

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ ИМ. И.М. СЕЧЕНОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

КУЛИКОВ АЛЕКСЕЙ АНДРЕЕВИЧ

**СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ГИППОКАМПА И НИЖНИХ БУГРОВ
ЧЕТВЕРОХОЛМИЯ ПРИ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗЕ У КРЫС ЛИНИИ
КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ**

1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской Академии Наук

Научный руководитель: **Черниговская Елена Валерьевна**
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии клеточных функций

Официальные оппоненты: **Карпенко Марина Николаевна**
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Физиологический отдел им. И. П. Павлова, заведующая лабораторией нейробиологии
Ещенко Наталья Дмитриевна
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор кафедры биохимии Биологического факультета

Ведущее научное учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита состоится «03» октября 2023 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.152.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова» по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Гореза, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова и на сайте <https://www.iephb.ru/nauka/dissertacionnyj-sovet/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологический наук

Р.Г. Парнова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Эпилепсия является одним из самых распространенных неврологических заболеваний. Наиболее распространенным типом эпилепсии является височная эпилепсия, для которой характерно несколько основных эпилептогенных структур: амигдала, гиппокамп и энторинальная кора (Bertram, 2009). Другой, менее распространенный тип эпилепсии - рефлекторная эпилепсия, характеризуется эпилептическими припадками, которые провоцируются различными стимулами. В зависимости от характера стимуляции происходит активация определенных триггерных структур: нижние бугры четверохолмия (НБЧ), гиппокамп, зрительная кора и других областей мозга (Okudan and Özkara, 2018; Wolf, 2017). Известно, что при эпилепсии происходят нарушение нейротрансмиссии, перестройки в нейрональных сетях и структурные повреждения в мозге (Glass and Dragunow, 1995; Henshall and Meldrum, 2012).

При исследовании эпилепсии у людей практически невозможно отследить ранние признаки и развитие структурных aberrаций. Поэтому для изучения патогенеза эпилепсии используется целый ряд экспериментальных моделей. Одной из экспериментальных моделей изучения механизмов формирования рефлекторной эпилепсии являются аудиогенно-чувствительные грызуны, в частности крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ), отвечающие развернутым клонико-тоническим припадком на звуковую стимуляцию (Poletaeva et al., 2017; Semiokhina et al., 2006). Судорожная готовность у крыс КМ развивается в течение первых трех месяцев жизни в ходе постнатального онтогенеза (Poletaeva et al., 2017). Первые проявления эпилептиформной активности у людей, страдающих рефлекторной эпилепсией, также часто возникают в пубертатном периоде. В связи с этим грызуны, генетически предрасположенные к рефлекторной эпилепсии, являются адекватной моделью для исследования механизмов нарушения структуры мозга как причины возникновения эпилепсии и определения функционального значения этих нарушений для эпилептогенеза. Первые аудиогенные стимулы вызывают у крыс КМ рефлекторные судороги, сходные по механизму их инициации с характерными для рефлекторной эпилепсии человека. Судорожная активность при предъявлении звукового сигнала возникает в стволовых отделах мозга (Faingold, 1999; Faingold, 2004). Хотя нижние бугры четверохолмия являются критической структурой, осуществляющей инициацию и распространение аудиогенного судорожного припадка (АСП) крайне мало известно об особенностях их развития в онтогенезе и о нарушениях их структуры при сформированной рефлекторной эпилепсии.

Гиппокамп первоначально не участвует в реализации аудиогенных судорог, но играет важную роль в дальнейшем распространении судорожной активности (Vinogradova, 2017). Однако ранее были выявлены нарушения в механизмах регуляции глутаматергических нейронов гиппокампа у наивных крыс КМ (Chernigovskaya et al., 2019), что позволило нам предположить существование нарушений структуры гиппокампа крыс линии КМ в ходе онтогенеза, вносящих вклад в развитие рефлекторной эпилепсии.

В настоящее время исследования в основном направлены на изучение патогенеза эпилепсии и связанных с этой болезнью структурных нарушений гиппокампа. Патологоанатомические исследования у людей больных эпилепсией показали наличие aberrантного нейрогенеза и нейродегенеративных повреждений, таких как склероз гиппокампа и спрутинг мшистых волокон (МВ). Аналогичные нарушения были выявлены в экспериментальных моделях эпилепсии, в которых использовали хемоконвульсанты или электрическую стимуляцию мозга. Однако при использовании этих моделей развития эпилептических состояний могут происходить нарушения в активности мозга, вызванные введением химических агентов, что не позволяет экстраполировать полученные результаты на пациентов. Аудиогенно-чувствительные крысы, подвергнутые многократным аудиогенным припадкам, демонстрируют возникновение новой фазы судорожного припадка (миоклонуса/пост-клонуса). При этом изменения электрофизиологических показателей коры (Vinogradova, 2017), гиппокампа и амигдалы (Hirsch et al., 1997) свидетельствуют о вовлечении

Список сокращений: DCX – даблкортин (doublecortin); DMSO – диметилсульфоксид; SGZ- субгранулярный слой зубчатой извилины; АСП – аудиогенный судорожный припадок; ГК – гранулярные клетки; нГК – нормотопические гранулярные клетки; эГК – ectopические гранулярные клетки; КМ – крысы линии Крушинского-Молодкиной; МВ – мшистые волокна; НБЧ– нижнее бугры четверохолмия двухолмие; НСК - нейрональные стволовые клетки

лимбической системы мозга и коры (Garcia-Cairasco et al., 2017) в реализацию эпилептиформной активности. Таким образом, крысы линии КМ, подвергнутые многократным аудиогенным стимуляциям, у которых проявились посттонические судороги, демонстрируют генерализацию эпилептиформной активности и могут служить адекватной моделью височной эпилепсии человека (Dutra Moraes et al., 2000). Однако данных о механизмах нарушений структуры гиппокампа при моделировании височной эпилепсии, полученных на животных с генетически обусловленной аудиогенной судорожной активностью, практически нет. Использование модели аудиогенного киндлинга различной продолжительности позволяет изучать этапы моделирования височной эпилепсии и механизмы структурной реорганизации гиппокампа и нижних бугров четверохолмия в ходе эпилептогенеза.

Цель: исследование морфофункциональных особенностей развития дорсального гиппокампа и нижних бугров четверохолмия в ходе формирования рефлекторной эпилепсии и патологических процессов, происходящих в этих структурах в результате моделирования височной эпилепсии.

Задачи:

- исследование механизмов нарушений развития структуры гиппокампа и нижних бугров четверохолмия в ходе формирования рефлекторной эпилепсии в постнатальном онтогенезе
- исследование нейрогенеза и реорганизации нейрональных связей гиппокампа и нижних бугров четверохолмия при моделировании височной эпилепсии
- исследование путей и механизмов нейродегенерации в гиппокампе при моделировании височной эпилепсии
- исследование возможности использования блокатора белка р53 пифитрин- α для коррекции нарушений структуры гиппокампа при эпилепсии.

Научная новизна. Впервые было проведено сравнение развития нижних бугров четверохолмия и гиппокампа крыс линии КМ и Вистар в ходе постнатального онтогенеза. У крыс с повышенной судорожной готовностью показана задержка развития нижних бугров четверохолмия и гиппокампа, о чем свидетельствует повышенная пролиферация клеток и высокий уровень апоптоза при меньшем числе нейронов. В гиппокампе крыс линии КМ также показана задержка формирования гиппокампа в процессе развития рефлекторной эпилепсии, и выявленные нарушения сопровождаются активацией ERK1/2 киназ. Впервые у молодых и зрелых наивных крыс линии КМ выявлена генетически детерминированная повышенная аберрантная миграция вновь образованных клеток, дифференцированных по глутаматергическому типу, в хилус, что может являться одной из причин повышенной судорожной готовности. С помощью аудиогенного киндлинга у крыс линии КМ была смоделирована височная эпилепсия. Впервые было продемонстрировано, что повторяющиеся аудиогенные судороги приводят к появлению пролиферирующих клеток в нижних буграх четверохолмия, которые не являются нейрогенной областью. Впервые было показано, что аудиогенный киндлинг дополнительно стимулирует аберрантный нейрогенез и приводит к разрастанию МВ и увеличению плотности синаптических контактов, обусловленных увеличением содержания синаптоподина в гиппокампе. На ранней стадии развития височной эпилепсии происходит апоптотическая гибель нейронов, активируемая р53-зависимым и митохондриальным путями, а также после периода покоя наблюдается активация аутофагии. На поздних стадиях формирования эпилепсии показана значительная гибель нейронов, и она является устойчивой и не компенсируется повышенным аберрантным нейрогенезом. У крыс линии КМ наиболее уязвимыми к аудиогенным судорогам нейронами являются мшистые клетки хилуса. Впервые была продемонстрирована возможность использования ингибитора белка р53 пифитрин- α для подавления дифференцировки вновь образованных клеток по глутаматергическому типу.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные новые данные расширяют представление о механизмах, лежащих в основе формирования эпилептиформных состояний. В работе было показано, что двумя основными механизмами структурной реорганизации при эпилепсии являются аберрантный нейрогенез и нейродегенерация. Была продемонстрирована возможность использования ингибитора белка р53 пифитрин- α как потенциального терапевтического агента для коррекции нарушений структуры гиппокампа при эпилепсии. Выявленные в ходе исследования механизмы позволят найти новые подходы в лечении рефлекторной и височной

эпилепсии у людей. Полученные в работе данные могут найти приложение в неврологии и эпилептологии. Результаты исследований могут быть использованы при подготовке курсов и материалов лекций для студентов и аспирантов биомедицинских направлений.

Положения, выносимые на защиту.

1. У крыс линии КМ в ходе формирования рефлекторной эпилепсии наблюдается задержка развития нижних бугров четверохолмия и дорсального гиппокампа по сравнению с крысами линии Вистар.
2. У крыс линии КМ на протяжении онтогенетического развития наблюдается аберрантная миграция дифференцированных гранулярных клеток в хилус.
3. Аудиогенный киндлинг дополнительно стимулирует аберрантный нейрогенез и приводит к перестройкам нейрональной сети гиппокампа.
4. В ходе формирования посттонических судорог как модели височной эпилепсии наблюдается устойчивая нейродегенерация гиппокампа.
5. Пифитрин- α можно использовать как потенциальный терапевтический агент для коррекции нарушений при эпилепсии.

Апробация работы. Результаты исследования представлены в виде устных и стендовых докладов на XII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017); V Всероссийской конференции с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пушино, 2018); II ассамблее для молодых нейробиологов BraYn-2019 (Милан, 2019); I онлайн-конференции и школе с международным участием “Эпилепсия: от фундаментальной науки к практике” (Онлайн конференция, 2020); XVI Всероссийском совещании с международным участием и IX школе по эволюционной физиологии, посвященной памяти академика Л.А. Орбели (Санкт-Петербург, 2020); XXV научной школе-конференции молодых ученых по физиологии и высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Онлайн конференция, 2021); I виртуальной конференции Европейского Нейрохимического Общества “Future perspectives for european neurochemistry – a young scientist’s conference” (Онлайн конференция, 2021); III Объединенном Научном Форуме Физиологов, Биохимиков и Молекулярных Биологов (Сочи, 2022); Всероссийской с международным участием конференции Российского нейрохимического общества Rusneurochem 2022 (Санкт-Петербург, 2022).

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 16-04-00681, №19-015-00070); субсидии Комитета по науке и высшей школе г. Санкт–Петербурга (диплом ПСП №21813).

Личный вклад автора. Все экспериментальные результаты, приведенные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку полученных данных, осуществлял их анализ и обобщение, принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 25 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных журналах, остальные – тезисы и другие печатные материалы. Всего за время работы было опубликовано 7 статей.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах и состоит из списка сокращений, введения, главы № 1 - обзор литературы, главы № 2 - материалов и методов, главы № 3 - результатов исследования, главы № 4 - обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 257 источников. Работа проиллюстрирована 63 рисунками и 3 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Для исследования реорганизации гиппокампа и нижних бугров четверохолмия (НБЧ) в ходе развития аудиогенной эпилепсии и в ходе формирования аудиогенного киндлинга были проведены две серии экспериментов. Все процедуры с использованием животных были одобрены этической комиссией ИЭФБ РАН.

Первая серия экспериментов. У крыс линии КМ судорожная готовность формируется в процессе онтогенеза, полноценный припадок проявляется только к 3 месяцам (90 дней), до этого

времени крысы или не способны на аудиогенный припадок (15 дней), или припадок бывает неполноценным (30 – 60 дней). В данной серии экспериментов использовались крысы линии КМ на разных стадиях постнатального онтогенеза (P15, P30, P60, P120). Крысы Вистар соответствующих возрастов были использованы в качестве контроля, так как линия Вистар является материнской для крыс линии КМ.

Вторая серия экспериментов. Во второй серии экспериментов животные линии КМ подвергались аудиогенному киндлингу, который является моделью височной эпилепсии. Многократные судорожные припадки приводят к возникновению эпилептиформной активности в гиппокампе и участках новой коры и к возникновению новой стадии аудиогенного припадка – посттонического клонуса.

Животным раз в день подавали звуковой сигнал с частотой 9 кГц и громкостью 50 дБ, что приводило к возникновению эпилептических припадков у крыс линии КМ. Если у крыс в течение 1 минуты после начала звукового сигнала не развивался припадок, животное не использовалось в эксперименте. Были проанализированы следующие стадии моделирования височной эпилепсии: 4-дневная экспозиция, 7-дневная экспозиция, 14-дневная экспозиция и 21-дневная экспозиция. В экспериментальных группах было 8 или 10 животных. По окончании всех экспериментов животных декапитировали.

