

Рикардо Миледи — выдающийся нейрофизиолог XX–XXI веков (1927–2017)

Пётр Дмитриевич Брежестовский*

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;
Институт системных нейронаук, Экс-Марсельский университет, г. Марсель, Франция

Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-531



Рикардо Миледи (16.09.1927–18.12.2017) — выдающийся нейрофизиолог и биофизик, внёсший огромный вклад в исследование функций синаптической передачи. Он доказал ключевую роль ионов кальция в выбросе нейромедиатора, разработал методы экспрессии рецепторов и встраивания мембранных фрагментов в крупные яйцеклетки, что открыло огромные возможности для тысяч исследователей в плане изучения тонких механизмов функционирования трансмембранных белков в норме и при патологии. Рикардо Миледи получил диплом врача в Национальном автономном университете Мексики и в 1954 г. защитил диссертацию в Национальном кардиологическом институте (Мехико) по исследованию электрической природы сердечных фибрилляций. С 1956 по 1958 гг. он стажировался в Институте медицинских исследований в Канберре (Австралия) в лаборатории, возглавляемой Джоном Экклсом (Нобелевская премия 1963 г.). В 1958 г. Р. Миледи был приглашён в Департамент биофизики Лондонского университетского колледжа, где в сотрудничестве с Бернардом Катцем (Нобелевская премия 1970 г.) сделал ряд важных от-

крытий по анализу экспрессии рецепторов ацетилхолина в денервированной мышце; выяснению роли кальция в выбросе нейромедиатора; анализу мембранных шумов, возникающих при аппликации нейромедиатора к нервно-мышечным синапсам; изучению действия антител от пациентов с болезнью *myasthenia gravis* на нервно-мышечную передачу. В начале 1980-х Рикардо Миледи внедряет способ функциональной экспрессии в яйцеклетках лягушки *Xenopus* рецепторов и ионных каналов из матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК). Его наследие крупнейшего масштаба по широте и глубине охвата представлено более чем в 500 статьях.

Ключевые слова: нейрофизиология, Р. Миледи, синаптическая передача, рецептор-управляемые ионные каналы, денервация, нервно-мышечный синапс.

Ricardo Miledi — an outstanding neurophysiologist of 20th–21st centuries (1927–2017)

P.D. Bregestovski

Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

Institut de Neurosciences des Systèmes, Aix-Marseille University, Marseille, France

Ricardo Miledi (16.09.1927–18.12.2017) is an outstanding neurophysiologist and biophysicist who made a great contribution to the study of synaptic transmission functions. He proved the key role of calcium ions in the release of neuromediators, developed methods of receptor expression and membrane fragments integration into large oocytes that provided huge possibilities for thousands of researchers to study subtle mechanisms of transmembrane proteins function in norm and pathology. Ricardo Miledi received his MD degree in the National Autonomous University of Mexico and in 1954 he defended his dissertation on the study of electrical nature of cardiac fibrillation in the National Institute of Cardiology (Mexico). In 1956–1958 he underwent training in Canberra Health Research Institute (Australia) in the laboratory headed by John Eccles (Nobel Prize 1963). In 1958 R. Miledi was invited to the Department of biophysics of University College London where in cooperation with Bernard Katz (Nobel Prize 1970) made a number of important discoveries in the analysis of acetylcholine receptor expression in denervated muscle; determination of the role of calcium in neuromediators release; analysis of membrane noise on neuromediator application to neuromuscular synapses; study of the effect of antibodies from patients with *myasthenia gravis* on neuromuscular transmission. In the early 1980s Ricardo Miledi implemented the method of functional expression in *Xenopus* frog oocytes of receptors and ion channels from messenger ribonucleic acid (mRNA). His heritage running the gamut is presented in more than 500 articles.

Keywords: neurophysiology, R. Miledi, synaptic transmission, receptor-operated ion channels, denervation, neuromuscular synapse.

Для многих нейрофизиологов мира конец 2017 г. опечалился уходом одного из величайших исследователей функций нервной системы и синаптической передачи — Рикардо Миледи. Его пионерские открытия внесли огромный вклад в понимание ключевых механизмов везикулярного выброса нейромедиаторов, оценки элементарных характеристик ионных каналов, синаптических и экстрасинаптических функций рецепторов при денервации и в процессе онтогенеза. Кроме того, он разработал методы экспрессии рецепторов и встраивания мембранных фрагментов в крупные яйцеклетки, что открыло огромные возможности для тысяч исследователей в плане изучения тонких механизмов функционирования трансмембранных белков в норме и при патологии.

