

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**

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

1.5.5 – Физиология человека и животных

Научный руководитель:

д.б.н., г.н.с. Черниговская Елена Валерьевна

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2023

## Оглавление

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	11
1.1 Крысы линии Крушинского-Молодкиной .....	11
1.2 Киндлинг.....	13
1.3 Роль нижних бугров четверохолмия в аудиогенной эпилепсии .....	17
1.4 Развитие гиппокампальной формации.....	18
1.5 Нейрогенез взрослого мозга .....	20
1.6 Образование нейрональных связей.....	21
1.7 Нейрогенез при эпилепсии.....	22
1.8 Перестройки нейрональных связей при эпилепсии. ....	23
1.9 Нейрогенез как потенциальная мишень лечения эпилепсии .....	25
1.10 p53 в нейрогенезе.....	25
1.11 Пифитрин- $\alpha$ .....	26
1.12 Апоптоз.....	27
1.12.1 Морфологические изменения, происходящие при апоптозе. ....	27
1.12.2 Пути запуска апоптоза.....	29
1.12.3 Каспазы .....	31
1.12.4 Каспаза 3 при эпилепсии .....	33
1.13 Нейропротекция.....	34
1.14 Аутофагия.....	34
1.14.1 Аутофагия в нервной системе.....	37
1.14.2 Аутофагия при эпилепсии.....	38
1.15 Нейродегенерация при эпилепсии и в моделях заболевания .....	39
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	41
2.1 Животные.....	41
2.2 Поведенческий анализ АСП. ....	44
2.3 Обработка материала.....	45
2.4 Иммуногистохимический метод .....	47
2.5 Метод TUNEL .....	48
2.6 Timm окрашивание .....	48
2.7 Вестерн-блот анализ .....	49
2.8 Анализ срезов, вестерн-блотов и статистический анализ данных .....	51
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	52

3.1	Аудиогенная эпилепсия .....	52
3.1.1	Развитие нижних бугров четверохолмия .....	52
3.1.2	Развитие гиппокампа .....	56
3.1.2.1	Активность ERK1/2 киназы в гиппокампе крыс линии КМ и Вистар.....	56
3.1.2.2	Нейрогенез и апоптоз в гиппокампе у крыс линии КМ и Вистар .....	60
3.2	Модель височной эпилепсии .....	75
3.2.1	Поведенческие особенности аудиогенных судорожных припадков крыс КМ в ходе моделирования лимбических судорог. ....	75
3.2.2	Структурные нарушения нижних бугров на ранней стадии формирования височной эпилепсии.....	77
3.2.3	Структурные нарушения гиппокампа на разных стадиях моделирования височной эпилепсии.....	79
3.2.3.1	Нейрогенез и дифференцировка в гиппокампе на разных стадиях моделирования височной эпилепсии .....	79
3.2.3.2	Экспрессия синаптоподина и ветвление мшистых волокон при аудиогенном киндлинге.....	89
3.2.3.3	Апоптоз и аутофагия на разных стадиях аудиогенного киндлинга .....	92
3.3	Влияние пифитрина- $\alpha$ на процессы нейрогенеза, дифференцировки, апоптоза и аутофагии.....	108
<b>Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>		<b>114</b>
4.1	Аудиогенная эпилепсия .....	114
4.2	Модель височной эпилепсии (аудиогенный киндлинг).....	118
4.3	Структурные нарушения нижних бугров четверохолмия при аудиогенном киндлинге .....	118
4.4	Аберрантный нейрогенез в ходе аудиогенного киндлинга .....	119
4.5	Перестройки нейрональной сети.....	121
4.6	Апоптоз и аутофагия в гиппокампе .....	123
4.7	Гибель мшистых клеток после АСП.....	127
4.8	Пифитрин- $\alpha$ .....	128
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>		<b>130</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>		<b>134</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>		<b>135</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2

BrdU – бромдезоксисуридин

CA 1-3 - Cornu Ammonis areas 1-3

Casp3 – Каспаза 3

Casp8 – Каспаза 8

Casp9 – Каспаза 9

CIC - центральное ядро нижнего двухолмия

DCX – даблкортин (doublecortin)

ERK1/2 – экстраклеточно сигнал-регулируемая киназа (extracellular signal-regulated kinase1/2);

GAPDH– глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GASH/Sal - The Genetic Audiogenic Seizure Hamster from Salamanca

GEPR –Genetically epilepsy-prone rat;

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein)

IC – нижнее двухолмие

i.p. – внутрибрюшинная инъекция

LC3B - Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 B

NeuN – нейронспецифичный ядерный антиген (neuronal nuclei)

P – постнатальный день

SGZ- субгранулярный слой зубчатой извилины

SP- Stratum pyramidale ,

SR- stratum radiatum

SVZ – субветрикулярная зона

TNF – Tumour Necrosis Factor

TUNEL – Terminal dUTP Nick End-Labeling

Vglut1/2 – везикулярный транспортер глутамата 1/2 (vesicular glutamate transporter 1/2);

WAR – Wistar audiogenic rat

АК – аудиогенный киндлинг

АСП – аудиогенный судорожный припадок;

АЭ – аудиогенная эпилепсия

ГАМК - гамма-аминомасляная кислота

ГК – гранулярные клетки

нГК – нормотопические гранулярные клетки

эГК – эктопические гранулярные клетки

ДМСО (DMSO) – диметилсульфоксид

КМ – крысы линии Крушинского-Молодкиной;

МВ – мшистые волокна

МК – мшистые клетки

НСК - нейрональных стволовых клеток.

ЭС – эпилептический статус

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Эпилепсия является одним из самых распространенных неврологических заболеваний. В среднем до 5% людей в течение своей жизни перенесли хотя бы один эпилептический припадок (Sirven, 2015). 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 ответ на стимуляцию происходит активация определенных триггерных структур (нижние бугры четверохолмия (IC), гиппокамп, зрительная кора и др) (Okudan and Özkara, 2018; Wolf, 2017). Известно, что при эпилепсии происходит нарушение нейротрансмиссии, перестройки в нейрональных сетях и структурные повреждения различных отделов мозга (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 эпилепсии являются аудиогенно-чувствительные крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ), отвечающие развернутым клонико-тоническим припадком на звуковую стимуляцию (Poletaeva et al., 2017; Semiokhina et al., 2006). Первые аудиогенные стимулы вызывают у этих животных рефлекторные судороги, сходные по механизму их инициации с характерными для рефлекторной эпилепсии человека. Судорожная активность при этом возникает в стволовых отделах мозга (Faingold, 1999; Faingold, 2004). IC является критической структурой, осуществляющей инициацию и распространение аудиогенного судорожного припадка (АСП). Гиппокамп первоначально не участвует в реализации аудиогенных судорог, но играет важную роль в дальнейшем распространении судорожной активности (Kim and Kim, 1962).

В настоящее время исследования в основном направлены на изучение патогенеза эпилепсии и связанных с этой болезнью структурных нарушений гиппокампа, таких как склероз гиппокампа, aberrатный нейрогенез и спрутинг мшистых волокон (МВ). Ранее были выявлены особенности работы глутаматергических нейронов гиппокампа у наивных крыс КМ (Chernigovskaya et al., 2019), что позволило нам предположить существование нарушения структуры гиппокампа крыс линии КМ в ходе онтогенеза, вносящие вклад в развитие рефлекторной эпилепсии. Хотя в реализации аудиогенного припадка у грызунов на начальных этапах развития рефлекторной эпилепсии в первую очередь принимают

участие нижние бугры четверохолмия, еще меньше известно об особенностях их развития и структуры. Судорожная готовность у крыс КМ развивается в течение первых трех месяцев жизни (Fedotova and Semiokhina, 2002). Особенности формирования аудиогенной рефлекторной эпилепсии у крыс линии КМ в ходе постнатального онтогенеза (Poletaeva et al., 2017) делают этих животных адекватной моделью для исследования механизмов аберрантного нейрогенеза, апоптоза и аутофагии в гиппокампе и в нижних буграх четверохолмия как причины эпилепсии и определения их функционального значения для эпилептогенеза. Патологоанатомические исследования показали наличие аберрантного нейрогенеза и нейродегенеративных повреждений в гиппокампе людей больных эпилепсией. Аналогичные нарушения были выявлены и в мозгу эпилептизированных животных. Однако данных о механизмах нарушений структуры гиппокампа при моделировании лимбических судорог, полученных на животных с генетически обусловленной аудиогенной судорожной активностью, практически нет. При многократных аудиогенных припадках эпилептиформная активность захватывает лимбическую систему мозга и кору (García-Cairasco et al., 2017), о чем свидетельствует возникновение новой фазы судорожного припадка (миоклонуса/пост-клонуса) и регистрация электрофизиологических показателей коры (Vinogradova, 2017), гиппокампа и амигдалы (Hirsch et al., 1997). Аудиогенно-чувствительные крысы, у которых проявились посттонические судороги, могут служить адекватной моделью височной эпилепсии человека (Dutra Moraes et al., 2000). Использование модели аудиогенного киндлинга различной продолжительности позволяет изучать этапы формирования височной (лимбической) эпилепсии и механизмы структурной реорганизации гиппокампа и нижних бугров четверохолмия в ходе эпилептогенеза. Поскольку при использовании этой модели эпилептических состояний не происходит нарушений в активности мозга, которые могут возникать при введении химических агентов, выявляемые нарушения наиболее точно отражают картину подобного состояния при эпилептогенезе у человека.

**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 гиппокаме при моделировании височной эпилепсии
- исследование возможности использования блокатора белка p53 пифитрин- $\alpha$  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. У крыс с аудиогенной эпилепсией в процессе проявления рефлекторной эпилепсии показаны нарушения в развитии гиппокампа, которые 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 p53-зависимым и митохондриальным путями, а также после периода покоя наблюдается активация аутофагии. На поздних стадиях формирования височной эпилепсии показана значительная гибель нейронов, 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 p53 пифитрин- $\alpha$  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 является аберрантный нейрогенез и



нейродегенерация. Была продемонстрирована возможность использования ингибитора белка р53 пифитрин- $\alpha$  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 по сравнению с крысами линии Вистар развития нижних бугров четверохолмия и дорсального гиппокампа.
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 пост-тонических судорог как модели височной эпилепсии наблюдается устойчивая нейродегенерация гиппокампа.
5. Пифитрин- $\alpha$  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 ассамблеи для молодых нейробиологов BraUn-2019 (Милан, 2019); I онлайн-конференции и школе с международным участием “Эпилепсия: от фундаментальной науки к практике” (Онлайн конференция, 2020); XVI Всероссийском совещание 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); 29ой международной конференции “Stress and Behavior” (Ереван, 2023)

**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 журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, остальные – тезисы докладов и другие печатные материалы.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 157 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 64 рисунками и 3 таблицами.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Крысы линии Крушинского-Молодкиной

Линия крыс Крушинского-Молодкиной (КМ) была выведена Крушинским Л.В, Молодкиной Л.Н и Флессом Д.А. на основе линии Вистар путем селекции крыс, чувствительных к звуку и проявляющих затяжное двигательное возбуждение (Крушинский, 1960). Через несколько поколений после начала селекции число крыс, реагирующих на звуковой стимул судорожным припадком, резко возросло. В настоящее время у 99% крыс обнаруживаются судорожные припадки в ответ на звук (Семиохина и др., 2006). В первый месяц после рождения крысы не дают стабильного припадка; в возрасте двух месяцев, в ответ на звуковой стимул, у животных обычно наблюдается только клонический припадок. Стабильный уровень чувствительности к звуку устанавливается только к трем месяцам (Семиохина и др., 2006).

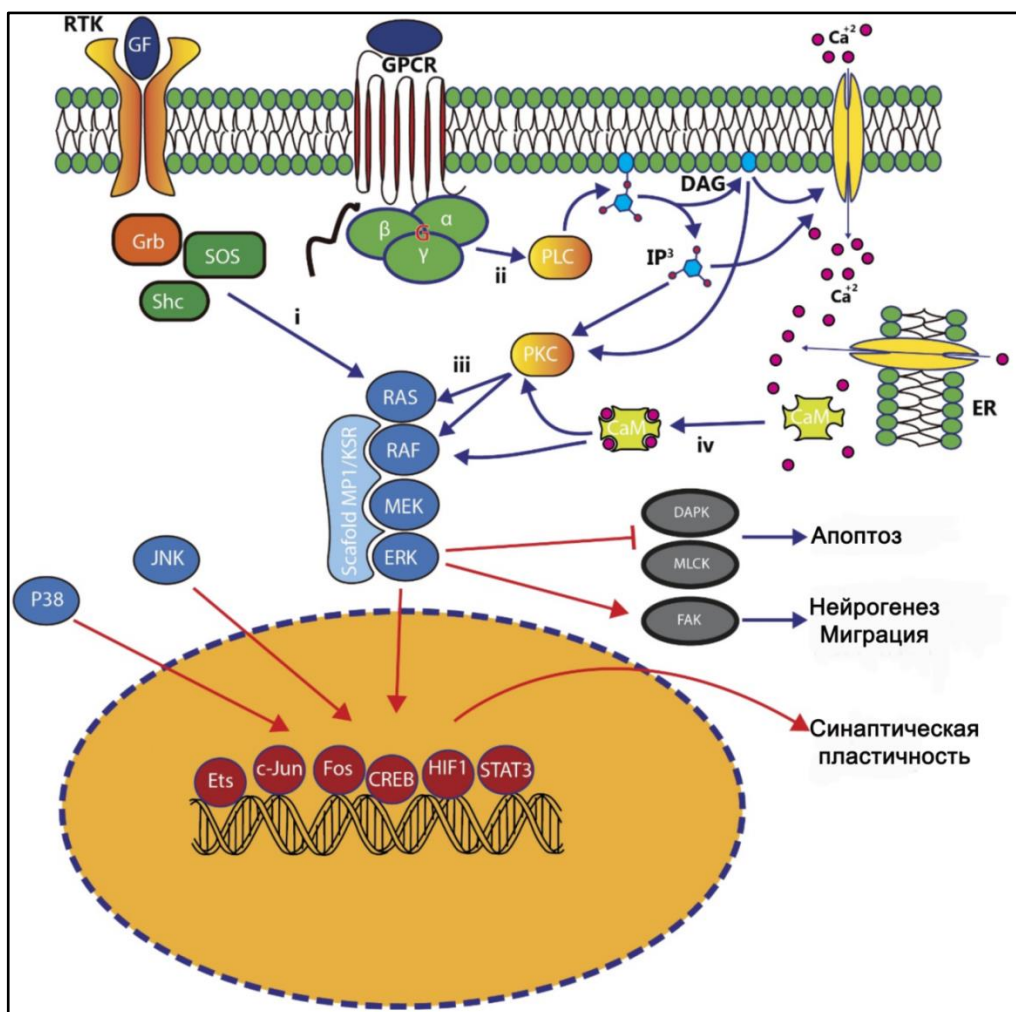
Крысы линии КМ являются моделью рефлекторной эпилепсии. Для рефлекторной эпилепсии характерно наличие стимула (акустический, визуальный), инициирующего развитие судорожного припадка. Реакция крыс на звук проявляется клонико-тоническим судорожным припадком, начальная фаза которого -(фаза «дикого» бега)) который может протекать в виде одной или двух «волн» двигательного возбуждения, разделенных тормозной фазой. После окончания судорог у крыс развивается каталепсия, характеризующаяся «восковой гибкостью» мышц тела и полной арефлексией (Семиохина и др., 2006). При анализе судорожного припадка Л.В. Крушинский предположил, что в основе судорожных припадков лежит генетически детерминированное нарушение соотношения процессов торможения и возбуждения (Крушинский, 1960). Ключевой структурой генеза аудиогенных судорог является нижнее двухолмие, которое инициирует судорожный ответ и развитие начального двигательного возбуждения (дикого бега) в моделях аудиогенной эпилепсии (Ватаев и др., 2014; Семиохина и др., 2006). При ежедневном предъявлении звукового сигнала, вызывающего припадок, постепенно (на 14-й –18-й день) у крыс формируется «миоклонический гиперкинез» и посттонический клонус (пост-клонус)– тикоподобные подергивания конечностей, туловища и прыжки, таким образом это приводит к возникновению аудиогенного киндлинга, являющегося моделью височной эпилепсии. В текущей работе термин аудиогенный киндлинг используется не только как результат возникновения миоклонуса, но как процедура предъявления звукового сигнала. Как показала ЭЭГ, в основе этих судорог лежит возбуждение, возникающее в новой коре и гиппокампе (Семиохина и др., 2006). То есть, при повторяющихся судорогах появляются новые очаги спайковой (синхронизирующей) активности в мозге, поэтому крысы линии КМ, подвергнутых процедуре АК, используют в

качестве модели височной эпилепсии. Действие сильного звука вызывает у крыс не только судорожный припадок с каталепсией и пост-клонус, но и острое нарушения мозгового кровообращения и ишемию (Крушинский и др., 1989).

Также у крыс линии КМ наблюдается повышенная чувствительность к агентам, вызывающим судороги разного генеза: камфорное масло, пилокарпин, пентилентетразол, электрошок (Ватаев, 2019). А обонятельная стимуляция, наоборот приводит к противосудорожному действию (Полетаева и др., 2019)

В ходе генетического анализа и диаллельного скрещивания выяснилось, что аудиогенная эпилепсия полигенное заболевание. Доминантными являются аллели генов, которые определяют нечувствительность к звуку (Романова и др., 1976). Транскриптомный анализ ткани четверохолмия крыс линии КМ показал повышенную экспрессию генов, вовлеченных в активацию MAP-киназного каскада и генов апоптоза. (Chuvakova et al., 2021). Вовлеченность MAPK каскада в генез эпилептических припадков подтверждается тем, что у 2- и 4-месячных крыс КМ в нижних буграх четверохолмия показано повышенное количество ERK1/2-иммунореактивных нейронов (Chernigovskaya et al., 2017). Введение ингибитора ERK1/2 SL 327 приводило к отмене аудиогенных судорог, эффект был дозозависимым и коррелировал с активностью ERK1/2 киназ (Glazova et al., 2015).

Нейрональные стволовые клетки, выделенные из гиппокампа эмбрионов крыс линии КМ, в основном дифференцируются в глутаматергические нейроны. При стимулировании дифференцировки по глутаматергическому типу, в нейрональных стволовых клетках (НСК) крыс КМ наблюдался запуск ERK1/2-сигнального и Akt-каскадов (Naumova et al., 2020). Это дополнительно свидетельствует о генетических нарушениях ERK1/2-сигнального каскада у крыс КМ и его возможное значения для формирования аудиогенной эпилепсии.

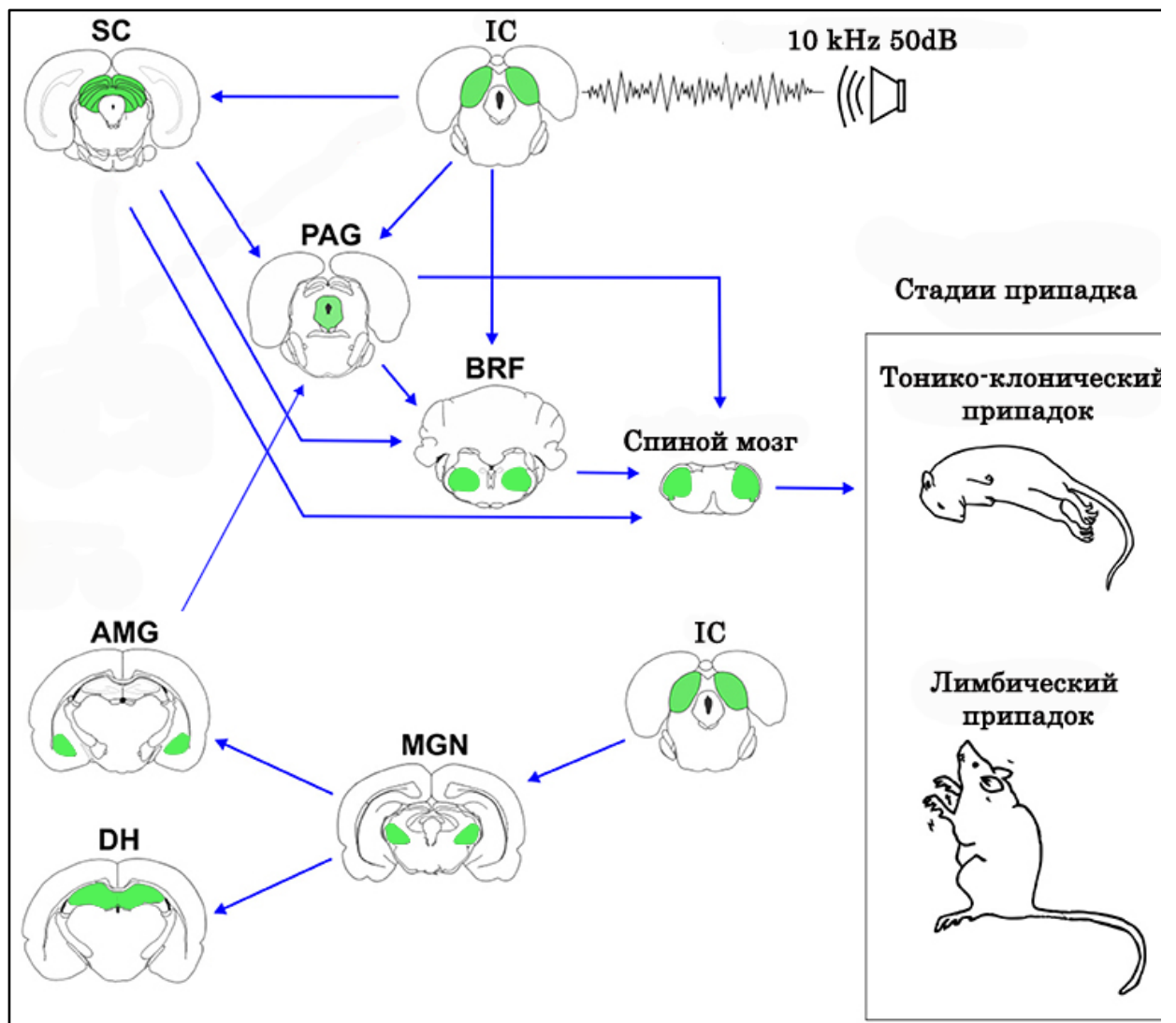


**Рисунок 1.** ERK1/2 сигнальный каскад. ERK может активироваться двумя основными рецепторами, рецепторной тирозинкиназой (RTK) (i) или рецептором, связанным с G-белком (GPCR) (ii). Кроме того, ERK1/2 может быть активирован через протеинкиназу C (PKC) (iii) или кальций-кальмодулин (CaM) (iv). Фосфорилирование ERK1/2 киназы приводит к активации генов, отвечающих за пролиферацию, дифференцировку и синаптическую пластичность. В цитоплазме ERK1/2 приводит к фосфорилированию белков участвующих в апоптозе, нейрогенезе и миграции. Схема на основе Albert-Gascó et al., 2020.