Также было исследовано влияние введения пифитрина- α на реорганизацию гиппокампа при АСП.

1-я и 3-я группа – группа контроля, крысы получали инъекции DMSO за 1 ч до каждого предъявления звука.

2-я и 4-я группа – крысы получали инъекции пифитрин- α (pifithrin- α hydrobromide (R&D Systems #1267)), растворенного в DMSO (2 мг/кг массы тела) за 1 ч до каждого предъявления звука.

Все животные дважды получали инъекции BrdU i.p. (BrdU, Sigma) (100 мг/кг) в последние 2 дня перед декапитацией.

Далее во всех экспериментах после декапитации мозг разделяли на две половины. Из одной половины иссекали дорсальный гиппокамп, который использовали для приготовления проб для Вестерн-блоттинга. Вторая половина мозга была фиксирована в 4%-ном параформальдегиде, разведенном в PBS для последующего иммуногистохимического анализа.

2.2 Поведенческий анализ АСП.

Во время аудиогенного киндлинга проводилась съемка АСП для последующего анализа. Была проанализирована длительность стадий припадка: латентный период, дикий бег, клоническая фаза, тоническая фаза, посттоническая фаза. Модифицированная шкала Racine (табл. 1) была использована для оценки тяжести посттонических судорог. Развитие киндлинга считалось успешным, если у животных в течение 3-х дней наблюдались полноценные припадки, включающие посттонические судороги (тяжесть припадков должна быть 4 или более по модифицированной шкале) и одного тяжелого припадка (5 - 6 по модифицированной шкале).

Таб.1. Шкала Racine модифицированная и оригинальная

Модифицированная		Оригинальная	
Стадия судорог	Поведение (фенотип припадка)	Стадия судорог	Поведение (фенотип припадка)
0	Нет изменений в АСП	0	Нет моторных судорог
1	Движение головы и рта, односторонний или неполный клонус задних конечностей	1	Движение головы и рта
2	Клонус задних конечностей	2	Кивки головой
3	Кивки головой и клонус задних конечностей	3	Односторонний или неполный клонус передних конечностей
4	Кивки головой и клонус всех конечностей	4	Клонус передних конечностей, животное стоит на задних лапах
5	Поведение как в 4-й стадии + прыжки и падения	5	Клонико-тонический припадок, дикий бег

6	Поведение как в 4-й стадии + прыжки и дикий бег		
---	---	--	--

Обработка материала

Для гистологического анализа животные были наркотизированы смесью Золетил/Ксилазина (Zoletil/Xylazine Virbac, Франция). Крысы были перфузированы охлажденным 0.01M фосфатно-солевым буфером (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) и 5%-ным раствором формалина, после чего животные были декапитированы. Мозг извлекали из черепной коробки и постфиксировали в 4%-ном растворе формалина при +4°C в течение 5 дней, в дальнейшем мозг помещали в 20% -ный раствор сахарозы на PBS при +4°C в течение 3 дней. Замораживание ткани проводили путем погружения в охлажденный до температуры -45°C изопентан. Материал хранили при температуре -80°C. Изготовление чередующихся серий фронтальных срезов толщиной 10 мкм происходило на криостате фирмы Leica при температуре -20°C.

Во всех экспериментах взятие материала, приготовление проб и проведение анализа осуществлялись аналогичным образом.

Иммуногистохимический метод

Для оценки содержания и локализации интересующих нас белков в НБЧ и гиппокампе был использован метод иммуногистохимического анализа. Для выявления антигенов использовали первичные антитела - Cell signaling: p-ERK1/2 (Thr202/ Tyr204 1:250), NeuN (1:500), DCX (1:300), LC3B (1:250), cleaved caspase 3 (1:400), LC3B (1:250); Novus Biologicals: GluR2 (1:250), Synaptopodin (1:250); Millipore: Ki-67 (1:300), VGLUT 1 (1:300) и 2 (1:500), Sigma-Aldrich: BrdU (1:500); Boster: cathepsin D (1:300).

Флуоресцентное иммуномечение: для выявления антигена с помощью антител, конъюгированных с флуоресцентными метками, использовался следующий протокол: срезы промывали в PBS, проводили тепловое демаскирование антигенов инкубированием срезов в горячем (+95°C) 0.01 M цитратном буфере (pH 6.0) в течение 15 минут. Далее срезы промывали PBS и PBS с 0.03% Triton x100 (PBST). После чего срезы инкубировали в блокирующем растворе, содержащем 5% нормальную сыворотку козы, разведенном на PBST в течение 1 часа. Затем при комнатной температуре проводили инкубацию с первичными антителами в течение ночи (16 - 18 часов). При двойном иммуномечении срезы одновременно инкубировали в растворе 2-х антител. После инкубации и промывки срезов в PBS и PBST, проводилась инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 488 (1:1000, Thermo Fisher) и DAPI (1:2000, Sigma-Aldrich, #D9542), в течение часа при комнатной температуре. DAPI использовался в качестве ядерного красителя. Срезы промывали PBS и заключали в мовеол. Хранение срезов осуществлялось при +4°C. Оценка специфичности иммунного окрашивания проводилась с помощью отрицательного контроля (без первичных антител).

Биотин–стрептавидиновый метод: для выявления антигена с помощью антител, конъюгированных с биотином, использовался следующий протокол: срезы промывали в PBS, проводили тепловое демаскирование антигенов инкубированием срезов в горячем (+95°C) 0.01 M цитратном буфере (pH 6.0) в течение 15 минут. Далее срезы промывали PBS и PBS с 0.03%-ным Triton x100 (PBST). После промывки PBST срезы помещали в 0.3%-ный раствор перекиси водорода в метаноле на 30 минут для блокирования эндогенной пероксидазы. После чего срезы инкубировали в течение 1 часа в блокирующем растворе, содержащем 5%-ную нормальную сыворотку козы, разведенном на PBST. Затем при комнатной температуре проводили инкубацию с первичными антителами в течение ночи (16 - 18 часов). После инкубации и промывки срезов в PBS и PBST проводили инкубацию с вторичными антителами, конъюгированными с биотином, в течение часа при комнатной температуре. Срезы промывали PBS и на 1 час помещали в раствор стрептаведина пероксидазы (1:500, Supelco, #S2438). Затем после промывки срезов в PBS проявляли реакцию с помощью диаминобензидина, разведенного в PBS в концентрации 50 мг/мл и содержащего 0.015% перекиси

водорода. Далее срезы подвергали стандартной гистологической обработке и заключали в акриловую среду «Витрогель».

Метод TUNEL

Выявление клеток, гибнущих путем апоптоза, происходило с помощью метода TUNEL. Этот метод основан на присоединении дУТФ к 3' концу ДНК с помощью фермента терминальная дезоксинуклеотидил трансфераза (ТдТ). В работе использовался ApopTag® Plus In Situ Apoptosis Fluorescein Detection Kit.

Срезы промывали в PBS, проводили тепловое демаскирование инкубированием срезов в горячем (+95°C) 0.01 М цитратном буфере (pH 6.0) в течение 15 минут. Далее срезы промывали PBS и PBS с 0.03%-ным Triton x100 (PBST). Затем срезы инкубировали в растворе протеиназы К (20 мкг/мл) в течение 15 минут при комнатной температуре. После промывки добавляли на срезы Equilibration buffer и инкубировали 30 секунд при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали в растворе ТдТ во влажной камере 1 час при 37°C. После этого срезы промывали специальным промывочным буфером (Washbuffer) и инкубировали в нем 10 минут при комнатной температуре. После промывки антител в PBS срезы в течение часа инкубировали с антителами против дегоксигенина, эти антитела были конъюгированы с флуоресцином. DAPI использовался в качестве ядерного красителя. Срезы промывали PBS и заключали в мовеол. После высыхания хранение срезов осуществлялось при -20°C.

Timm окрашивание

Окрашивание методом Timm проводилось для визуализации мшистых волокон в зубчатой извилине и оценки спрутинга волокон. В основе окрашивания лежит связывание серебра и сульфидов с Zn-содержащими волокнами. Использовался набор FD Rapid TimmStain Kit (FD Neuro Technologies Inc., #PK701).

Для окрашивания методом Timm животные были наркотизированы смесью Золетил/Ксилазина (Zoletil/Xylazine Virbac, Франция). Животные были перфузированы холодной смесью 1:1 HCL и Na₂S в течение 10 минут, после чего были перфузированы 0.1М фосфатным буфером (pH 7.4) и 5%-ным раствором формалина, далее животные были декапитированы. Мозг извлекали из черепной коробки и обрабатывали стандартным методом. Изготовление чередующихся серий фронтальных срезов толщиной 10 мкм происходило на криостате фирмы Leica при температуре -20°C. Срезы помещались в 200 мл раствора, содержащего гуммиарабику, лимонную кислоту, цитрат натрия, гидрохинон и нитрата серебра ~ 30 мин при температуре 20°C. Для контроля процесса окрашивания проводили визуальную оценку срезов.

Вестерн-блот анализ

Иммуноблоттинг был проведен в соответствии с протоколом, описанным ранее (Kulikov et al. 2020). Использовали первичные антитела - Cell Signaling: phospho-p53 (Ser15, 1:500), cleaved caspase-3 (Asp175, 1:1000), GAPDH (1:1000), b-tubulin (1:1000); Abcam: actin (1:1000), caspase-8 (1:500); Novus Biologicals: p53 (1:500), LC3B (1:500); Epitomic: pro-caspase-9 (1:500); GeneTex: cleaved caspase-9 (Asp353, 1:1000); Santa Cruz Biotechnology: Bcl-2 (1:500); Millipore: phospho-Bcl-2 (Ser70, 1:1000); MBL International: beclin-1 (1:1000); MBL International p62 (1:1000). Детекция хемилюмениценции происходила с помощью с помощью BioRad ChemiDoc Touch или рентгеновской пленки (Amersham, Великобритания). Оптическая плотность бендов оценивалась в программе ImageJ или Image Lab Software денситометрическим методом. Для осуществления загрузочного контроля уровень специфического сигнала был нормирован по оптической плотности b-tubulin, actin, GAPDH или всех белков (Ponceau).

Анализ срезов, вестерн-блотов и статистический анализ данных

Все процедуры при иммуногистохимическом анализе проводились одновременно в стандартных условиях. Оценка специфичности иммунного окрашивания проводилась с помощью отрицательного контроля (без первичных антител). Анализ препаратов проводился с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000B (Leica Microsystems GmbH), микроскопа Zeiss Axio Imager A1 (Германия) и конфокального микроскопа Leica TCS SP5 MP (Германия). Для анализа

использовали 4 - 5 срезов для каждого животного, содержащих НБЧ или дорсальный гиппокамп на одном уровне в rostro-каудальном направлении.

Для определения уровня пролиферации были подсчитаны BrdU и Ki-67 - иммунореактивные нейроны в нижних буграх четверохолмия, зубчатой извилине и гиппокампе. Для анализа уровня дифференцировки нейронов были проанализированы клетки, коэкспрессирующие DCX и VGLUT1/2 в зубчатой извилине и гиппокампе. Оптическая плотность иммунореактивного вещества (p-ERK1/2 и Synaptopodin) и гранул серебра при окраске по Timm измерялась в программе Image J (NIH, США). Были исследованы гранулярный, внутренний молекулярный слой и хилус зубчатой извилины, пирамидный слой и stratum lucidum поля гиппокампа CA4/3, пирамидный слой и stratum radiatum поля гиппокампа CA1 (p-ERK1/2). Значение оптической плотности получали путем вычитания уровня окрашивания участка ткани, содержащего иммунореактивное вещество, и уровня участка ткани того же среза, не содержащий иммунореактивного вещества.

Для оценки апоптоза были подсчитаны cIcasp3 и TUNEL-позитивные клетки в гиппокампе. Для оценки изменений в количестве клеток было подсчитано количество ядер, окрашенных DAPI на 0.05 мм² в исследуемых структурах (гранулярный слой и хилус зубчатой извилины, поле гиппокампа CA4). Для исследования аутофагии были проанализированы клетки, коэкспрессирующие LC3B/cathepsin в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины, а также в CA4 поле гиппокампа.

Все полученные данные обрабатывались статистически по U-критерию Манна-Уитни, критерию Краскела-Уоллиса и post-hoc критерию Данна с помощью программы GraphPad Prism 7 и Microsoft Excel. Был проведен корреляционный анализ Спирмена между продолжительностью посттонических припадков, их тяжестью и количеством АСП. Анализ поведенческих особенностей АСП проводился с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Данные выражались в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (SEM). Отличия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие рефлекторной эпилепсии

У крыс линии КМ повышенная судорожная готовность развивается в ходе постнатального онтогенеза и полностью формируется только к концу третьего месяца жизни (Fedotova and Semiokhina, 2002), что позволяет охарактеризовать различные этапы развития рефлекторной эпилепсии.

