

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**IN VITRO МОДЕЛИ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ**

© 2019 г. Ю. Л. Ергина<sup>1, \*</sup>, Е. Ю. Смирнова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: for.mail.ergin@gmail.com

Поступила в редакцию 10.05.2019 г.

После доработки 06.06.2019 г.

Принята к публикации 10.06.2019 г.

На сегодняшний день моделирование острых судорожных состояний *in vitro* является одним из ключевых методов получения информации о механизмах генерации, распространения и прекращения эпилептоподобной активности. С помощью *in vitro* моделей изучают последствия острого фармакологического и электрического воздействия на ткани мозга, изменения синаптической передачи в ходе эпилептоподобных разрядов. Применение *in vitro* моделей позволяет обойти часть ограничений, традиционно ассоциируемых с *in vivo* исследованиями; в частности, их использование значительно упрощает процесс доставки химических агентов, а также обеспечивает механическую стабильность электрофизиологической регистрации за счет отсутствия артефактов, связанных с судорогами, а также сердцебиением и дыханием. В *in vitro* исследованиях становятся доступными структуры вентральной поверхности мозга, лежащие у основания черепа. В обзоре описаны современные *in vitro* модели эпилептической активности, обсуждаются преимущества и недостатки, а также область их применения.

*Ключевые слова:* острые судорожные состояния, эпилептоподобная активность, *in vitro* модели эпилепсии, переживающие срезы, энторинальная кора, гиппокамп

DOI: 10.1134/S0869813919080041

*In vitro* исследования служат важнейшим источником информации о механизмах генерации, распространения и прекращения острой судорожной активности. Исследования механизмов эпилепсии на срезах мозга начались еще в 70-х гг. XX века. Одной из первых работ в этом направлении было исследование природы вызванных разрядов, подобных интериктальным событиям [1]. Основными преимуществами исследования механизмов эпилепсии *in vitro* являются следующие: прицельное фармакологическое воздействие на очаг эпилептической активности; возможность внутриклеточной регистрации как динамики мембранного потенциала, так и постсинаптических токов; доступность одновременной регистрации динамики ионных концентраций и активности нейронов. С другой стороны, работа *in vitro* обеспечивает механическую стабильность записей за счет отсутствия артефактов, связанных с сердцебиением и дыханием [2, 3]. Кроме того, становятся доступными для исследования структуры вентральной поверхности мозга, которые расположены в труднодоступной зоне у основания черепа.

Однако использование *in vitro* моделей сопряжено с рядом недостатков, которые необходимо учитывать при экстраполяции результатов исследований. Функцио-

нирование мозга в значительной степени зависит от обеспеченности кислородом и энергией, поступление которых в интактном мозге осуществляется через кровеносные сосуды. Отношения между доставкой кислорода, поглощением энергии и потребностью в них достаточно сложны. К примеру, показано, что существует пространственно-временная связь между активностью нейронов и мозговым кровотоком в локальных нейронных сетях [4]. Подобные отношения не воспроизводятся в условиях *in vitro*. Также следует учитывать, что при моделировании острых судорожных состояний *in vitro* невозможно оценить поведенческие и моторные компоненты эпилептической активности. Поэтому такие исследования направлены, главным образом, на получение данных об электрофизиологических характеристиках наблюдаемой нейрональной активности, изменениях ионных концентраций и последствиях воздействия различных химических агентов.

В зависимости от поставленной задачи, эпилептоподобную активность можно исследовать в органотипических культурах, на переживающих срезах мозга, изолированном гиппокампе и, наконец, изолированном мозге.

В моделях *in vitro* в качестве эпилептогенного фактора могут выступать:

- хемоконвульсанты, к примеру, 4-аминопиридин [5], каиновая кислота [6], биккуллин [7];
- нарушенный ионный состав перфузирующего раствора, к примеру, пониженная концентрация ионов магния [8, 9], повышенная концентрация ионов калия [10, 11], пониженная концентрация ионов кальция [12];
- электрическая стимуляция [13];
- гипоксическое воздействие [14].

В данном обзоре описаны современные модели *in vitro* эпилептиформной активности и области их применения.

## ПРЕПАРАТЫ МОЗГА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЯХ

**1. Переживающие срезы мозга грызунов.** Существует несколько методических подходов к изготовлению переживающих срезов мозга, причем выбор метода зависит от цели исследования и области научных интересов. Первоначально в большинстве лабораторий использовались обычные режущие инструменты; последующее применение вибраторов позволило уменьшить степень механических повреждений ткани [15]. Особые усилия для сохранения целостности ткани прилагаются при работе с субклеточными компартментами, такими как дендриты и пресинаптические терминалы [16]. Другим важным параметром является качество искусственной спинномозговой жидкости, используемой для перфузии. Осмолярность раствора находится в пределах 290–310 мОсм/л, pH 7.4, раствор аэрируют карбогеном (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). Для предотвращения ацидоза и снабжения среза кислородом поддерживается высокая скорость перфузии (5 мл/мин или более). Толщина переживающих срезов в разных исследованиях варьирует от 200 до 600 мкм. При изучении эпилептоподобной активности широко используются комплексные срезы, в которых частично сохранены связи между отдельными структурами: между энторинальной корой и гиппокампом [17], между энторинальной корой, гиппокампальной формацией и миндалиной [18], между неокортексом и таламусом [19], между передней частью поясной извилины и медиальным таламусом [20], между двумя гиппокампам [21].