## 1.2 Киндлинг

Киндлинг используется в качестве модели развития (эпилептогенеза) височной эпилепсии человека. Киндлинг приводит к вовлечению в эпилептическую сеть корковых и подкорковых центров. Сама процедура киндлинга представляет собой повторяющиеся эпилептогенные стимуляции, которые постепенно ведут к изменению фенотипического проявления судорог. В классической модели киндлинга - электрическом киндлинге - используются подпороговые стимуляции лимбических структур, при аудиогенном киндлинге (АК) используется интенсивная звуковая стимуляция, дающая максимальный припадок с клонико-тонической судорогой (Виноградова, 2014; Семиохина и др., 2006).

Впервые АК был описан у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ) в 60-е годы прошлого столетия. Так, у крыс линии КМ после 14 ежедневных аудиогенных судорог возникали тикоподобные движения мышц, головы и конечностей (Семиохина, Федотова, Полетаева, 2006). Далее подобное явление было описано на крысах линии Вистар инбредных по аудиогенным судорогам (Wistar rats inbred for AS in Strasbourg) и получило название «аудиогенный киндлинг» (Vinogradova, 2017). Зоной, отвечающей за начальную синхронизацию эпилептического припадка у крыс, подверженных аудиогенной эпилепсии, являются нижние бугры четверохолмия. У этих крыс наблюдается дефицит ГАМК-ергического торможения в ядрах ствола мозга (Faingold, 2002). Эфферентные нисходящие структуры - ретикулярная формация и околотоводопроводное серое вещество принимают участие в проявлении моторных компонентов судорог (Faingold, 2002). В формировании генерализованных припадков при АК принимает участие таламоамигдолярный путь (Feng, Faingold, 2002). Именно миндалевидное тело (играет критическую роль в формировании АК. Припадки могут быть заблокированы инактивацией амигдалы (Vinogradova, 2017). В процессе АК амигдала претерпевает схожие изменения в пластичности, как и при электрическом киндлинге (Vinogradova, 2017). Главным преимуществом этой модели развития височной эпилепсии является использование сенсорных стимуляций для индукции повторяющихся припадков. Это исключает возможный эффект от имплантации электродов и усиливает роль эндогенных факторов, ведущих к формированию эпилепсии. Исследования АК показали, что эту модель можно использовать для тестирования противозепилептической активности лекарств на различных типах судорог (Vinogradova, 2017).



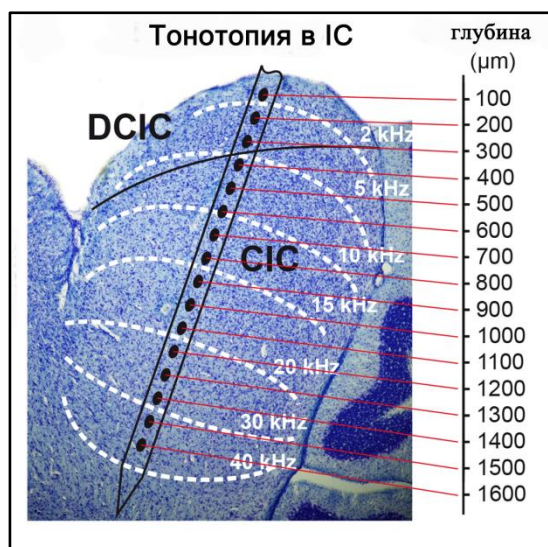
**Рисунок 2.** Нейронная сеть, вовлеченная в реализацию одиночного и множественных (аудиогенный киндлинг) аудиогенных припадков. Нижнее двухолмие является основной структурной ствола мозга вовлеченной в восприятие звука и является триггерной структурой для аудиогенных припадков. Нижнее двухолмие имеет множество проекций в другие структуры ствола мозга: верхнее двухолмие, околосредовое серое вещество и ретикулярную формацию. Эта нейронная сеть имеет большое значение для проявления острого аудиогенного припадка. Стадия «дикого бега» зависит от активации глубоких слоев верхнего двухолмия, клонико-тоническая фаза связана с возбуждением околосредового вещества и ретикулярной формации и распространением этого возбуждения по спиноному мозгу. При аудиогенном киндлинге припадки приводят к вовлечению структур лимбической системы в эпилептическую сеть. При множественных судорогах в эпилептическую сеть через проекции нижнего двухолмия вовлекается медиальное колленчатое тело, которое имеет проекции в амигдалу и дорсальный гиппокамп. Эта лимбико-стволовая сеть имеет большое значения для формирования лимбических припадков у животных, подвергнутых АК. IC – нижнее двухолмие, SC – верхнее двухолмие, PAG - околосредовое серое вещество, BRF – ретикулярная формация ствола

*мозга, AMG – миндалевидное тело, MGN – медиальное коленчатое тело, DH – дорсальный гиппокамп. Адаптировано по Lazarini-Lopes et al., 2021.*

У крыс в процессе киндлинга может наблюдаться 2 фенотипа лимбических припадков. Это лимбический клонус, который проявляется в виде судорог головы и передних конечностей, и посттонический клонус, представляющий собой клонические судороги всех конечностей (Merrill et al., 2005). Первый тип судорог возникает у крыс с низкой и средней восприимчивостью к аудиогенным припадкам. Это крысы линий GEPR-3 (Genetically epilepsy prone rats), которая была выведена в 50-х годах XX-го века в Аризонском университете (США) на основе линии Спрэг–Дуули, и линия WAR (Wistar audiogenic rats) - относительно молодой линии, выведенной на основе линии Вистар в Сан Пауло (Garbuz et al., 2022; Garcia-Cairasco et al., 2017). У этих крыс однократный аудиогенный припадок представлен в виде дикого бега и клонических или клонико-тонических судорог, тяжесть которых в ходе АК падает (Garcia-Cairasco et al., 1996; Merrill et al., 2005). Во время АК у этих крыс продолжительность и интенсивность лимбического клонуса увеличивается, проходя стадии, описанные для электрического киндлинга (Racine, 1972). Также у крыс с низкой/средней восприимчивостью к аудиогенным припадкам наблюдается 2 паттерна развития киндлинга: у части животных лимбический припадок развивается неполностью (2-я стадия по шкале Racine), а у другой части припадок достигает 5-й конечной стадии (Vinogradova, 2017). Пост-клонус возникает у крыс с высокой восприимчивостью к аудиогенным припадкам. Это крысы линии КМ и GEPR-9, у которых однократный аудиогенный эпилептический приступ представляет собой полную клонико-тонический припадок и его тяжесть не падает в процессе АК (Vinogradova, 2017). У этих крыс посттонический клонус становится самой продолжительной частью аудиогенного припадков, и он всегда достигает максимальной интенсивности в процессе АК. Фенотипически проявление пост-клонуса отличаются от припадков при электрическом киндлинге, и пост-тонический клонус нельзя описать, используя стандартную шкалу Racine.



### 1.3 Роль нижних бугров четверохолмия в аудиогенной эпилепсии



*Рисунок 3. Сагиттальный срез IC, показывающий топонотическую организацию структуры. DCIC – дорсальный кортекс нижнего двухолмия, CIC – центральное ядро нижнего двухолмия. Схема по Popelář et al., 2016*

Нижнее двухолмие (IC) в среднем мозге - это слуховой релейный центр, который функционально созревает в постнатальном периоде. IC состоит из 3 групп нейронов: центрального ядра (CIC), кортекса и парацентрального ядра (Flint et al., 2020).

У крыс развитие IC завершается в первые двенадцать дней постнатального развития, непосредственно перед появлением слуха (Andrew and Paterson, 1989; Fathke and Gabriele, 2009). Топонотическая организация IC завершается к концу первого месяца (Pierson and Snyder-Keller, 1994) (рис.3). Было показано, что интенсивная звуковая стимуляция (акустический прайминг) крыс на P15 приводит к формированию аудиогенной эпилепсии у взрослых животных (Iida et al., 1998). Также было обнаружено, что у взрослых крыс после звукового воздействия в критический период развития топонотической организации (P14-P16), участки IC, ответственные за обработку высоких частот, оставались недоразвитыми и сохраняли такую же организацию, как и у двухнедельных наивных крыс (Pierson and Snyder-Keller, 1994). Исследователи предположили, что в основе предрасположенности к аудиогенным судорожным припадкам лежит задержка развития IC (Pierson and Snyder-Keller, 1994).

IC являются критической структурой для инициации и распространения судорожной активности в моделях рефлекторной эпилепсии (Faingold, 2004). У взрослых здоровых мышей сверхпродолжительная звуковая стимуляция приводит к апоптозу и потере клеток в IC, но не вызывает развития аудиогенной эпилепсии (Coordes et al., 2011). А у крыс линии КМ было показано, что аудиогенные припадки приводят к уменьшению числа нейронов в верхних буграх четверохолмия (Ревинин и др., 2018). На различных моделях аудиогенной эпилепсии были проведены анализы транскриптома IC. На крысах линии WAR и на

хомячках линии GASH:SAL было показано, что после аудиогенного припадка в нижнем двуххолмии увеличивается экспрессия генов ERG, транскрипционных факторов, вовлеченных в процессы миенилизации, роста и апоптоза (López-López et al., 2017). У крыс линии КМ в IC также была показана повышенная экспрессия генов, вовлечённых в активацию апоптоза (Chuvakova et al., 2021).

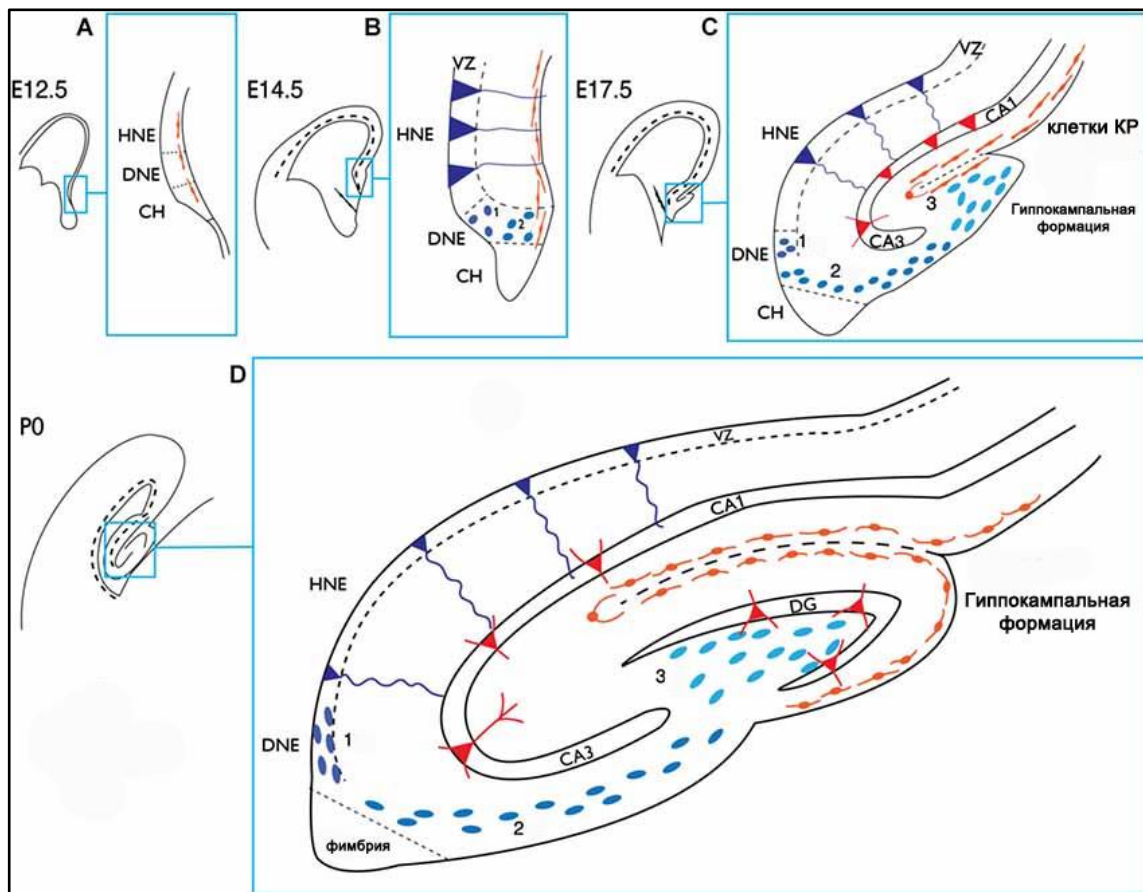
#### **1.4 Развитие гиппокампальной формации**

Отделы гиппокампальной формации образуются из разных эмбриональных источников. Гиппокамп (аммонов рог) состоит из полей (CA1-3, также иногда выделяют поле CA4). Эти поля делятся на несколько слоев stratum oriens, stratum pyramidale (SP или pyramidal cell layer), stratum radiatum (SR), и stratum lacunosum-moleculare. Также в поле CA3 выделяют stratum lucidum между SP и SR (Hayashi et al., 2015). При исследовании постнатального развития гиппокампа было показано, что большая часть пирамидных нейронов формируется пренатально. Образование пирамидных нейронов CA1 происходит с E16 по E20 из гиппокампального нейроэпителлия (HNE). Особенностью выселения пирамидных клеток гиппокампа является то, что они мигрируют не по принципу изнутри-наружу как это происходит в коре. В гиппокампе клетки разного возраста могут находиться в одном слое. Это может быть связано, с тем, что пирамидный слой гиппокампа намного уже, и клетки гиппокампа заполняют любые возникающие пространства между клетками (Hayashi et al., 2015).

Особенность поля CA3 является Y-образное закругление. И считается, что для завершения формирования поля CA3 необходимо образование нейрональных связей с клетками зубчатой извилины, из-за чего поле CA3 формируется дольше, чем остальные поля (Hatami et al., 2018).

Зачаток, из которого возникает зубчатая извилина называется зубчатым нейроэпителием (DNE), он находится между гиппокампальным нейроэпителием и кортикальной кромкой (cortical hem), **организатором** гиппокампа, который выделяет молекулы семейства Wnt (Hatami et al., 2018). Именно из кортикальной кромки выселяются клетки Кахаля-Ретциуса на E12. На 14 день около DNE формируется пулл пролиферирующих клеток, который называется первичный матрикс зубчатой извилины. Далее эти клетки мигрируют тангенциально вдоль радиальной глии. На 17-й день формируется борозда (фиссура) гиппокампа, куда мигрируют клетки будущей зубчатой извилины и формируют третичный матрикс, который в дальнейшем формирует гранулярный и полиморфный слои (хилус) зубчатой извилины, (Hatami et al., 2018). Далее,

к моменту рождения (P0) формируется так называемое верхнее лезвие зубчатой извилины (супрапирамидальное). Миграция клеток Кахаля-Ретциуса продолжается, и начинает формироваться инфрапирамидальное лезвие (infrapyramidal blade) (Hayashi et al., 2015). При образовании гранулярного слоя клетки третичного матрикса располагаются в хилусе и продолжают пролиферировать и выселяться в гранулярный слой. (рис.4) Большинство гранулярных клеток зубчатой извилины (85%) и интернейронов формируется после рождения. 45 % этих клеток формируется в течение первой недели постнатального развития (Bayer and Altman, 1974; O'keefe et al., 1979). К 6-му постнатальному дню формируется медиальная часть зубчатой извилины (Gaarskjaer, 1985). К P7 начинается формирование субгранулярного слоя зубчатой извилины (SGZ). К P14 эта зона клеток становится хорошо выраженной (Nicola et al., 2015). Именно к 14-му дню пролиферация нейронов почти полностью ограничивается SGZ и хилусом. Значительное число вновь образованных клеток погибает путем апоптоза. При исследовании апоптоза в постнатальном гиппокампе было показано, что максимальное число апоптотических клеток наблюдается в первый день после рождения, а к P21 единичные апоптотические клетки обнаруживаются в гранулярном слое и в зубчатой извилине. Во взрослом состоянии у крыс апоптотических клеток очень мало, или они вообще не детектируются (White et al., 2001). Плотность клеток в гиппокампе на 15-й день жизни и у половозрелых крыс не отличается (Bandeira et al., 2009).



**Рисунок 4.** *Пренатальное формирование гиппокампальной формации у мышей. А - на E12,5 день из зубчатого нейроэпителлия (DNE) выселяются клетки Кахаля-Рециуса (КР). В - на E14,5 в вентрикулярную зону (VZ) выселяются клетки первичного матрикса, которые начинают мигрировать в сторону поверхности мозга и образуют вторичный матрикс. В VZ гиппокампальный нейроэпителлий (HNE) дает начало радиальной глие. С - на E17,5 начинает формироваться зубчатая извилина, в гиппокампальную борозду мигрируют предшественники гранулярных клеток и образуют третичный матрикс. Клетки Кахаля-Рециуса мигрируют в сторону образующейся зубчатой извилины. Из HNE выселяются предшественники пирамидных нейронов, которые мигрируют по радиальной глие к пирамидным слоям. D – к моменту рождения начинает формироваться лезвия зубчатой извилины. DNE – зубчатый нейроэпителлий, HNE – гиппокампальный нейроэпителлий, CH – кортикальная кромка, VZ – вентрикулярная зона, КР – клетки Кахаля-Рециуса, DG – зубчатая извилина. Адаптировано по Urbán and Guillemot, 2014.*

Формирование нейрональных связей гиппокампа происходит одновременно с образованием клеток. Пик синаптогенеза в гиппокампе находится между 4 и 10 днем постнатального развития. К P25 формирование синаптической сети заканчивается и не отличается от характерной для взрослых животных (Crain et al., 1973). Длина MB, выявленных с помощью окрашивания Timm, существенно возрастает в первые 2 недели после рождения крысят и продолжает медленно увеличиваться в течение следующих 3х-4х недель (Gaarskjaer, 1985).

### **1.5 Нейрогенез взрослого мозга**

Открытие нейрогенеза у взрослых млекопитающих произошло более 50 лет назад (Altman and Das, 1965), и в течение последних десятилетий был достигнут огромный прогресс в изучении механизмов регуляции нейрогенеза, его значения и роли в различных заболеваниях нервной системы, но, тем не менее, исследование нейрогенеза до сих пор остается актуальным. Дальнейшее изучение взаимосвязи нейрогенеза и неврологических, психических расстройств сможет улучшить понимание функционального значения этого процесса.

Описаны две основные нейрогенные зоны взрослого (или зрелого) мозга: это субгранулярная зона зубчатой извилины (SGZ) и субвентрикулярная зона латеральных желудочков (SVZ). Также было показано существование «неклассических» нейрогенных областей мозга. В частности, нейрогенез был показан в гипоталамусе, стриатуме, черной субстанции и амигдале. Также было показано, что при различных патологических состояниях нейрогенез может усиливаться в «не нейрогенных» областях мозга (Jurkowski et al., 2020). Так, в нижних буграх четверохолмия в норме обнаруживается очень мало BrdU-

позитивных клеток, а при дефиците тиамина обнаруживается множество BrdU-позитивных клеток в центральном ядре нижнего двухолмия (Hazell et al., 2014).

Подробно мы остановимся на нейрогенезе в субгранулярном слое. В SGZ имеется несколько типов нейрональных стволовых клеток (НСК). Первый класс - это медленно делящиеся НСК (тип 1) имеют 1 радиальный отросток и экспрессируют глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) и Nestin1. Второй класс НСК 1-го типа представлен клетками, несущими горизонтальный отросток. Считается, что горизонтальные клетки делятся быстрее. Исследователи не пришли к общему мнению, являются ли эти клетки предшественниками друг друга (Hsieh, 2012). При пролиферации покоящейся НСК происходит ассиметричное деление, образуются транзитно-амплифицирующие клетки (тип 2a и 2b), которые потенциально могут дифференцироваться в глутаматергические нейроны или астроциты (Mineyeva et al., 2018). Морфологически клетки типа 2 представляют собой небольшие клетки с короткими отростками, часто образуют группы в SGZ. Клетки типа 2a характеризуются экспрессией Nestin и Sox2, а 2b клетки экспрессируют DCX и Nestin. Клетки, которые экспрессируют только DCX, являются нейробластами - клетками 3-го типа. В ходе дифференцировки/созревания незрелых гранулярных клеток (ГК) в зрелые происходит снижение экспрессии DCX и увеличение экспрессии Prox1 и NeuN. Созревание нейронов у мышей происходит в течение 6-8 недель (Zhao et al., 2006). Было показано, что у крыс созревание нейронов происходит быстрее в среднем на 1-2 недели (Snyder et al., 2009). По мере созревания НСК мигрируют из SGZ в гранулярный слой и интегрируются в нейрональную сеть зубчатой извилины (Bond et al., 2015).

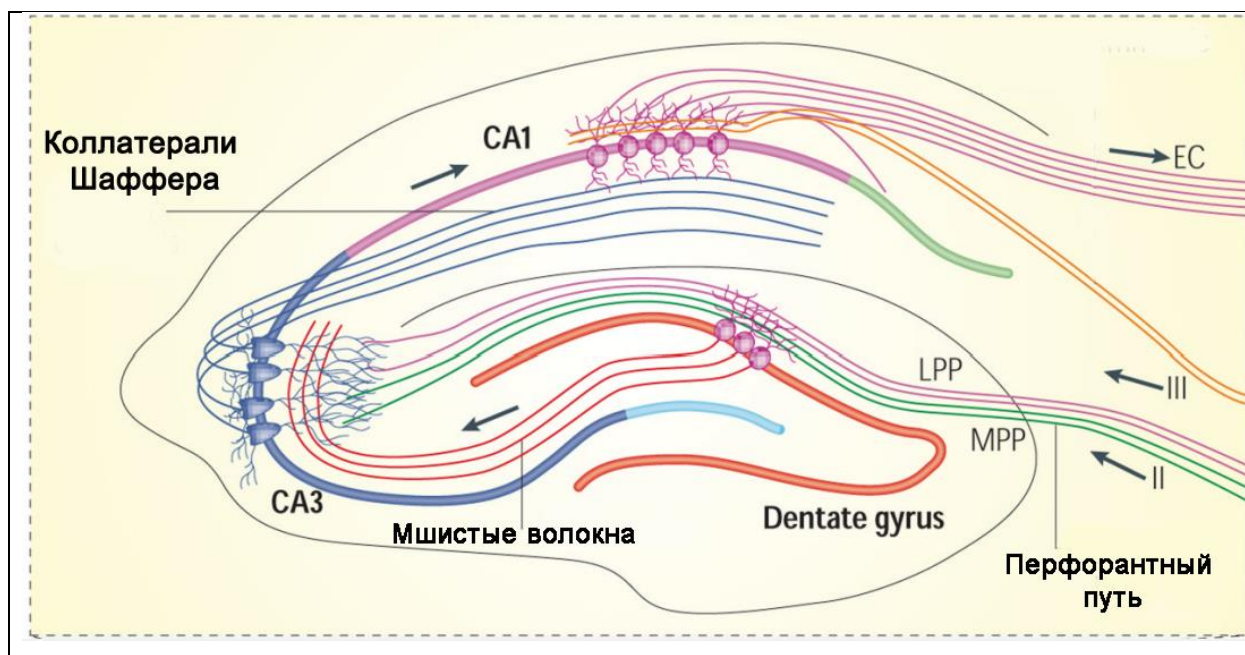
В ходе нейрональной дифференцировки НСК происходит смена экспрессии транскрипционных факторов. Так, в клетках 1-го и 2-го типа ключевую роль играет Sox2, который отвечает за поддержание пула стволовых клеток. В клетках типов 2b и 3 важную роль играют транскрипционные факторы - NeuroD1, Sox11 и CREB. Другим транскрипционным фактором, необходимым для созревания и выживания незрелых ГК является Prox1, который экспрессируется в зрелых ГК (Ahmed et al., 2009).

