDA-рецепторов после судорожных состояний может являться одной из причин нарушений индукции пластичности. Во время эпилептического статуса может происходить быстрая транспортировка NMDA-рецепторов из внутренних клеточных компартментов в синапсы. Например, было выявлено, что иммунореактивность к GluN1-субъединице в области постсинаптической плотности возрастает в 3 раза в течение часа после литий-пилокарпинового эпилептического статуса, также увеличивается амплитуда зависимых от NMDA-рецепторов миниатюрных постсинаптических ответов [16].

Одновременно с встраиванием в постсинаптическую мембрану уже существующих рецепторов может происходить изменение экспрессии генов различных субъединиц и синтез новых NMDA-рецепторов. Экспрессия генов субъединиц NMDA-рецепторов была ранее изучена в нескольких экспериментальных моделях эпилепсии [17, 30, 31]. В настоящем исследовании было проанализировано изменение уровня



**Рис. 7.** Относительный уровень экспрессии субъединиц NMDA-рецепторов через 3 и 24 ч после введения пентилентетразола ( $n = 6-7$ , кружки) и физиологического раствора ( $n = 4-5$ , треугольники). Нормировано по циклофилину А. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$



экспрессии генов, кодирующих субъединицы GluN1, GluN2A и GluN2B, в гиппокампе крыс через 3 и 24 ч после ПТЗ-индуцированного эпилептического статуса. Усиление экспрессии гена, кодирующего субъединицу GluN2A, через час после введения ПТЗ в гиппокампе крыс показано Ahmadirad et al. [30], что согласуется с нашими результатами. Через 24 ч после ПТЗ-индуцированных судорог, согласно полученным нами результатам, усиливается продукция мРНК GluN2B-субъединицы. Ранее опубликованные данные указывают на увеличение доли именно GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов после эпилептического статуса [16, 32]. Сходные результаты были показаны у крыс с хронической эпилепсией при исследовании синапсов, формируемых коллатеральными Шаффера [6]. Избыточная экспрессия GluN1- и GluN2B-субъединиц была показана в модели *in vitro* на первичной культуре гиппокампа через 24 ч после действия пилокарпина [17].

Хорошо известно, что субъединичный состав NMDA-рецепторов напрямую связан с их функциональной активностью [15, 33]. В ряде работ было выявлено, что преобладание NMDA-рецепторов определенного субъединичного состава может оказывать влияние на знак долговременной синаптической пластичности. Было показано, что GluN2A-содержащие NMDA-рецепторы играют важную роль в индукции долговременной потенциации, в то время как GluN2B-содержащие – в индукции долговременной депрессии [18, 34]. При этом для

регуляции порогов возникновения долговременной потенциации и депрессии принципиально важным является соотношение продукции GluN2A- и GluN2B-субъединиц [35].

Экспрессия GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов может увеличиваться как на синаптических, так и на экstrasинаптических участках нейронов, однако Frasca et al. было выявлено, что этот подтип NMDA-рецепторов может перераспределяться между синаптическими и экstrasинаптическими участками в пользу экstrasинаптической локализации [36]. Недавние исследования показали, что синаптические и экstrasинаптические NMDA-рецепторы оказывают различное влияние на долговременную синаптическую пластичность: синаптически расположенные NMDA-рецепторы способствуют индукции ДВП, тогда как экstrasинаптические – депрессии [37]. Таким образом, увеличение экспрессии мРНК GluN2B-субъединицы и, возможно, преимущественное встраивание GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов в экstrasинаптические области может быть одной из причин уменьшения величины ДВП в синапсах гиппокампа после эпилептического статуса.

#### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-04-00413, 15-04-02951 и 16-04-00998) и программы Президиума РАН I.19П.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giovagnoli, A.R., and Avanzini, G. (1999) Learning and memory impairment in patients with temporal lobe epilepsy: relation to the presence, type, and location of brain lesion, *Epilepsia*, **40**, 904–911.
- Aniol, V.A., Ivanova-Dyatlova, A.Y., Keren, O., Guekht, A.B., Sarne, Y., and Gulyaeva, N.V. (2013) A single pentylene-tetrazole-induced clonic-tonic seizure episode is accompanied by a slowly developing cognitive decline in rats, *Epilepsy Behav.*, **26**, 196–202.
- Kalemenev, S.V., Zubareva, O.E., Frolova, E.V., Sizov, V.V., Lavrentyeva, V.V., Lukomskaya, N.Y., Kim, K., Zaitsev, A.V., and Magazanik, L.G. (2015) Impairment of exploratory behavior and spatial memory in adolescent rats in lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Dokl. Biol. Sci.*, **463**, 175–177.
- Kandel, E.R. (2004) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses, *Biosci. Rep.*, **24**, 475–522.
- Abegg, M.H., Savic, N., Ehrenguber, M.U., McKinney, R.A., and Gahwiler, B.H. (2004) Epileptiform activity in rat hippocampus strengthens excitatory synapses, *J. Physiol.*, **554**, 439–448.
- Muller, L., Tokay, T., Porath, K., Kohling, R., and Kirschstein, T. (2013) Enhanced NMDA receptor-dependent LTP in the epileptic CA1 area via upregulation of NR2B, *Neurobiol. Dis.*, **54**, 183–193.
- Zhou, J.L., Shatskikh, T.N., Liu, X., and Holmes, G.L. (2007) Impaired single cell firing and long-term potentiation parallels memory impairment following recurrent seizures, *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 3667–3677.
- Meador, K.J. (2007) The basic science of memory as it applies to epilepsy, *Epilepsia*, **48**, 23–25.
- Debanne, D., Thompson, S.M., and Gahwiler, B.H. (2006) A brief period of epileptiform activity strengthens excitatory synapses in the rat hippocampus *in vitro*, *Epilepsia*, **47**, 247–256.
- 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.
- Suarez, L.M., Cid, E., Gal, B., Inostroza, M., Brotons-Mas, J.R., Gomez-Dominguez, D., de la Prida, L.M., and Solis, J.M. (2012) Systemic injection of kainic acid differentially affects LTP magnitude depending on its epileptogenic efficiency, *PLoS One*, **7**, e48128.
- Guli, X., Tokay, T., Kirschstein, T., and Kohling, R. (2016) Status epilepticus enhances depotentiation after fully established LTP in an NMDAR-dependent but

- GluN2B-independent manner, *Neural Plast.*, **2016**, 6592038.
13. O'Leary, H., Bernard, P.B., Castano, A.M., and Benke, T.A. (2016) Enhanced long term potentiation and decreased AMPA receptor desensitization in the acute period following a single kainate induced early life seizure, *Neurobiol. Dis.*, **87**, 134–144.
  14. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors, *Neuron*, **12**, 529–540.
  15. Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 327–335.
  16. 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.
  17. Di Maio, R., Mastroberardino, P.G., Hu, X., Montero, L., and Greenamyre, J.T. (2011) Pilocarpine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms, *Neurobiol. Dis.*, **42**, 482–495.
  18. 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., and 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.
  19. Wang, D., Cui, Z., Zeng, Q., Kuang, H., Wang, L.P., Tsien, J.Z., and Cao, X. (2009) Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats, *PLoS One*, **4**, e7486.
  20. 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.
  21. Livak, K.J., and 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.
  22. Zaitsev, A.V., and Anwyl, R. (2012) Inhibition of the slow afterhyperpolarization restores the classical spike timing-dependent plasticity rule obeyed in layer 2/3 pyramidal cells of the prefrontal cortex, *J. Neurophysiol.*, **107**, 205–215.
  23. Buonomano, D.V. (1999) Distinct functional types of associative long-term potentiation in neocortical and hippocampal pyramidal neurons, *J. Neurosci.*, **19**, 6748–6754.
  24. Ben-Ari, Y., and Gho, M. (1988) Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid, *J. Physiol.*, **404**, 365–384.
  25. Amakhin, D.V., Ergina, J.L., Chizhov, A.V., and Zaitsev, A.V. (2016) Synaptic conductances during interictal discharges in pyramidal neurons of rat entorhinal cortex, *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, 233.
  26. Zaitsev, A.V., Kim, K.K., Vasilev, D.S., Lukomskaya, N.Y., Lavrentyeva, V.V., Tumanova, N.L., Zhuravin, I.A., and 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.
  27. Aniol, V.A., Stepanichev, M.Y., Lazareva, N.A., and Gulyaeva, N.V. (2011) An early decrease in cell proliferation after pentylentetrazole-induced seizures, *Epilepsy Behav.*, **22**, 433–441.
  28. Ahmed, M.M., Arif, M., Chikuma, T., and Kato, T. (2005) Pentylentetrazol-induced seizures affect the levels of prolyl oligopeptidase, thimet oligopeptidase and glial proteins in rat brain regions, and attenuation by MK-801 pretreatment, *Neurochem. Int.*, **47**, 248–259.
  29. Zhvania, M.G., Ksovreli, M., Japaridze, N.J., and Lordkipanidze, T.G. (2015) Ultrastructural changes to rat hippocampus in pentylentetrazol- and kainic acid-induced status epilepticus: a study using electron microscopy, *Micron*, **74**, 22–29.
  30. Ahmadi-rad, N., Shojaei, A., Javan, M., Pourgholami, M.H., and Mirnajafi-Zadeh, J. (2014) Effect of minocycline on pentylentetrazol-induced chemical kindled seizures in mice, *Neurol. Sci.*, **35**, 571–576.
  31. Davoudi, M., Shojaei, A., Palizvan, M.R., Javan, M., and Mirnajafi-Zadeh, J. (2013) Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylentetrazol kindled seizures in the rat, *Epilepsy Res.*, **106**, 54–63.
  32. Wasterlain, C.G., Naylor, D.E., Liu, H., Niquet, J., and Baldwin, R. (2013) Trafficking of NMDA receptors during status epilepticus: therapeutic implications, *Epilepsia*, **54**, 78–80.
  33. Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 383–400.
  34. Fox, C.J., Russell, K.I., Wang, Y.T., and Christie, B.R. (2006) Contribution of NR2A and NR2B NMDA subunits to bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus *in vivo*, *Hippocampus*, **16**, 907–915.
  35. Xu, Z., Chen, R.Q., Gu, Q.H., Yan, J.Z., Wang, S.H., Liu, S.Y., and 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.
  36. Frasca, A., Aalbers, M., Frigerio, F., Fiordaliso, F., Salio, M., Gobbi, M., Cagnotto, A., Gardoni, F., Battaglia, G.S., Hoogland, G., Di Luca, M., and Vezzani, A. (2011) Misplaced NMDA receptors in epileptogenesis contribute to excitotoxicity, *Neurobiol. Dis.*, **43**, 507–515.
  37. Parsons, M.P., and Raymond, L.A. (2014) Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders, *Neuron*, **82**, 279–293.