Эпилептическую активность в переживающих срезах можно регистрировать несколькими способами. Регистрация полевых потенциалов используется для изучения популяционных свойств [22], внутриклеточная регистрация (с помощью острых микроэлектродов или патч-электродов) [23] позволяет более тонко оценивать синаптическую активность нейрона [24], свойства ионных каналов [25] и т.д. Если

исследуемый нейрон был заполнен красителем, его можно идентифицировать и соотнести его морфологические свойства (например, вид дендритного и аксонального дерева) с его электрофизиологическими характеристиками. С помощью кальциевого имиджинга можно измерять динамику внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  в отдельных клеточных компартментах (дендритах, шипиках), или же функциональную активность нейронных сетей. Таким образом, переживающие срезы подходят для проведения междисциплинарных исследований.

К недостаткам переживающих срезов можно отнести следующее. Во-первых, такие срезы претерпевают короткий период гипоксии и механических повреждений, что может в дальнейшем повлиять на свойства изучаемых клеток [26]. Во-вторых, известно, что одним из последствий изоляции изучаемых структур мозга является резкое снижение спонтанной синаптической активности [27]. Это важно учитывать при использовании срезов неокортекса, поскольку в этих областях коры именно внешние синаптические входы обычно выступают в роли основного источника возбуждения. Снижение спонтанной активности не столь критично, например, при использовании срезов гиппокампа, поскольку нужный уровень возбуждения может быть получен за счет его локальных нейронных сетей. С другой стороны, хотя ключевые глутаматергические и ГАМКергические синаптические связи сохраняются в гиппокампальных срезах, в них оказываются перерезанными связи, оказывающие модулирующее воздействие (дофаминергические, серотонинергические, холинергические и т.д.). В-третьих, горизонтальный срез мозга взрослой крысы, толщиной 400 мкм, составляет менее одной десятой всей структуры гиппокампа. Поскольку аксоны нейронов гиппокампа могут ветвиться вдоль его продольной оси [28], часть внутренних гиппокампальных связей оказывается утеряна. Наконец, время жизни среза составляет всего 6–12 ч. В работе [29] было показано, что здоровое состояние клеток гиппокампа и коры поддерживается только первые 4 ч.

**2. Изолированный гиппокамп и изолированный мозг.** В ряде исследований, в том числе исследований эпилептоподобной активности, используются *in vitro* модели на основе изолированного гиппокампа грызунов [30, 31] и изолированного мозга морской свинки [32]. Эти модели позволяют оценить вклад различных структур мозга в исследуемый процесс, они были разработаны для преодоления методологических ограничений, связанных с использованием переживающих срезов. Показано, что в изолированном мозге морской свинки *in vitro* сохраняются связи между диэнцефалическими и телэнцефалическими структурами обоих полушарий [33]. Более того, сохраняются сосудистая система, гематоэнцефалический барьер и их взаимодействие с паренхимой головного мозга [2, 34, 35]. Изолированный мозг удобен для изучения направлений распространения эпилептоподобной активности, также его можно использовать для изучения связи между активностью нейронов и внеклеточными/гематоэнцефалическими/сосудистыми компартментами в ходе генерации паттернов эпилептоподобной активности; изолированный гиппокамп интересен тем, что демонстрирует спонтанную активность [27]. Тем не менее, изучение клеточных механизмов генерации и распространения эпилептоподобной активности, которое легко осуществимо в более простых *in vitro* моделях, сложно реализовать в изолированном гиппокампе и изолированном мозге.

**3. Органотипическая культура гиппокампа.** Преимуществом использования органотипической культуры гиппокампа по сравнению с переживающими срезами мозга является стабильный уровень здоровых клеток в течение нескольких недель. Однако следует иметь в виду, что в процессе культивирования происходит существенная перестройка синаптических связей [36]. В культуре со временем растет число рекуррентных взаимодействий, поэтому усиливается и эпилептическая активность. Сначала наблюдается интериктальная активность, через пару недель уже происходят иктальные разряды [37]. Поэтому органотипическая культура удобна

для исследования механизмов эпилептогенеза. Методика приготовления органо-типической культуры подробно описана в работе [38].

### ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

В работах на гиппокампальных и неокортикальных переживающих срезах с использованием нескольких *in vitro* моделей было показано, что характер вызванной эпилептоподобной активности зависит от возраста исследуемого животного. Эпилептоподобная активность чаще возникала у молодых животных по сравнению с животными более старших возрастных групп (P23–26, P41–47), а иктальные события у 41–47-дневных животных были менее продолжительны по сравнению с более молодыми животными [39].

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

Осмолярность перфузирующего раствора существенно сказывается на возбудимости сети, поэтому должна быть строго выдержана не только в ходе эксперимента, но и на подготовительной стадии [40]. Оптимальной является осмолярность 290 мОсм/л, понижение осмолярности уже на 10% приводит к набуханию клеток, уменьшению межклеточного пространства, повышению возбудимости нейронов и появлению эпилептиформной активности [41]. Повышенная осмолярность приводит к сморщиванию клеток, что препятствует формированию эпилептиформной активности.

Еще одним фактором, который необходимо учитывать в электрофизиологическом эксперименте, в том числе на моделях эпилептиформной активности *in vitro*, является кислотность перфузирующего раствора. Оптимальным является pH 7.4. Повышение кислотности приводит к понижению возбудимости, тогда как в щелочном растворе наблюдается повышенная возбудимость нейронов [42]. Кислотность изменяет проводимость каналов синаптических рецепторов, в частности, повышение кислотности приводит к уменьшению НМДА-рецептор опосредованной проводимости [43] и увеличению ГАМК<sub>A</sub>-рецептор опосредованной проводимости [44]. Оптимальный уровень кислотности обычно достигается путем аэрации раствора карбогеном, но важно иметь в виду, что есть температурная зависимость [36]. Из-за того, что CO<sub>2</sub> медленнее растворяется в теплых растворах, нежели при комнатной температуре, необходимо уменьшить концентрацию NaHCO<sub>3</sub>. Рекомендуют использовать концентрацию NaHCO<sub>3</sub> 21 мМ при 35°C и 26 мМ при комнатной температуре [36].