## **1.6 Образование нейрональных связей**

У крыс через неделю после деления НСК их дендриты начинают получать ГАМКергические афференты, а через 2 недели глутаматные (Li et al., 2009). Синаптическая интеграция окончательно завершается к четвертой неделе с образованием соматических ГАМКергических синапсов. Незрелые ГК отличаются от зрелых повышенной возбудимостью и синаптической пластичностью. Эти уникальные свойства

новообразованных нейронов позволяют им функционировать иначе, чем их созревшим нейронам (Li et al., 2009).

В исследовании (Zhao et al., 2006) на мышах было показано, что эфференты (МВ) новообразованных ГК достигают поля СА3 на 10-11-й день после инъекции ретровируса. Полностью аксоны развиваются к 21-му дню после инъекции. Количество дендритов становится максимальным на 17-й день, а максимальной длины дендриты достигают также на 21-й день после инъекции (Sun et al., 2013).



**Рисунок 5. Связи гиппокампа.** Классическая трисинаптическая сеть гиппокампа (EC-DG-CA3-CA1-EC). От нейроны II слоя энтеринальной коры идут проекции к гранулярным клеткам зубчатой извилины и образуют перфорантный путь. Гранулярные клетки в свою очередь иннервируют клетки поля СА3/4. Их аксоны называются мшистыми волокнами. Также пирамиды поля СА3 получают проекции из энтеринальной коры. После сумации сигнала нейроны поля СА3 передают возбуждение пирамидам поля СА1 с помощью коллатералей Шаффера. А далее пирамиды СА1 дают проекции в глубокие слои энтеринальной коры. В хилусе зубчатой извилины располагаются мшистые клетки и ГАМКергические интернейроны, которые иннервируются гранулярными клетками. Адаптировано по Deng et al., 2010.

## 1.7 Нейрогенез при эпилепсии

В экспериментах с использованием электрического киндлинга и химических моделях височной эпилепсии было показано, что после острой фазы судорожного припадка наблюдается aberrantный нейрогенез, который заключается в значительном увеличении пролиферации и миграции новообразованных клеток в хилус, молекулярный слой зубчатой извилины (Bengzon et al., 1997; Covolan et al., 2000a; Hattiangady et al., 2004). У крыс линии WAR при аудиогенном киндлинге было показано повышение уровня пролиферации в зубчатой извилине, и BrdU-иммунореактивные клетки обнаруживали в хилусе (Romso-Pereira and Garcia-Cairasco, 2003). Во время хронической фазы судорожных припадков данные, касающиеся нейрогенеза, противоречивы. В пилоркорпиновой модели

эпилептического статуса (ЭС) было показано, наличие BrdU-иммунореактивных клеток в субгранулярной зоне и хилусе после возникновения спонтанных судорог (Andres-Mach et al., 2011). На модели электрического ЭС было показано, что через 6 месяцев после индукции статуса уровень пролиферации не отличался от контроля. В гранулярном слое зубчатой извилины число DCX-иммунореактивных клеток тоже не отличалось от контроля. Однако в хилусе после индукции ЭС были обнаружены DCX-иммунореактивные клетки, которые не обнаруживаются у контрольных животных (Bonde et al., 2006). В других же работах было показано снижение числа DCX-иммунореактивных клеток в зубчатой извилине (Hattiangady et al., 2004), а большая часть BrdU-позитивных клеток дифференцировалась в олигодендроциты или астроциты (Hattiangady and Shetty, 2010).

При исследовании нейрогенеза у больных височной эпилепсией был обнаружен aberrantный нейрогенез, дисперсия гранулярных клеток и аномальная миграция новообразованных нейронов в хилус и молекулярный слой зубчатой извилины (Crespel et al., 2005; Thom et al., 2005). При исследовании детей больных височной эпилепсией было показано уменьшение количества PSA-NCAM-иммунопозитивных нейронов, что свидетельствует о снижении нейрогенеза (Mathern et al., 2002). В работах на нейросферах, выделенных из гиппокампа больных височной эпилепсии, было обнаружено, что нейросферы, полученные от пациентов с более короткой продолжительностью эпилепсии, способны пролиферировать (Paradisi et al., 2010). У пациентов со склерозом гиппокампа пролиферативная активность значительно снижена (Marucci et al., 2013). В другом исследовании также было показано, что уровень нейрональной дифференцировки снижается по мере увеличения продолжительности эпилепсии (Ammothumkandy et al., 2022).

Таким образом, можно предположить, что на начальных этапах эпилептогенеза судорожная активность приводит к активации aberrantного нейрогенеза, появлению эктопических гранулярных клеток, а уже после формирования эпилепсии, в хроническую фазу судороги угнетают дифференцировку по нейрональному типу, приводят к астроглиозу, гибели клеток и склерозу гиппокампа.

### **1.8 Перестройки нейрональных связей при эпилепсии.**

Было выдвинуто предположение, что незрелые ГК могут способствовать эпилептогенезу, т.к. являются более возбудимыми (Li et al., 2009). Однако ряд исследований опровергает это предположение. В модели электрического ЭС новые ГК, образовавшиеся после судорожных припадков, демонстрируют иные свойства, а именно: пониженную возбудимость, повышенную тормозную синаптическую активность, это позволяет

предположить, что эти новые клетки могут способствовать снижению возбуждения и синхронизации в локальной нейрональной сети –(Li et al., 2009). В другом исследовании показано, что взрослые нормотопические ГК (нГК), образовавшиеся после индукции эпилептического статуса пилокарпином, проявляют такой же паттерн активности, как и ГК в зубчатой извилине контрольного животного (Gao et al., 2015).

Активность же эктопических гранулярных клеток (эГК) имеет иной характер. Было продемонстрировано, что эГК после ЭС являются более активными, чем нГК (Gao et al., 2015). У крыс со спонтанными судорогами эГК демонстрируют всплески синхронной активности с пирамидными нейронами поля СА3, тем самым способствуя распространению эпилептиформной активности в гиппокампальной сети (Scharfman et al., 2007). У людей, наоборот было показано, что эГК менее возбудимы. Исследователи это связывают с тем, что после эпилептогенеза, в хроническую фазу эпилепсии активируются компенсаторные механизмы, которые приводят к снижению возбудимости эГК (Althaus et al., 2015).

эГК отличаются от нГК организацией дендритов: у эГК практически всегда имеются базальные дендриты, а один из апикальных дендритов толще, чем у нГК (Scharfman et al., 2007). Было показано, что эГК образуют новых связи с пирамидными нейронами СА4/СА3 в гиппокампе (Kuruba et al., 2009).

Эпилептическая активность приводит к ветвлению и разрастанию волокон (спрутингу) аксонов ГК, т.е. к разрастанию МВ во внутренний молекулярный слой зубчатой извилины. В разрастании МВ принимают участие как новообразованные ГК после химического ЭС, так и зрелые ГК (Althaus et al., 2016). МВ вмогут образовывать терминали на эГК и способствовать возникновению спонтанных потенциалов действия в этих клетках (Althaus et al., 2015; Kuruba et al., 2009; Pierce et al., 2005). В некоторых работах было показано, что разрастание МВ не связано с эпилептогенезом и его блокировка не приводит к уменьшению частоты эпилептических припадков при пилкарпиновом ЭС (Buckmaster, 2014). Тем не менее, разрастание МВ обнаруживается во многих случаях височной эпилепсии и при моделировании этого заболевания, и возможно, его патологическая роль связана не только с эпилептогенезом, но и с возникновением коморбидных нарушений при эпилепсии (уменьшение когнитивных способностей, депрессия) (Danzer, 2017).

Эпилептическая активность приводит к изменениям в дендритном аппарате. Наблюдаются изменения в плотности и морфологии дендритных шипиков в молекулярном слое зубчатой извилины и *stratum radiatum* (SR) поля СА3 гиппокампа. Через 24 часа после индукции ЭС пилокарпином было показано сокращение плотности шипиков в SR поля СА3, в латентную фазу (через 20 дней) было обнаружено увеличение плотности дендритных шипиков и повышенное количество грибовидных шипиков. В хроническую



фазу количество шипиков начинает сокращаться (Heysieattalab and Sadeghi, 2021). При электрическом киндлинге было показано уменьшение плотности шипиков в молекулярных слоях зубчатой извилины (Singh et al., 2013). При введении каината найдено, что через 2 недели после ЭС уровень синаптоподина (маркера белка дендритных шипиков) сокращается, однако через 8 недель он возвращается к контрольным значениям (Roth et al., 2001).

## **1.9 Нейрогенез как потенциальная мишень лечения эпилепсии**

Исследования показали, что элиминация делящихся клеток в гиппокампе с помощью радиации приводит к снижению аксонального спрутинга и аберрантной миграции нейронов в хилус (Victor and Tsirka, 2020). Было продемонстрировано, что снижение нейрогенеза и аберрантной миграции нейронов в течение 4 недель после индукции химического ЭС способствовало сокращению спонтанных судорог на 65%. Однако после 4 недель при возобновлении нейрогенеза частота спонтанных припадков возвращалась к контрольным значениям (Varma et al., 2019). Было также показано на трансгенных мышах, что устранение нейрогенеза перед индукцией ЭС не препятствовало разрастанию МВ в молекулярный слой зубчатой извилины, но способствовало снижению частоты спонтанных судорог и препятствовало снижению когнитивных способностей (Cho et al., 2015).

Некоторые антиконвульсанты способны снижать аберрантный нейрогенез. Так, при введении левитирацетама крысам, перенесшим ЭС, происходит угнетение спонтанных судорог и аберрантного нейрогенеза (Andres-Mach et al., 2011). Вальпроевая кислота через ингибирование гистоновой ацетилазы препятствует усилению нейрогенеза после судорожной активности (Jessberger et al., 2007).

## **1.10 p53 в нейрогенезе**

Ген *p53*, который кодирует фактор транскрипции *p53*, был идентифицирован как наиболее часто мутирующий ген-супрессор опухоли при раке человека. Мутации *p53* или активация путей, которые блокируют *p53*, в значительной степени способствуют злокачественной трансформации при различных видах рака.

В развивающемся мозге экспрессия мРНК *p53* в основном ограничивается областью, которая не подвергается апоптозу, это позволяет предположить, что *p53* участвует в дифференцировке нейронов (Komarova et al., 1997; Rogel et al., 1985). Роль *p53* в дифференцировке нейронов подтверждается исследованиями *in vivo*. У мышей с нокаутом по *p53*, в особенности у самок, проявляется экзэнцефалия из-за избыточного роста нервной ткани, что, в свою очередь, вызывает нарушение закрытия нервной трубки во время

эмбриогенеза (Niklison-Chirou et al., 2020). p53 контролирует пролиферацию и дифференцировку НСК как *in vitro*, так и *in vivo*, главным образом, путем регуляции экспрессии нескольких регуляторов клеточного цикла, не влияя на экспрессию канонических нейрональных маркеров (Niklison-Chirou et al., 2020). Интересно, что как активация, так и ингибирование p53 способно приводить к запуску дифференцировки нейрональных клеток. В одних работах сообщалось (Meletis et al., 2006), что нейросферы из p53-null и НСК дикого типа содержат одинаковое количество нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, тогда как в других экспериментах (Armesilla-Diaz et al., 2009; Nagao et al., 2008) и было обнаружено, что дифференцировка нейросфер от p53-нокаутных мышей смещена в сторону предшественников нейронов. Независимо от различных сообщений о роли p53 в дифференцировке НСК, активность p53 увеличивается в то время, когда дифференцировка нейронов достигает своего максимума (Komarova et al., 1997). В клетках P19 (клеточная линия, полученная из эмбриональной карциномы) увеличение экспрессии p53 приводило к дифференцировке этих клеток по нейрональному типу (Ostrakhovitch and Semenikhin, 2011). Активация дифференцировки клеток PC12 с помощью NGF приводит к активации белка p53, а ингибирование экспрессии p53 вызывает блокировку NGF-зависимой дифференцировки клеток PC12 (Glazova, 2016). В постмитотических нейронах ацетилирование p53 способствует созреванию нейронов и регенерации аксонов (Tedeschi and Di Giovanni, 2009).

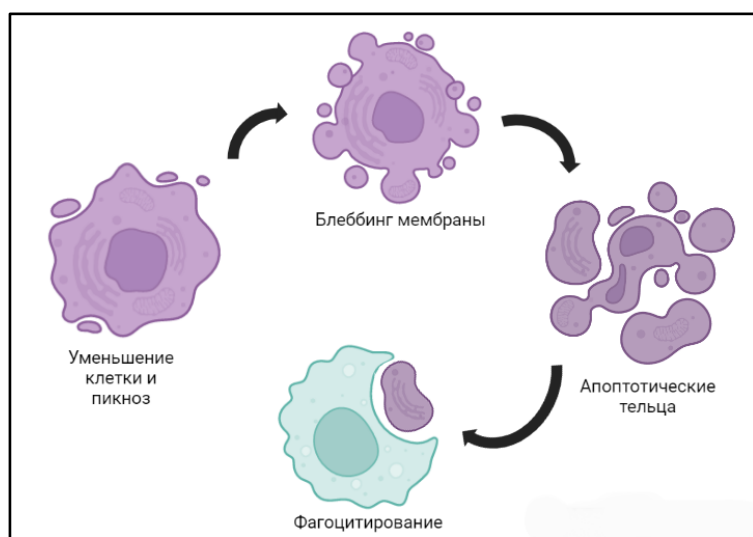
### 1.11 Пифитрин-α

Пифитрин-α – это низкомолекулярный ингибитор p53. Точный механизм ингибирования p53 не известен. Считается, что пифитрин-α прямо взаимодействует с p53 и блокирует его транслокацию в ядро (Chen et al., 2019; Culmsee et al., 2001). Также было показано, что пифитрин-α способен препятствовать доксорубин-зависимому фосфорилированию p53 по Ser15 и Ser33. Таким образом, в зависимости от контекста и физиологического статуса клетки пифитрин-α способен ингибировать часть функций p53 (Zhu et al., 2020). При моделировании ишемии введение пифитрина-α приводило не только к повышению числа НСК в SVZ, но и к дифференцировке, миграции и интеграции этих НСК в месте повреждения. Также пифитрин-α приводит к активации Ah-рецепторов (Aryl hydrocarbon receptor), которые участвуют в регуляции пролиферации/дифференцировки нейронов (Juricek and Coumoul, 2018; Zhu et al., 2020). Было также показано, что при моделировании черепно-мозговой травмы введение пифитрина-α приводило к изменению уровня белков аутофагии (Beclin-1, LC3BII, p62) (Huang et al., 2018).

## 1.12 Апоптоз

Апоптоз - термин, впервые использованный в 1972 г. в работе Керра и коллег для описания механизма контролируемой клеточной смерти (Kerr et al., 1972). Важно отметить, что в настоящее время открыты и другие виды программируемой клеточной гибели (Debnath et al., 2005). Апоптоз - важный компонент нормального развития организма, так как приводит к гибели поврежденных и инфицированных клеток, которые могли бы помешать нормальному его функционированию (Labbé and Saleh, 2008). Было показано, что ряд стресс-факторов, ведущих к повреждению ДНК (препараты химиотерапии, облучение) вызывают апоптоз через p53-зависимый сигнальный путь. Часть клеток начинает гибнуть в результате отсутствия факторов роста и гормонов. Другие же клетки экспрессируют Fas-рецептор и TNF-рецепторы, активация которых ведет к запуску апоптоза. Апоптоз является энергозависимым и скоординированным процессом, в котором ведущую роль играют белки семейства цистеиновых протеаз – каспазы, активация которых ведет к сложному каскаду внутриклеточных взаимодействий, которые приводят к гибели клетки.

### 1.12.1 Морфологические изменения, происходящие при апоптозе.

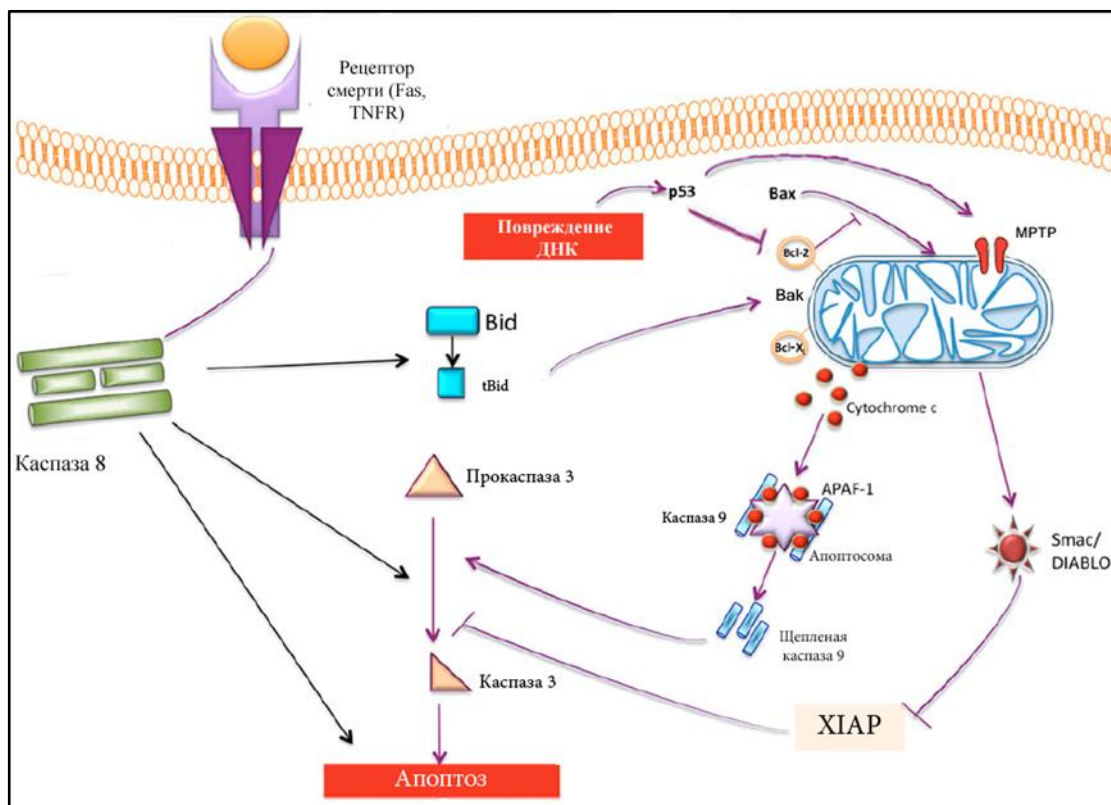


*Рисунок 6. Морфология клетки при апоптозе. Первым морфологическим изменением является «усыхание» клетки, потом происходит блеббинг мембраны, образование апоптотических телец, которые фагоцитируются макрофагами. Схема на основе Guerin et al., 2009.*

При исследовании апоптотической клетки с помощью световой и электронной микроскопий можно наблюдать различные морфологические изменения. На ранних стадиях апоптоза происходит уменьшение размеров клетки (shrinkage) и пикноз ядер (Kerr et al., 1972). Во время этой стадии цитоплазма становится более конденсированной, уменьшается размер клетки, и органеллы в клетке размещаются плотнее. Пикноз ядер происходит в результате конденсации хроматина и является наиболее характерной чертой клеток, гибнущих путем апоптоза. При гистологическом окрашивании становится

заметным, что апоптоз затрагивает одиночные клетки или группу рядом лежащих клеток (кластеры). Клетки имеют округлую форму с уплотненной темной оксифильной цитоплазмой и плотным базофильным ядром. С помощью электронной микроскопии показано, что в начале фазы конденсации электронноплотный ядерный материал объединяется на периферии ядра. Далее происходит блэббинг (blabbing) цитоплазматической мембраны (происходят выпячивания мембраны, она как будто пузырится), ядро разделяется на сферические тельца – происходит кариорексис, после чего клетка распадается на фрагменты (апоптотические тельца). Эти события происходят вследствие активации каспазы 3 (Casp3), которая расщепляет ингибитор эндонуклеазы CAD, ламины, актин, гельзолин и ведет к сокращению миозиновых филаментов (Slee et al., 2001). В апоптотических тельцах содержатся фрагменты ядра, цитоплазма и органеллы. Впоследствии происходит фагоцитоз этих телец макрофагами. Макрофаги, которые переваривают апоптотические тела, называются “tingible body macrophages”. Они образуются в герминативных центрах фолликулов и в корковом слое тимуса. Одним из самых важных биохимических маркеров запуска апоптоза является перераспределение липидов в бислой цитоплазматической мембраны. Фосфатидилсерин, который обычно находится во внутреннем слое мембраны, в процессе апоптоза начинает появляться во внешнем (Bratton et al., 1997). Это является сигналом «съешь меня» для макрофагов. Фагоцитирование апоптотических телец, опосредованное фосфатидилсерин-чувствительными рецепторами, происходит без воспаления, т.к. ингибируется высвобождение провоспалительных цитокинов (Graham et al., 2014). С помощью белка аннексина V, который специфически связывается с фосфатидилсерином, можно детектировать клетки, гибнущие путем апоптоза (Arur et al., 2003). Другим характерным маркером апоптоза является фрагментирование ДНК  $Ca^{2+}$ - и  $Mg^{2+}$ -зависимыми эндонуклеазами (Bortner et al., 1995). С помощью электрофореза в агарозном геле и окрашивания экстрагированной ДНК можно детектировать апоптоз, при котором разделенная в геле ДНК имеет вид лестницы. Ещё одним методом детекции фрагментированной ДНК может служить метод TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling), основанный на действии терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT), которая связывает нуклеотид дУТФ с 3' концом поврежденной ДНК.

### 1.12.2 Пути запуска апоптоза



**Рисунок 7.** Два основных пути запуска апоптоза. Во внешнем пути происходит активация рецептора, приводящая к активации каспазы 8 (Casp8), которая способна как сама индуцировать апоптоз, так и через tBid и Casp3. Запуск апоптоза по внутреннему пути часто инициируется повреждением ДНК, которое ведет к активации p53, ингибированию антиапоптотических свойств Bcl-2 и Bcl-x1, открытию митохондриальных пор (MPTP), образованию мембраноатакующих комплексов на наружной мембране митохондрий (олигомеризации Bak и Bax). Происходит выход в цитозоль CytC и Smac. В цитозоле из комплекса Apaf-1, CytC и расщепленной каспазы 9 (clCasp9) собирается апоптосома. Casp9 активирует Casp3, что ведет к апоптозу. Схема на основе Kiraz et al., 2016.