Родился Рикардо Миледи в 1927 г. в городе Чихуава (Chihuahua), в северной части Мексики. После окончания школы он решил изучать медицину, однако денег на обучение не было. Тогда Рикардо со своим другом придумал оригинальный способ, как обеспечить оплату за высшее образование. Они решили учиться по очереди: один год Рикардо учится, а его друг зарабатывает деньги на оплату учёбы; на следующий год друг учится, а Рикардо, взяв академический отпуск, зарабатывает на обучение.

Первые два года план успешно претворялся в жизнь. Однако напряжённая учёба на медицинском факультете другу Рикардо не понравилась, и он отказался от дальнейших занятий. Миледи оказался в очень затруднительном положении, поскольку невозможно было учиться и одновременно работать.

Достоверных сведений о том, как молодой студент нашёл способ продолжать обучение, у меня нет. По одной из версий, помощь пришла от будущей жены, в то время его близкой подруги Мелы. Её отец был практикующим врачом с хорошим доходом. Мела уговорила отца оплачивать обучение. Благодаря этой поддержке Рикардо Миледи получил диплом врача в Национальном автономном университете Мексики (UNAM).

Однако, ещё будучи студентом, Рикардо Миледи понял, что его больше привлекает научно-исследовательская деятельность, чем работа врача. В результате он в 1952 г. присоединился к одной из наиболее активных в стране исследовательских групп в Национальном кардиологическом институте (Мехико). Темой диссертации, которую он

защитил в 1954 г., было исследование электрической природы сердечных фибрилляций. Основной экспериментальной моделью служило сердце черепахи. В этих исследованиях уже начал проявляться талант вдохновенного экспериментатора, умеющего создавать эффективно работающие, сложные экспериментальные модели.

В 1955 г., получив стипендию Альберта Грасса, Рикардо провёл лето на морской биологической станции в Вудз-Холе (США). Здесь он начал проводить исследования на гигантских синапсах кальмара и получил первые результаты, указывающие на тот факт, что ионы кальция играют важную роль в регуляции синаптической передачи.

Эти исследования были развиты при совместной работе с Бернардом Катцем, в департаменте которого Р. Миледи начал работать в 1958 г. В серии элегантных опытов на аксоне кальмара, проведённых при повторном посещении биостанций в Вудз-Холе (1964) и в ходе нескольких визитов на морскую зоологическую биостанцию в Неаполе (1965–1973), а также в опытах на нервно-мышечном препарате лягушки гипотеза о том, что кальций является триггером в выбросе квантов нейромедиатора, была убедительно доказана [1–3].

В 1956 г. Рикардо Миледи получил стипендию на 18-месячную стажировку в Институте медицинских исследований в Канберре (Австралия). Лабораторию возглавлял известный нейрофизиолог Джон Экклс (в 1963 г. он стал лауреатом Нобелевской премии вместе с Аланом Ходжкиным и Эндрю Хаксли).

Пребывание в Австралии началось с курьёзного случая, который говорит о степени дисциплины и напряжённой работы, которая велась в лаборатории Джона Экклса. Из Мехико в Канберру Рикардо летел с любимой женой Мелой и только что родившимся сыном Энрико. В Сингапуре у них была пересадка. Рикардо очень захотелось немного посмотреть этот самобытный город, и он перенёс на день вылет в Австралию. Когда же они после незабываемых впечатлений от Сингапура приземлились в Канберре, в аэропорту их ждало две машины.

«Какой шик», — подумал Рикардо. Однако его гордость сразу же охладил. Встречающий сказал: «Поскольку вы опоздали на день, ваша жена с сыном поедут на квартиру, а доктор Миледи — в лабораторию ставить опыт. Препарат для эксперимента уже приготовлен». Вот так, с первого

дня Рикардо начал напряжённую экспериментальную работу в новой лаборатории. Первое время Джон Эклс практически не обращал внимания на молодого мексиканца. Но когда Рикардо сделал очень сложную препаративку, которую не удавалось сделать никому в лаборатории, Эклс принял его в свою команду.