Влияние температуры на работу нейронов не ограничивается изменением кислотности, температура также влияет на кинетику каналов и других белков. Например, температурная зависимость потенциал-управляемых натриевых и калиевых каналов приводит к изменению формы спайков под действием температуры [45]. Поэтому и эпилептиформная активность в моделях *in vitro* существенно зависит от температуры, при температуре ниже 32°C сложно вызвать эпилептоподобные состояния активности сети [46].

Как уже было отмечено, для генерации эпилептиформной активности необходимо поддерживать высокий уровень оксигенации перфузирующего раствора. Для этого необходимо поддерживать скорость протока не менее 4 мл/мин [47].

## НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

В случае височной эпилепсии [48], различают интериктальную и иктальную активность, которые отличаются продолжительностью сетевой активности. В животных моделях также различают интериктальные и иктальные разряды. Интериктальные разряды представляют собой одиночные пачки активности продолжительностью несколько секунд, тогда как иктальный разряд представляет собой пачку пачек продолжительностью десятки и даже сотни секунд.

**1. Модели, основанные на подавлении тормозной активности.** Фармакологическое подавление торможения применяется в исследованиях эпилептоподобной активности достаточно давно [49]. Для этой цели обычно используют бикуккуллин и пикротоксин – антагонисты ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Было показано, что в отсутствие ГАМК<sub>A</sub>-рецептор-обусловленной синаптической передачи могут возникать синхронизированные интериктальные разряды [50, 51]. В дальнейшем было подтверждено, что регистрируемые разряды связаны с глутаматергической синаптической передачей, а именно обусловлены активностью АМПА/КА и НМДА-рецепторов [52]. Как правило, для генерации иктальных разрядов в таких моделях требуются дополнительные фармакологические воздействия (по крайней мере, в срезах мозга взрослых животных), например, повышение  $[K^+]_O$  до 5 мМ [53]. Однако в срезах мозга молодых животных можно зарегистрировать иктальные события, используя перфузирующий раствор с  $[K^+]_O = 3.5$  мМ [54]. Кроме того, используя антагонисты ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, иктальные разряды удалось получить в области CA1 в срезах мозга взрослых морских свинок [55]. Таким образом, этот тип *in vitro* моделей не слишком подходит для изучения иктогенеза, но его можно использовать для изучения изменений возбуждающей активности, характерных для хронической эпилепсии [56].

**2. 4-аминопиридиновая модель.** 4-аминопиридин блокирует несколько типов калиевых каналов, из них наибольшую роль в ткани мозга играют калиевые каналы DR- и А-типов [57, 58]. Хотя механизм конвульсионного действия 4-аминопиридина все еще требует дальнейших исследований, общепринятой считается гипотеза о том, что блокада калиевых каналов приводит к увеличению ширины спайков пресинаптического нейрона из-за задержки реполяризации и к повышению концентрации кальция в силу деполяризации нейрона. В результате этих процессов усиливается выброс медиатора [59, 60], за счет чего возникает эпилептоподобная активность [60].

Добавление 4-аминопиридина в перфузирующий раствор позволяет быстро вызывать как интериктальную, так и иктальную активность в нервной ткани [61]. Еще одним преимуществом модели является возможность изучения роли ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов в эпилептогенезе с помощью этой модели, поскольку 4-аминопиридин не нарушает их работу [62]. Представляет интерес то, что регистрируемые в 4-аминопиридиновой модели медленные интериктальные разряды блокируются бикуккулином, антагонистом ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [63].

**3. Каиновая модель.** Каинат обладает широким спектром действия, демонстрируя как пресинаптический, так и постсинаптический эффект, поэтому остается неясным, чем именно обусловлена его эпилептогенность [64–66]. Каиновая кислота может деполяризовать пирамидные нейроны зоны CA3 гиппокампа [67] и интернейроны [68], которые экспрессируют каинатные рецепторы, с другой стороны, может оказывать пресинаптическое воздействие на глутаматергические и ГАМКергические терминалы [65], а также на ионные каналы [69].

В работе на интактном гиппокампе было показано, что при введении каиновой кислоты даже возникает “зеркальный” очаг эпилептоподобной активности в контралатеральном гиппокампе [70]. Несмотря на эпилептогенный эффект каината *in vivo* [64] и его способность вызывать тонико-клонические разряды, подобные иктальным, при наномолярных концентрациях *in vitro* [71], каинат не получил широкого распространения в исследованиях эпилептоподобной активности в переживающих срезах гиппокампа.