**Внешний путь.** Запуск апоптоза по внешнему пути осуществляют трансмембранные рецепторы. Они называются рецепторами смерти и относятся к суперсемейству рецепторов TNF (Locksley et al., 2001). Для рецепторов этого семейства характерны богатый цистеином внеклеточный домен и цитоплазматический домен из 80 аминокислот, который также называется «доменом смерти» (Elmore, 2007). Этот домен играет ключевую роль в передаче сигнала от поверхности клетки к внутриклеточному сигнальному пути. В настоящее время открыто большое количество рецепторов смерти и их лигандов: FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3 и другие.

Лучше всего описан запуск апоптоза в моделях взаимодействия Fas-лиганд/Fas-рецептор и TNF- $\alpha$ /TNF-рецептор. В этих моделях гомотримерный рецептор связывается с гомотримерным лигандом. При связывании лиганда с рецептором происходит рекрутирование адапторных белков. В случае активации Fas-рецептора адапторным белком является FADD, а при активации TNF-рецептора – TRADD, которые рекрутирует FADD и белок RIP. Далее FADD димеризуется с прокаспазой-8 с помощью эффекторного домена смерти. Образуется так называемый DISC-комплекс, в составе этого комплекса происходит автокаталитическая активация ProCasp-8 (Kischkel et al., 1995). Иногда прямого пути активации Casp8 может быть недостаточно, поэтому в таких клетках усиление сигнала идет через митохондриальный путь. Casp8 активирует цитоплазматический белок семейства Bcl-2 Bit посредством его протеолиза. Расщепленный Bit (tBit) взаимодействует с Bak, вызывая его олигомеризацию и выход цитохрома C в цитозоль (Kantari and Walczak, 2011).

**Внутренний (митохондриальный) путь.** Стимулы, способные инициировать запуск апоптоза через митохондриальный путь, могут быть как негативными, так и позитивными. Под негативным стимулом понимается депривация/отсутствие факторов роста, гормонов и цитокинов, которые в норме подавляют запуск апоптоза. Позитивным стимулом для запуска апоптоза является радиация, токсины, вирусная инфекция, окислительный стресс, гипоксия и гипертермия. При многих стрессорных воздействиях происходит повреждение ДНК. И ключевым фактором, опосредующим апоптоз при повреждении ДНК, является белок p53.

Повышение транскрипции белка p53 наблюдается при ишемии мозга. При стрессе происходит фосфорилирование p53 и убиквитин-лигазы MDM2 (негативный регулятор p53) через DNA-ПК, Chk1/Chk2(p53) и c-Abl (MDM2) (Cheng and Chen, 2010; Kruse and Gu, 2008). При фосфорилировании убиквитинлигазная активность MDM2 ингибируется, не происходит протеосомной деградации p53, и он накапливается в клетке. p53 способен запускать апоптоз опосредовано через транскрипцию проапоптотических белков семейства Bcl-2, таких как Puma (вызывает апоптоз через взаимодействие с проапоптотическими белками семейства Bcl-2), Noxa (вызывает увеличение концентрации АФК в клетке и может ингибировать антиапоптотические свойства Bcl-2, Mcl-2 и Bcl-xl), Bax (способен олигомеризоваться и образовывать мембранно-атакующие комплексы на наружной мембране митохондрий) (Kim et al., 2003; Nakano and Vousden, 2001) или прямо через открытие митохондриальных пор и блокирование антиапоптотического действия Bcl-2, Mcl-2 и Bclxl (Deng et al., 2006; Vaseva and Moll, 2009). Стоит заметить, что белок p53 участвует не только в запуске апоптоза, но и во многих других процессах: регуляция метаболизма, фертильность, дифференцировка и развитие (Vousden and Prives, 2009).

В экспериментах на культурах нейронов было показано, что судорожно-подобная активность приводит к накоплению в цитоплазме большого количества кальция, это ведет к активации кальций-связывающего белка кальцийнерина (фосфатазы), который дефосфорилирует белок Bad (BH3-only белок), и он освобождается от шаперона 14-3-3 (Meller et al., 2003). В итоге каскад всех этих событий приводит к потере трансмембранного потенциала мембраны митохондрий, открытию митохондриальных пор и образованию мембранно-атакующих комплексов, которые ведут к выходу 2 больших групп проапоптотических молекул из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль. К первой группе относятся цитохром С, Smac/DIABLO и сериновая протеаза HtrA2/Omi. В цитоплазме цитохром С и АТФ связываются с белком Araf-1, изменяют его конформацию, и мономеры Araf-1 принимают гептамерную четвертичную структуру. В таком виде Araf-1 способна рекрутировать и активировать ProCasp9 через связывание с CARD доменом. После связывания происходит автокаталитический протеолиз ProCasp9, и она становится уже активной расщепленной Casp9 (clCasp9). Комплекс clCasp9, Araf-1 и цитохрома С называется апоптосомой. Далее апоптосома активирует Casp 3, 6 и 7 (Eleftheriadis et al., 2016; Shakeri et al., 2017). Smac/DIABLO и HtrA2/Omi ингибируют действие белка XIAP, который в норме ингибирует действие каспаз (Oberoi-Khanuja et al., 2013).

К другой группе проапоптотических молекул относятся флавопротеин AIF, эндонуклеаза G и CAD. AIF и эндонуклеаза G транслируются в ядро и осуществляют там фрагментирование ядерной ДНК (Kook et al., 2007). Делают они это независимо от каспаз, в то время как фермент CAD должен быть активирован Casp3 для реализации своей эндонуклеазной активности (Susin et al., 2000). Результатом как внешнего, так и внутреннего пути запуска апоптоза является активации эффекторных Casp 3, 6 и 7. Они расщепляют RARP-1 (фермент репарации),  $\alpha$ -фодрин (белок цитоскелета), ядерные ламины, флиппазы и многие другие белки (Segawa et al., 2014; Slee et al., 2001). Casp3 считается самой главной эффекторной каспазой, т.к. именно она способна активировать эндонуклеазу CAD, отщепляя от нее ингибирующую субъединицу ICAD.

Долгое время считалось, что апоптоз необратим. Однако было показано, что на ранних этапах p53-индуцированного апоптоза наблюдается усиление репарации ДНК, и как показано теперь, точкой невозврата является максимальная активация Casp3, которая начинается через 12 часов после запуска апоптоза (Geske et al., 2000).

### *1.12.3 Каспазы*

Каспазы представляют собой семейство цистеин-зависимых аспартат-специфичных протеаз. Часто действие каспаз приводит к инактивации белков, однако они могут и

активировать специфические белки, участвующие в воспалении и апоптозе. Соответственно, каспазы были классифицированы по их ролям в апоптозе (Casp-3, -6, -7, -8 и -9 у млекопитающих) и в воспалении (Casp-1, -4, -5, -12 у людей и Casp-1, -11 и -12 у мышей) (рис. 8). Каспазы, вовлеченные в апоптоз, можно также разделить по механизму их действия. Одни отвечают за запуск апоптоза: иницирующие каспазы (Casp-8 и -9), другие же за его выполнение: исполнительные каспазы (Casp-3, -6 и -7).

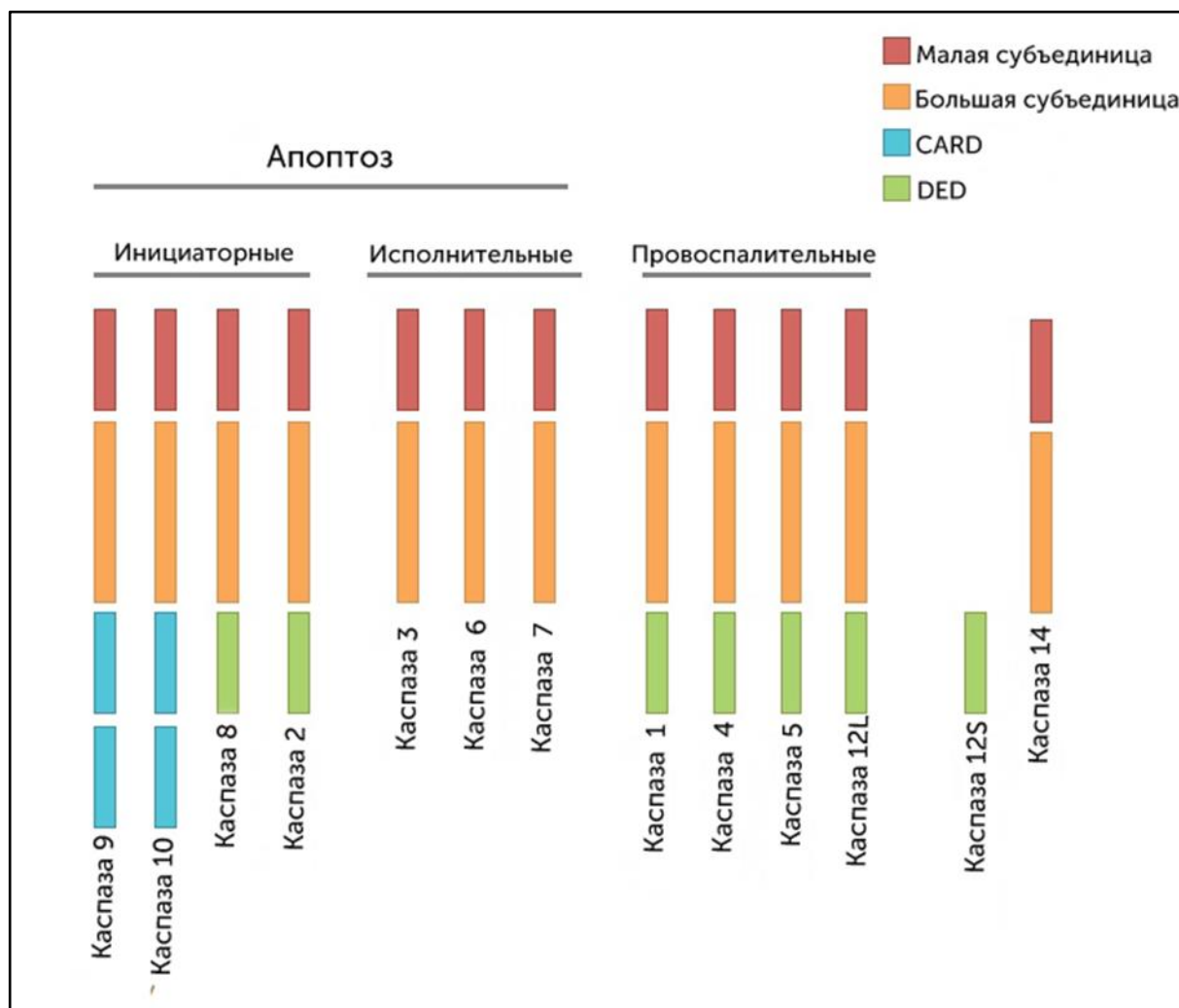
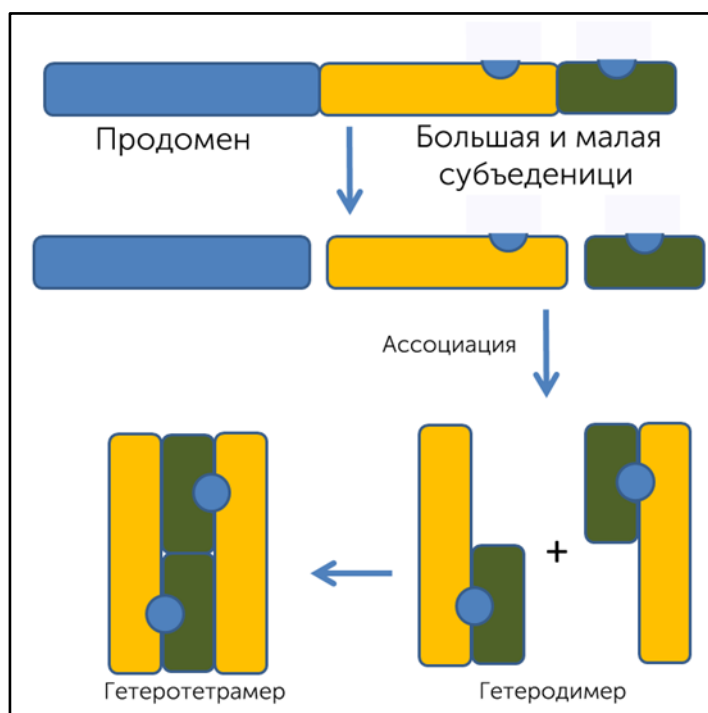


Рисунок 8 Классификация каспаз по Degtrev et al., 2003.

Каспазы синтезируются в виде проферментов (прокаспаз), которые в нормальных физиологических условиях контролируются эндогенными ингибиторами, такими как ингибиторы белков апоптоза (IAP), антиапоптотические белки Bcl-2 и белки теплового шока (LeBlanc and Ashkenazi, 2003). Каспазы должны быть расщеплены для активации их ферментативной активности. Перед активацией продомен и линкерный участок отщепляются от прокаспаз, образуя большую и малую субъединицы, которые далее димеризуются с другой расщепленной молекулой каспазы и образуют активную гетеротетрамерную структуру (рис.9). Активный сайт состоит из остатков, как от больших,



так и от малых субъединиц, поэтому молекула активной каспазы имеет два сайта для связывания и расщепления субстрата. Длина аминокислотной последовательности в прокаспазах варьируется от 293 аминокислот (Casp6) до 479 аминокислот (Casp8 и 10). Размер N-концевого продомена варьируется от 3 до 13 кДа, тогда как размеры больших и малых субъединиц относительно постоянны среди каспаз, то есть 20 кДа и 10 кДа, соответственно. Большие и маленькие субъединицы образуют протеазный домен, который высоко консервативен среди каспаз (Narkilahti, 2005)



*Рисунок 9. Схематическое представление активации каспазы с помощью протеолитического расщепления прокаспазы на малую и большую субъединицы с последующей их ассоциацией. Адаптировано по Cohen, 1997.*

Сборка в тетрамеры облегчается различными адапторными белками, которые связываются с определенными областями в доменах прокаспазы. Различные каспазы имеют разные домены межбелкового взаимодействия, что позволяет им образовывать комплексы с различными адаптерами. Например, Casp-1, -2, -4, -5 и -9 содержат домен рекрутирования каспазы (CARD), тогда как Casp-8 и -10 имеют эффекторный домен смерти (DED) (Taylor et al., 2008).

#### 1.12.4 Каспаза 3 при эпилепсии

Преимущественно Casp3 локализуется в ядре (Henshall et al., 2000). При исследовании Casp3 у больных височной эпилепсией с помощью вестерн-блота и иммуногистохимии была показана преимущественная локализация расщепленной Casp3 (clCasp3) в ядрах нейронов (Schindler et al., 2005). При пентилентетразоловом (PTZ) киндинге наблюдается активация Casp3 и выявляются TUNEL-позитивные нейроны в гиппокампе (Pavlova et al., 2004; Yu et al., 2019). У крыс через неделю после ЭС,

индуцированного пилокарпином, cIcasp3 выявляется в нейронах гиппокампа (CA1-3) (Weise et al., 2005). У мышей при ЭС экспрессия Casp3 увеличивается в нейронах гиппокампа через 30 ч - 4 дня после системного введения каиновой кислоты (Faherty et al., 1999). У Casp3 после введения каиновой кислоты наблюдается 2 пика активности: первый пик обнаруживается в пределах 8 - 16ч после введения, затем ее активность снижается и второй пик активности наблюдается на 7-й день после индукции ЭС (Narkilahti, 2005). После амигдаларной инъекции каиновой кислоты экспрессия Casp3 увеличивается в TUNEL позитивных пирамидных нейронах CA3 между 24 и 72 часами.

### **1.13 Нейропротекция**

Использование различных антиоксидантов и противовоспалительных веществ показало свою эффективность как нейропротекторов и антиэпилептических препаратов. Так, витамин Е считается перспективным нейропротектором при эпилепсии. Было показано, что введение витамина Е на различных моделях эпилепсии приводило к снижению частоты судорожной активности и к уменьшению гибели нейронов (Ambrogini et al., 2019; Zhang et al., 2022). Использование ингибитора рецептора IL-1 – анакинры в литий-пилокарпиновой модели снижало гибель пирамидных нейронов в гиппокампе и приводило к уменьшению частоты и длительности спонтанных судорог (Dyomina et al., 2020). Прекондиционирование (введение неконвульсивных доз каината перед индукцией ЭС) приводило к снижению гибели нейронов и уменьшению частоты судорожных приступов (Jimenez-Mateos et al., 2008). Но не во всех случаях нейропротекция приводит к антиэпилептическому эффекту. Введение ингибитора Casp3 z-DEVD-fmk снижало клеточную гибель в гиппокампе и препятствовало разрастанию МВ, но не приводило к снижению судорожной активности в гиппокампе и восстановлению когнитивных функций (Narkilahti et al., 2003). Таким образом, нейропротекция при эпилепсии должна не только защищать нейроны от гибели, но и препятствовать перестройке нейрональных сетей и эпилептизации мозга. При уже сформированной эпилепсии нейропротекция должна способствовать коррекции коморбидных нарушений (Pitkänen, 2010; Walker, 2007).

### **1.14 Аутофагия**

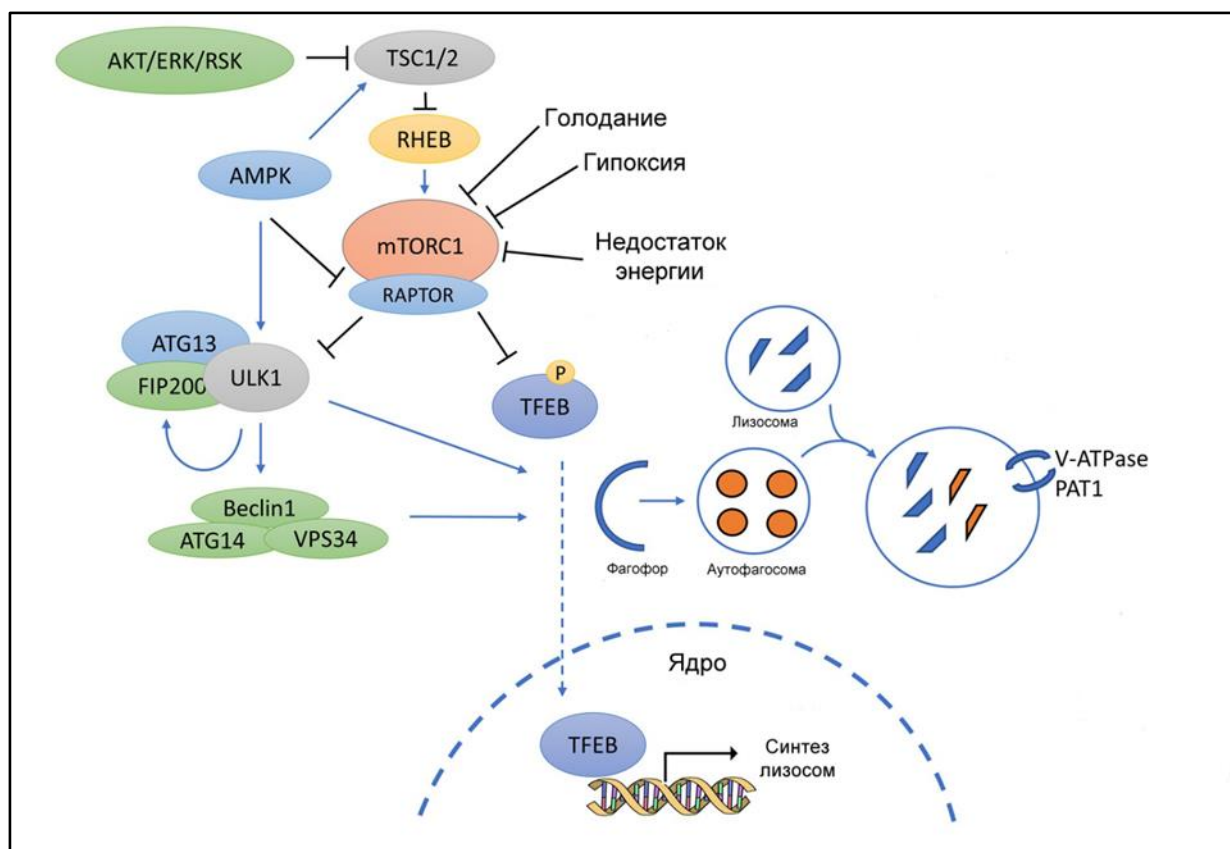
Аутофагия также может выполнять нейропротекторную функцию, так как позволяет избавиться от долгоживущих белков и поврежденных органелл. Аутофагия – это процесс регулируемой деградации компонентов цитоплазмы и органелл, который происходит с помощью лизосом. Существует 3 вида аутофагии: микроаутофагия, шаперон-опосредованная аутофагия и макроаутофагия. При микроаутофагии происходит

инвагинация лизосомальной мембраны и захват части цитоплазмы. При шаперон-опосредованной аутофагии, шаперон HSC70 и его кошапероны распознают и расплетают белки с аминокислотной последовательностью KFERQ. Далее шапероновый комплекс связывается с белком LAMP-2A, который осуществляет транслокацию белка-мишени в полость лизосомы.

Макроаутофагия является основным типом аутофагии и отличается от двух других типов аутофагии тем, что субстрат ограничивается мембраной (фагофором), которая удлиняется и окружает его, формируя двумембранную структуру – аутофагосому. В последующем аутофагосома сливается с лизосомой и формирует аутолизосому, в которой происходит гидролитическая деградация содержимого аутофагосомы. Субстратом для макроаутофагии помимо белков являются органеллы: митохондрии, пероксисомы и ядра, также это могут быть липиды и бактерии (Nikoletopoulou et al., 2015).

Понимание молекулярных путей запуска аутофагии было достигнуто с помощью открытия генов аутофагии - ATG. Аутофагия состоит из следующих этапов: инициация, рост мембраны аутофагосомы, созревание аутофагосомы и деградация. Каждая из этих стадий требует координации нескольких ATG-генов.