Особо тесное сотрудничество у Рикардо возникло с нейрофизиологом сербского происхождения К. Крневичем (Krnjević K.), в будущем — одним из открывателей основных возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в мозге млекопитающих. Результатом этого сотрудничества стало 8 работ, касающихся различных аспектов модуляции нервно-мышечной передачи.

В 1958 г., возвращаясь из Канберры в Мексику, Рикардо ненадолго остановился в Лондоне и встретился с Бернардом Катцем, руководителем Департамента биофизики Лондонского университетского колледжа. Эта встреча положила начало чрезвычайно плодотворному периоду научно-исследовательской работы обоих учёных.

Возвращение в Мексику было кратковременным. Поняв бесперспективность организации научных исследований в родной стране, столкнувшись с бытовыми трудностями, Рикардо написал об этом Катцу, который мгновенно откликнулся и пригласил его к себе на работу. Рикардо написал, что очень хочет приехать, но у него нет денег на билеты. В ответ он получил письмо со следующими условиями: «Если контракт будет подписан на один год, нужно будет полностью вернуть деньги за проезд; если на два года — вернуть за проезд в одну сторону; если на три года — университет полностью оплачивает перелёт всей семьи». Миледи подписал контракт на три года, которые вылились более чем в четверть века плодотворной работы в Лондонском университете колледже.

Появление энергичного и неуёмного Рикардо Миледи привело к усилению темпов экспериментальных исследований в департаменте. Режим работы Рикардо был далеко не под силу каждому. Два дня в неделю он ставил опыты с Б. Катцем, четыре — с другими приезжающими исследователями, а утро в воскресенье проводил за чтением литературы и дополнительным анализом результатов. Вторую половину воскресенья он отдыхал. Этот режим оставался неизменным на протяжении десятилетий. Я впервые встретил Рикардо в 1978 г., когда получил

разрешение на стажировку в этом департаменте. В этом году Б. Катц в 68-летнем возрасте передал бразды правления департаментом Рикардо Миледи. Они поменялись кабинетами, но в остальном, режим работы не изменился. Два дня в неделю они ставили опыты, потом Б. Катц анализировал результаты, читал лекции, ездил на конференции и симпозиумы, а Рикардо экспериментировал с другими, анализировал результаты, писал статьи.

В Лондоне Миледи работал над несколькими проектами, где основной экспериментальной моделью был нервно-мышечный препарат лягушки. В эти годы проводились исследования по:

- 1) анализу экспрессии рецепторов ацетилхолина в денервированной мышце;
- 2) выяснению роли кальция в выбросе нейромедиатора;
- 3) анализу мембранных шумов, возникающих при аппликации нейромедиатора к нервно-мышечным синапсам;
- 4) изучению действия антител, взятых от пациентов с болезнью *myasthenia gravis*, на нервно-мышечную передачу.

Каждое направление исследований представляло собой ключевые вехи в расширении наших знаний о физиологии синапса.

Исследуя феномен денервации, Р. Миледи обнаружил, что примерно через 10 недель после перерезки нерва вся мышца (длиной около 30 мм) становилась чувствительной к ацетилхолину, в то время как в нормальных, иннервируемых мышечных волокнах чувствительность к ацетилхолину была только в пределах 1 мм от окончания нерва [4, 5]. Это явление, *денервационная сверхчувствительность*, было впервые открыто советскими учёными из Ленинграда, Гинецинским и Шамариной, и опубликовано в русском журнале [6], а затем, как минимум дважды, «переоткрыто» [4, 7]. Миледи, естественно, не знал о пионерской работе, написанной на русском языке, но после того, как ему об этом сообщили, он всегда отмечал приоритет открытия русскими учёными.

Исследования Миледи в этом направлении поразительно точны количественно и глубоки идеологически. Миледи составил карту распределения чувствительности к ацетилхолину в мышечном волокне после 2 мес денервации. Он обнаружил, что свойства рецепторов ацетилхолина в норме и после денервации значительно различаются [8], предположив существование разных типов ацетилхолиновых рецепторов

в нормальной и эмбриональной/денервированной ткани. Таким образом, он предвосхитил открытия по экспрессии в процессе развития разных субъединиц ацетилхолиновых рецепторов в нормальной и эмбриональной тканях с различающимися свойствами одиночных каналов [9].