**4. Модель с пониженной концентрацией внеклеточного  $Mg^{2+}$ .** Такой тип моделей в первую очередь основан на потенцировании НМДА-рецепторов за счет снижения эффективности их магниевого блока. Показано, что в переживающих гиппокампальных срезах мозга крысы снижение внеклеточной концентрации  $Mg^{2+}$  ведет к появлению повторяющихся краткосрочных разрядов, по своим свойствам напоминающих интериктальные. Длительность таких разрядов составляет от 30 до 120 мс, они возникают в области СА3 и распространяются в область СА1 гиппокампа, обычно не затрагивая зубчатую извилину [72]. Роль НМДА-рецепторов в генерации эпилептоподобной активности в рамках этой модели подтверждается экспериментальными данными об успешном подавлении регистрируемых спонтанных и вызванных эпилептоподобных разрядов после добавления в перфузирующий раствор антагониста НМДА-рецепторов APV [73]. Понижение внеклеточной концентрации  $Mg^{2+}$  до 0,2, 0,1 или номинально 0 мМ позволяет индуцировать спонтанную эпилептоподобную активность в изолированном гиппокампе, полученном от новорожденных мышей [74]. В этом исследовании также было продемонстрировано, что снижение  $[Mg^{2+}]_o$  до 0,2 мМ и повышение  $[K^+]_o$  до 5 мМ в изолированном гиппокампе мышей на 3–4-е дни жизни приводит к появлению высоко воспроизводимой спонтанной эпилептоподобной активности, которая частично блокируется применением антагониста НМДА-рецепторов CPP. Добавление CPP (10 мкМ) в перфузирующий раствор приводило к обратимому исчезновению иктальных разрядов, в то время как интериктальные события продолжали наблюдаться. Добавление CPP в сочетании с блокатором АМПА-рецепторов CNQX в 5 из 7 экспериментов приводило к полному исчезновению эпилептоподобной активности [74]. Модель пониженного магния широко используется в исследованиях на клеточных культурах. Используя культуральную среду с низким содержанием  $Mg^{2+}$ , было показано, что ранняя эпилептиформная активность приводит к временному снижению экспрессии GluN2B субъединицы на 7-й день культивирования [75].

**5. Модель с повышенной концентрацией внеклеточного  $K^+$ .** Повышенная концентрация  $K^+$  в перфузирующем растворе приводит к возникновению эпилептоподобной активности [76]. В работе [77] показано, что при повышенной концентрации  $K^+$  на фоне пачечной активности пирамидных нейронов гиппокампа наблюдаются НМДА-рецептор опосредованные токи вследствие сдвига равновесного потенциала  $K^+$ . Модель повышенной концентрации  $K^+$  может быть использована для исследования роли астроцитов в эпилептогенезе, поскольку они отвечают за буферизацию  $K^+$ , тем самым влияя на возбудимость нейронов. Поскольку изменения концентрации  $K^+$  недостаточно, чтобы вызвать иктальные разряды, этот фактор чаще используют совместно с другими, к примеру, с 4-аминопиридином [61] или с пониженной концентрацией  $Mg^{2+}$  [78].

**6. Смешанные модели эпилептической активности *in vitro*.** В лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий ИЭФБ РАН исследуются механизмы возникновения, распространения и прекращения эпилептической активности *in vitro* с использованием методов электрофизиологии, оптогенетики и иммуногистохимии. Эффекты блокады ионных каналов, рецепторов, транспортеров и помп, а также

влияния стимуляции или оптогенетического воздействия удобно изучать на 4-аминопиридиновой модели с пониженной концентрацией  $Mg^{2+}$  [79], (рис. 1). Среди преимуществ этой модели мы отметили отсутствие спонтанной активности пирамидных нейронов коры (все потенциалы действия возникают в ответ на синхронизированный синаптический вход в рамках эпилептической активности), а также стабильный режим генерации икталных разрядов в течение записи более 1.5 ч.

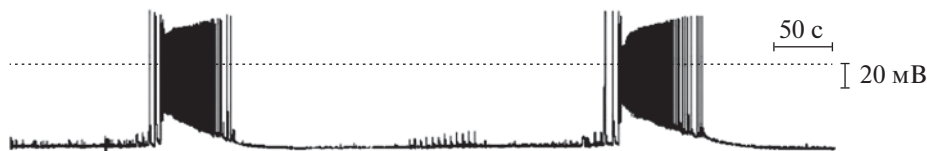
Для исследования перехода между режимами интериктальной и иктальной активности используется 4-аминопиридиновая модель с пониженной концентрацией  $Mg^{2+}$  и повышенной концентрацией  $K^+$  [61].

Кратко опишем типы эпилептиформной активности в срезах гиппокампа и энторинальной коры в 4-аминопиридиновой модели с повышенной концентрацией  $K^+$  и пониженной концентрацией  $Mg^{2+}$ . На рис. 2 приведена динамика эпилептической активности в этой модели на примере синаптических входов одного репрезентативного нейрона энторинальной коры, иктальному разряду предшествует интериктальная активность первого типа, когда преобладает синхронизация тормозных интернейронов, тогда как после иктального разряда регистрируются глутаматергические ответы, характерные для интериктальной активности второго типа.

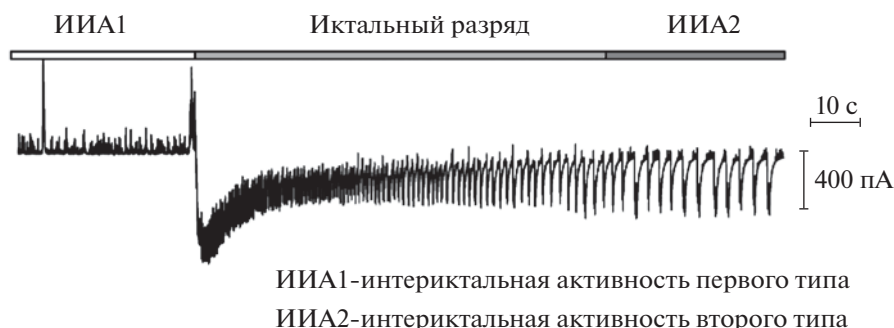
Эпилептическая активность возникает из-за нарушения баланса возбуждения и торможения в нервной ткани. Однако факторы, приводящие к нарушению баланса, могут отличаться в разных случаях. Поэтому, чтобы выявлять общие закономерности, независимые от первичных провоцирующих факторов, предпочтительно использовать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

При выборе модели необходимо учитывать возможную роль выключенного компонента системы в исследуемом процессе. К примеру, бикикуллиновая модель не подходит для изучения роли интернейронов в генерации эпилептических событий, поэтому такие исследования обычно проводятся с использованием 4-аминопиридиновой модели [80, 81]. Модель пониженной концентрации  $Mg^{2+}$  не позволяет изучить роль НМДА-рецепторов, 4-аминопиридиновую модель необходимо с осторожностью применять для исследования пресинаптических процессов.