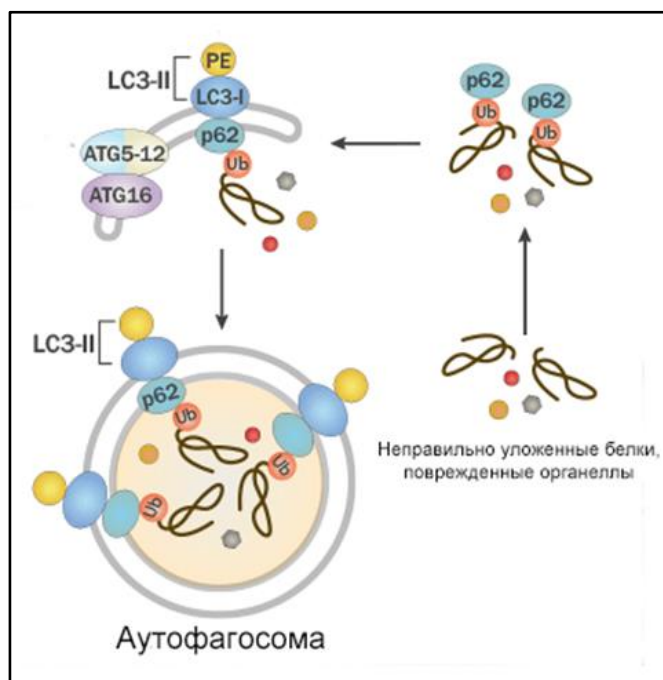
Инициация. Хотя аутофагия происходит конститутивно в большинстве типов клеток, стресс и дефицит нутриентов является сильным индуктором аутофагии (Singh, Cuervo, 2011). Киназа mTOR является ключевым негативным регулятором аутофагии. При достаточном количестве питательных веществ mTOR ингибирует аутофагию через фосфорилирование и инактивацию ключевых белков-мишеней ULK1, ATG13 и FIP200, которые являются частью комплекса инициации аутофагосом. При ингибировании mTOR белок ULK1 может сформировать комплекс с ATG13 и FIP200, который активирует аутофагию (Hosokawa et al., 2009). Далее происходит формирование фагофора, происхождение которого остается дискуссионным, он может формироваться из аппарата Гольджи, ЭПР, митохондрий или плазматической мембраны с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза (Mari, Tooze, Reggiori, 2011). Есть 2 основных белка, регулирующих этот процесс. Один из них - белок Vps34, являющийся фосфосфатидилинозитол-3-киназой, который производит фосфатидилинозитол-3-фосфат для рекрутирования ATG17 и ATG13 в зону формирования фагофора. Vps34 образует комплекс с другими белками, вовлеченными в формирование аутофагосомы: Beclin1, p150, ATG14. Второй белок, вовлеченный в формирование аутофагосом - это белок ULK1, который образует комплексы с FIP200 и ATG13. Образование этого комплекса приводит к активации киназной активности ULK1 (рис.10).



**Рисунок 10.** Регуляция аутофагии. Центральным регулятором аутофагии является протеин киназа *mTORC1*. Факторы роста и аминокислоты приводят к ингибированию *mTOR* через *TSC1/2*, которые ингибируют основной активатор *mTOR* малую ГТФазу *Rheb*. Если питательных веществ достаточно, то *mTORC1* фосфорилирует *ULK1* и транскрипционный фактор *TFEB*. При голодании *ULK1* способствует образованию аутофагосом, а *TFEB* стимулирует транскрипцию генов, отвечающих за биосинтез лизосом Paquette, El-Houjeiri, Pause, 2018.

Рост мембраны аутофагосомы. Рост фагофора зависит от 2-х убиквитин-подобных сопряженных систем. Первая из них это система *ATG12–ATG5–ATG16L*: *ATG12*, *ATG5* и *ATG7* (E1-комплекс) и *ATG10* (E2-комплекс) и далее происходит конъюгация комплекса с *ATG16L*. Комплекс *ATG12–ATG5–ATG16L* располагается на внешней мембране растущего фагофора и перед окончанием формирования аутофагосомы диссоциирует с мембраны. Исследования показали, что при некоторых стрессорных воздействиях макроаутофагия может проходить независимо от *ATG5/ATG7*, что предполагает наличие альтернативного пути формирования аутофагосомы. Второй является система *PE-LC3*: в ходе которой к белку *LC3* присоединяется фосфатидилэтанолламин (*PE*). *LC3* способствует начальному этапу стыковки (*membrane tethering*) 2х мембранных пузырьков, в результате происходит слияния бислоев. Имеются 2 формы *LC3*: первая - *LC3I* образуется посредством расщепления *pro-LC* с помощью *ATG4B*, она является цитоплазматической и вторая - *LC3II*, которая образуется посредством присоединения фосфатидилэтанолламина к *LC3I* с

помощью ATG7 и ATG3. (Feng et al., 2014) LC3II специфически ассоциируется с мембраной аутофагосом и его уровень коррелирует с числом аутофагосом и фагофоров (Gómez-Sánchez et al., 2015). p62/SQSTM1 является адаптерным белком, он связывает убиквитинированные белки, а затем комплекс p62-белок связывается с LC3II и мембраной. По мере роста фагофора, количество связанных белков увеличивается и они оказываются внутри везикулы- аутофагосомы.



**Рисунок 11.** Элонгация аутофагии. Присоединение PE к LC3I является важным процессом для формирования аутофагосомы. Затем LC3II (LC3I+PE) ассоциируется с вновь образующимися мембранами аутофагосом. LC3II остается на зрелых аутофагосомах до их слияния с лизосомами. Таким образом, превращение LC3I в LC3II используется как маркер индукции аутофагии. Адаптерный белок p62/SQSTM1 связывается с убиквитинированными белками и LC3II. p62 участвует в транспорте убиквитинированных белков и поврежденных органелл к аутофагосоме для последующей деградации этих компонентов (Novus Biologicals). <https://www.novusbio.com/support/faqs-autophagy-and-lc3>

Созревание аутофагосом. Аутофагосома транспортируется к эндосоме или лизосоме вдоль микротрубочек с помощью динеин-динактинового комплекса. Слияние аутофагосомы с лизосомой требует некоторых дополнительных компонентов, таких как эндосомальный сортировочный комплекс, SNARE-комплекс, RAB протеины и АТФазы. На финальной стадии цитоплазматические компоненты разрушаются в аутолизосоме. Известно, что недостаточность лизосомальных ферментов, в частности, катепсина, приводит к блокаде аутофагии. Для маркировки аутофагосом были использованы трансгенные мыши, у которых к белку LC3 был присоединен GFP. Это исследование показало, что аутофагия индуцируется голоданием в большинстве тканей. В некоторых тканях аутофагия происходит и без голодания, это позволяет предположить, что степень активации аутофагии зависит от органа, и ее проявление не ограничивается ответом на голодание.

#### 1.14.1 Аутофагия в нервной системе

Хотя аутофагия чаще всего изучается в контексте стресса и патологий, исследования показывают, что в нервной системе аутофагия является физиологическим процессом, который происходит конститутивно.

Аутофагия играет решающую роль в регуляции гомеостаза и выживаемости нейронов (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Mizushima and Levine, 2010). Так, инактивация генов Atg5 или Atg7 (основные белки необходимые для формирования аутофагосом) приводит к расширению аксона и гибели нейронов (Feng et al., 2014; Weidberg et al., 2011). Изучалась роль аутофагии в нейрогенезе у взрослых. Нокаут гена *FIP200* приводит к прогрессирующей потере НСК и нарушению дифференцировки нейронов, особенно в постнатальном, но не в эмбриональном мозге у мышей. В НСК постнатального пула наблюдается p53-зависимый апоптоз и остановка клеточного цикла. Тем не менее, нарушение дифференцировки нейронов было восстановлено антиоксидантом N-ацетилцистеином, но не инактивацией p53. Эти данные свидетельствуют о том, что FIP200-опосредованная аутофагия способствует поддержанию и функционированию НСК с помощью регулирования Red/Ox-статуса взрослых (неэмбриональных) НСК (Wang et al., 2013). Интересно, что различные области мозга отвечают на снижение аутофагии не одинаково, что указывает на нейрон-специфическую уязвимость к дефициту аутофагии. Так, наиболее уязвимыми нейронами к потере аутофагии являются клетки Пуркинью.

#### *1.14.2 Аутофагия при эпилепсии*

На пентилентетразоловой модели было показано увеличение маркеров аутофагии при киндлинге в гиппокампе (Wang et al., 2018). Также индукцию аутофагии показали при использовании каиновой кислоты в неокортексе: происходило увеличение соотношения LC3II к LC3I, экспрессии Beclin-1 и уменьшение экспрессии p62 и Bcl-2 (Li et al., 2018). Но в этом исследовании использовались очень молодые крысы - от 21- до 56-дневных, поэтому результаты нельзя однозначно экстраполировать на другие модели и сравнивать с другими возрастными группами. При ЭС, с одной стороны, происходит увеличение экспрессии маркеров аутофагии, а с другой стороны, происходит увеличение активности mTOR киназы, негативного регулятора аутофагии (Macias et al., 2013). Поэтому исследователи решили проверить эффекты ингибитора mTOR-киназы рапамицина на модели эпилепсии. Его использование показало неоднозначный результат. Одни исследователи сообщали, что хроническое введение рапамицина после ЭС, индуцированного пилокарпином, приводит к снижению частоты спонтанных повторяющихся судорог (Huang et al., 2010). При ЭС, индуцированного каиновой кислотой, было показано, что введение рапамицина перед началом судорог приводит к уменьшению частоты спонтанных судорог, снижению клеточной смерти и уменьшению спрутинга (Zeng et al., 2009). Другие исследователи выявили, что рапамицин препятствует спрутингу гранулярных клеток зубчатой извилины, но не влияет на частоту спонтанных повторяющихся судорог (Buckmaster and Lew, 2011).

Такие различия в данных могут быть связаны как с различиями в моделях ЭС (пилокарпин или каинат), так и со временем введения рапамицина. Так, введение ингибитора mTOR в течение 3 дней до ЭС препятствует как спрутингу, так нейродегенерации и aberrантному нейрогенезу, а при введении ингибитора за день до начала эксперимента приводит только к уменьшению спрутинга и частоты спонтанных повторяющихся судорог (однако не так эффективно, как при первом варианте введения) и не влияет на нейрогенез и нейродегенерацию (Giorgi et al., 2015; Meng et al., 2013). Киназа mTOR участвует во множестве процессов, происходящих в нейронах. Поэтому было интересно оценить непосредственное участие аутофагии в формировании эпилептической активности. Так, было показано, что у мышей, нокаутных по гену *ATG7*, наблюдаются спонтанные судороги. У этих мышей происходило уменьшение количества LC3II и аккумуляция p62 в гиппокампе и коре. У этих животных не наблюдалось апоптотической гибели нейронов в гиппокампе. Причинами возникновения судорог при непосредственном уменьшении аутофагии может являться изменение регуляции образования синаптических контактов между нейронами и уменьшение митофагии (аутофагии митохондрий) (McMahon et al., 2012).

### **1.15 Нейродегенерация при эпилепсии и в моделях заболевания**

У больных генерализованной тонико-клонической эпилепсией было показано, что самыми уязвимыми нейронами являются нейроны поля CA3 и гранулярные клетки (Dam, 1980). При височной эпилепсии потеря нейронов наблюдается в хилусе и поле CA1 и CA3 (Henshall and Meldrum, 2012).

При использовании Вестерн-блот для анализа ткани мозга больных медиальной височной эпилепсией, было показано увеличение экспрессии белка p53, каспазы 3, Bcl-2 и Fas-рецептора, и сделан вывод о том, что запуск апоптоза происходит рецепторным и p53-зависимым путем (Xu et al., 2007). При исследовании путей запуска апоптоза после введения пилокарпина удалось показать увеличение экспрессии нейротрофического рецептора p75, относящегося к семейству TNF-рецепторов, и был сделан вывод, что апоптоз происходит при активации этого рецептора (Roux et al., 1999).

Данные, касающиеся клеточной гибели, полученные на разных моделях эпилепсии, достаточно противоречивы. Было показано отсутствие клеточной гибели в дорсальном гиппокампе, древней коре и амигдале при моделировании фебрильных судорог (Dubé et al., 2004). На модели электрического kindlinga было выявлено, 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). Однако при использовании хемоконвульсантов гибель нейронов

наблюдалась в различных отделах гиппокампа: при PTZ-киндлинге апоптотическая гибель обнаруживалась в полях CA1, CA3 (Sun et al., 2019), при действии каиновой кислоты наибольшая нейродегенерация происходила в поле CA3/CA4, хилусе, в то время как поле CA1 и гранулярный слой зубчатой извилины оставался практически нетронутым. Также стоит отметить, что в *stratum oriens* наблюдалась потеря ГАМК-ергических интернейронов (Lévesque and Avoli, 2013). При моделировании ЭС с помощью пилоркорпина потеря клеток наблюдается в гранулярном слое и в хилусе зубчатой извилины, а также в поле CA1 и CA3. При исследовании гиппокампа методом TUNEL наибольшее количество апоптотических клеток выявлялось на 3-й день после ЭС. TUNEL-позитивные клетки в основном располагались в поле гиппокампа CA1, небольшое число апоптотических клеток выявлялось в гранулярном слое (Covolán et al., 2000a; Fujikawa et al., 1999; Roux et al., 1999). С помощью аргирофильного окрашивания поврежденные клетки были обнаружены в полях гиппокампа CA1, CA2 и CA3, а также в гранулярном слое зубчатой извилины, при повторном ЭС небольшое число поврежденных клеток было обнаружено в хилусе и поле CA1. Таким образом, после ЭС умирают самые уязвимые клетки и остаются самые устойчивые, и можно предположить, что эпилептические припадки повышают устойчивость выживших клеток, являясь таким образом своеобразным прекодиционированием (Covolán and Mello, 2006).

На животных с аудиогенной эпилепсией клеточную гибель исследовали на крысах линии WAR после 14-16-дневного аудиогенного киндлинга с помощью флуоресцентного окрашивания Fluoro-Jade (окрашивает дегенерирующие клетки) (Romcy-Pereira and Garcia-Cairasco, 2003). Однако нейродегенерации не было обнаружено. После длительного аудиогенного киндлинга (80 судорог) существенная потеря клеток была выявлена в амигдале с помощью прямого подсчета числа клеток (Galvis-Alonso et al., 2004). В моделях электрического киндлинга данные о нейродегенерации не однозначны. При индуцировании 16 судорог 5-го класса по шкале Racine (клонико-тонические судороги) методом TUNEL показано увеличение числа апоптотических клеток только в гранулярном слое зубчатой извилины (Osawa et al., 2001). При исследовании плотности нейронов после трех клонико-тонических судорог потеря нейронов наблюдалась в поле гиппокампа CA1, CA3 и в хилусе (Cavazos et al., 1994).

Самой многочисленной популяцией нейронов в хилусе являются мшистые клетки. Мшистые клетки это глутаматергические интернейроны, которые длинные и короткие проекции. Длинные проекции иннервируют ГК, а короткие иннервируют ГАМКергические интернейроны (Scharfman, 2016). При различных эпилептиформных состояниях происходит массовая гибель мшистых клеток (Blümcke et al., 2000; Jiao and Nadler, 2007;



Volz et al., 2011). Предполагается, что потеря этих клеток способствует эпилептогенезу. Гибель мшистых клеток приводит к нарушениям в активации ГАМК-ергических интернейронов хилуса, что в свою очередь может вести к гиперактивации гранулярных клеток. Мшистые клетки иннервируют МВ гранулярных клеток, и гибель мшистых клеток может провоцировать разрастание МВ (Jiao and Nadler, 2007).

### **Заключение**

Несмотря на обилие данных, практически ничего неизвестно об особенностях развития четверохолмия и гиппокампа у крыс с рефлекторной аудиогенной эпилепсией. Повышенная судорожная готовность у крыс линии КМ развивается в ходе постнатального онтогенеза и полностью формируется только к концу третьего месяца жизни, что позволяет охарактеризовать механизмы аберрантного нейрогенеза, апоптоза и аутофагии в гиппокампе и в нижних буграх четверохолмия как причины эпилепсии и определения их функционального значения для эпилептогенеза на крысах разного возраста.

Данных о механизмах нарушений структуры гиппокампа при формировании височной эпилепсии, полученных на животных с генетически обусловленной аудиогенной судорожной активностью, крайне мало. Аудиогенно-чувствительные крысы подвергнутые киндлингу могут служить адекватной моделью височной эпилепсии человека. Использование киндлинга различной продолжительности позволяет изучать этапы и механизмы структурной реорганизации гиппокампа наблюдаемые при формировании височной эпилепсии на данной модели.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Животные**

Крыс линии КМ получили из вивария биологического факультета МГУ в 2010 г. С тех пор в ИЭФБ РАН поддерживается популяция крыс линии КМ. Инбредность линии обеспечивается братско-сестринским скрещиванием (сибкросс). 100% крыс при звуковой стимуляции дают аудиогенный припадок. Для исследования реорганизации гиппокампа и ИС в ходе развития аудиогенной эпилепсии и в ходе формирования аудиогенного киндлинга были проведены две серии экспериментов. Животные, которые были использованы в экспериментах, содержались в стандартных условиях вивария, доступ к воде и еде был свободным. Все процедуры с использованием животных были одобрены этической комиссией ИЭФБ РАН.

Первая серия экспериментов. В данной серии экспериментов использовались животные разных возрастов. У крыс линии КМ судорожная готовность формируется в процессе онтогенеза, полный и стабильный припадок проявляется только к 3 месяцам (90

дней), до этого времени крысы или не способны на аудиогенный припадок (15 дней) или припадок состоит только из стадии дикого бега (30 – 60 дней). Так как линия Вистар является материнской для крыс линии КМ, крысы Вистар были взяты в качестве возрастного контроля. У контрольных и экспериментальных животных не были индуцированы аудиогенные припадки. В 2015 году в виварии ИЭФБ РАН проверяли крыс линии Вистар на АЭ. Всех животных этой линии, у которых обнаруживались припадки, не использовали в размножении. Вывод животных из эксперимента осуществлялся с помощью декапитирования.

- Первая группа – крысы линии Вистар (n=10) и КМ (n=10), 15 дней;
- Вторая группа – крысы линии Вистар (n =10) и КМ (n=10), 30 дней;
- Третья группа - крысы линии Вистар (n=10) и КМ (n=10), 60 дней;
- Четвертая группа – крысы линии Вистар (n=10) и КМ (n=10) 120 дней.

Вторая серия экспериментов. Во второй серии экспериментов половозрелые (4-х месячные) животные линии КМ подвергались аудиогенному киндлингу, который является моделью эпилептогенеза лимбической генерализованной эпилепсии. Многократные судорожные припадки приводит к возникновению эпилептиформной активности в гиппокампе и участках новой коры и к появлению новой стадии аудиогенного припадка – посттонического клонуса.

Животным раз в день подавался звуковой сигнал с частотой 9 кГц и громкостью 50 дБ, что приводило к возникновению эпилептических припадков у крыс линии КМ. Припадки регистрировались на видео для последующего анализа. Если у крыс в течение 1 минуты после начала звукового сигнала припадок не содержал все стадии, животное не использовалось в эксперименте. Доля таких животных крайне мала < 1% процент.

Были проанализированы следующие стадии аудиогенного киндлинга:

- ЭКСПОЗИЦИЯ ДЕЙСТВИЮ ЗВУКА 4-дня. Крысы линии КМ были разделены на 3 группы: 1) контрольная группа (n=10), состоящая из наивных крыс, у которых никогда не были индуцированы АСП - группа naïve; 2) крысы КМ (n=10) - после 4 АСП, которые были декапитированы через 24 ч после последнего АСП – группа 4+1;
- ЭКСПОЗИЦИЯ ДЕЙСТВИЮ ЗВУКА 4-дня после периода покоя. Крысы линии КМ были разделены на 2 группы: 1) контрольная группа (n=10), состоящая из наивных крыс, у которых не были индуцированы АСП - группа naïve; 2) крысы КМ (n = 10) - после 4 АСП, которые были декапитированы через 7 дней после последнего АСП – группа 4+7.

- ЭКСПОЗИЦИЯ ДЕЙСТВИЮ ЗВУКА 7-дней. Экспериментальные группы: 1) контрольная группа, состоящая из наивных крыс, (n=10) - группа naïve 2) крысы КМ (n = 8) после 7 АСП, которые были декапитированы через 24ч после последнего АСП– группа 7+1; 3) крысы КМ (n = 8) - после 7 АСП, которые были декапитированы через 7 дней после последнего АСП – группа 7+7.
- ЭКСПОЗИЦИЯ ДЕЙСТВИЮ ЗВУКА 14-дней. Экспериментальные группы: 1) контрольная группа, состоящая из наивных крыс, (n=10) - группа naïve 2) крысы КМ (n = 8) после 14 АСП, которые были декапитированы через 24ч после последнего АСП – группа 14+1;
- ЭКСПОЗИЦИЯ ДЕЙСТВИЮ ЗВУКА 21-день. Экспериментальные группы: 1) контрольная группа, состоящая из наивных крыс, (n=10) - группа naïve 2) крысы КМ (n = 8) после 21 АСП, которые были декапитированы через 24ч после последнего АСП – группа 21+1; 3) крысы КМ (n = 4) перенесли 21-ну звуковую стимуляцию, в результате которых изначально у крыс развивалось 4-5 АСП, после чего развитие АСП в ответ предъявление звука не происходило. Крысы были декапитированы через 24ч после последнего звукового предъявления – группа resistance
- ЭКСПОЗИЦИЯ ДЕЙСТВИЮ ЗВУКА 14- и 21-день после периода покоя. Экспериментальные группы: 1) контрольная группа, состоящая из наивных крыс, (n=5) - группа naïve; 2) крысы КМ (n = 5) - после 14 АСП, которые были декапитированы через 7 дней после последнего АСП – группа 14+7, крысы КМ (n = 5) - после 21 АСП, которые были декапитированы через 7 дней после последнего АСП – группа 21+7.

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

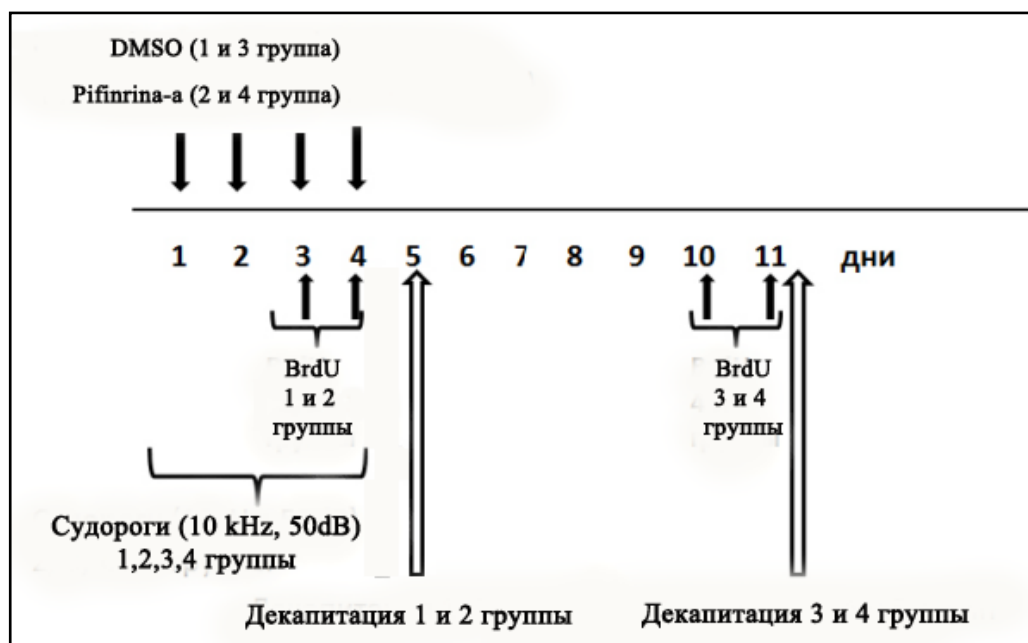


Рисунок 12. Схема эксперимента.