В норме формирование гиппокампа и нижних бугров четверохолмия заканчивается к 15 дню постнатального развития (Nicola et al., 2015; Fathke and Gabriele, 2009). Однако у крыс линии КМ мы продолжаем наблюдать процессы, свидетельствующие о продолжающемся развитии данных структур. Так, на 15 день жизни мы показали повышенный уровень пролиферации в НБЧ крыс линии КМ по сравнению с крысами линии Вистар (Рис.1). Методом TUNel показано повышение уровня апоптотической гибели в НБЧ крыс линии КМ, и выявлено меньшее число клеток в данной структуре (Рис.2, Г,Ж). Эти данные свидетельствуют о задержке развития НБЧ. К концу первого месяца различия в уровнях апоптоза, пролиферации и в числе клеток в НБЧ крыс КМ и Вистар нивелируется (Рис.1,2).

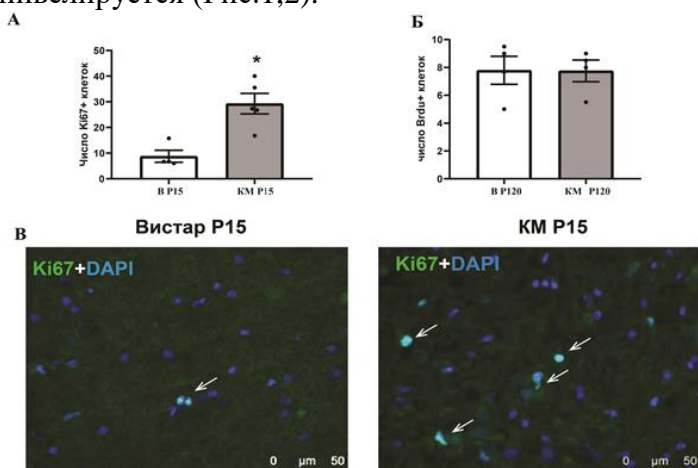


Рис.1 Анализ уровня пролиферации у крыс линии КМ и Вистар в IC. А - число Ki-67-иммунопозитивных клеток в С1С; Б число BrdU-позитивных клеток в С1С у 120-дневных (взрослых) крыс линии Вистар и КМ. В - иммунофлуоресцентное выявление Ki-67-иммунопозитивных клеток в С1С крыс Вистар и КМ. Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на Ki-67-иммунопозитивные клетки. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

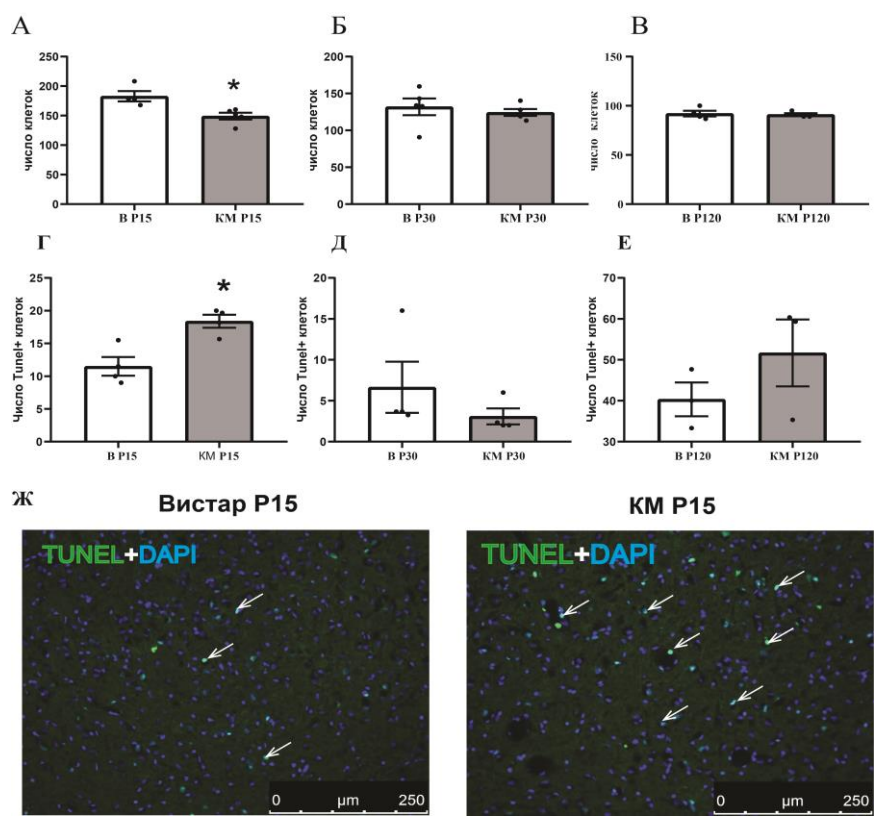


Рис.2 Анализ апоптоза в CIC. А-В – число клеток у 15, 30 и 120-дневных крыс линии Вистар и КМ; Г-Д – число TUNEL+ клеток в CIC у 15, 30 и 120-дневных крыс линии Вистар и КМ; Ж – иммунофлуоресцентное выявление TUNEL+ клеток в CIC крыс Вистар и КМ. Стрелки указывают на TUNEL+ клетки. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

Гиппокамп первоначально не участвует в реализации аудиогенных судорог, он играет важную роль в дальнейшем распространении судорожной активности (Vinogradova, 2017). Развитие гиппокампа у аудиогенно-чувствительных крыс до настоящего времени не изучали, хотя можно предположить существование нарушений в его формировании, так как ранее были выявлены некоторые особенности в работе глутаматергических нейронов в ходе онтогенеза крыс линии КМ (Chernigovskaya et al., 2019). В норме у крыс формирование гиппокампа заканчивается к 15-му дню постнатального развития, и в дальнейшем пролиферация нейронов почти полностью ограничивается SGZ и хилусом зубчатой извилины (Nicola et al., 2015). К концу первого месяца все основные популяции клеток в зубчатой извилине и гиппокампе считаются полностью сформированными.

В данной работе нами было показано, что гиппокамп у крыс КМ претерпевает схожие нарушения в развитии, что и НБЧ. На 15 день постнатального развития у крыс линии КМ по сравнению с крысами линии Вистар выявлено большее число пролиферирующих клеток в гранулярном слое зубчатой извилины, в хилусе и поле СА4 гиппокампа. (Рис.3,А). Хилус является пролиферативной зоной, из которого клетки выселяются в зубчатую извилины. Также в гранулярном слое зубчатой извилины, в хилусе и поле СА4 наблюдалось сниженное общее число клеток по сравнению с крысами Вистар этого возраста.(Рис.3,Б).

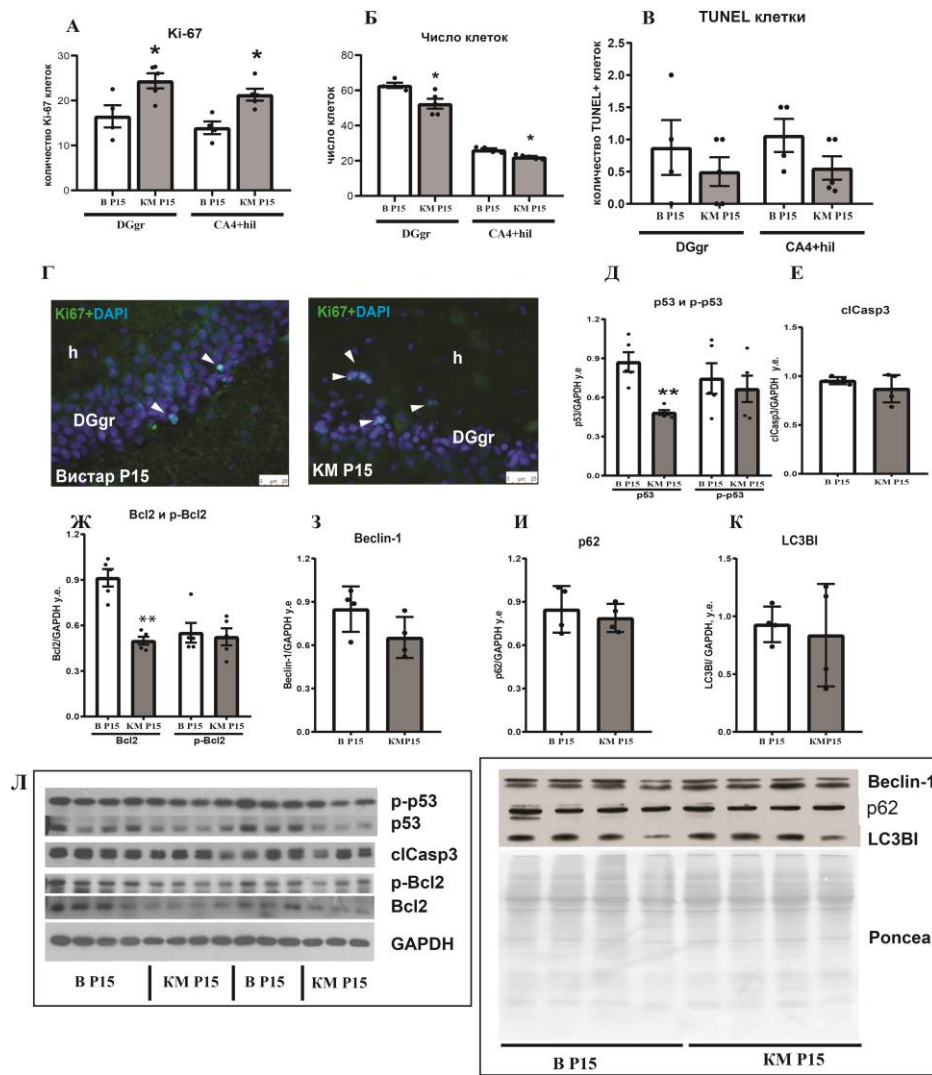


Рис.3 Анализ пролиферации и апоптоза в гиппокампе 15-дневных крыс. А-В – число Ki-67+ клеток (А), число клеток (Б) и число TUNEL+ клеток (В) у 15-дневных крыс линии Вистар и КМ; Г – иммунофлуоресцентное выявление пролиферирующих клеток в зубчатой извилины 15-дневных крыс линии Вистар и КМ; стрелки указывают на Ki-67+ клетки (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Уровень p53 и p-p53 (Д), cIcasp3 (Е), Bcl2 и p-Bcl2 (Ж), p62(И), LC3BI (К) в гиппокампе 15-дневных крыс линии Вистар и КМ. Л- Репрезентативный вестерн-блот гиппокампа 15-дневных крыс линии КМ и Вистар. DGgr – гранулярный слой зубчатой извилин, h – хилус. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней.* - достоверные различия при $p < 0.05$.

В отличие от НБЧ на 30 день постнатального развития мы продолжаем наблюдать сниженное число клеток и повышенный уровень пролиферации в гиппокампе крыс линии КМ (Рис.4 А, Б, Г). У крыс линии КМ наблюдается повышение уровня апоптоза (Рис.4 В, Д). Вестерн блот анализ показал повышение уровня проапоптотических белков (cIcasp3, cIcasp9, p53), следовательно запуск апоптоза осуществляется p53-зависимым и митохондриальным путями (Рис.4 Е-Л). К концу второго месяца (Р60) жизни уровень пролиферации и число клеток в гиппокампе крыс линии КМ не отличаются от таковых у крыс линии Вистар, и это позволяет предположить, что к этому возрасту формирование структуры гиппокампа завершается (Рис.5).