Важно также учитывать то, что от выбранного конвульсанта зависит область возникновения эпилептической активности. В 4-аминопиридиновой модели икталные разряды генерируются в энторинальной коре, тогда как интериктальные разряды генерируются как в коре, так и в зоне СА3 гиппокампа [63]. В модели пониженной концентрации  $Mg^{2+}$  икталные разряды также генерируются в энторинальной коре, тогда как интериктальные разряды были зарегистрированы в СА зонах гиппокампа [82]. Повышенная концентрация  $K^+$  в растворе приводит к возникновению как интериктальных, так и икталных разрядов в зоне СА1 гиппокампа [83].



**Рис. 1.** Эпилептическая активность в 4-аминопиридиновой модели с пониженной концентрацией магния в срезах гиппокампа и энторинальной коры, продемонстрированная динамикой мембранного потенциала репрезентативного принципиального нейрона глубоких слоев энторинальной коры. Во время преиктальных разрядов возникают одиночные короткие пачки спайков, тогда как во время двух икталных разрядов с выраженными тонической и клонической фазами наблюдается продолжительная спайковая активность. Запись получена методом патч-кламп в конфигурации “целая клетка” в режиме фиксации тока.



**Рис. 2.** Динамика epileptической активности в 4-аминопиридиновой модели эпилепсии с повышенным содержанием  $K^+$  и пониженным  $Mg^{2+}$ , продемонстрированная постсинаптическими токами на репрезентативном нейроне энторинальной коры в режиме фиксации потенциала на  $-27$  мВ.

Несмотря на то, что количественные характеристики синхронизированной активности, вызываемой в рамках разных *in vitro* моделей, несколько отличаются, регистрируемые иктальные разряды имеют определенное сходство. Это позволяет говорить о существовании единых механизмов генерации эпилептоподобной активности, а также предположить, что ее возникновение во многом обусловлено специфической организацией локальных нейронных сетей [39]. Например, на переживающих срезах, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, было показано, что иктальные разряды, вызываемые разными способами (повышенной концентрацией  $K^+$ , пониженной концентрацией  $Mg^{2+}$  и 4-аминопиридином), чаще всего генерируются в энторинальной коре и отсюда распространяются в области СА1 и СА3 гиппокампа [84, 85]. *In vitro* исследования, опирающиеся на использование изолированного мозга, также подтвердили роль энторинальной коры в генерации иктальных разрядов [86].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпилепсия височной доли является одной из наиболее распространенных форм эпилепсии, поэтому многие *in vitro* модели epileptической активности основаны на изготовлении переживающих срезов, содержащих те или иные структуры височной доли. Использование переживающих срезов, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, оправдано еще и наличием сложной структуры внутригиппокампальных связей, сохраняющихся при изготовлении среза. Кроме того, четкая послойная организация гиппокампа позволяет легко идентифицировать основные типы клеток, что упрощает организацию экспериментальной работы. С другой стороны, становится невозможным оценить вклад других подкорковых структур и областей коры в генерацию синхронизированной активности. Использование более сложных *in vitro* моделей, таких как изолированный мозг и изолированный гиппокамп, накладывает свои ограничения, усложняя изучение клеточных механизмов генерации и распространения эпилептоподобной активности. Таким образом, моделирование *in vitro* позволяет изучать механизмы иктогенеза, но требует осторожности при экстраполяции полученных результатов.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантом РФФ (проект № 17-75-10082).