**1-я и 3-я группа** – группа контроля, крысы подвергались звуковой стимуляции в течение 4 дней и получали инъекции DMSO за 1 ч до каждого предъявления звука. Крысы этих экспериментальных групп были декапитированы через 24 ч (1-я группа) или через 7 дней (3-я группа) после последней инъекции.

**2-я и 4-я группа** – подвергалась звуковой стимуляции в течение 4 дней и 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. Крысы были декапитированы через 24 ч (2-я группа) или через 7 дней (4-я группа) после последней инъекции. Все животные дважды получали инъекции BrdU i.p. (BrdU, Sigma) (100 мг/кг) в последние 2 дня перед декапитацией.

Далее 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 на 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. Шкала Racine была разработана на модели электрического киндлинга. Так как развитие посттонического клонуса у крыс линии КМ отличается от описанных ранее лимбических припадков, в нашей работе для описания тяжести посттонической стадии мы модифицировали шкалу Racine (табл. 1). Моделирование лимбических судорог считалось успешным, если у животных

возникали 3 следующих друг за другом посттонических припадков (тяжесть припадков должна быть 4 или больше по модифицированной шкале) и одного тяжелого припадков (5 - 6 по модифицированной шкале).

**Таблица 1.** Шкала Racine модифицированная и оригинальная

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

### 2.3 Обработка материала

Во всех экспериментах взятие материала, пробоподготовка и изготовление анализов осуществлялись аналогичным образом.

Для гистологического анализа животные были наркотизированы смесью Золетил/Ксилазина (Zoletil/Xylazine Virbac, Франция). Крысы были перфузированы охлажденным 0.01М фосфатно-солевым буфером (PBS: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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, и 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  $-45^{\circ}\text{C}$  изопентан. Материал хранили в морозильной камере при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Изготовление чередующихся серий фронтальных срезов толщиной 10 мкм происходило на криостате фирмы Leica при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Таблица 2.** Антитела, используемые для иммуногистохимического выявления.

Антиген	Первичное антитело (хозяин, концентрация, фирма производитель, кат. номер)	Вторичное антитело
BrdU	Мышь, 1:500, Sigma- Aldrich, #B8434	Анти-мышь IgG конъюгированные с Alexa Fluo, 1:1000 Invitrogen, #762708
LC3B	Мышь, 1:250, Cell Signaling, #E5Q2K	
VGLUT	Мышь, VGLUT1 1:200 Millipore, #MAB5502; VGLUT2 1:500, Millipore, #MAB5504	
Ki-67	Кролик, 1:300, Millipore, #AB9260	Анти-кролик IgG конъюгированные с Alexa Fluor 488; 1:1000 Invitrogen, #913909
DCX	Кролик, 1:300, Cell Signaling, #4604	
cathepsin D	Кролик, 1:300, Boster, #PB9048	
cleaved caspase 3	Кролик, 1:400, Cell Signaling, #5A1E	
NeuN	Кролик, 1:500, Cell Signaling, #12943	

Synaptopodin	Кролик, 1:250, Novus Biologicals, #NBP2-39100	Анти-кролик IgG конъюгированные с биотином; 1:300 Sigma-Aldrich, #A5420
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Кролик, 1:250, Cell Signaling, #4376	
GluR2	Кролик, 1:250, Novus Biologicals, #NBP2-75510	

## 2.4 Иммуногистохимический метод

Для оценки содержания и локализации интересующих нас белков в IC и гиппокампе был использован метод иммуногистохимического анализа. Для выявления антигенов использовали первичные антитела (табл. 2). Краткий протокол:

### 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 М цитратном буфере (pH 6.0) в течение 15 минут, после чего буферный раствор охлаждали 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) (табл. 2), антитела разводили в блокирующем растворе. После инкубации и промывке срезов в PBS и PBST, проводилась инкубация в темноте со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями и DAPI (1:2000, Sigma-Aldrich, #D9542), в течение часа при комнатной температуре. При двойном иммуномечении срезы одновременно инкубировали в растворе 2 антител. 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 М цитратном буфере (pH 6.0) в течение 15 минут, после чего буферный раствор охлаждали 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) (табл. 2), антитела разводили в блокирующем растворе. После инкубации и промывки срезов в PBS и PBST проводили инкубацию со 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 промывали в дистиллированной воде. После чего стекла подвергали стандартной гистологической обработке и заключали в акриловую среду «Витрогель».

## **2.5 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 дезоксирибонуклеотидил трансфераза (ТдТ). В работе использовался ApopTag® Plus In Situ Apoptosis Fluorescein Detection Kit. Краткий протокол:

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, после чего буферный раствор охлаждался в течение 15 минут. Далее срезы промывали PBS и PBS с 0.03%-ным Triton x100 (PBST). После промывки 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 дегидроксигеназы, 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.

## **2.6 Timm окрашивание**

Timm окрашивание проводилось для визуализации мшистых волокон в зубчатой извилине и оценке спрутинга волокон во внутренний молекулярный слой зубчатой



извилины. В основе окрашивания лежит связывание серебра и сульфидов с Zn-содержащими волокнами. Использовался набор FD Rapid TimmStain Kit (FD Neuro Technologies Inc., #PK701). Краткий протокол:

Для окрашивания методом Timm животные были наркотизированы смесью Золетил/Ксилазина (Zoletil/Xylazine Virbac, Франция). Животные были перфузированы холодной смесью 1:1 HCL и Na<sub>2</sub>S в течение 10 минут, после чего были перфузированы 0.1M фосфатным буфером (pH 7.4) и 5%-ным раствором формалина, далее животные были декапитированы. Мозг извлекали из черепной коробки и постфиксировали в 5%-ном растворе формалина при +4°C в течение 5 дней, и 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 в морозильной камере при температуре -80°C. 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.

## 2.7 Вестерн-блот анализ

Приготовление проб для вестерн-блот анализа из головного мозга иссекали нижние бугры четверохолмия и гиппокамп и после взвешивания добавляли лизатный буфер в соотношении 1:10 (20 mM Трис pH 7.5; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1% Triton X-100), содержащий ингибиторы протеаз (PhosSTOP, Roche) и фосфатаз (Sigma). Образцы гомогенизировали и оставляли на льду в течение 1 часа. Далее лизаты центрифугировали в течение 15 минут при 12000 g при +4 °C, супернатант отбирали в эппендорфы, к двум частям отобранного супернатанта добавляли 1 часть 3-кратного SDS-буфера, содержащего 0.2 M Трис-HCl, pH 6.7; 6% додецилсульфата натрия; 15% глицерина; 0.003% бромфенолового синего и 10% β- меркаптоэтанола. Пробы инкубировали в течение 10 минут при температуре +96 °C. Готовые пробы хранили в морозильной камере при температуре -20°C до проведения вестерн-блот анализа.

Для исследования апоптоза и аутофагии, разделение белковых проб проходило в 10-12%-ном полиакриламидном геле по Лэммли (SDS-page). После электрофореза осуществляли блоттинг (перенос) белков на нитроцеллюлозную мембрану с помощью «мокрого» переноса. Мембраны окрашивали красителем Ронсеау, для контроля качества переноса и использования в качестве загрузочного контроля. Далее мембрану отмывали в растворе TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) в течение 10 мин. Затем, для блокирования неспецифического связывания антител, мембраны инкубировали в

буфере TBS-T, содержащем 3%-ый бычий сывороточный альбумин или 3%-ое сухое обезжиренное молоко, в течение 1 часа. Затем мембраны инкубировали с раствором первичных антител (табл. 3), разведенных на блокирующем растворе, в течение ночи при 4°C. После промывок мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Проявка мембран проводилась с помощью набора SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, #34075).

Детекция хемилюминисценции 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).

**Таблица 2.** Антитела, используемые для Вестерн-блоттинга.

Антиген	Первичное антитело (хозяин, концентрация, фирма производитель, кат. номер)	Вторичное антитело
cleaved caspase 3	Кролик, 1:1000, Cell Signaling, #5A1E	Анти-кролик IgG, конъюгированные с пероксидазой, 1:10000, Sigma-Aldrich, #A0545
Phospho-p53 (Ser15)	Кролик, 1:500, Cell Signaling, #D4S1H	
Pro-caspase 9	Кролик, 1:500, Epitomic, #1084-1	
Cleaved caspase 9	Кролик, 1:750, GeneTex, #GTX86912	
Caspase 8	Кролик, 1;500, Abcam, #ab25901	
Bcl-2	Мышь, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, sc-7382	Анти-мышь IgG, конъюгированные с пероксидазой, 1:40000, Sigma-Aldrich, #A9044
p53	Мышь, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, #sc-98	

phospho-Bcl-2 (Ser70)	Кролик, 1:1000, Millipore, #05-843R	Анти-кролик IgG, конъюгированные с пероксидазой, 1:10000, Sigma-Aldrich, #A0545
Beclin-1	Кролик, 1:1000, MBL Life Science, #PD017	
p62	Кролик, 1:1000, Novus Biologicals, #NBP1-48320	
b-tubulin	Кролик, 1:1000, Cell Signaling, #2148	
LC3B	Мышь, 1:500, Cell Signaling, #E5Q2K	Анти-мышь IgG, конъюгированные с пероксидазой, 1:40000, Sigma-Aldrich, #A9044
Actin	Мышь, 1:1000, Abcam, #ab3280	
GAPDH	Мышь, 1:1000, Cell Signaling, #97166	

## 2.8 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 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 Synaptorodin) и гранул серебра измерялась в программе Image J (НИН, 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 фона. Фоном выбирался участок ткани того же среза, не содержащий иммунореактивного вещества.

Для оценки апоптоза были подсчитаны *clCasp3* and TUNEL-позитивные клетки в гиппокампе. Для оценки изменений в количестве клеток было подсчитано количество ядер, окрашенных DAPI на  $0.0001 \text{ мм}^2$  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, в поле гиппокампа CA4.

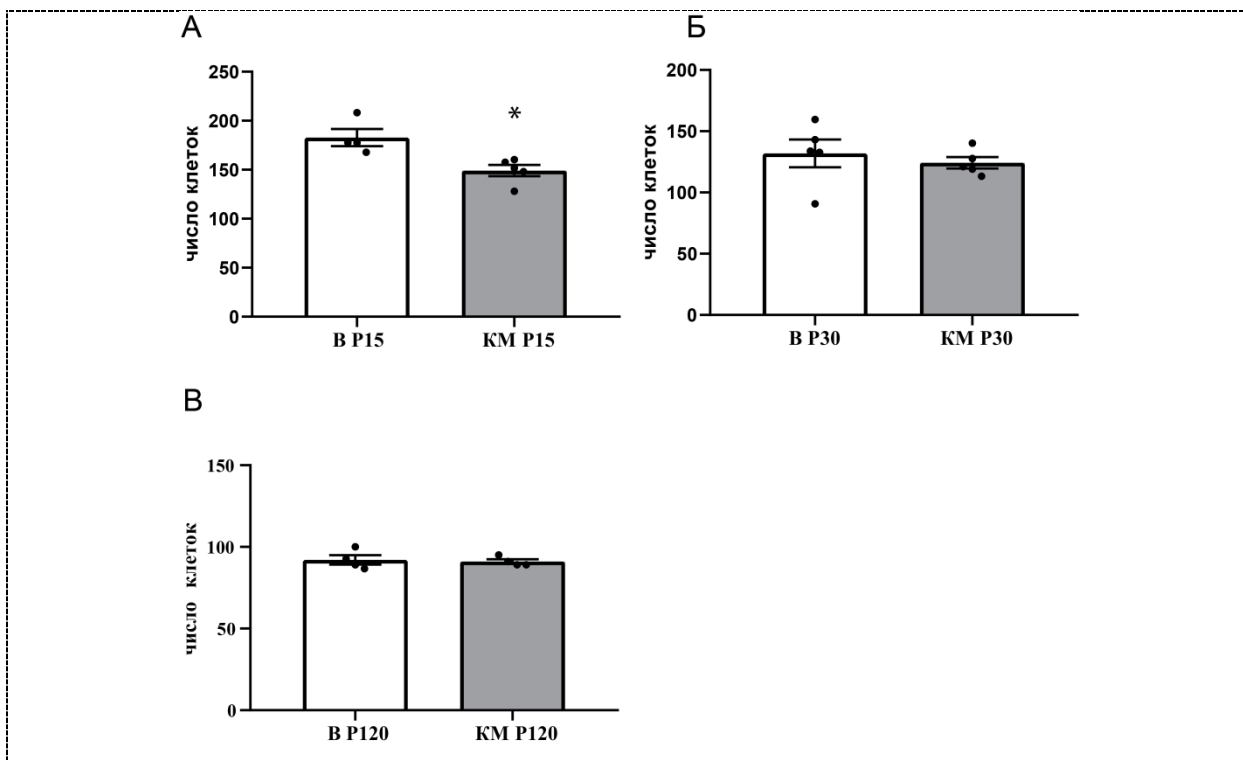
Все полученные данные обрабатывались статистически по U-критерию Манна-Уитни, критерию Краскела-Уоллиса и post-hoc критерию Данна с помощью программы GraphPad Prism 7 и Microsoft Excel. Был проведен корреляционный анализ Спирмена между продолжительностью посттонических припадков, их тяжестью и количеством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

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **3.1 Аудиогенная эпилепсия**

#### *3.1.1 Развитие нижних бугров четверохолмия*

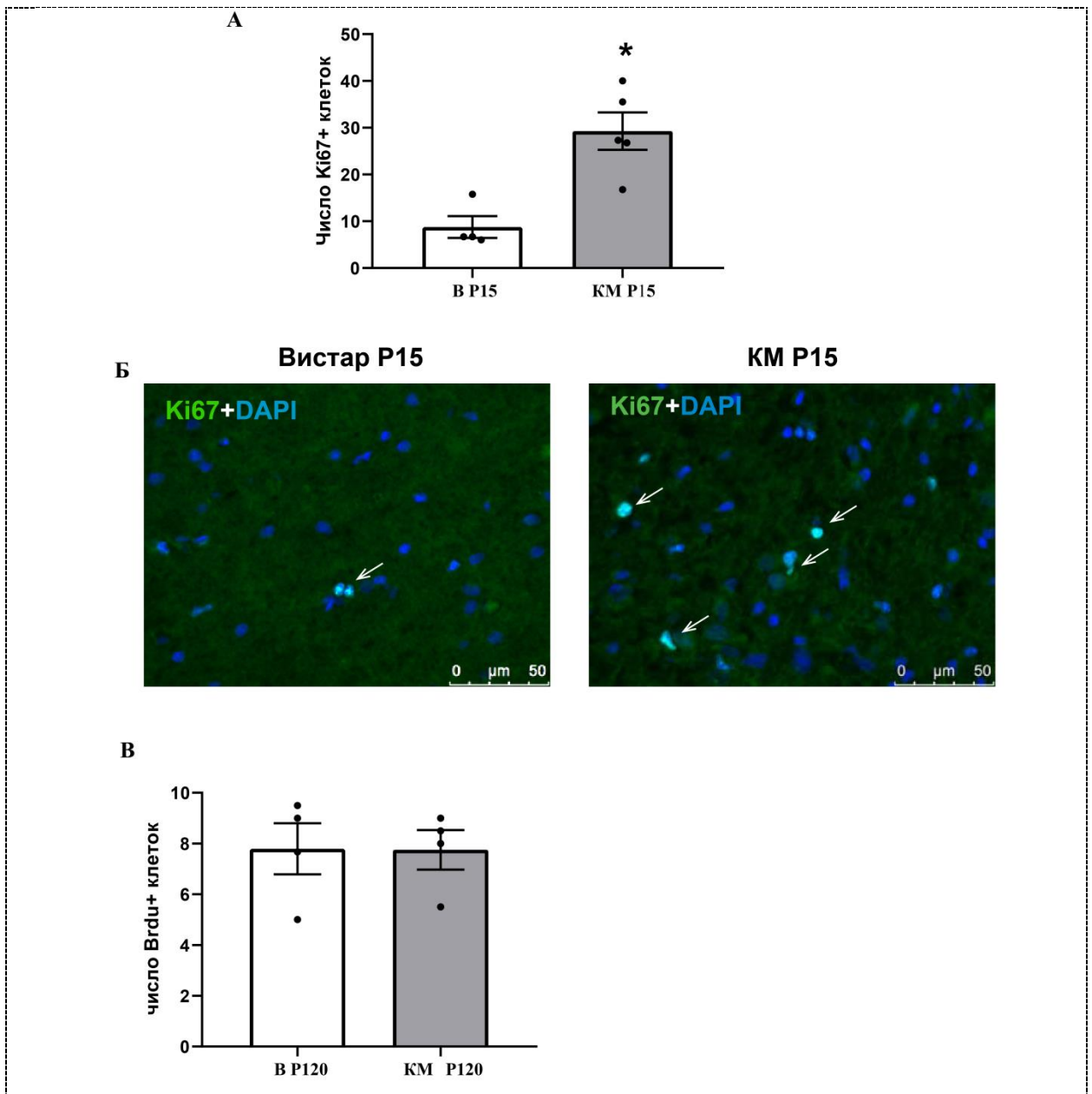
Число клеток было проанализировано в вентральной части нижнего двуххолмия: центральном ядре. У 15-дневных крыс линии КМ наблюдается меньшее число клеток по сравнению с крысами линии Вистар того же возраста (рис. 13 А). На других сроках постнатального развития (P30 и P120) отличий в числе клеток между крысами КМ и Вистар обнаружено не было (рис.13 Б, В).



**Рисунок 13.** Анализ количества клеток в СИС. А – число клеток у 15-дневных крыс линии Вистар и КМ; Б - число клеток у 30-дневных крыс линии Вистар и КМ; В - число клеток у 120-дневных (взрослых) крыс линии Вистар и КМ; Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. Черными точками показаны индивидуальные значения. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

## Пролиферация

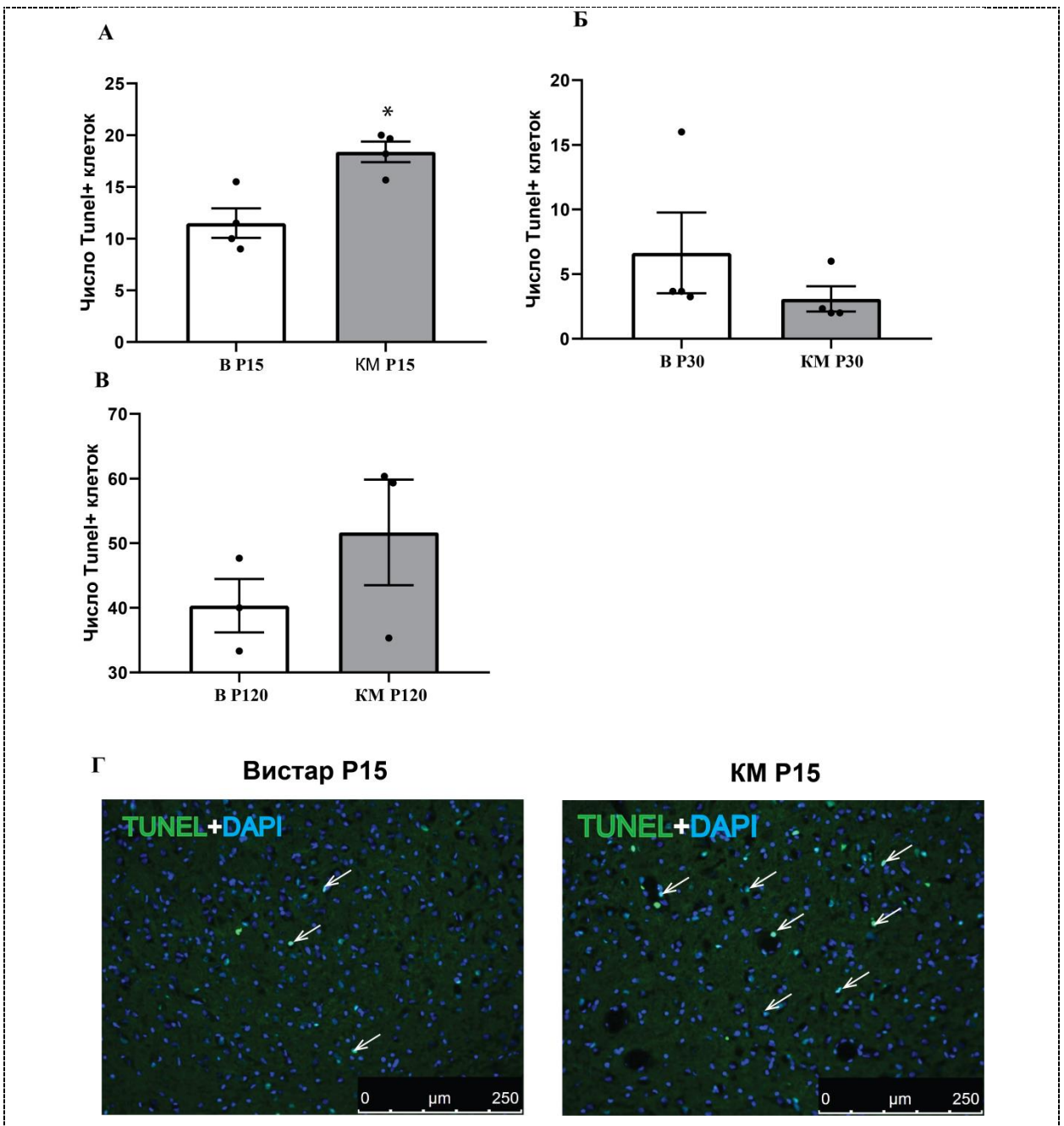
Иммуногистохимическое выявление маркера пролиферации белка Ki-67 показало увеличение количества иммуномеченных клеток в СИС крыс КМ 15-дневного возраста по сравнению с крысами Вистар того же возраста (рис. 14 А, Б). На 30-й день постнатального развития отличий обнаружено не было. Анализ количества BrdU-позитивных клеток у взрослых животных (P120) также не выявил отличий в уровне пролиферации между крысами КМ и Вистар (рис. 15 В).



**Рисунок 14.** Анализ уровня пролиферации у 15-дневных крыс линии КМ и Вистар. А - число Ki-67-иммунопозитивных в CIS; Б – иммунофлуоресцентное выявление Ki-67-иммунопозитивных клеток в CIS крыс Вистар и КМ. В - число BrdU-позитивных клеток в CIS у 120-дневных (взрослых) крыс линии Вистар и КМ. Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на Ki-67-иммунопозитивные клетки. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

### Апоптоз

Метод TUNEL показал, что у 15-дневных крыс линии КМ обнаруживается больше апоптотических клеток, чем у крыс Вистар того же возраста (рис.15 А, Г). На 30-й и 120-й день постнатального развития в CIS различий в уровне апоптоза обнаружено не было (рис.15 Б, В).