В ранних работах по анализу денервации Миледи впервые описал явление увеличения мембранного шума при действии нейромедиатора, отмечая, что в денервированном препарате вызванный ацетилхолином шум намного выше, чем в норме, предполагая, что рецепторы в денервированной мышце могут открывать каналы на более длительное время [5]. Эти наблюдения дали начало серии пионерских исследований по оценке элементарных параметров ацетилхолин-управляемых каналов. В конце 1960-х — начале 1970-х годов исследователи ещё не знали, на какое время способны открываться каналы и какова их элементарная проводимость. Строились различные гипотезы, предлагались косвенные методы оценки до тех пор, пока Катц и Миледи не предложили способ этой оценки на основании измерения мембранных шумов [10].

Следует отметить, что в 1971 г. мы послали Б. Катцу (в то время уже Нобелевскому лауреату) рукопись статьи, в которой анализировали синаптические ответы нервно-мышечного препарата при разных температурах и косвенно показывали, что время открытого состояния ацетилхолин-управляемых каналов изменяется в зависимости от температуры и может быть разным при действии разных агонистов. Эту работу Катц послал в журнал *Nature* [11], а нам прислал похвальное письмо, отмечая, что они сейчас анализируют мембранные шумы и получили результаты, согласующиеся с нашими предсказаниями. Действительно, эти свойства ацетилхолин-активируемых каналов Катц и Миледи экспериментально подтвердили методом мембранных шумов [12]. Через три года Э. Неер и Б. Сакман получили прямые доказательства этих предсказаний в опытах с измерением токов одиночных каналов [13].

После публикации нашей работы профессор Б. Катц присылал мне каждый год (с 1973 по 1977 гг.) приглашения пройти стажировку в его департаменте. В конечном итоге Академия наук дала разрешение на этот визит, и в 1978 г. я провёл 12 мес в Департаменте биофизики.

Это был чрезвычайно важный период. Основной проект касался доказательства

кальциевой проницаемости ацетилхолин-управляемых каналов в нервно-мышечном препарате лягушки. Методом мембранных шумов были определены элементарные характеристики (время открытого состояния и проводимость) каналов в условиях, когда проводящим ионом служит только кальций [14].

В дополнение к экспериментальной работе с Рикардо Миледи и Ином Паркером (I. Parker), научным обсуждениям с Б. Катцем (B. Katz), Э. Хаксли (A. Huxley) и другими выдающимися учёными Университетского колледжа я познакомился с Ф. Ашером (P. Ascher), Ж. Кихо (J.-S. Kehoe), Ж. Стиннакром (J. Stinnakre), Ф. Эусеби (F. Eusebi), С. Алема (S. Alema), А. Винцент (A. Vincent), С. Кулл-Канди (S. Cull-Candy), П. Фетт (P. Fatt), Т. Такахаша (T. Takahashi), Э. Неером (E. Neher) и другими талантливыми нейробиологами и биофизиками из разных стран. Этот период обогатил меня бесценным опытом и знаниями о том, как ставить научные задачи и решать их экспериментально.

Работы Катца и Миледи по анализу мембранных шумов трудно переоценить. Элегантный экспериментальный и теоретический анализ создал базу для оценки элементарных характеристик рецептор-управляемых каналов — времени открытого состояния и элементарной проводимости [10, 12]. Эти исследования положили начало интенсивному анализу элементарных свойств ионных каналов, созданию метода пэтч-кламп регистрации и прямой регистрации агонист-активируемых ионных каналов [13], за что Неер и Сакман были удостоены Нобелевской премии в 1991 г.

В сотрудничестве с талантливым врачом-неврологом из Лондона, Анжелой Винцент, в 1970-х годах были начаты также исследования по изучению действия антител, взятых от пациентов с болезнью *myasthenia gravis*, на нервно-мышечную передачу [15–17], заложившие основу для выяснения механизмов развития и затем лечения этого аутоиммунного заболевания.