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamamoto C. Intracellular study of seizure-like afterdischarges elicited in thin hippocampal sections in vitro. *Exp. Neurol.* 35(1): 154–164. 1972.
2. de Curtis M., Biella G., Buccellati C., Folco G. Simultaneous investigation of the neuronal and vascular compartments in the guinea pig brain isolated in vitro. *Brain Res. Protoc.* 3(2): 221–228. 1998.
3. Muhlethaler M., de Curtis M., Walton K., Llinas R. The isolated and perfused brain of the guinea-pig in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 5(7): 915–926. 1993.
4. Chaigneau E., Oheim M., Audinat E., Charpak S. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(22): 13081–13086. 2003.
5. Spyker D., Lynch C., Shabanowitz J., Sinn J. Poisoning with 4-aminopyridine: Report of three cases. *Clin. Toxicol.* 16: 487–497. 1980.
6. Ben-Ari Y., Tremblay E., Riche D., Ghilini G., Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: Metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience.* 6: 1361–1391. 1981.
7. Baram T., Snead 3<sup>rd</sup> O. Bicuculline induced seizures in infant rats: Ontogeny of behavioral and electrocortical phenomena. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 57(2): 291–295. 1990.
8. Pfeiffer M., Draguhn A., Meierkord H., Heinemann U. Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) agonists and GABA uptake inhibitors on pharmacosensitive and pharmacoresistant epileptiform activity in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 119: 569–577. 1996.
9. Dreier J., Zhang C., Heinemann U. Phenytoin, phenobarbital, and midazolam fail to stop status epilepticus-like activity induced by low magnesium in rat entorhinal slices, but can prevent its development. *Acta Neurol. Scand.* 98: 154–160. 1998.
10. Balestrino M., Aitken P., Somjen G. The effects of moderate changes of extracellular K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on synaptic and neural function in the CA1 region of the hippocampal slice. *Brain Res.* 377: 229–239. 1986.
11. Poolos N., Mauk M., Kocsis J. Activity-evoked increases in extracellular potassium modulate presynaptic excitability in the CA1 region of the hippocampus. *Neurophysiology.* 58: 404–416. 1987.
12. Jefferys, J. G., Haas, H. L. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature.* 300(5891): 448–450. 1982.
13. Sloviter R. Epileptic brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies. *Brain Res. Bull.* 10: 675–697. 1983.
14. Moshe S., Albala B. Perinatal hypoxia and subsequent development of seizures. *Physiol. Behav.* 35: 819–823. 1985.
15. Ting J.T., Daigle T.L., Chen Q. *Patch-Clamp Methods and Protocols.* 1183: 221–242. 2014.
16. Geiger J., Bischofberger J., Vida I., Frobe U., Pfützinger S., Weber H.J., Haverkamp K., Jonas P. Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology. *Pflugers Arch.* 443(3): 491–501. 2002.
17. Dreier J., Heinemann U. Regional and time dependent variations of low Mg<sup>2+</sup> induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp. Brain Res.* 87(3): 581–596. 1991.
18. von Bohlen und Halbach O., Albrecht D. Tracing of axonal connectivities in a combined slice preparation of rat brains – a study by rhodamine-dextran-amine-application in the lateral nucleus of the amygdala. *J. Neurosci. Methods* 81(1–2): 169–175. 1998.
19. Coulter D. and Lee C. Thalamocortical rhythm generation in vitro: Extra- and intracellular recordings in mouse thalamocortical slices perfused with low Mg<sup>2+</sup> medium. *Brain Res.* 631(1): 137–142. 1993.
20. Chang W., Lu H., Shyu B. Treatment with direct-current stimulation against cingulate seizure-like activity induced by 4-aminopyridine and bicuculline in an in vitro mouse model. *Exp. Neurol.* 265: 180–192. 2015.
21. Toprani S., Durand D. Fiber tract stimulation can reduce epileptiform activity in an in-vitro bilateral hippocampal slice preparation. *Exp. Neurol.* 240: 28–43. 2013.
22. Buzsáki G. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* 7(5): 446–451. 2004.
23. Martina M. *Patch-Clamp Methods and Protocols.* Totowa, NJ. Humana Press. 2014.
24. Amakhin D.V., Soboleva E.B., Ergina J.L., Malkin S.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. Seizure-Induced Potentiation of AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission in the Entorhinal Cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 12 (486). 2018.
25. Smirnova E.Y., Amakhin D.V., Malkin S.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. Acute Changes in Electrophysiological Properties of Cortical Regular-Spiking Cells Following Seizures in a Rat Lithium-Pilocarpine Model. *Neuroscience.* 379: 202–215. 2018.
26. Schurr A., Payne R.S., Heine M.F., Rigor B.M. Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in the hippocampal slice preparation. *J. Neurosci. Methods.* 59(1): 129–138. 1995.