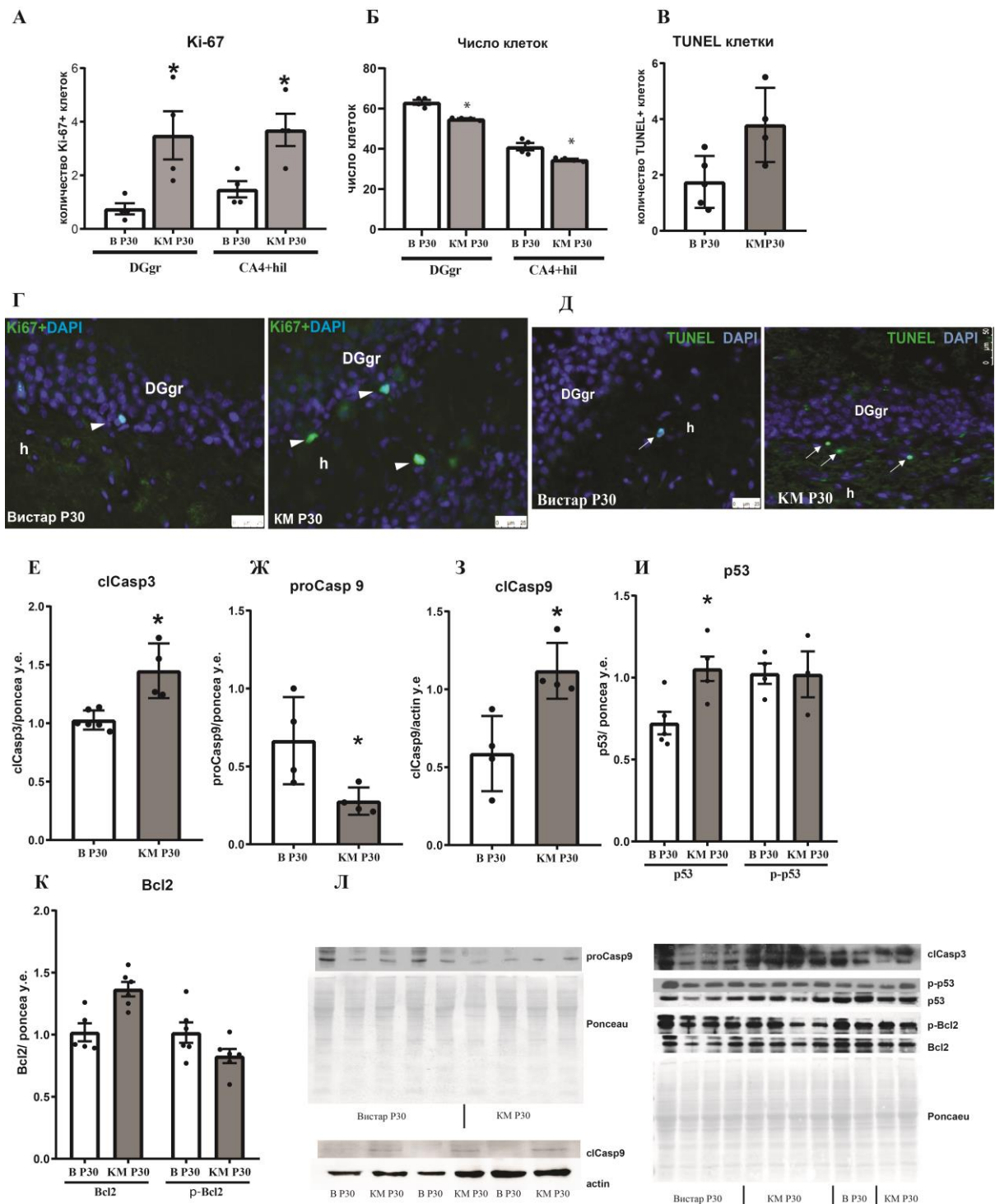


Рис.4. Анализ пролиферации и апоптоза в гиппокампе 30-дневных крыс. А-В – число Ki-67+ клеток (А), число клеток (Б) и число TUNEL+ клеток (В) у 30-дневных крыс линии Вистар и КМ; Г – иммунофлуоресцентное выявление пролиферирующих клеток в зубчатой извилины 30-дневных крыс линии Вистар и КМ; стрелки указывают на Ki-67+ клетки (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий); Д -флуоресцентное выявление TUNEL+ клеток зубчатой извилины 30-дневных крыс линии Вистар и КМ. Стрелки указывают на TUNEL+ клетки (зеленые), Уровень cIcasp3 (Е), proCasp9 (Ж), cIcasp9(З) p53 и p-p53 (И), Bcl2 и p-Bcl2 (К), в гиппокампе 30-дневных крыс линии Вистар и КМ. Л - Репрезентативный вестерн-блот гиппокампа 30-дневных крыс линии КМ и Вистар. DGgr – гранулярный слой зубчатой извилин, h – хилус. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

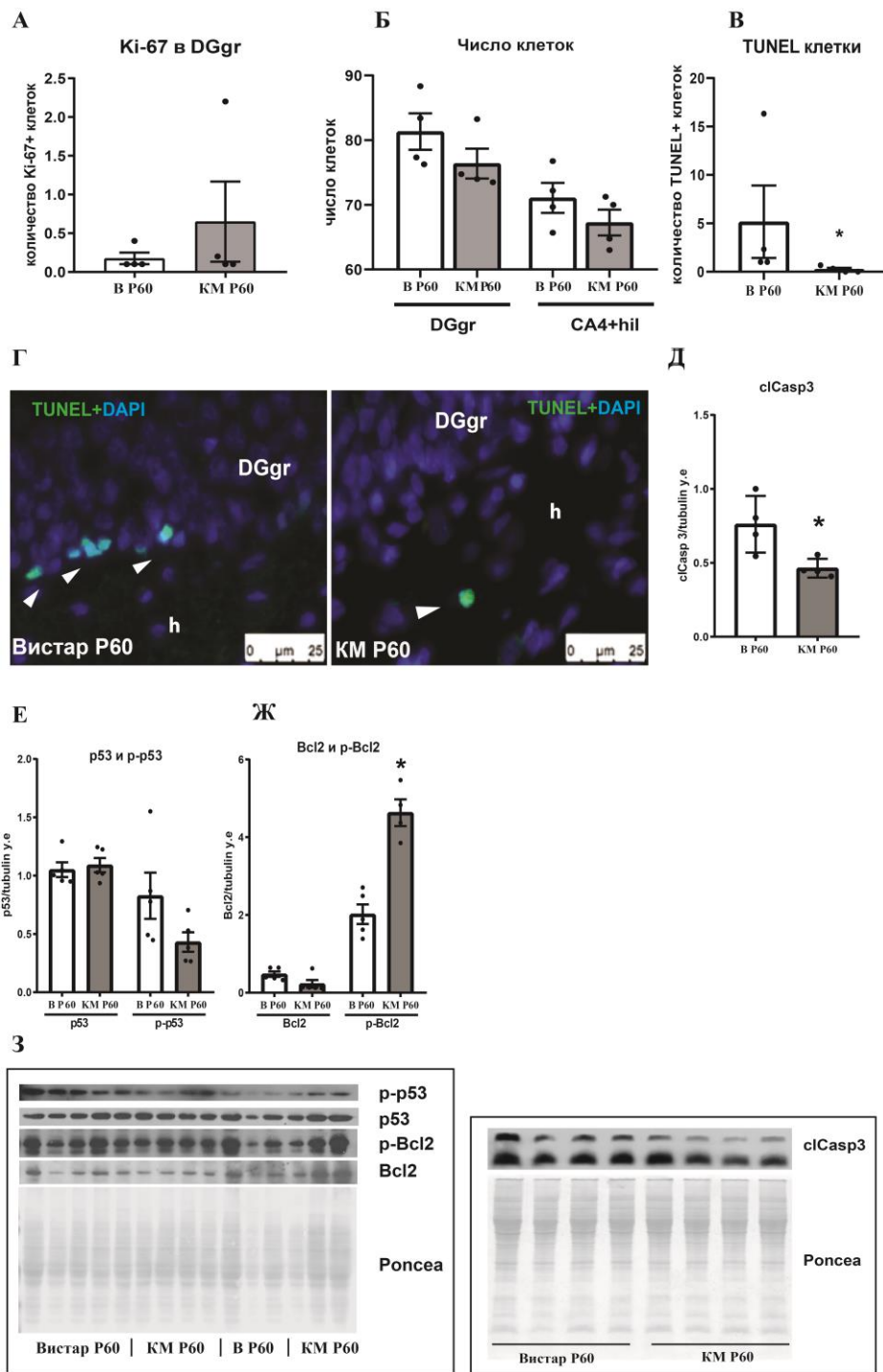


Рис.5. Анализ пролиферации и апоптоза в гиппокампе 60-дневных крыс. А-В – число Ki-67+ клеток (А), число клеток (Б) и число TUNEL+ клеток (В) у 60-дневных крыс линии Вистар и КМ; Г - флуоресцентное выявление TUNEL+ клеток зубчатой извилины 30-дневных крыс линии Вистар и КМ. Ядра окрашены DAPI (синий). Стрелки указывают на TUNEL+ клетки (зеленые), Уровень cIcasp3 (Д), p53 и p-p53 (Е), Bcl2 и p-Bcl2 (Ж), p62(З), LC3BI (И) в гиппокампе 60-дневных крыс линии Вистар и КМ. Л - Репрезентативный вестерн-блот гиппокампа 30-дневных крыс линии КМ и Вистар. DGgr – гранулярный слой зубчатой извилин, h – хилус. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

У взрослых крыс КМ структура гиппокампа в целом не отличается от характерной для крыс линии Вистар. Однако анализ характера дифференцировки и миграции новообразованных клеток показал значительные нарушения у крыс линии КМ на всех изученных этапах развития.

Известно, что судорожная активность может приводить к aberrантному нейрогенезу и миграции ГК в хилус (Hattiangady et al., 2004; Romcy-Pereira and Garcia-Cairasco, 2003). Индукция фебрильных судорог у 11-дневных крысят приводит к образованию эктопических ГК и появлению судорог в зрелом возрасте (Кояма et al., 2012). Эти эГК являются более возбудимыми, чем нормотопические и способствуют распространению эпилептического припадка (Gao et al., 2015; Scharfman et al., 2007). Наши данные показали, что в хилусе как молодых, так и зрелых крыс линии КМ значительно больше дифференцирующихся эГК (клетки экспрессируют DCX), чем в хилусе крыс линии Вистар тех же возрастов (Рис. 6). Более того, у крыс линии КМ на всех изученных этапах онтогенеза было показано с помощью двойного иммуногистохимического выявления, что большая часть DCX-позитивных эГК ко-экспрессирует VGLUT1/2, что свидетельствует об их дифференцировке в глутаматергические нейроны. При культивировании гиппокампальных нейрональных стволовых клеток (НСК) крыс КМ *in vitro* была также показана преимущественная дифференцировка в глутаматергические нейроны, в то время как НСК, полученные от крыс Вистар, дифференцировались также и в ГАМКергические нейроны (Naumova et al., 2020). Анализ дифференцировки *in vivo* и *in vitro* указывает на то, что у крыс линии КМ существует генетически детерминированная предрасположенность НСК к дифференцировке в глутаматергические нейроны, что может способствовать повышению судорожной готовности у крыс этой линии.

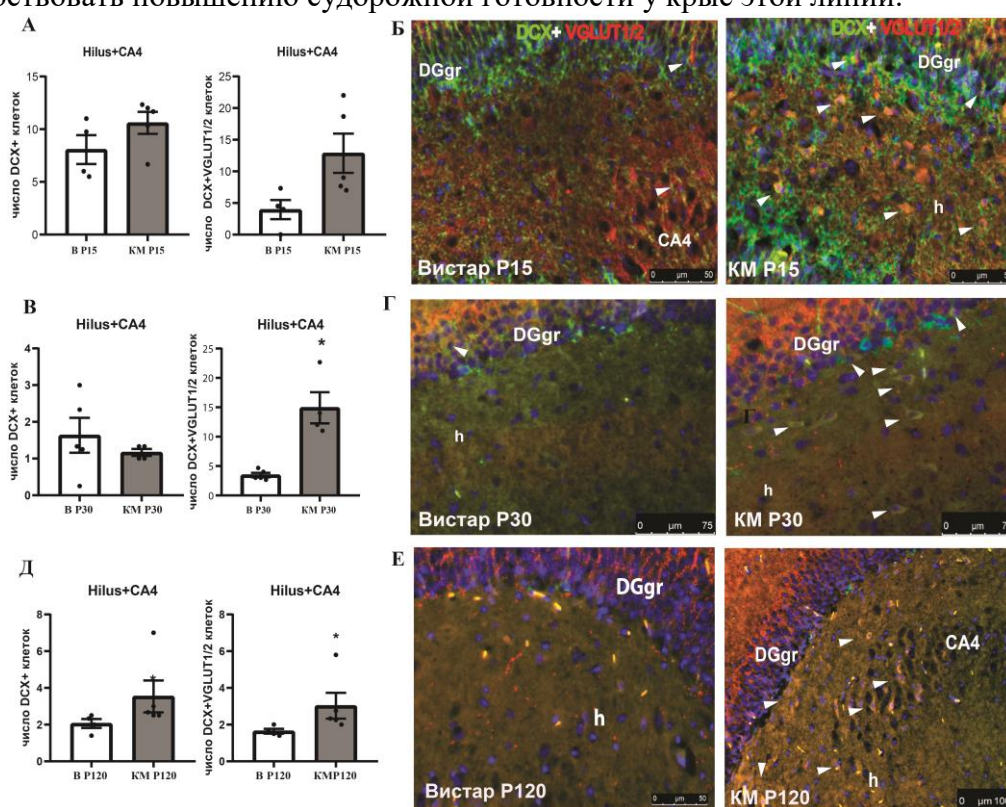


Рис. 6. Анализ дифференцировки в гиппокампе у крыс линии КМ и Вистар. А, В, Д – число клеток, экспрессирующих DCX, и число клеток коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, в гранулярном слое зубчатой извилины на 15(А), 30(В) и 120 (Д) день постнатального развития; Б,Г,Е - иммунофлуоресцентное выявление DCX (зеленый) и VGLUT1/2 (красный) в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки, коэкспрессирующие DCX и VGLUT1/2. Ядра окрашены DAPI (синий). DGgr – гранулярный слой зубчатой извилин, h – хилус. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

Моделирование височной эпилепсии

Известно, что при многократных аудиогенных судорожных припадках происходит возникновение новых очагов эпилептической активности в структурах лимбической системы (гиппокампе и амигдале) и участках новой коры (височной) (Garcia-Cairasco et al., 2017). Индикатором рекрутирования этих структур в эпилептическую сеть является возникновение новой фазы аудиогенного припадка - лимбических судорог. Так как развитие посттонического клонуса у крыс линии КМ отличается от описанных на других моделях лимбических судорог, в нашей работе для описания тяжести посттонической стадии мы модифицировали шкалу Racine. В течение первых 4

- 7 АСП появление посттонического клонуса было нестабильным и непродолжительным, к 14-м АСП все крысы линии КМ демонстрировали пост-клонус, к 21-му припадку проявление пост-клонуса выражалось в более продолжительных, тяжёлых и стабильных клонических судорогах (Рис.7). В процессе киндлинга продолжительность и тяжесть посттонического клонуса увеличивалась, что свидетельствует о вовлеченности лимбической системы в судорожную активность (Vinogradova, 2017). Таким образом, применение аудиогенного киндлинга позволило нам смоделировать развитие височной эпилепсии и изучить различные этапы ее формирования.