Следует отметить также другое важное открытие Катца и Миледи — так называемый Н-ответ [18]. Было обнаружено, что локальная ионофоретическая аппликация кураре (антагониста рецепторов ацетилхолина) приводит к гиперполяризации мышечного волокна (Н-hyperpolarisation ответ) на несколько десятков микровольт. Тщательный анализ этого явления

позволил высказать гипотезу, что в дополнение к квантовому, кальций-зависимому выбросу, ацетилхолин способен спонтанно вытекать из пресинаптического окончания. Это открытие дало возможность объяснить противоречие между общим количеством ацетилхолина, выделяемого покоящейся мышцей, и количеством, выбрасываемым квантами нейромедиатора (не более 2%). Открытие также породило целое направление экспериментальных исследований, особенно интенсивно развиваемое Казанской школой синаптологов [19, 20].

В начале 1980-х Рикардо Миледи делает очередной прорыв в экспериментальных исследованиях: он внедряет способ функциональной экспрессии в яйцеклетках лягушки *Xenopus laevis* рецепторов и ионных каналов из матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), кодирующей эти белки [21, 22]. Крупные яйцеклетки лягушки — удобная система для экспрессии генов в молекулярной биологии. Использование яйцеклеток для инъекции разных мРНК с целью исследования экспрессируемых белков предложили Джон Гурдон и соавт. в 1971 г. [23]. Однако широкое признание эта идея получила после серии блестящих работ Миледи и соавт., которые показали возможность исследования свойств потенциал-управляемых натриевых, калиевых и кальциевых каналов, а также каналов, управляемых такими нейромедиаторами, как глутамат, γ -аминомасляная кислота, глицин, ацетилхолин, серотонин [24].

Эти методы экспрессии произвели «взрыв» в исследованиях, особенно в области фармакологии. В настоящее время их используют в сотнях лабораторий, и многие молодые исследователи даже не подозревают, что методологию разработали Рикардо Миледи и соавт. в начале 1980-х годов.

В дальнейшем, уже переехав в США, Миледи разработал способ «трансплантации» мембранных фрагментов из нервной ткани в яйцеклетки лягушки. Этот подход оказался перспективным для исследования рецепторов из послеоперационной нервной ткани человека. Таким образом, появилась возможность исследовать свойства рецепторов больных эпилепсией [25, 26], аутизмом [27] и другими нарушениями нервной системы [28, 29].

Наследие Рикардо Миледи огромнейшего и трудно вообразимого масштаба по широте и глубине охвата представлено более чем в 500 статьях, большинство из которых

опубликованы в ведущих научных журналах. Мне он представляется личностью, идущей по полю, в глубинах которого запрятаны «золотые слитки неизведанного». Подавляющее большинство проходит, не замечая их. Некоторые натываются на один и уже не сходят с этого места всю оставшуюся научную жизнь. Рикардо удивительным образом видел эти глубоко запрятанные «слитки неизведанного», исследовал их и двигался дальше, влекомый детским любопытством, энтузиазмом и неукротимой энергией, которые не покидали его до последних дней.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Katz B., Miledi R. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1965; 161: 496–503. DOI: 10.1098/rspb.1965.0017.
2. Katz B., Miledi R. Input–output relation of a single synapse. *Nature.* 1966; 212: 1242–1245. DOI: 10.1038/2121242a0.
3. Miledi R., Slater C.R. The action of calcium on neuronal synapses in the squid. *J. Physiol.* 1966; 184: 473–498. DOI: 10.1113/jphysiol.1966.sp007927.
4. Miledi R. Acetylcholine sensitivity of partially denervated frog muscle fibres. *J. Physiol.* 1959; 147: 45–46.
5. Miledi R. The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibres after complete or partial denervation. *J. Physiol.* 1960; 151: 1–23. PMID: 14422356.
6. Гинетинский А.Г., Шамарина Н.М. Тонотормный феномен в денервированной мышце. *Успехи соврем. биол.* 1942; 15: 283–294. [Ginetzinskiy A.G., Shamarina N.M. The tonomotor phenomenon in denervated muscle. *Uspekhii sovremennoy biologii.* 1942; 15: 283–294. (In Russ.)]
7. Kuffler S.W. Specific excitability of the end-plate region in normal and denervated muscle. *J. Neurophysiol.* 1943; 6: 99–110. DOI: 10.1152/jn.1943.6.2.99.
8. Miledi R. Junctional and extrajunctional acetylcholine receptors in skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 1960; 151: 24–30. PMID: 14422355.
9. Mishina M., Takai T., Imoto K. et al. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature.* 1986; 321: 406–411. DOI: 10.1038/321406a0.
10. Katz B., Miledi R. The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J. Physiol.* 1972; 224: 665–699. DOI: 10.1113/jphysiol.1972.sp009918.
11. Bregestovski P.D., Chailachjan L.M., Dunin-Barkovski V.L. et al. Effect of temperature on the equilibrium endplate potential. *Nature.* 1972; 236: 453–454. DOI: 10.1038/236453a0.
12. Katz B., Miledi R. The characteristics of ‘end-plate noise’ produced by different depolarizing drugs. *J. Physiol.* 1973; 230: 707–717. DOI: 10.1113/jphysiol.1973.sp010213.
13. Neher E., Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog

- muscle fibres. *Nature*. 1976; 260: 799–802. DOI: 10.1038/260799a0.
14. Bregestovski P.D., Miledi R., Parker I. Calcium conductance of acetylcholine-induced endplate channels. *Nature*. 1979; 279: 638–639. DOI: 10.1038/279638a0.
15. Ito Y., Miledi R., Vincent A. Transmitter release induced by a 'factor' in rabbit serum. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1974; 187: 235–241. DOI: 10.1098/rspb.1974.0072.
16. Green D.P., Miledi R., Vincent A. Neuro-muscular transmission after immunization against acetylcholine receptors. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1975; 189: 57–68. DOI: 10.1098/rspb.1975.0041.
17. Molenaar P.C., Polak R.L., Miledi R. et al. Acetylcholine in intercostal muscle from myasthenia gravis patients and in rat diaphragm after blockade of acetylcholine receptors. *Progr. Brain Res.* 1979; 49: 449–458. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)64657-9.
18. Katz B., Miledi R. Transmitter leakage from motor nerve endings. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1977; 196: 59–72. DOI: 10.1098/rspb.1977.0029.
19. Nikolsky E.E., Voronin V.A., Vyskocil F. Kinetic differences in the effect of calcium on quantal and non-quantal acetylcholine release at the murine diaphragm. *Neurosci. Lett.* 1991; 123: 192–194. DOI: 10.1016/0304-3940(91)90928-M.
20. Nikolsky E.E., Oranska T.I., Vyskocil F. Non-quantal acetylcholine release after cholinesterase inhibition *in vivo*. *Physiol. Res.* 1992; 41: 333–334. PMID: 1286102.
21. Barnard E.A., Miledi R., Sumikawa K. Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1982; 215: 241–246. DOI: 10.1098/rspb.1982.0040.
22. Miledi R., Parker I., Sumikawa K. Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1982; 216: 509–515. DOI: 10.1098/rspb.1982.0089.
23. Gurdon J.B., Lane C.D., Woodland H.R., Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*. 1971; 233: 177–182. DOI: 10.1038/233177a0.
24. Sumikawa K., Parker I., Miledi R. Partial purification and functional expression of brain mRNAs coding for neurotransmitter receptors and voltage-operated channels. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984; 81: 7994–7998. DOI: 10.1073/pnas.81.24.7994.
25. Ragozzino D., Palma E., Di Angelantonio S. et al. Rundown of GABA type A receptors is a dysfunction associated with human drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 15219–15223. DOI: 10.1073/pnas.0507339102.
26. Palma E., Ragozzino D., Angelantonio S.D. et al. The antiepileptic drug levetiracetam stabilizes the human epileptic GABAA receptors upon repetitive activation. *Epilepsia.* 2007; 48 (10): 1842–1849. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2007.01131.x.
27. Limon A., Reyes-Ruiz J.M., Miledi R. Microtransplantation of neurotransmitter receptors from postmortem autistic brains to *Xenopus* oocytes. *Proc. National Acad. Sci.* 2008; 105 (31): 10 973–10 977. DOI: 10.1073/pnas.0804386105.
28. Miledi R., Palma E., Eusebi F. Microtransplantation of neurotransmitter receptors from cells to *Xenopus* oocyte membranes: new procedure for ion channel studies. *Methods Mol. Biol.* 2006; 322: 347–355. DOI: 10.1007/978-1-59745-000-3_24.
29. Eusebi F., Palma E., Amici M., Miledi R. Microtransplantation of ligand-gated receptor-channels from fresh or frozen nervous tissue into *Xenopus* oocytes: a potent tool for expanding functional information. *Progress in Neurobiol.* 2009; 88 (1): 32–40. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.01.008.