27. Whittington M., Traub R. Interneuron Diversity series: Inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci.* 26(12): 676–682. 2003.
28. Freund T., Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6(4): 347–470. 1996.
29. Fukuda A., Czurkó A., Hida H., Muramatsu K., Lénárd L., Nishino H. Appearance of deteriorated neurons on regionally different time tables in rat brain thin slices maintained in physiological condition. *Neurosci. Lett.* 184(1): 13–16. 1995.
30. Zhang M., Ladas T.P., Qiu C., Shivacharan R.S., Gonzalez-Reyes L.E., Durand D.M. Propagation of Epileptiform Activity Can Be Independent of Synaptic Transmission, Gap Junctions, or Diffusion and Is Consistent with Electrical Field Transmission. *J. Neurosci.* 34. 2014.
31. Jackson J., Amilhon B., Goutagny R., Bott J.-B., Manseau F., Kortleven C., Bressler S., Williams S. Reversal of theta rhythm flow through intact hippocampal circuits. *Nat. Neurosci.* 17: 1362–1370. 2014.
32. de Curtis M., Paré D., Llinás R.R. The electrophysiology of the olfactory-hippocampal circuit in the isolated and perfused adult mammalian brain in vitro. *Hippocampus.* 1: 341–354. 1991.
33. de Curtis M., Biella G., Forti M., Panzica F. Multifocal spontaneous epileptic activity induced by restricted bicuculline ejection in the piriform cortex of the isolated guinea pig brain. *J. Neurophysiol.* 71(6): 2463–2476. 1994.
34. Librizzi L., Janigro D., de Biasi S., de Curtis M. Blood-brain barrier preservation in the in vitro isolated guinea pig brain preparation. *J. Neurosci. Res.* 66(2): 289–297. 2001.
35. Librizzi L., Noe F., Vezzani A., de Curtis M., Ravizza T. Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. *Ann. Neurol.* 72(1): 82–90. 2012.
36. Raimondo J., Heinemann U., de Curtis M., Goodkin H., Dulla C., Janigro D., Ikeda A., Lin C., Jiruska P., Galanopoulou A., Bernard C. Methodological standards for in vitro models of epilepsy and epileptic seizures. A TASK1-WG4 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE. *Epilepsia.* 58: 40–52. 2017.
37. Dyhrfeld-Johnsen J., Berdichevsky Y., Swiercz W., Sabolek H., Staley K.J. Interictal spikes precede ictal discharges in an organotypic hippocampal slice culture model of epileptogenesis. *J. Clin. Neurophysiol.* 27: 418–24. 2010.
38. de Simoni A., Yu L. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: Interface method. *Nat. Protoc.* 1: 1439–1445. 2006.
39. Wong M., Yamada K. Developmental characteristics of epileptiform activity in immature rat neocortex: A comparison of four in vitro seizure models. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 128(2): 113–120. 2001.
40. Schwartzkroin P.A., Baraban S.C., Hochman D.W. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. *Epilepsy Res.* 32(1–2): 275–285. 1998.
41. Dudek F.E., Obenaus A., Tasker J.G. Osmolality-induced changes in extracellular volume alter epileptiform bursts independent of chemical synapses in the rat: Importance of non-synaptic mechanisms in hippocampal epileptogenesis. *Neurosci. Lett.* 120: 267–270. 1990.
42. Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol. Rev.* 83: 1183–1221. 2003.
43. Taira T., Smirnov S., Voipio J., Kaila K. Intrinsic proton modulation of excitatory transmission in rat hippocampal slices. *Neuroreport.* 4 (93): 93–96. 1993.
44. Pasternack M., Smirnov S., Kaila K. Proton Modulation of Functionally Distinct GABAA Receptors in Acutely Isolated Pyramidal Neurons of Rat Hippocampus. *Neuropharmacology.* 35: 1279–1288. 1996.
45. Hodgkin A.L., Katz B. The effect of temperature on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 109: 240–249. 1949.
46. Hill M.W., Wong M., Amarakone A., Rothman S.M. Rapid Cooling Aborts Seizure-Like Activity in Rodent Hippocampal-Entorhinal Slices. *Epilepsia.* 41: 1241–1248. 2000.
47. Schuchmann S., Meierkord H., Stenkamp K., Breustedt J., Windmüller O., Heinemann U., Buchheim K. Synaptic and nonsynaptic ictogenesis occurs at different temperatures in submerged and interface rat brain slices. *J. Neurophysiol.* 87: 2929–2935. 2002.
48. Fisher R.S., Scharfman H.E., de Curtis M. How can we identify ictal and interictal abnormal activity? *Adv. Exp. Med. Biol.* 813: 3–23. 2014.
49. Borgstrom L., Chapman A.G., Siesjo B.K. Glucose consumption in the cerebral cortex of the rat during bicuculline-induced status epilepticus. *J. Neurochem.* 27: 971–973. 1976.
50. Schwartzkroin P., Prince D. Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. *Brain Res.* 147(1): 117–130. 1978.
51. Wong R., Traub R., Miles R. Cellular basis of neuronal synchrony in epilepsy. *Adv. Neurol.* 44: 583–592. 1986.
52. Williamson R., Wheal H. The contribution of AMPA and NMDA receptors to graded bursting activity in the hippocampal CA1 region in an acute in vitro model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 12(2): 179–188. 1992.
53. Traub R., Borck C., Colling S., Jefferys J. On the structure of ictal events in vitro. *Epilepsia.* 37(9): 879–891. 1996.