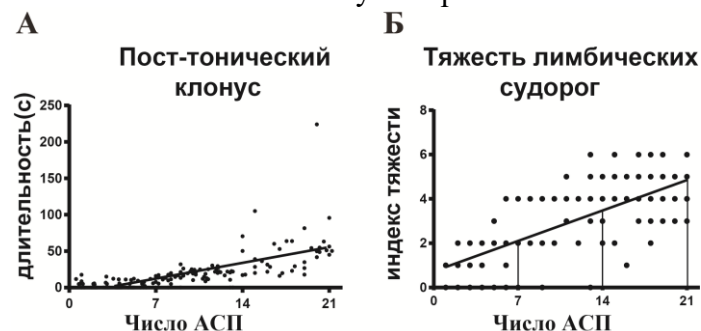


Рис.7. Анализ продолжительности и тяжести посттонического клонуса в течение аудиогенного киндлинга. А – продолжительность посттонического клонуса; Б – тяжесть посттонического клонуса; Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

На начальной стадии моделирования височной эпилепсии через неделю после 7 АСП в нижних буграх четверохолмия мы показали повышенную апоптотическую гибель клеток (Рис. 8 А, Б, Д). Ранее мы показали наличие пролиферирующих клеток в НБЧ наивных крыс линии КМ. В норме НБЧ не являются нейрогенной нишей, однако при некоторых патологических состояниях (дефицит тиамина) наблюдается индукция пролиферации в НБЧ, что свидетельствует о возможности возникновения патологической пролиферации в данной структуре (Hazell et al., 2014). В настоящей работе было показано, что через неделю после 7 АСП наблюдается значительное усиление пролиферации в НБЧ. Усиление пролиферации может носить компенсаторный характер и являться ответом на активацию апоптоза после АСП (Рис. 8 В, Г). Однако общее число клеток в НБЧ значительно снижается, несмотря на повышенную пролиферацию.

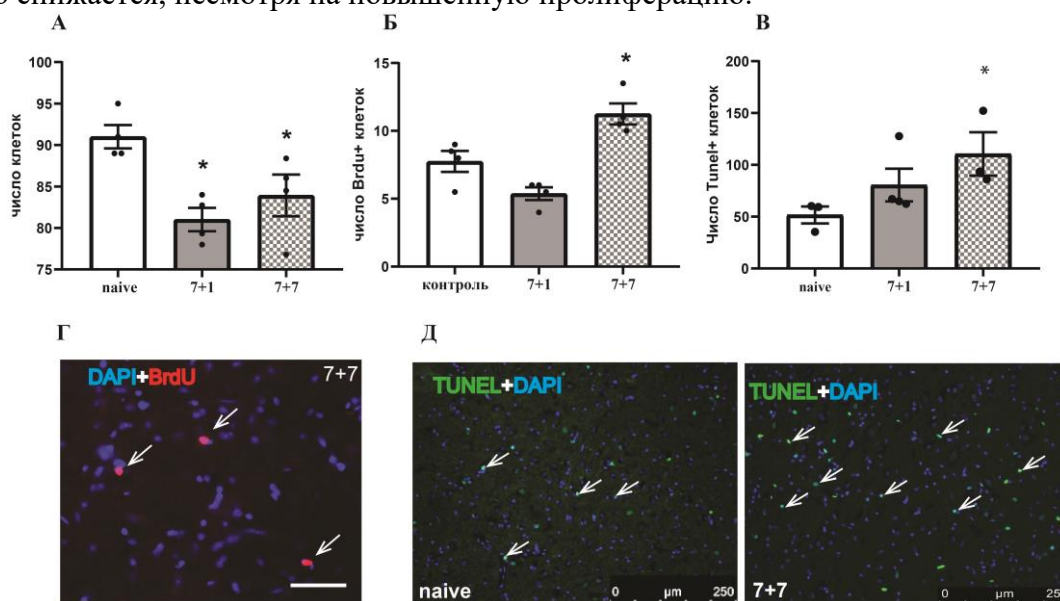


Рис. 8. Анализ количества клеток, уровня пролиферации и апоптоза в НБЧ после 7 АСП. А - число клеток после 7 АСП (7+1) и через неделю после 7 АСП (7+7); Б – число BrdU-позитивных клеток после 7 АСП (7+1) и через неделю после 7 АСП (7+7); В - число TUNEL-позитивных клеток в СИС крыс линии КМ после 7 АСП (7+1) и через неделю после 7 АСП (7+7) Г - иммунофлуоресцентное выявление BrdU + клеток в НБЧ крыс КМ через неделю после 7 АСП. Шкала – 100 мкм; Д - флуоресцентное выявление TUNEL+ клеток в СИС крыс КМ. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

В субгранулярном слое зубчатой извилины крыс линии КМ на начальной стадии моделирования височной эпилепсии уже после 4 АСП происходит дальнейшее усиление пролиферации (Рис.9 А-Г). Также показана aberrantная миграция вновь образованных клеток в хилус и ускорение их дифференцировки в нейроны (Рис.9 Д, Е). Высокая скорость дифференцировки

новообразованных клеток характерна для эпилептиформных состояний (Kralic et al., 2005; Overstreet-Wadiche et al., 2006; Ueno et al., 2019). Наиболее ярко усиление пролиферации и дифференцировки проявляются после 14 АСП, когда крысы демонстрируют посттонические припадки, которые дополнительно стимулируют пролиферацию, аномальную миграцию и дифференцировку новых клеток в глутаматергические нейроны в гранулярном слое зубчатой извилины и хилусе (Рис.10,11). Миграция ГК в хилус считается одним из факторов, приводящих к возникновению гипервозбуждения в нейрональных цепях гиппокампа (Botterill et al., 2015; Gao et al., 2015).

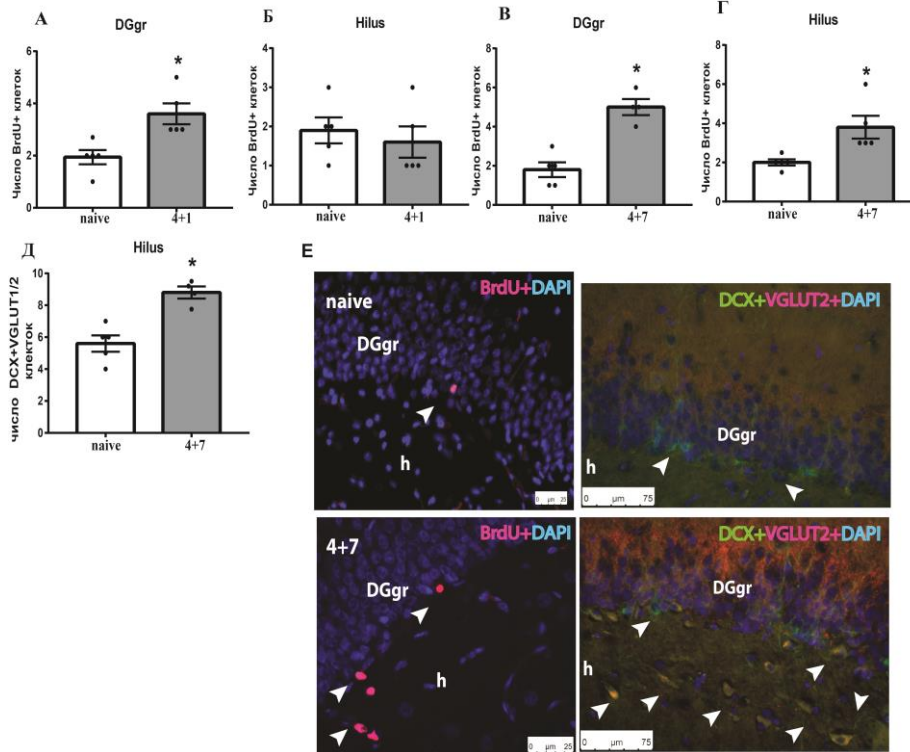


Рис. 9. Анализ пролиферации и дифференцировки в зубчатой извилине после 4 АСП. А,Б - число BrdU+ клеток после 4 АСП (4+1) в DGgr(А) и в хилусе(Б); В,Г - число BrdU+ клеток после 4 АСП (4+7) в DGgr(В) и в хилусе(Г);Д- число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, через неделю после 4 АСП (4+7) в хилусе; Е- иммунофлуоресцентное выявление BrdU (красный), DCX (зеленый), VGLUT1/2 (красный) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине. Ядра окрашены DAPI (синий). DGgr – гранулярный слой зубчатой извилины, h – хилус. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

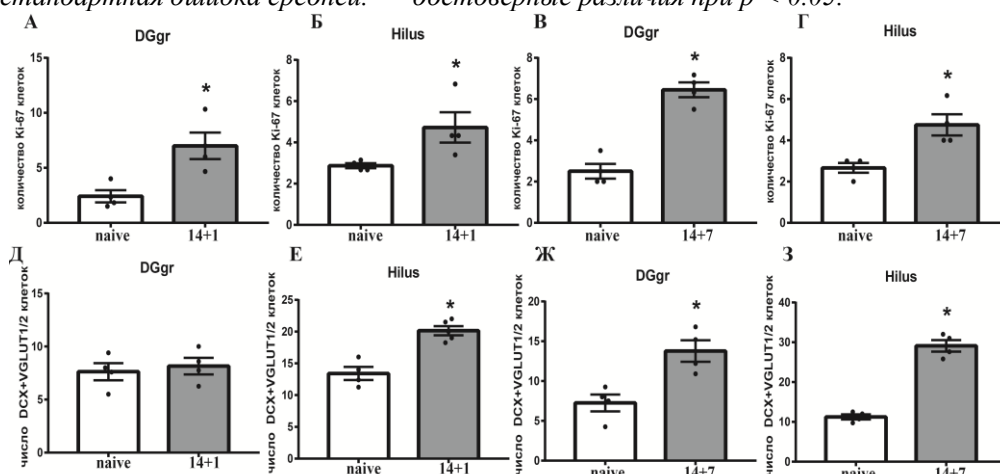


Рис.10. Анализ пролиферации и дифференцировки в зубчатой извилине после 14 АСП. А,Б - число Ki67+ клеток после 14 АСП (14+1) в DGgr(А) и в хилусе(Б); В,Г - число Ki67+ клеток после 14 АСП (14+7) в DGgr(В) и в хилусе(Г);Д,Е - число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2 после 14 АСП (14+1) в DGgr(Д) и в хилусе (Е); Ж,З - число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, через неделю после 14 АСП (14+7) в DGgr(Ж) и в хилусе (З); Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$.

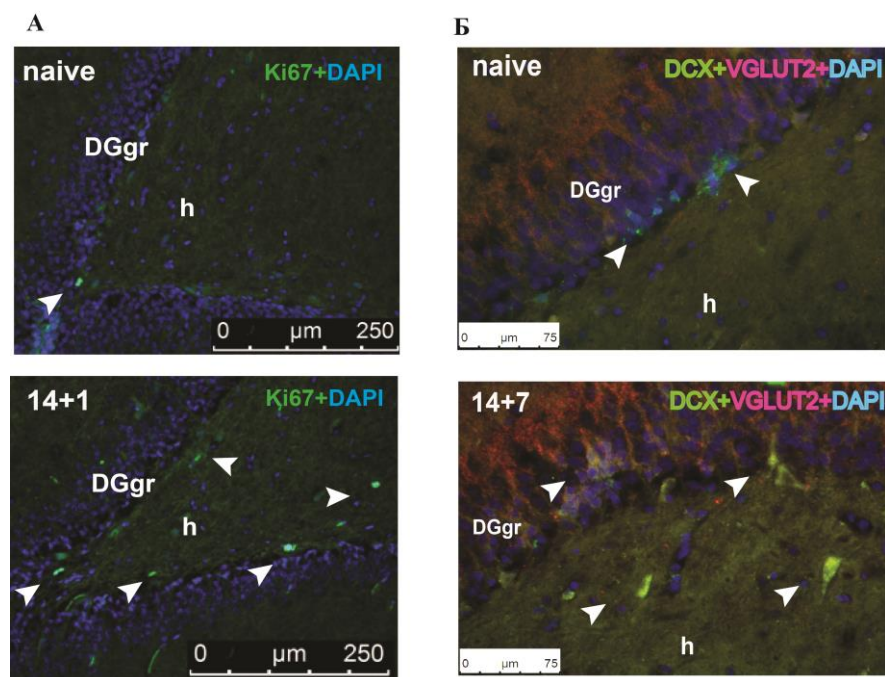


Рис.11. Иммунофлуоресцентное выявление *Ki67* (зеленый) (А), *DCX* (зеленый) и *VGLUT1/2* (красный) (Б) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине. Ядра окрашены *DAPI* (синий). *DGgr* – гранулярный слой зубчатой извилины, *h* – хилус.