**STATUS EPILEPTICUS DISTURBS SYNAPTIC  
PLASTICITY IN RAT HIPPOCAMPUS  
AND IS ACCOMPANIED BY CHANGES  
IN EXPRESSION OF NMDA RECEPTORS**

**T. Y. Postnikova<sup>1,2</sup>, O. E. Zubareva<sup>1,3</sup>, A. A. Kovalenko<sup>3</sup>,  
K. K. Kim<sup>1</sup>, L. G. Magazanik<sup>1,4</sup>, and A. V. Zaytsev<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,  
Russian Academy of Sciences, 194223 Saint Petersburg,  
Russia; E-mail: aleksey\_zaitsev@mail.ru*

<sup>2</sup> *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,  
195251 Saint Petersburg, Russia*

<sup>3</sup> *Institute of Experimental Medicine, 197376 Saint Petersburg,  
Russia*

<sup>4</sup> *Saint Petersburg State University, 199034 Saint Petersburg,  
Russia*

Received November 1, 2016

Revision received November 14, 2016

Cognitive deficits and memory loss are frequent in patients with temporal lobe epilepsy. Persistent changes in synaptic efficacy are considered as a cellular substrate underlying memory processes. Electrophysiological studies have shown that properties of short-term and long-term synaptic plasticity in the cortex and hippocampus may change substantially after seizures. However, the neural mechanisms responsible for these alterations are not entirely clear. In this study, we investigated the properties of short-term and long-term synaptic plasticity in rat hippocampal slices 24 h after pentylenetetrazole (PTZ)-induced status epilepticus. We found that the induction of long-term potentiation (LTP) in CA1 pyramidal cells is reduced compared to the control, while the short-term facilitation is increased. The experimental results do not support the hypothesis that status epilepticus leads to background potentiation of hippocampal synapses and further LTP induction weakened due to the occlusion, as the dependence of the synaptic responses from the input stimulation strength did not differ between the control and experimental animals. The decrease in LTP can be caused by disorder of the molecular mechanisms of neuronal plasticity, including those associated with the NMDA receptors and/or changes in their subunit composition. Using real-time PCR, we found that there were significant increases in GluN1 and GluN2A subunit expressions 3 h after PTZ-induced status epilepticus. Overexpression of obligate GluN1 subunit suggests an increase in the total number of NMDA receptors in the hippocampus. Twenty-four hours after PTZ-induced status epilepticus, there was a three-fold increase in GluN2B subunit expression, which may indicate an increase in the proportion of GluN2B-containing NMDA receptors. Increased expression of GluN2B subunit may be one of the reasons for reducing the magnitude of LTP at hippocampal synapses after status epilepticus.

**Keywords:** long-term synaptic potentiation (LTP), CA1, epilepsy, NMDA receptors, GluN2B, GluN2A