54. Khalilov I., Esclapez M., Medina I., Aggoun D., Lamsa K., Leinekugel X., Khazipov R., Ben-Ari Y. A novel in vitro preparation: The intact hippocampal formation. *Neuron*. 19: 743–749. 1997.
55. Karnup S., Stelzer A. Seizure-like activity in the disinhibited CA1 minislice of adult guinea-pigs. *J. Physiol.* 532(3): 713–730. 2001.
56. Meier C., Dudek F. Spontaneous and stimulation-induced synchronized burst afterdischarges in the isolated CA1 of kainate-treated rats. *J. Neurophysiol.* 76(4): 2231–2239. 1996.
57. Yao J.A., Tseng G.N. Modulation of 4-AP block of a mammalian A-type K channel clone by channel gating and membrane voltage. *Biophys. J.* 67(1): 130–142. 1994.
58. Choquet D., Korn H. Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 99(2): 217–240. 1992.
59. Buckle P.J., Haas H.L. Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J. Physiol.* 326: 109–122. 1982.
60. Galvan M., Grafe P., ten Bruggencate G. Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice. *Brain Res.* 241(1): 75–86. 1982.
61. Amakhin D.V., Ergina J.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. Synaptic conductances during interictal discharges in pyramidal neurons of rat entorhinal cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 10(233). 2016.
62. Gonzalez-Sulser A., Wang J., Motamedi G.K., Avoli M., Vicini S., Dzakpasu R. The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array. *Neuropharmacology*. 60(7–8): 1142–1153. 2011.
63. Avoli M., D'Antuono M., Louvel J., Kohling R., Biagini G., Pumain R., D'Arcangelo G., Tancredi V. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog. Neurobiol.* 68(3): 167–207. 2002.
64. Ben-Ari Y., Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: Two decades of progress. *Trends Neurosci.* 23(11): 580–587. 2000.
65. Huettner J. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 70(5): 387–407. 2003.
66. Шубина Л.В., Мальков А.Е., Кичигина В.Ф. Каиновая модель височной эпилепсии и ее применение для изучения роли эндоканнабиноидной системы в нейропротекции. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 105(6): 680–693. 2019. [Shubina L.V., Malkov A.E., Kichigina V.F. The Kainic Acid Model of Temporal Lobe Epilepsy and its Application for Studying the Role of the Endocannabinoid System in Neuroprotection. *Russ. J. Physiol.* 105(6): 680–693. 2019. (In Russ.)].
67. Westbrook G., Lothman E. Cellular and synaptic basis of kainic acid-induced hippocampal epileptiform activity. *Brain Res.* 273(1): 97–109. 1983.
68. Cossart R., Esclapez M., Hirsch J., Bernard C., Ben-Ari Y. GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat. Neurosci.* 1(6): 470–478. 1998.
69. Melyan Z., Wheal H., Lancaster B. Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron*. 34(1): 107–114. 2002.
70. Khalilov I., Holmes G., Ben-Ari Y. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat. Neurosci.* 6(10): 1079–1085. 2003.
71. Khalilov I., Dzhalal V., Medina I., Leinekugel X., Melyan Z., Lamsa K., Khazipov R., Ben-Ari Y. Maturation of kainate-induced epileptiform activities in interconnected intact neonatal limbic structures in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 11(10): 3468–3480. 1999.
72. Mody I., Lambert J., Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 57(3): 869–888. 1987.
73. Stanton P., Jones R., Mody I., Heinemann U. Epileptiform activity induced by lowering extracellular  $[Mg^{2+}]$  in combined hippocampal-entorhinal cortex slices: Modulation by receptors for norepinephrine and N-methyl-D-aspartate. *Epilepsy Res.* 1(1): 53–62. 1987.
74. Moser J., Kilb W., Werhahn K.J., Luhmann H.J. Early developmental alterations of low- $Mg^{2+}$ -induced epileptiform activity in the intact corticohippocampal formation of the newborn mouse in vitro. *Brain Res.* 1077(1): 170–177. 2006.
75. Jiang Q., Wang J., Wu X., Jiang Y. Alterations of NR2B and PSD-95 expression after early-life epileptiform discharges in developing neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25(3): 165–170. 2007.
76. Jensen M., Yaari Y. The relationship between interictal and ictal paroxysms in an in vitro model of focal hippocampal epilepsy. *Ann. Neurol.* 591–598. 1988.
77. Poolos N.P., Mauk M.D., Kocsis J.D. Activity-evoked increases in extracellular potassium modulate presynaptic excitability in the CA1 region of the hippocampus. *Neurophysiology*. 58: 404–416. 1987.
78. Huberfeld G., Blauwblomme T., Miles R. Hippocampus and epilepsy: Findings from human tissues. *Rev. Neurol.* 171(3): 236–251. 2015.
79. Смирнова Е.Ю., Ерофеев А.И., Власова О.Л., Чижов А.В., Зайцев А.В. Система биологической обратной связи для подавления эпилептической активности в оптогенетическом эксперименте. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. 104(6): 731–737. 2018. [Smirnova E.Y., Erofeev A.I., Vlasova O.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. A biological closed-loop system in optogenetic experiments for suppression of epileptic activity. *Russ. J. Physiol.* 104 (6): 731–737. 2018. (In Russ.)].

80. Yekhleif L., Breschi G., Lagostena L., Russo G., Taverna S. Selective activation of parvalbumin- or somatostatin-expressing interneurons triggers epileptic seizure like activity in mouse medial entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.* 113(5): 1616–1630. 2015.
81. Avoli M., de Curtis M. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog. Neurobiol.* 95: 104–132. 2011.
82. Dreier J., Heinemann U. Late low magnesium-induced epileptiform activity in rat entorhinal cortex slices becomes insensitive to the anticonvulsant valproic acid. *Neurosci. Lett.* 119(1): 68–70. 1990.
83. Jensen M., Yaari Y. Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *J. Neurophysiol.* 77(3): 1224–1233. 1997.
84. Bear J., Lothman E. An in vitro study of focal epileptogenesis in combined hippocampal-para-hippocampal slices. *Epilepsy Res.* 14(3): 183–193. 1993.
85. Barbarosie M., Avoli M. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J. Neurosci.* 17(23): 9308–9314. 1997.
86. Uva L., Librizzi L., Wendling F., de Curtis M. Propagation dynamics of epileptiform activity acutely induced by bicuculline in the hippocampal-para-hippocampal region of the isolated guinea pig brain. *Epilepsia.* 46(12): 1914–1925. 2005.

### ***In vitro* Models of Epileptic-Like Activity**

**J. L. Ergina<sup>a, \*</sup>, E. Y. Smirnova<sup>a, b</sup>**

<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*Ioffe Institute, St. Petersburg, Russia*

\**e-mail: for.mail.ergin@gmail.com*

**Abstract**—The modeling of acute seizures *in vitro* is one of the key methods for obtaining information about the mechanisms of generation, propagation, and termination of epileptiform activity. Acute pharmacological effects, the effect of electrical stimulation on brain tissue, changes in synaptic transmission during epileptiform discharges are studied using *in vitro* models. Using *in vitro* models simplifies the delivery of chemical agents and ensures the mechanical stability of electrophysiological recording due to the absence of artifacts associated with heartbeat and breathing. Also, the use of *in vitro* models means that the structures of the ventral surface of the brain that lies at the base of the skull become more accessible for electrophysiological studies. The review describes the main *in vitro* models of epileptic activity, discusses their strengths and limitations, and also the field of their application.

**Keywords:** acute seizures, epileptiform activity, *in vitro* models of epilepsy, acute brain slices, entorhinal cortex, hippocampus

### **ЦИТИРОВАТЬ:**

Ергина Ю.Л., Смирнова Е.Ю. *In vitro* модели эпилептиформной активности. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(8): 954–965.

DOI: 10.1134/S0869813919080041

### **TO CITE THIS ARTICLE:**

Ergina J.L., Smirnova E.Y. *In vitro* models of epileptic-like activity. *Russian Journal of Physiology.* 105(8): 954–965.

DOI: 10.1134/S0869813919080041