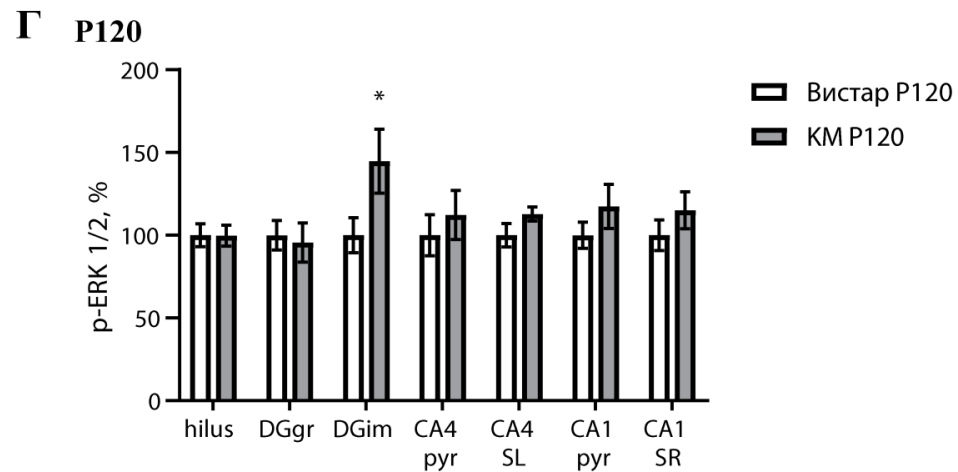
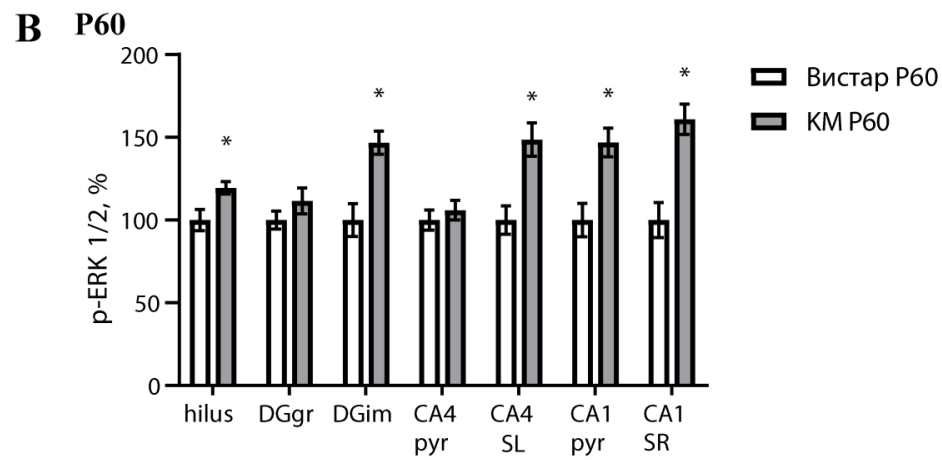
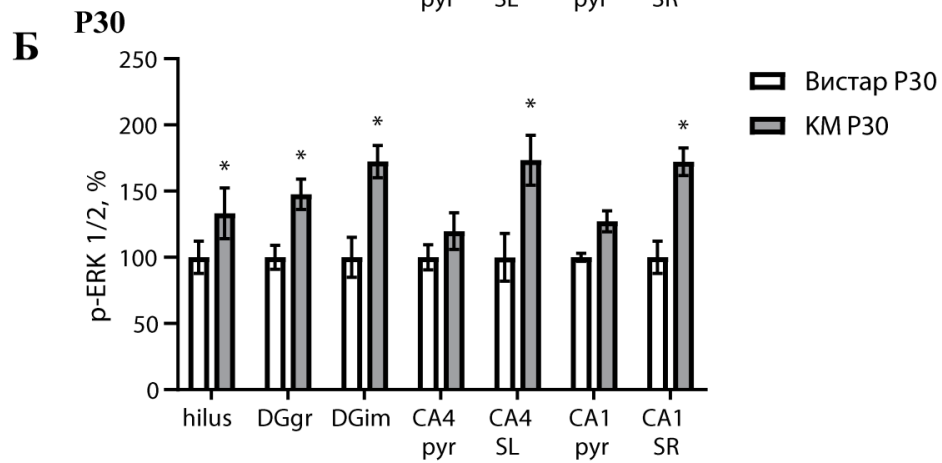
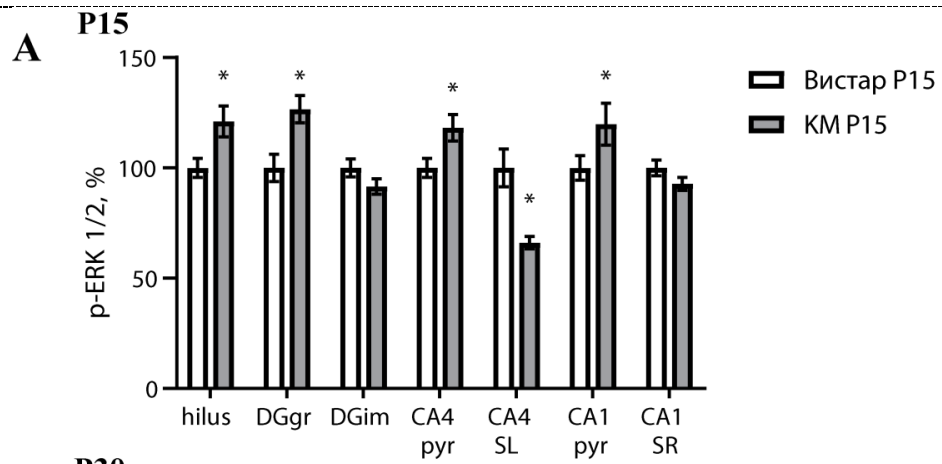
**Рисунок 15.** Анализ уровня апоптоза у крыс линии КМ и Вистар. А - число TUNEL+ клеток в СИС у 15-дневных крыс линии Вистар и КМ; Б – число TUNEL+ клеток у 30-дневных крыс линии КМ и Вистар; В - иммунофлуоресцентное выявление TUNEL+ клеток в СИС крыс Вистар и КМ. Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на TUNEL+ клетки. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

### 3.1.2 Развитие гиппокампа

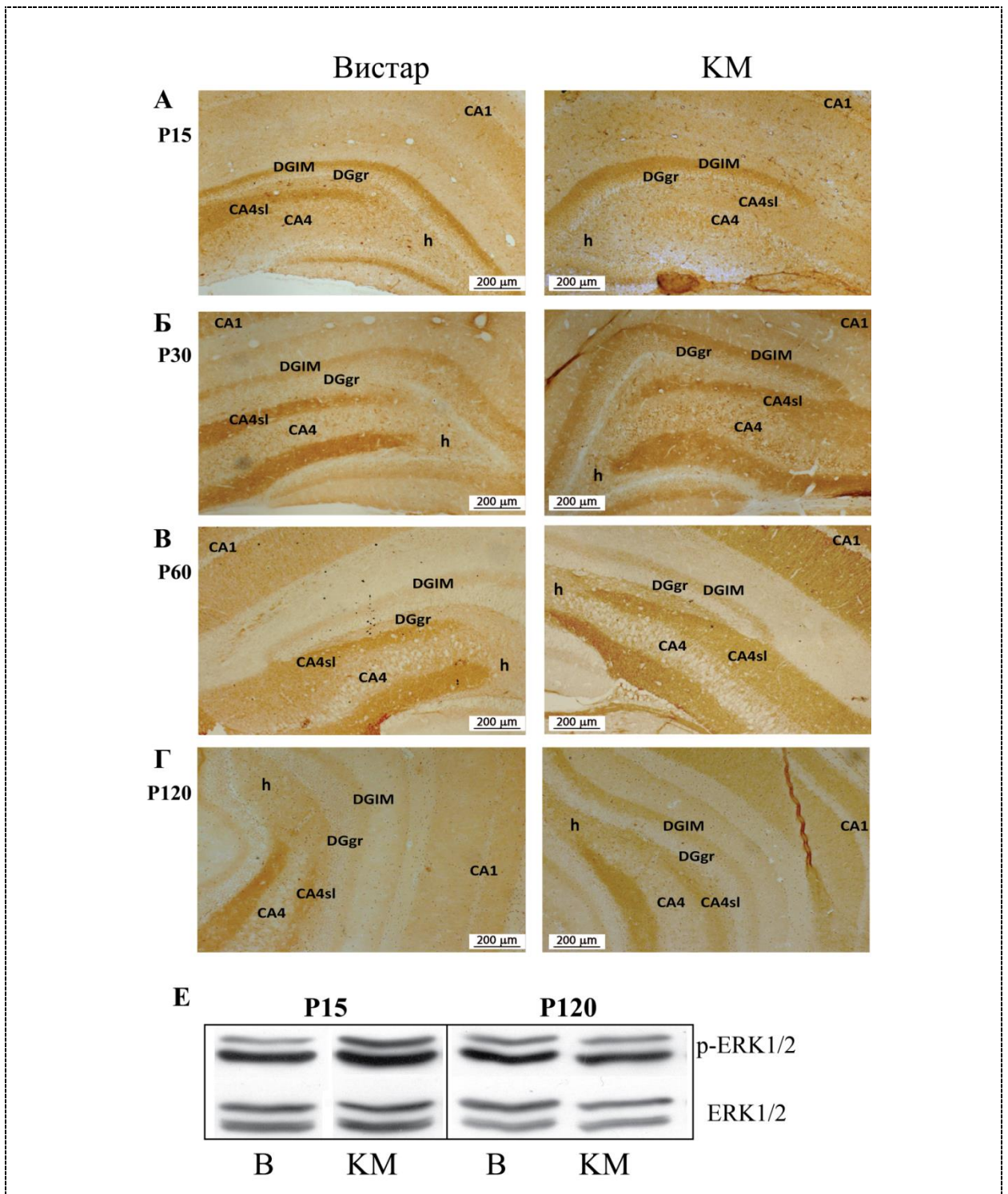
#### 3.1.2.1 Активность ERK1/2 киназы в гиппокампе крыс линии КМ и Вистар

У 15-дневных крыс линии КМ было показано увеличение оптической плотности р-ERK1/2 иммунореактивного вещества в хилусе и гранулярном слое зубчатой извилины, а также в пирамидном слое СА4 и СА1 по сравнению с крысами линии Вистар того же возраста (рис.15 А; рис. 16 А). У 30- и 60-дневных крыс линии КМ повышение активности ERK1/2 киназы было обнаружено в хилусе, гранулярном (P60) и молекулярном слоях зубчатой извилины, в stratum lucidum поля СА4 и в stratum pyramidale, stratum radiatum поля СА1 (P60) (рис.16 Б, В; рис. 17 Б, В). Это свидетельствует о высокой активности ERK1/2 киназы в гиппокампе в первые месяцы жизни у крыс КМ по сравнению с крысами Вистар. У 4х-месячных крыс линии КМ по сравнению с крысами Вистар обнаруживается увеличение оптической плотности р-ERK1/2 иммунореактивного вещества только в молекулярном слое зубчатой извилины (рис. 15 Г; рис. 16 Г). Вестерн-блотт анализ проб гиппокампов показал, что в уровне фосфорилирования ERK1/2 между 4х-месячными крысами линии Вистар и КМ различий нет (рис. 17 Д).





**Рисунок 16.** Анализ уровня активности ERK1/2 в гиппокампе крыс линии КМ. Содержания pERK1/2-иммунореактивного вещества в гиппокампе крыс линии КМ по сравнению с крысами линии Вистар соответствующего возраста P15 (А), P30 (Б), P60 (В), P120 (Г). Оптическая плотность pERK1/2-иммунореактивного вещества была определена для каждой зоны гиппокампа и зубчатой извилины крыс Вистар и принята за 100%, оптическая плотность у крыс линии КМ нормировалась относительно крыс Вистар. Данные представлены в виде среднего процента  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ . Hilus - хилус; DGgr – гранулярный слой зубчатой извилины; DGim – молекулярный слой зубчатой извилины; CA4 pyr – stratum pyramidale поля CA4; CA4 SL – stratum lucidum поля CA4; CA1 pyr - stratum pyramidale поля CA1; CA1 SR - stratum lucidum поля CA1.



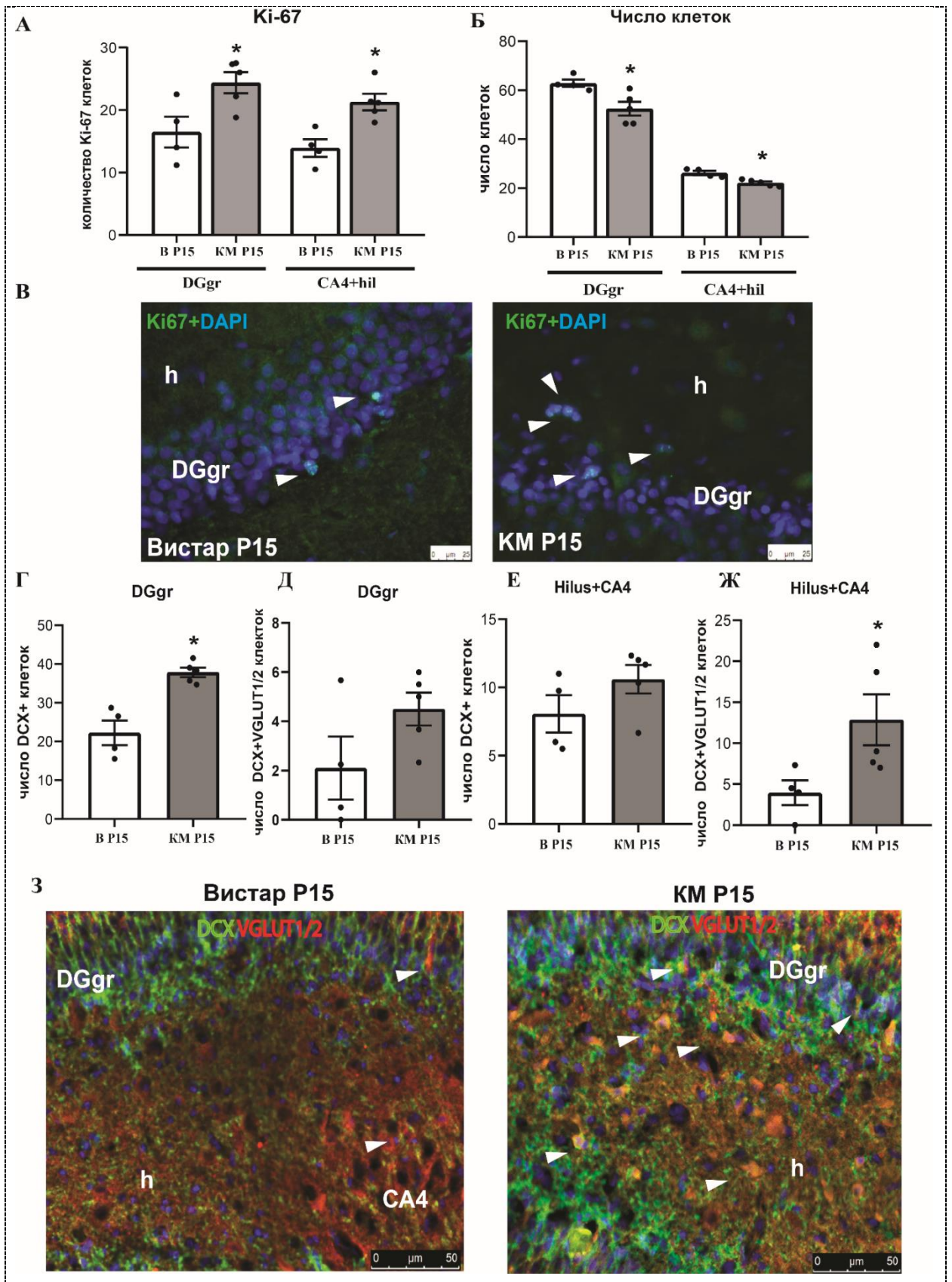
**Рисунок 17.** Детекция *pERK1/2* в гиппокампе крыс линии Вистар и КМ с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга. А – Г – иммуногистохимическая реакция на *pERK1/2* в гиппокампе и зубчатой извилине крыс линии Вистар и КМ P15, P30, P60 и P120; Е - вестерн- блот *pERK1/2* в гиппокампе крыс линии КМ и Вистар P15 и P120. h - хилус; DGgr – гранулярный слой зубчатой извилины; DGIM – молекулярный слой зубчатой извилины; CA4 – stratum pyramidale поля CA4; CA4 SL – stratum lucidum поля CA4; CA1 - поля CA1.

### 3.1.2.2 Нейрогенез и апоптоз в гиппокампе у крыс линии КМ и Вистар

#### **P15**

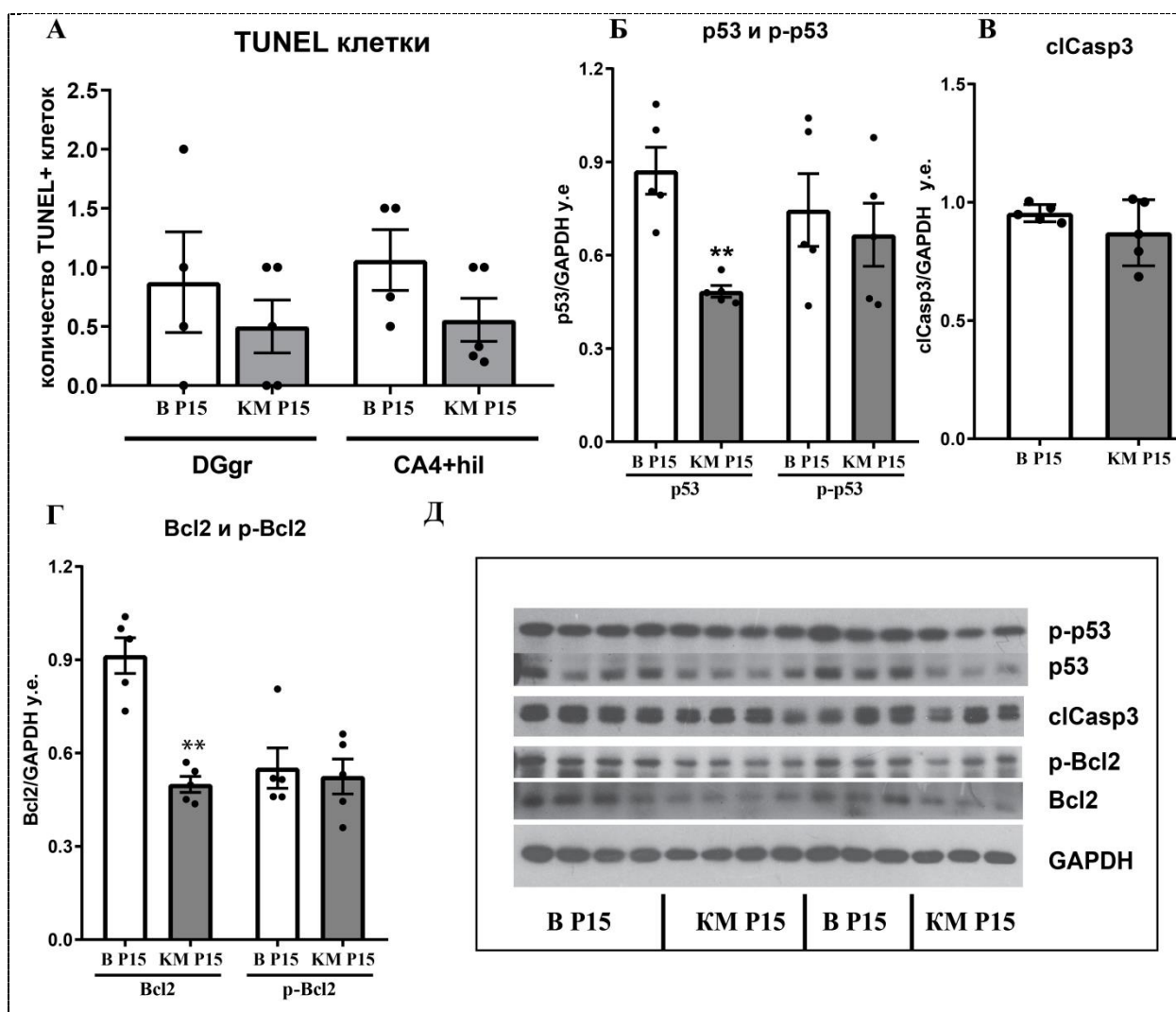
Подсчет числа клеток в грануляном слое зубчатой извилины и в зоне хилуса, поле СА4 показал достоверно меньшее число клеток у крыс линии КМ 15-дневного возраста по сравнению с крысами линии Вистар (Рис. 18 Б). Иммуногистохимическое выявление маркера пролиферации Ki-67 показало большее число делящихся клеток в грануляном слое зубчатой извилины и в зоне хилуса, поле СА4 у крыс линии КМ по сравнению с крысами линии Вистар (рис.18 А,В) У 15-дневных крыс линии КМ наблюдается повышенное число DCX-иммунопозитивных клеток по сравнению с крысами линии Вистар того же возраста (рис. 18 Г). Двойное иммунофлуоресцентное выявление DCX и VGLUT1/2 (маркер глутаматных нейронов) показало большее число дифференцированных нейронов в хилусе и поле СА4 у 15-дневных крыс линии КМ, чем у крыс линии Вистар (рис.18 Ж, З).

С помощью метода TUNEL показано, что достоверных различий в уровне апоптоза в зубчатой извилине у 15-дневных крыс линий Вистар и КМ нет (рис 19 А). Вестерн-блоттинг выявил, что у крыс линии КМ понижен уровень Bcl-2, p53, хотя уровень фосфорилирования этих белков не отличался от характерного для крыс линии Вистар (рис.19 Б, Г, Д). Содержание cIcasp3 у крыс линий КМ и Вистар не отличался (рис. 19 В, Д). Вестерн-блоттинг показал, что отличий в уровне белков аутофагии (Beclin-1, p62 и LC3BI) между 15-дневными крысами линии КМ и Вистар также нет (рис.20).