При развитии височной эпилепсии у крыс линии КМ формируется две популяции новообразованных клеток. Первая - клетки мигрируют в гранулярный слой зубчатой извилины и становятся нормотопическими гранулярными клетками. Вторая популяция - новообразованные клетки мигрируют в хилус и являются эктопическими гранулярными клетками (Bielefeld et al., 2014a; Scharfman and Pierce, 2012). Усиление миграции новообразованных нейронов из субгранулярного слоя в хилус обусловлено нарушением экспрессии белков, отвечающих за миграцию гранулярных клеток. Мы показали, что в отличие от новообразованных *DCX*-позитивных нейронов, локализованных в субгранулярном слое зубчатой извилины, клетки, локализованные в хилусе, уже не содержат *DCX*-позитивных отростков, что также свидетельствует об их большей зрелости, и, следовательно, о высокой скорости дифференцировки (Kulikov et al., 2021). Наши данные соотносятся с результатами, полученными на других моделях височной эпилепсии, в которых при эпилептогенезе наблюдается повышение нейрогенеза и aberrantная миграция ГК в хилус (Cho et al., 2015; Romcy-Pereira and Garcia-Cairasco, 2003). Таким образом, длительный АК приводит к усилению нейрогенеза, к aberrantной миграции новообразованных клеток в хилус и их быстрой дифференцировке в глутаматергические нейроны.

Аудиогенный киндлинг в течение 14 дней приводил к усилению экспрессии маркера дендритных шипиков синаптоподина и к разрастанию мшистых волокон (МВ) в гиппокампе, что свидетельствует об увеличении плотности синаптических контактов (Рис.12). За усиление ветвления МВ отвечают как зрелые, так и новообразованные нейроны. Известно, что aberrantные МВ формируют синаптические контакты с апикальными дендритами пирамидных нейронов поля СА3 (Simpson et al., 1997) и с дендритами ГК во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (Kotti et al., 1997; Sutula et al., 1989) и, таким образом, участвуют в распространении эпилептической активности, приводя к быстрой активации постсинаптических клеток (Hendricks et al., 2019). Можно заключить, что при формировании височной эпилепсии происходит ремоделирование синаптических контактов в гиппокампе и формирование циклических связей между гранулярными клетками зубчатой извилины, мшистыми клетками полиморфного слоя и пирамидными нейронами поля СА3, что вызывает дальнейшее усиление эпилептиформной активности.

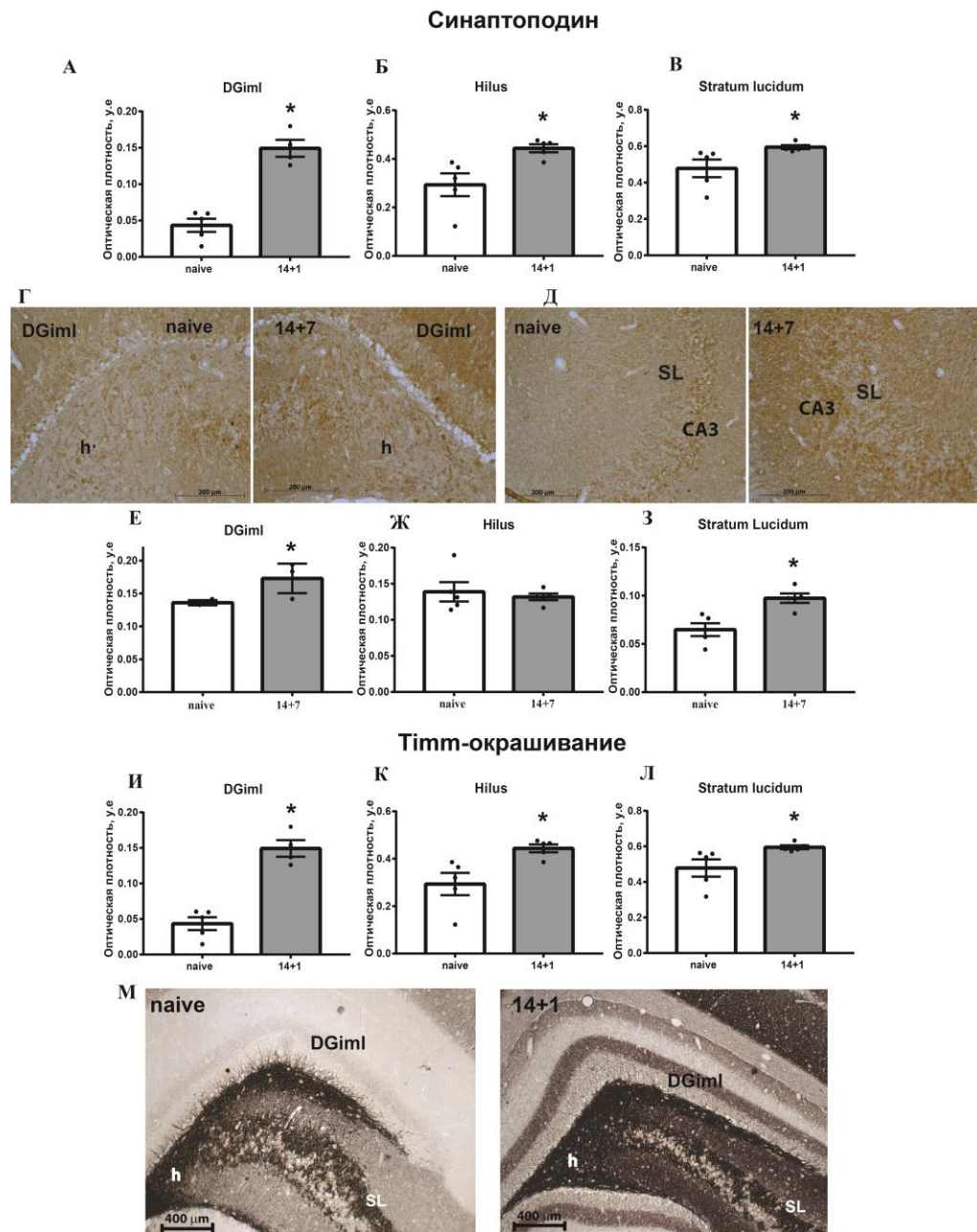


Рис.12. Иммуногистохимический анализ синаптоподина и визуализация мышечных волокон в гиппокампе крыс линии КМ после 14. А – В - оптическая плотность синаптоподин-иммунореактивного вещества во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (А), хилусе (Б), stratum lucidum (В) после 14 АСП (14+1); Г - иммуногистохимическое выявление синаптоподина в зубчатой извилине. DGiml – внутренний молекулярный слой зубчатой извилины, h – хилус. Д - иммуногистохимическое выявление синаптоподина в гиппокампе. Ca3 - поле гиппокампа CA3, SL - stratum lucidum. Е – З - оптическая плотность синаптоподин-иммунореактивного вещества во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (Е), хилусе (Ж), stratum lucidum (З) через неделю после 14 АСП (14+7); И – Л – содержание аргирофильного вещества во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (И), хилусе (К), stratum lucidum (Л) после 14 АСП (14+1). М - гистохимическое окрашивание мышечных волокон после 14 АСП (14+1). Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$

В течение 21-дневного киндинга часть животных перестала демонстрировать судорожные припадки в ответ на звуковую стимуляцию (группа resistant). У этих животных не было обнаружено изменений в пролиферации (naïve- $0,5 \pm 0,2$; resistant- $0,6 \pm 0,1$; $p=0,99$), дифференцировке (naïve- $2,7 \pm 0,2$; resistant- $2,8 \pm 0,4$; $p=0,99$) и уровне синаптоподина (naïve- $0,14 \pm 0,10$; resistant- $0,16 \pm 0,06$; $p=0,17$) по сравнению с наивными крысами линии КМ. Эти данные подтверждают, что усиление aberrантного нейрогенеза и перестройки нейрональной сети были вызваны многократными судорожными припадками.

При височной эпилепсии у человека и при моделировании этого состояния с помощью эпилептического статуса у животных наблюдалась гибель клеток в гиппокампе и активация аутофагии (Engel and Henshall, 2009; Wu et al., 2021). Данные, касающиеся клеточной гибели, полученные на разных моделях эпилепсии, достаточно противоречивы. На модели электрического киндинга было показано, что судороги не всегда приводят к гибели нейронов, а изменение плотности клеток связаны не с убылью нейронов, а с изменением объема гиппокампа (Brandt et al., 2004; Khurgel et al., 1995; Tuunanen and Pitkänen, 2000).

Одним из маркеров апоптотической гибели клеток является изменение субклеточной локализации cIcasp 3. Мы показали, что после 7 судорожных припадков Casp3 локализуется в ядрах гранулярных клеток зубчатой извилины и пирамидных нейронов CA4 поля гиппокампа (Рис. 13 В,Е,З,И), однако уменьшение числа клеток отмечено только в гранулярном слое, где наблюдалась апоптотическая гибель клеток и уменьшение их числа (Рис.13 А, Б, Ж).

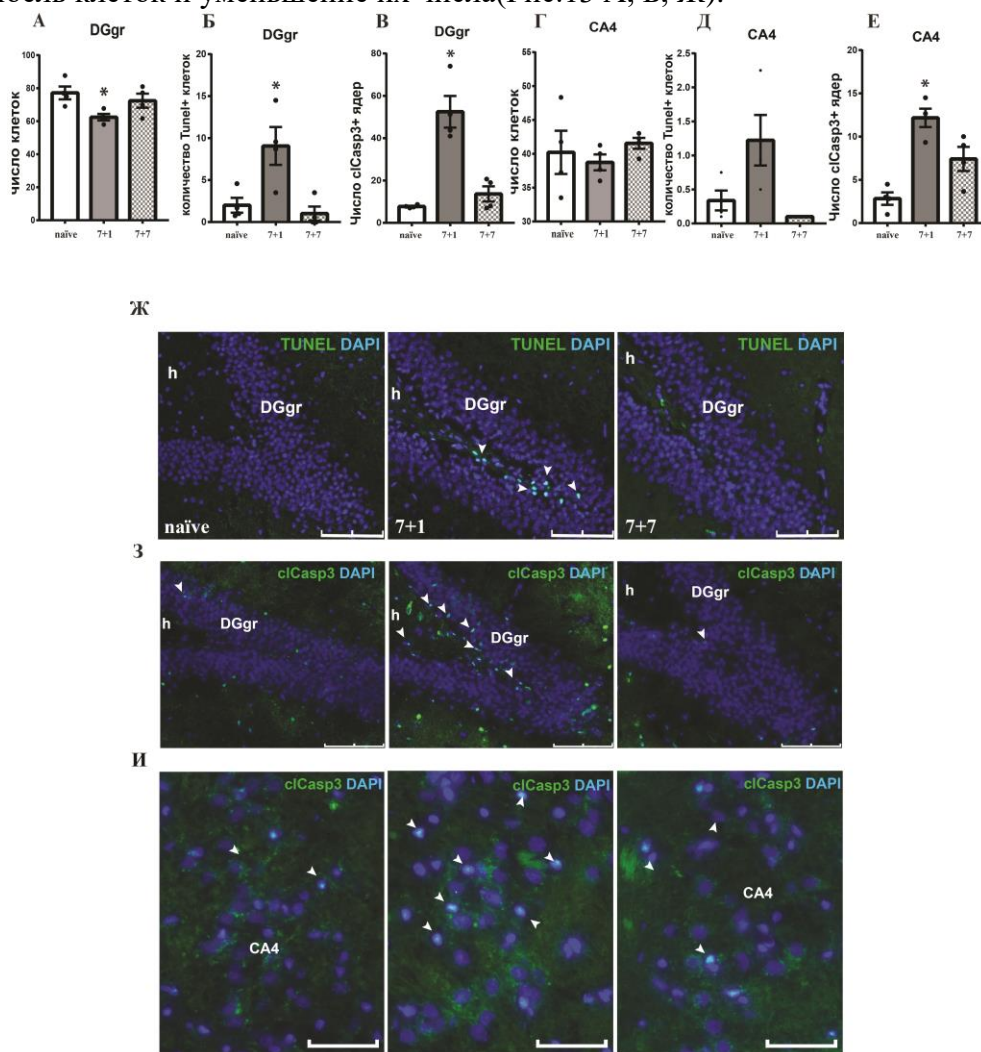


Рис.13. Анализ апоптоза в гиппокампе крыс КМ после 7 АСП. А,Г – число клеток в DGgr(А) и поле CA4(Г). Б,Д – число TUNEL+ ядер DGgr (Б), поле CA4 (Д) после 7 АСП. Ж – иммунофлуоресцентное выявление TUNEL-позитивных ядер в зубчатой извилине(зеленый), стрелки указывают на TUNEL+ ядра. Масштаб: 100 мкм. Ядра окрашены DAPI (синий). DGgr – гранулярный слой зубчатой извилины, h (hilus) – хилус.

Гибель нейронов происходила за счет активация митохондриального пути запуска апоптоза, на что указывало увеличение экспрессии cleaved caspase9 (Рис.14 А, Б). Увеличение экспрессии проапоптотического белка p53, что предполагает активацию p53-зависимого пути запуска апоптоза (Рис.14 А, Д).

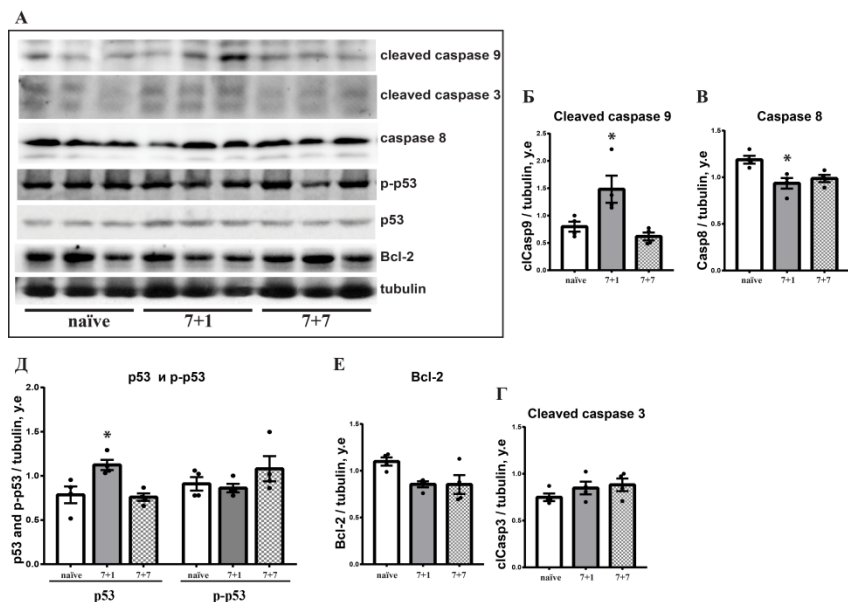


Рис.14. Вестерн-блотт анализ гиппокампов крыс после 7 АСП. А - репрезентативный вестернблот анализ содержания *clCasp9*, *clCasp3*, *Casp8*, *p53* и *p-p53*, *Bcl2* в гиппокампе крыс линии КМ после 7 АСП. Уровень *clCasp9* (Б), *Casp8* (В), *clCasp3* (Г), *p53* и *p-p53* (Д), *Bcl2* (Е). Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$ naive vs 7+1, 7+7.

Аутофагия играет решающую роль в регуляции гомеостаза и выживаемости нейронов и может выполнять как повреждающую, так и протективную функции (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Mizushima and Levine, 2010). Через неделю после 7 АСП наблюдается активация процессов деградации аутофагосом, так как было выявлено увеличение экспрессии белка Beclin-1, отвечающего за инициацию аутофагии, и превращение LC3BI в LC3BII, что коррелирует с образованием аутофагосом (Рис.15 А, В, Г, Д). При этом происходит снижение содержания p62, вызванное его деградацией в аутолизосоме (Рис.15 А, Б). Снижение содержания p62 свидетельствует об усилении деградации аутофагосом (Min et al., 2018). Двойное иммуногистохимическое окрашивание против LC3B (маркер аутофагосом) и CathD (фермент лизосом) показало активацию аутофагии в поле СА4 гиппокампа через неделю после 7 судорог (Рис.15 Е, Ж). Поскольку активация *Casp3* в пирамидных нейронах поля СА4 не приводила к апоптозу этих нейронов, мы предполагаем, что активация аутофагии носит протективный характер. В гранулярном слое и в хилусе изменений в аутофагии показано не было. На более поздних сроках киндлинга при продолжительных посттонических припадках (14 АСП и 21 АСП) мы не наблюдали активации аутофагии, в отличие от ранних этапов формирования височной эпилепсии.

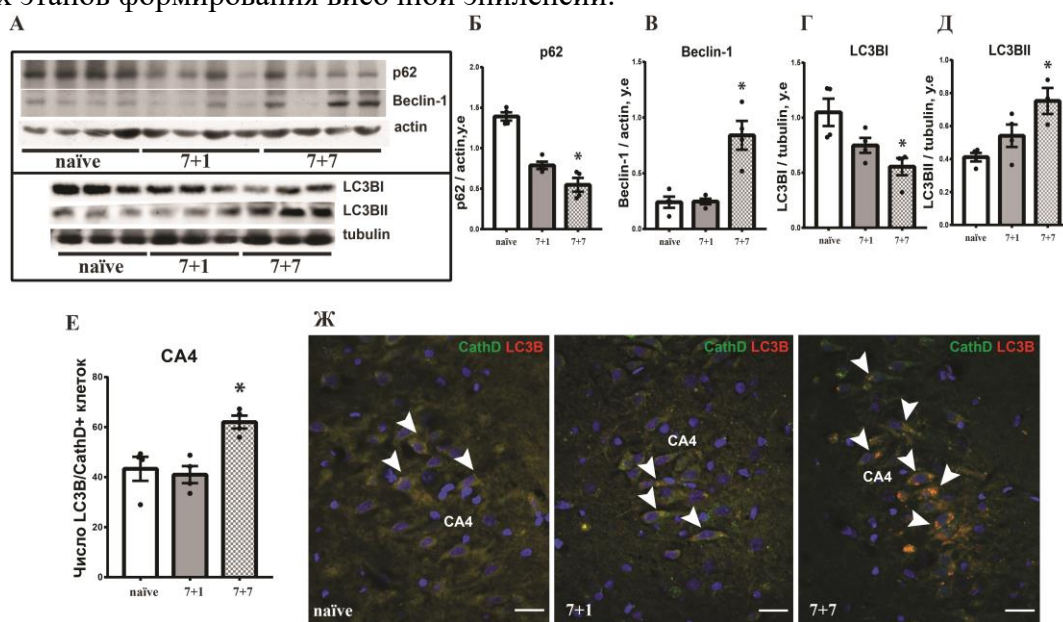


Рис. 15. Анализ аутофагии в гиппокампе крыс линии КМ после 7 АСП. А – репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p62, Beclin-1, LC3BI и II в гиппокампе крыс линии КМ после 7 АСП. Уровень p62 (Б), Beclin-1 (В), LC3BI (Г), LC3BII (Д). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали тубулин и актин. Е – число клеток, коэкспрессирующих CathD и LC3B, в поле СА4. Ж - иммунофлуоресцентное выявление CathD (зеленый), LC3B (красный) экспрессирующих

клеток в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки, коэкспрессирующие *CathD* и *LC3B* (желтые). Масштаб: 50 мкм. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$ naïve vs 7+1, 7+7.

При дальнейшем моделировании височной эпилепсии клеточная гибель усиливается и затрагивает хилус и гранулярный слой, но не поле СА4 (Рис.16 Б, В, Г). Наиболее распространёнными клетками хилуса являются мшистые клетки (Amaral et al., 2007a), которые являются глутаматергическими интернейронами, иннервирующими гранулярные клетки и ГАМК-ергические нейроны. При височной эпилепсии и на фармакологических моделях было показано, что судорожная активность приводит к гибели большого числа мшистых клеток (Blümcke et al., 2000; Jiao and Nadler, 2007; Volz et al., 2011). Гибель этих клеток является одним из возможных механизмов эпилептогенеза, так как с одной стороны, потеря мшистых клеток уменьшает активацию ГАМК-ергических нейронов, что может приводить к гиперактивации гранулярных клеток. С другой стороны, мшистые клетки иннервируются МВ, и потеря клеток может приводить к спрутингу МВ в гранулярный слой зубчатой извилины. В представленной работе через 7 дней после 14 и 21 АСП была показана значительная потеря мшистых клеток в хилусе, что сопровождалось усилением спрутинга МВ после 14 АСП (Рис.16 А, Д).

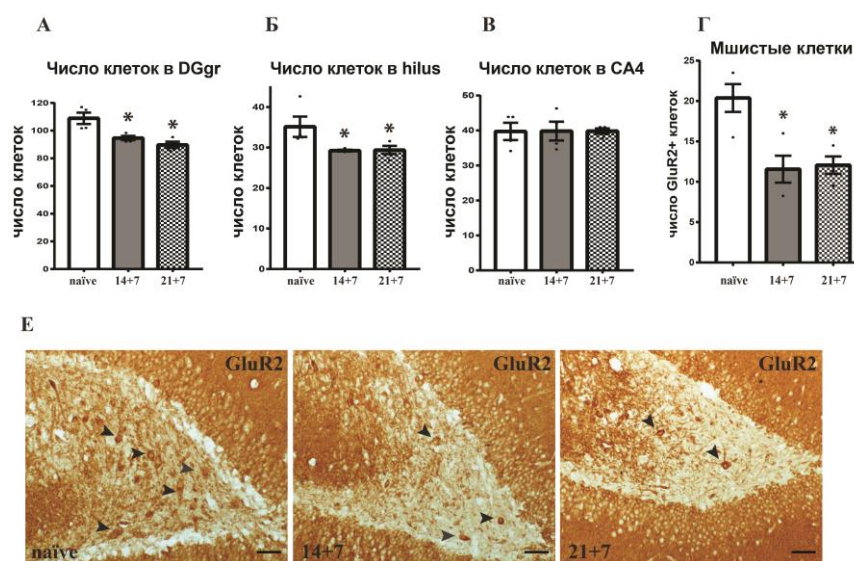


Рис. 16. Мшистые клетки в гиппокампе. А - В - число клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (А), хилусе (Б), поле СА4 (В) через неделю после 14 (14+7) и 21 (21+7) АСП. Г – число *GluR2*-иммунопозитивных клеток в хилусе через неделю после 14 (14+7) и 21 (21+7) АСП. Е – иммуногистологическое выявление *GluR2* (маркер мшистых клеток) в гиппокампе через неделю после 14 (14+7) и 21 (21+7) АСП. Стрелки указывают на *GluR2*-иммунопозитивные клетки. Масштаб: 50 мкм. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней. * - достоверные различия при $p < 0.05$ naïve vs 14+7, 21+7.

Влияние пифитрина- α на процессы нейрогенеза и дифференцировки

Показанное нами усиление aberrантного нейрогенеза при развитии рефлекторной эпилепсии, усугубляющееся при моделировании височной эпилепсии, а также усиление апоптотической гибели клеток, очевидно, является одной из причин развития этого патологического состояния. В связи с этим представляется важным поиск новых подходов для подавления этих процессов (апоптоза и дифференцировки). Возможным кандидатом для решения этой задачи является полифункциональный белок p53. Он не только является регулятором клеточного цикла, но и участвует в процессах пролиферации и дифференцировки (Komarova et al., 1997; Luo et al., 2009). Пифитрин- α – это низкомолекулярный ингибитор p53. Было показано, что ингибирование p53 при судорожной активности (4 АСП) приводило к повышению пролиферации в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины. Однако пифитрин- α вызывал снижение числа дифференцированных клеток в хилусе через неделю после окончания припадков (Рис.17 А, Б, Д). Уменьшение числа дифференцированных нейронов в хилусе позволяет рассматривать пифитрин- α как потенциальный терапевтический агент для коррекции нарушений при эпилепсии (Рис. 17 В, Г, Д).

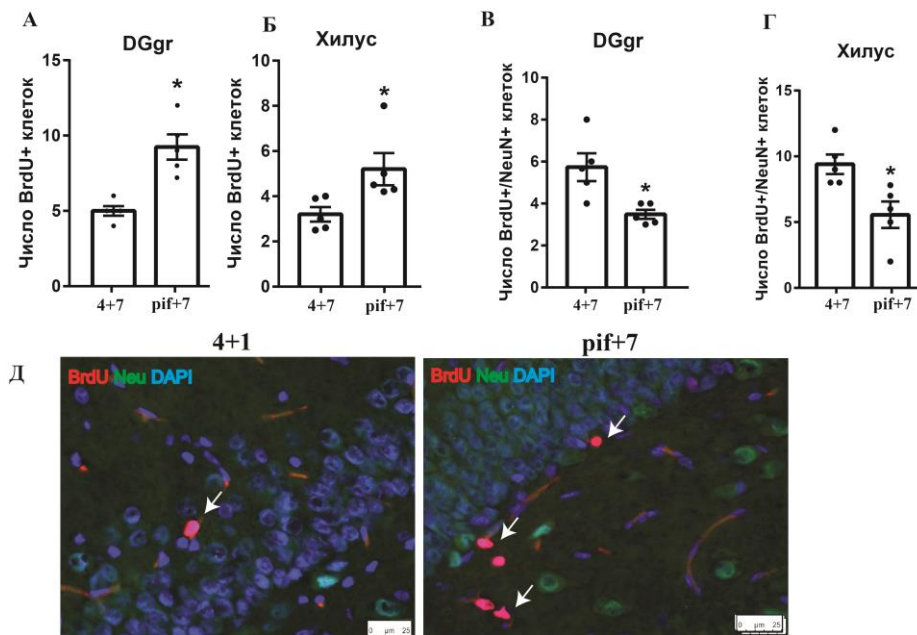


Рис.17. Анализ пролиферации и дифференцировки в гиппокампе зоне при введении пифитрина- α . А, Б – число BrdU+ клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (А) и в хилусе (Б). В, Г – число нейронов с BrdU-меткой, и экспрессирующих NeuN, в гранулярном слое (В) и в хилусе (Г). Д – иммунофлуоресцентное выявление BrdU (красный), NeuN (зеленый) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине. Ядра окрашены DAPI (синий). Стрелки указывают на BrdU-позитивные клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У наивных крыс линии КМ показано, что нижние бугры четверохолмия и гиппокамп претерпевают схожие нарушения в ходе постнатального развития: повышение пролиферации, апоптоза и пониженное число клеток по сравнению с крысами линии Вистар. Таким образом, формирование этих отделов у крыс линии КМ продолжается дольше, чем у крыс линии Вистар. Показано, что формирование нижних бугров заканчивается в месячном возрасте, а формирование гиппокампа продолжается в течение двух месяцев. Возможным механизмом усиления пролиферации и апоптоза у крыс КМ является активация ERK1/2 киназ, которая наблюдается в различных отделах гиппокампа крыс линии КМ в первые месяцы жизни. У крыс КМ в ходе постнатального развития повышен уровень aberrантной миграции новообразованных клеток в хилус и их дифференцировка по глутаматергическому типу. Так же aberrантный нейрогенез наблюдается у взрослых интактных крыс линии КМ со сформированной рефлекторной эпилепсией.

Таким образом, мы предполагаем, что задержка развития нижних бугров четверохолмия и гиппокампа способствует повышению судорожной готовности и может вносить вклад в формирование рефлекторной эпилепсии. Генетически детерминированный aberrантный нейрогенез, сопровождающийся формированием aberrантных связей и возникновением гипервозбуждения в гиппокампе у крыс линии КМ является, возможно, одним из паталогических процессов приводящих к развитию генерализованной эпилептиформной активности.

При помощи аудиогенного киндлинга у крыс линии КМ удалось смоделировать вовлечение лимбической системы в эпилептическую сеть. Мы показали, что в процессе киндлинга у крыс КМ возникает новый тип припадков - посттонические судороги. Проявление, продолжительность и тяжесть этих припадков коррелирует с обнаруженными в настоящей работе изменениями в нейрохимическом и морфологическом паттерне взаимодействия клеточных элементов НБЧ и гиппокампа.

Одновременно с распространением эпилептической активности в новые области (передний мозг) при моделировании височной эпилепсии, в нижних буграх четверохолмия также были выявлены структурные изменения. На ранних этапах моделирования эпилепсии в нижних буграх показана активация процессов апоптоза и пролиферации, хотя в норме для этой структуры

нехарактерно наличие постнатального нейрогенеза. Пролиферация в нижних буграх может носить компенсаторный характер.

В ходе моделирования височной эпилепсии у крыс линии КМ в гиппокампе происходит усиление уже существующей aberrантной миграции новообразованных клеток в хилус и их дифференцировки в глутаматергические нейроны. Повторные АСП и посттонические судороги приводят к усилению экспрессии маркера дендритных шипиков синаптоподина и к разрастанию мшистых волокон в гиппокампе, что свидетельствует об увеличении плотности синаптических контактов между гранулярными, мшистыми клетками и пирамидными нейронами поля СА4/3. Полученные данные позволяют заключить, что обнаруженная реорганизация сетей гиппокампа является одной из причин возникновения и дальнейшего распространения эпилептической активности.

Одновременно с процессами пролиферации и образованием новых связей в гиппокампе крыс линии КМ выявлены нейродегенеративные процессы. Полученные в работе данные свидетельствуют, что в зубчатой извилине наблюдается 2 волны клеточной гибели. Первая волна апоптотической гибели клеток происходит после 7 АСП на ранней стадии развития височной эпилепсии р53-зависимым и митохондриальным путями. Однако после недели покоя наблюдается восстановление числа клеток в зубчатой извилине, которое очевидно связано с активацией нейрогенеза. На поздних стадиях формирования височной эпилепсии показана массовая гибель нейронов в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины. В хилусе наиболее уязвимыми к аудиогенным судорогам нейронами оказались мшистые клетки. Пирамидные нейроны поля СА4 при действии аудиогенных судорог не погибают. Возможно, это связано с активацией аутофагии в этой области, которая оказывает нейропротекторное действие. Нейродегенерация в гранулярном слое и в хилусе зубчатой извилины после второй волны клеточной гибели является необратимой – даже после периода покоя восстановления числа клеток не происходит.

Аберрантная миграция гранулярных клеток в хилус и их быстрое созревание является одним из возможных механизмов, проводящих к повышению судорожной активности в гиппокампе. Для коррекции данных нарушений был использован пифитрин-α - блокатор белка р53, который участвует в регуляции клеточного цикла, играя важную роль в процессах дифференцировки, пролиферации и апоптоза. Внутривентрикулярное введение пифитрин-α крысам КМ на начальной стадии формирования височной эпилепсии приводило к снижению числа дифференцированных клеток в хилусе. Уменьшение aberrантного нейрогенеза, приводящего к формированию аномальных гипервозбудимых нейрональных связей при эпилепсии, позволяет рассматривать пифитрин-α как потенциальный терапевтический агент для коррекции структурных нарушений гиппокампа.



Рис.18 Схема, отображающая особенности развития нижних бугров четверохолмия в ходе формирования рефлексорной эпилепсии и механизмы структурной реорганизации в ходе формирования височной эпилепсии. Стрелки указывают на направленность изменений.

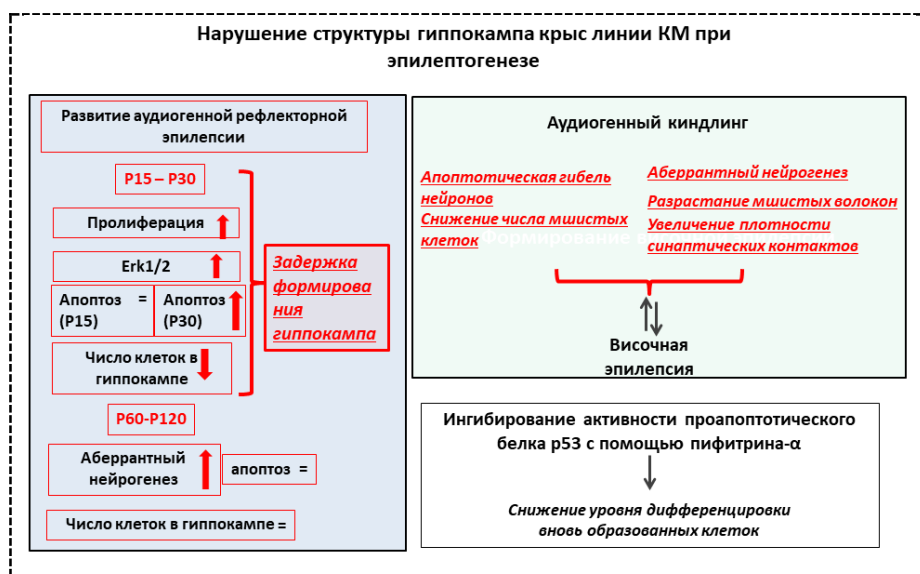


Рис.19 Схема,отображающая особенности формирования гиппокампа в ходе формирования рефлексорной эпилепсии и механизмы структурной реорганизации в ходе формирования височной эпилепсии. Стрелки указывают на направленность изменений.

ВЫВОДЫ

1. В дорсальном гиппокампе и в нижних буграх четверохолмия крыс линии КМ в ходе формирования рефлексорной эпилепсии в первые месяцы жизни, несмотря на повышенный уровень апоптоза, пролиферации и дифференцировки нейронов, наблюдается меньшее число клеток, чем у крыс линии Вистар, что свидетельствует о задержке формирования этих отделов мозга.
2. В процессе развития крыс линии КМ наблюдается повышенная аберрантная миграция вновь образованных клеток в хилус и их дифференцировка по глутаматергическому типу, сохраняющаяся у взрослых животных со сформированной рефлексорной эпилепсией. Таким образом, аберрантный нейрогенез у наивных крыс линии КМ носит генетически детерминированный характер.
3. При моделировании височной эпилепсии происходит дальнейшее повышение аберрантной миграции вновь образованных клеток в хилус и их дифференцировка по глутаматергическому пути, а также усиление ветвления мышечных волокон и увеличение содержания маркера шипикового аппарата синаптоподина в дендритных полях гиппокампа, что свидетельствует о реорганизации нейрональных связей.
4. На ранней стадии развития височной эпилепсии показана апоптотическая гибель нейронов, активируемая p53-зависимым и митохондриальным путями. После недели покоя наблюдается восстановление числа клеток в зубчатой извилине, которое связано с активацией нейрогенеза и нейропротекторным действием аутофагии. На поздних стадиях моделирования височной эпилепсии показана массовая гибель нейронов и при этом после периода покоя восстановления числа клеток не происходит.
5. На ранней стадия моделирования височной эпилепсии внутрибрюшинное введение химического ингибитора белка p53 пифитрин-α приводит к подавлению дифференцировки вновь образованных клеток по глутаматергическому типу.
6. Нарушения структуры гиппокампа у крыс линии КМ генетически детерминированы, проявляются в ходе постнатального развития и способствуют развитию генерализованных лимбических судорог.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

- 1) Chernigovskaya E. V. Dorofeeva, N. A., Nasluzova, E. V., **Kulikov, A. A.**, Ovsyannikova, V. V., & Glazova, M. V. Apoptosis and proliferation in the inferior colliculus during postnatal development and

epileptogenesis in audiogenic Krushinsky–Molodkina rats //Epilepsy & Behavior. – 2018. – Т. 88. – С. 227-234.

2) Chernigovskaya, E.V., Korotkov, A.A., Dorofeeva, N.A., Gorbacheva, E.L., **Kulikov, A.A.**, Glazova, M.V. Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with overactivation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling //Epilepsy & Behavior. – 2019. – Т. 99. – С. 106494.

3) **Kulikov A. A.**, Dorofeeva, N. A., Naumova, A. A., Harbachova, E. L., Glazova, M. V., & Chernigovskaya, E. V. Impaired postnatal development of the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to audiogenic seizures //Epilepsy & Behavior. – 2020. – Т. 113. – С. 107526.

4) **Куликов А. А.**, Наслузова, Е. В., Дорофеева, Н. А., Глазова, М. В., Лаврова, Е. А., & Черниговская, Е. В. Пифитрин-альфа тормозит дифференцировку вновь образованных клеток субгранулярной зоны зубчатой извилины у крыс линии Крушинского–Молодкиной при аудиогенном киндлинге //Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2021. – Т. 107. – №. 3. – С. 332-351.

5) **Kulikov A. A.**, Naumova, A. A., Aleksandrova, E. P., Glazova, M. V., & Chernigovskaya, E. V. Audiogenic kindling stimulates aberrant neurogenesis, synaptopodin expression, and mossy fiber sprouting in the hippocampus of rats genetically prone to audiogenic seizures //Epilepsy & Behavior. – 2021. – Т. 125. – С. 108445.

6) **Kulikov A. A.**, Naumova, A. A., Dorofeeva, N. A., Ivlev, A. P., Glazova, M. V., & Chernigovskaya, E. V. Dynamics of neurodegeneration in the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats correlates with the progression of limbic seizures //Epilepsy & Behavior. – 2022. – Т. 134. – С. 108846.

Тезисы докладов:

1) **Куликов АА**, Глазова МВ, Черниговская ЕВ. Апоптоз нейронов у крыс линии Крушинского-Молодкиной в ходе формирования эпилептиформной активности / XXII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова(18.09-22.09) (Воронеж, 2017) с. 543-545.;

2) Черниговская ЕВ, Наслузова ЕВ, **Куликов АА**, Дорофеева НА, Овсянникова ВВ, Горбачёва ЕЛ, Глазова МВ. Морфофункциональная характеристика нижних бугров четверохолмия при эпилептогенезе / Международная конференция «Психофизиология и психонейроэндокринология»(23.05-26.05) (Ставрополь, 2018) с.

3) **Куликов АА**, Наслузова ЕВ, Березовская АС, Глазова МВ, Черниговская ЕВ. Механизмы нейродегенерации у крыс линии Крушинского-Молодкиной / IV Всероссийская конференция с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология»(25.06-29.06) (Пушино, 2018) с. 110.

4) **Kulikov АА**, Chernigovskaya EV, Glazova MV. Apoptosis and autophagy in the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats during epileptogenesis / 2nd Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists(14.11-16.11) (Milan, 2019) с.

5) **Куликов АА**, Ивлев АП, Александрова ЕП, Глазова МВ, Черниговская ЕВ. Механизмы формирования нарушений функциональных связей гиппокампа на модели лимбической эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной / Материалы I онлайн-конференции и школы с международным участием «ЭПИЛЕПСИЯ: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ НАУКИ К ПРАКТИКЕ»(12.12-13.12) (Онлайн конференция, 2020) с. 73-75.

6) Черниговская ЕВ, **Куликов АА**, Дорофеева НА, Наумова АА, Глазова МВ. Структурная реорганизация гиппокампа крыс линии Крушинского–Молодкиной при эпилептогенезе / Ж эвол биохим и физиол 56(7): 709-709,

7) **Куликов АА**, Глазова МВ, Горбачёва ЕЛ, Черниговская ЕВ. Анализ апоптоза и аутофагии в гиппокампе крыс линии крушинского-молодкиной в ходе формирования лимбической эпилепсии / XVI Всеросс. совещание с междунар. участием и IX школа по эволюционной физиологии, посвящ. памяти акад. Л.А. Орбели(19.10-22.10) (Санкт-Петербург, 2020) с. 771.

8) **Куликов АА**, Дорофеева НА, Глазова МВ, Лаврова ЕА, Черниговская ЕВ. Влияние p53 на дифференцировку вновь образованных клеток зубчатой извилины при аудиогенном киндлинге / XXV научная школа-конференция молодых ученых по физиологии и высшей нервной деятельности и нейрофизиологии(27.10-28.10) (Онлайн конференция, 2021) с. 243-247.

9) **Kulikov АА**, Aleksandrova EP, Glazova MV, Chernigovskaya EV. Audiogenic kindling leads to impairments in structures of the hippocampus / 1 St Esn Virtual Conference “Future Perspectives For European Neurochemistry – A Young Scientist’s Conference”(25.05-26.05) (Онлайн конференция, 2021) с. 44.

10) **Куликов АА**, Глазова МВ, Александрова ЕП, Черниговская ЕВ. Mechanisms Of Structural Reorganization Of The Hippocampus And Inferior Colliculi During Epileptogenesis In Krushinsky-Molodkina Rats / RUSNEUROCHEM 2022(22.05-24.05) (Санкт-Петербург, 2022) с