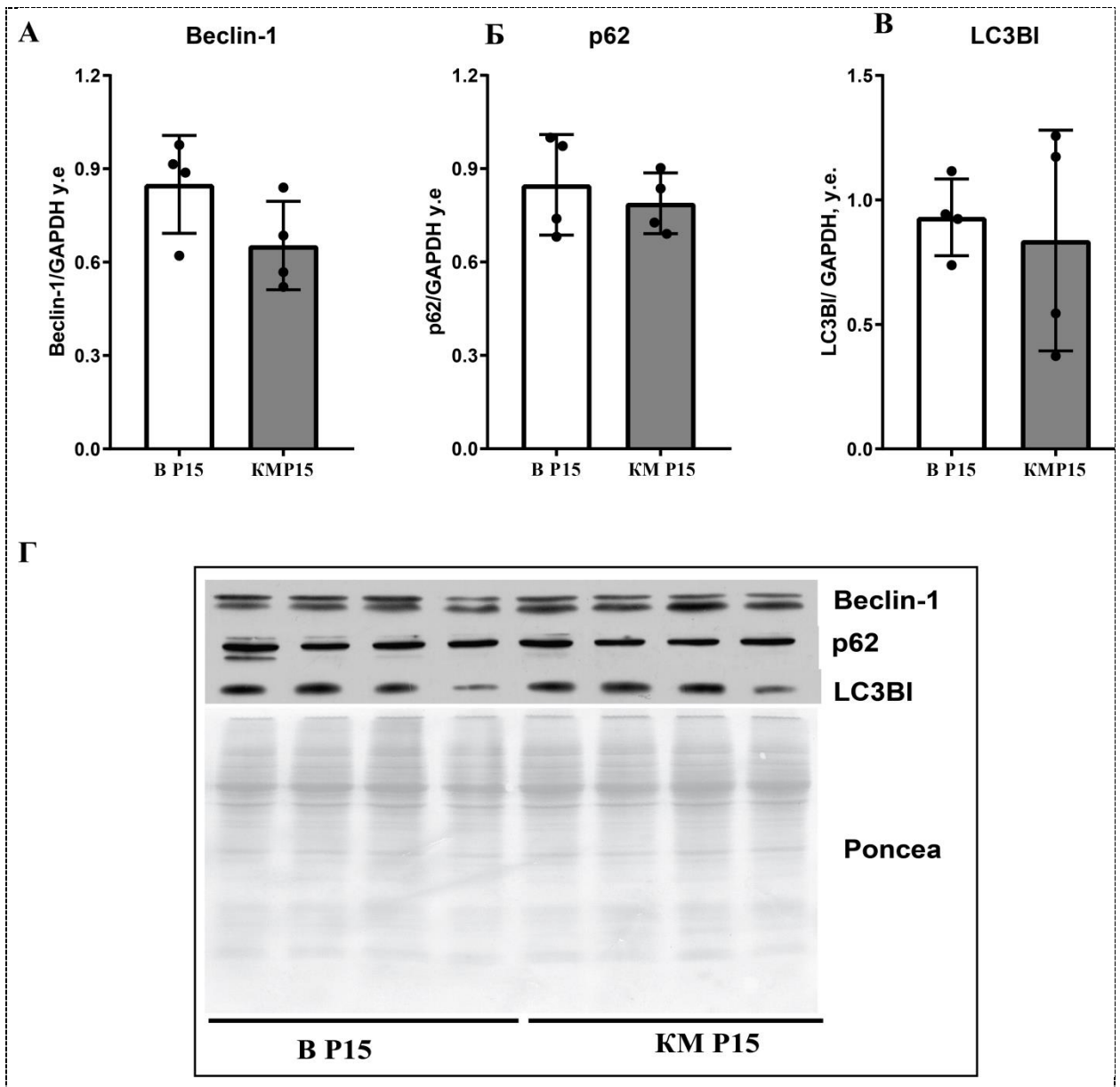


**Рисунок 18.** Анализ количества клеток и уровня пролиферации в гиппокампе крыс линий Вистар и КМ на 15-день постнатального развития. А – число Ki-67-иммунореактивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr), хилусе и в поле CA4 гиппокампа; Б – число клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr), хилусе и в поле CA4 гиппокампа; В –

иммунофлуоресцентное выявление пролиферирующих клеток в зубчатой извилины 15-дневных крыс линии Вистар и КМ; стрелки указывают на Ki-67-иммунореактивные клетки (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий); Г – число DCX-иммунореактивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr); Д – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2 в гранулярном слое зубчатой извилины; Е – число DCX-иммунореактивных клеток в поле СА4 и хилусе; Ж – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2 в поле СА4 и хилусе; З - иммунофлуоресцентное выявление, DCX (зеленый), VGLUT1/2 (красный) иммунореактивных клеток в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2. Ядра окрашены DAPI (синий). Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



**Рисунок 19.** Анализ апоптоза в гиппокампе на 15-й день постнатального развития. А – число TUNEL-позитивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr), хилусе и в поле СА4 гиппокампа. Уровень p53 и p-p53 (Б), cIcasp3 (В), Bcl2 и p-Bcl2 (Г) в гиппокампе 15-дневных крыс линии Вистар и КМ. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



**Рисунок 20.** Анализ аутофагии в гиппокампе на 15-й день постнатального развития. Уровень Beclin-1 (A), p62 (Б), LC3BI (B) в гиппокампе 15-дневных крыс линии Вистар и КМ. (Г) репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p62, Beclin-1, LC3BI в гиппокампе 15-дневных крыс линии КМ и Вистар. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали Понсеа. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 005$ .

### Р30

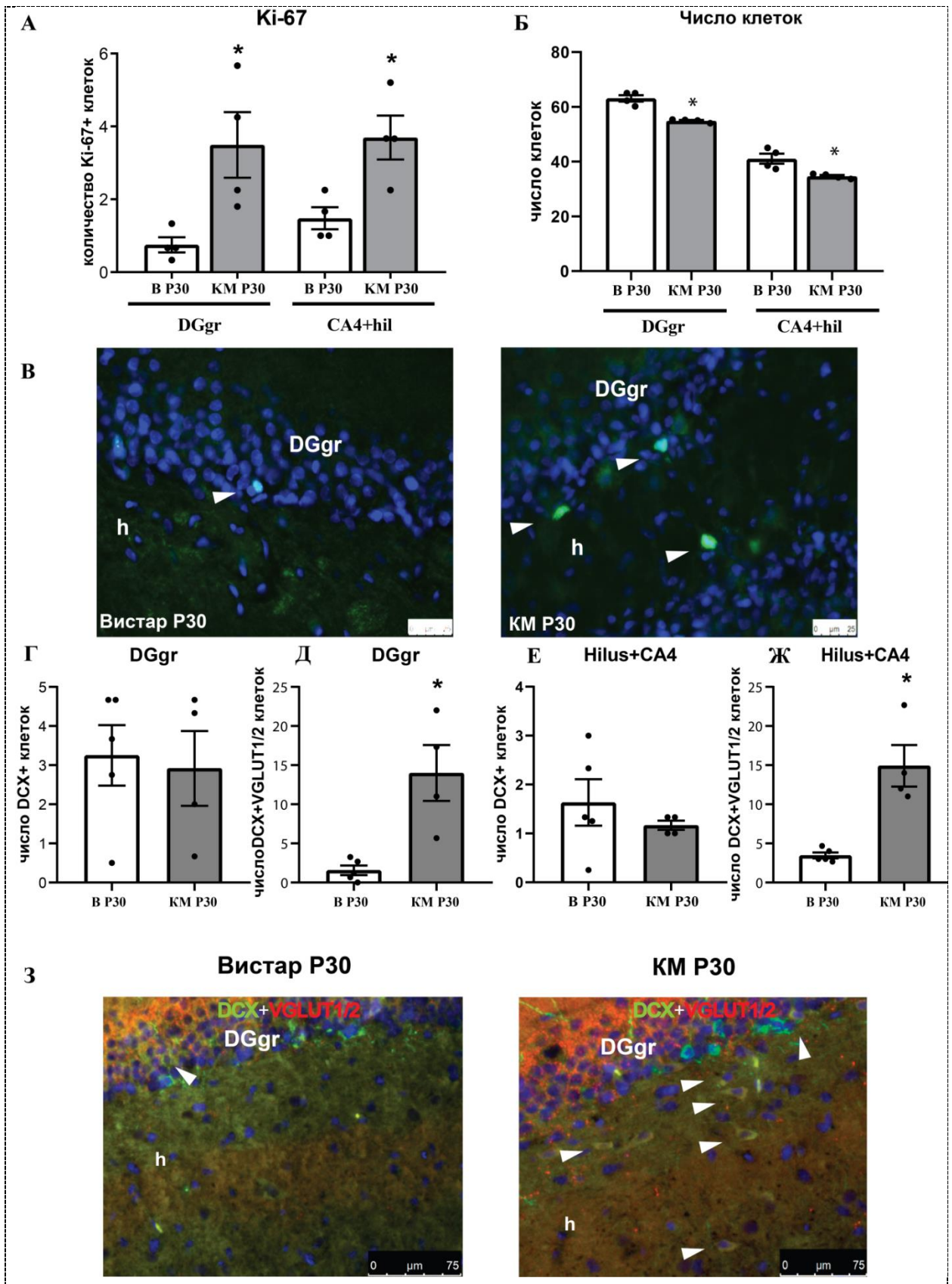
Подсчет числа клеток показал, что у крыс линии КМ 30-дневного возраста достоверно меньше клеток в гранулярном слое зубчатой извилины, хилусе и поле СА4 гиппокампа, чем у крыс линии Вистар этого возраста (рис. 21 Б). У 30-дневных крыс линии КМ наблюдается большее число Ki-67-иммунореактивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины, хилусе и поле СА4, чем у крыс линии Вистар (рис. 21 А, В). Число DCX-иммунореактивных клеток в исследуемых отделах гиппокампа и зубчатой извилины

не отличается между 30-дневными крысами КМ и Вистар (рис. 21 Г, Е). Однако количество клеток, ко-экспрессирующих DCX и VGLUT1/2, повышено у крыс линии КМ в гранулярном слое зубчатой извилины, хилусе и поле СА4 (рис. 21 Д, З).

Количество TUNEL-позитивных клеток повышено в гиппокампе у крыс КМ (P30) по сравнению с крысами линии Вистар этого же возраста (рис. 22 А, Б). У крыс КМ 30-дневного возраста повышена экспрессия проапоптотических белков: cIcasp9, cIcasp3, p53 и снижен уровень proCasp9 по сравнению с крысами линии Вистар (рис. 22 В-У; рис. 22).

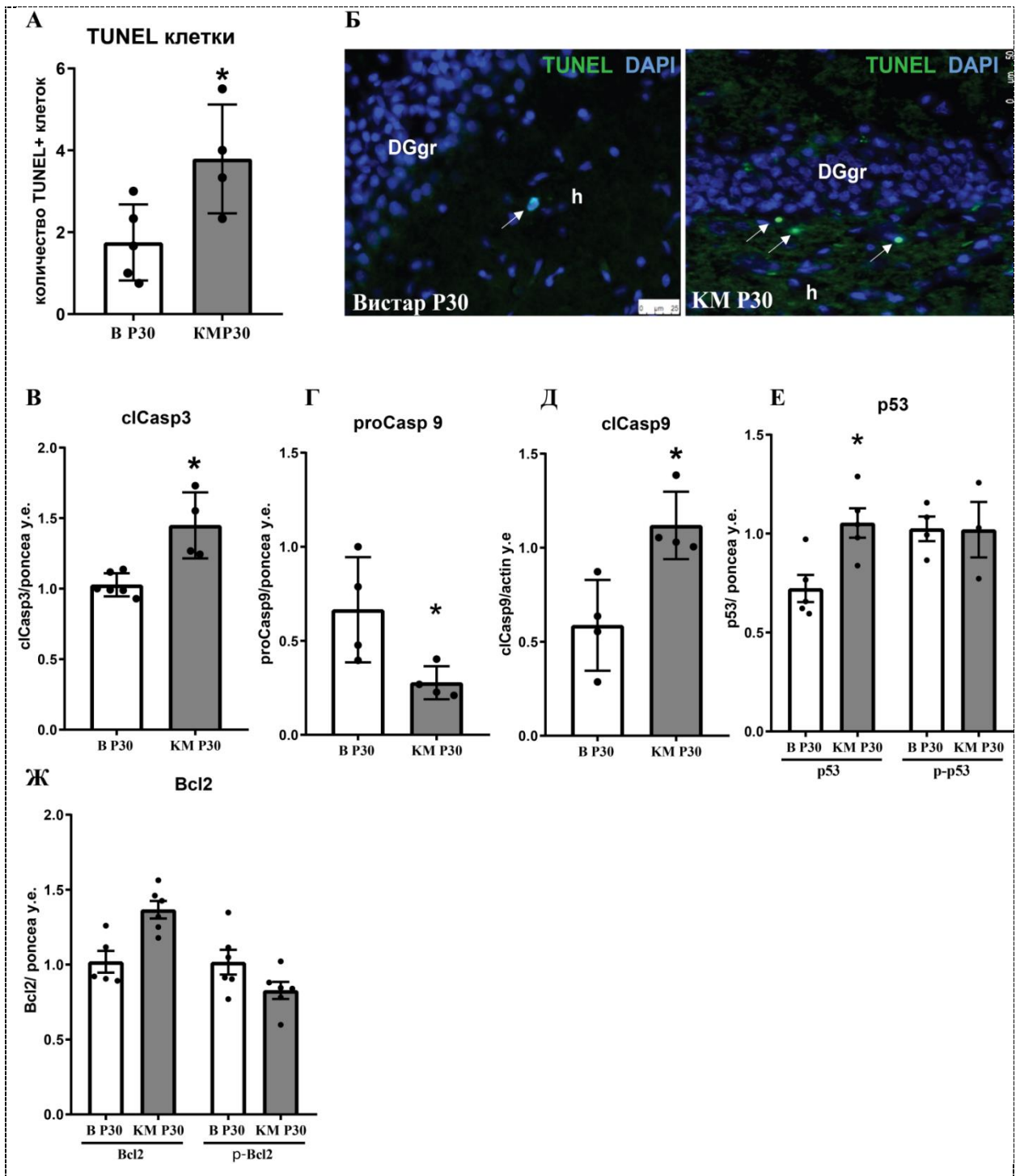
При изучении белков аутофагии было показано, что у крыс линии КМ 30-дневного возраста содержание LC3ВІ повышено по сравнению с крысами линии Вистар, а уровни экспрессии Beclin-1, p62, LC3ВІІ не отличаются у крыс линий Вистар и КМ (рис. 24).



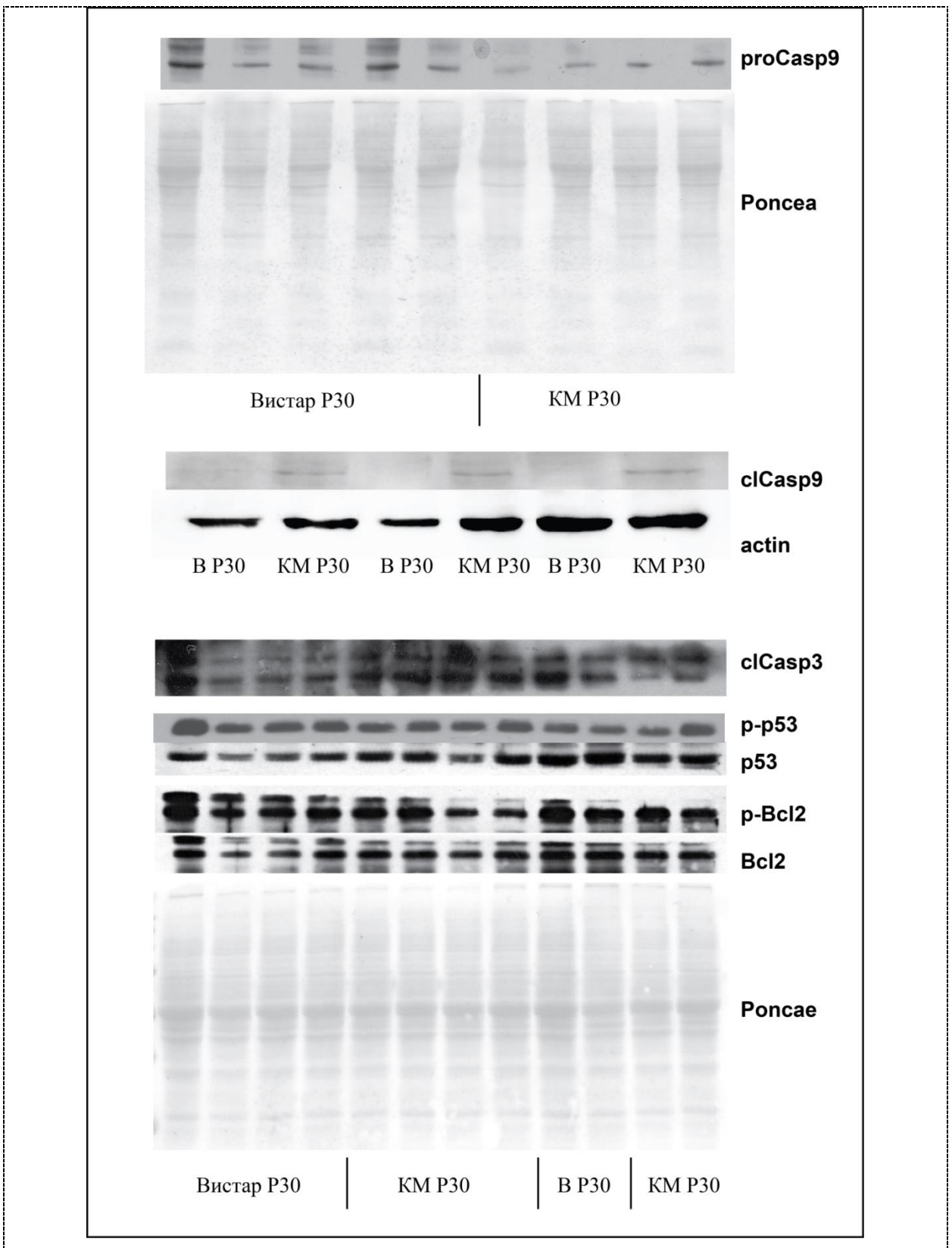


**Рисунок 21.** Анализ количества клеток и уровня пролиферации и дифференцировки в гиппокампе на 30-й день постнатального развития. А – число Ki-67-иммунореактивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr), хилусе и в поле CA4 гиппокампа; Б – число клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr), хилусе и в поле CA4 гиппокампа; В – иммунофлуоресцентное выявление

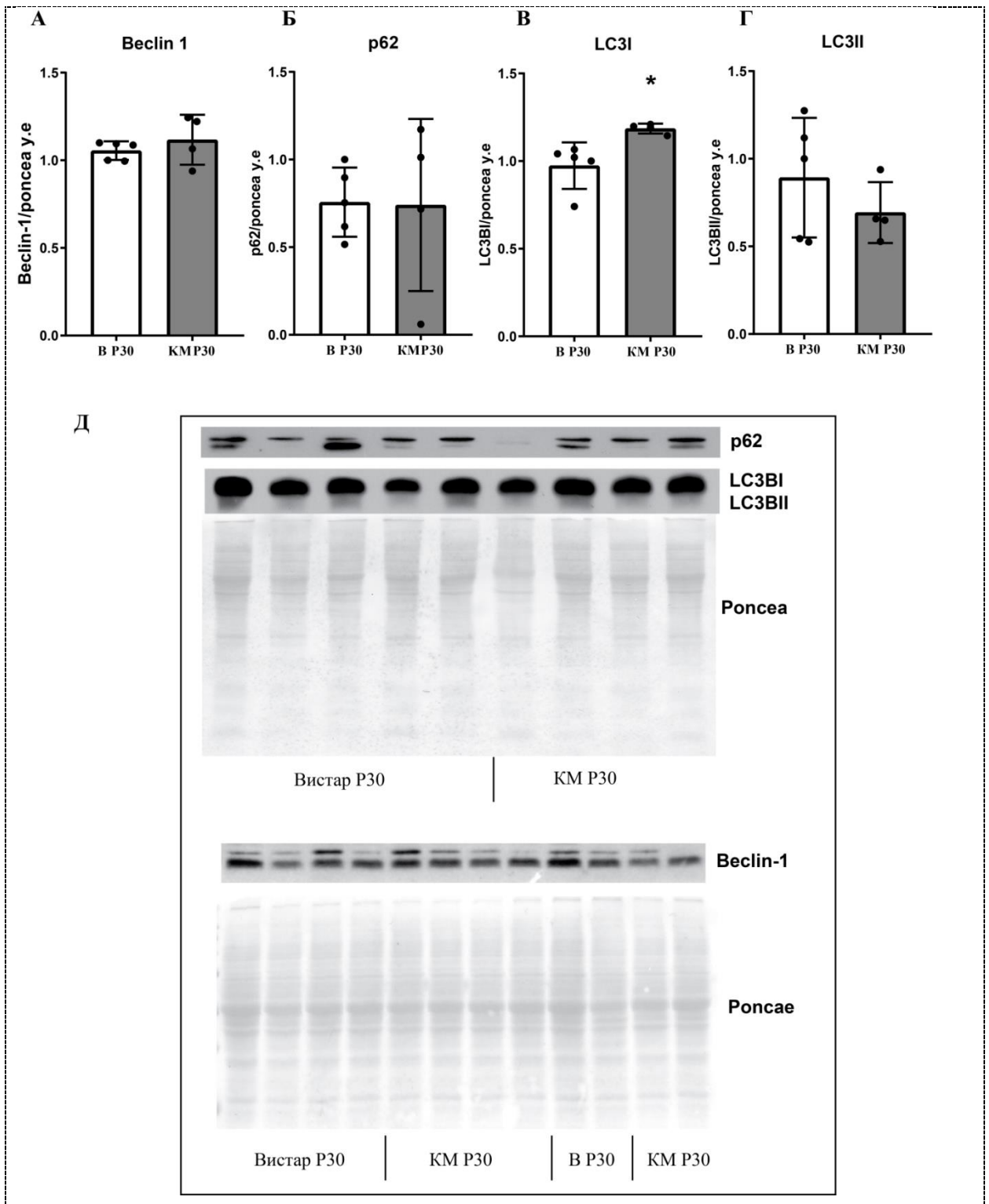
пролиферирующих клеток в зубчатой извилины 15-дневных крыс линии Вситар и КМ, стрелки указывают на Ki-67-иммунореактивные клетки (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий); Г – число DCX-иммунореактивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr); Д – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, в гранулярном слое зубчатой извилины; Е – число DCX-иммунореактивных клеток в поле СА4 и хилусе; Ж – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, в поле СА4 и хилусе; З - иммунофлуоресцентное выявление DCX (зеленый) и VGLUT1/2 (красный) в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2.). Ядра окрашены DAPI (синий). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



**Рисунок 22.** Анализ апоптоза в гиппокампе на 30-день постнатального развития. А – число TUNEL-положительных клеток в зубчатой извилины; Б – флуоресцентное выявление TUNEL-положительных клеток зубчатой извилины 30-дневных крыс линии Вистар и КМ. Стрелки указывают на TUNEL-положительные клетки (зеленые), ядра окрашены DAPI (синий). Уровни clCasp3 (В), proCasp9 (Г), clCasp9 (Д), p53 и p-p53 (Е), Bcl2 и p-Bcl2 (Ж) в гиппокампе 30-дневных крыс линии Вистар и КМ. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



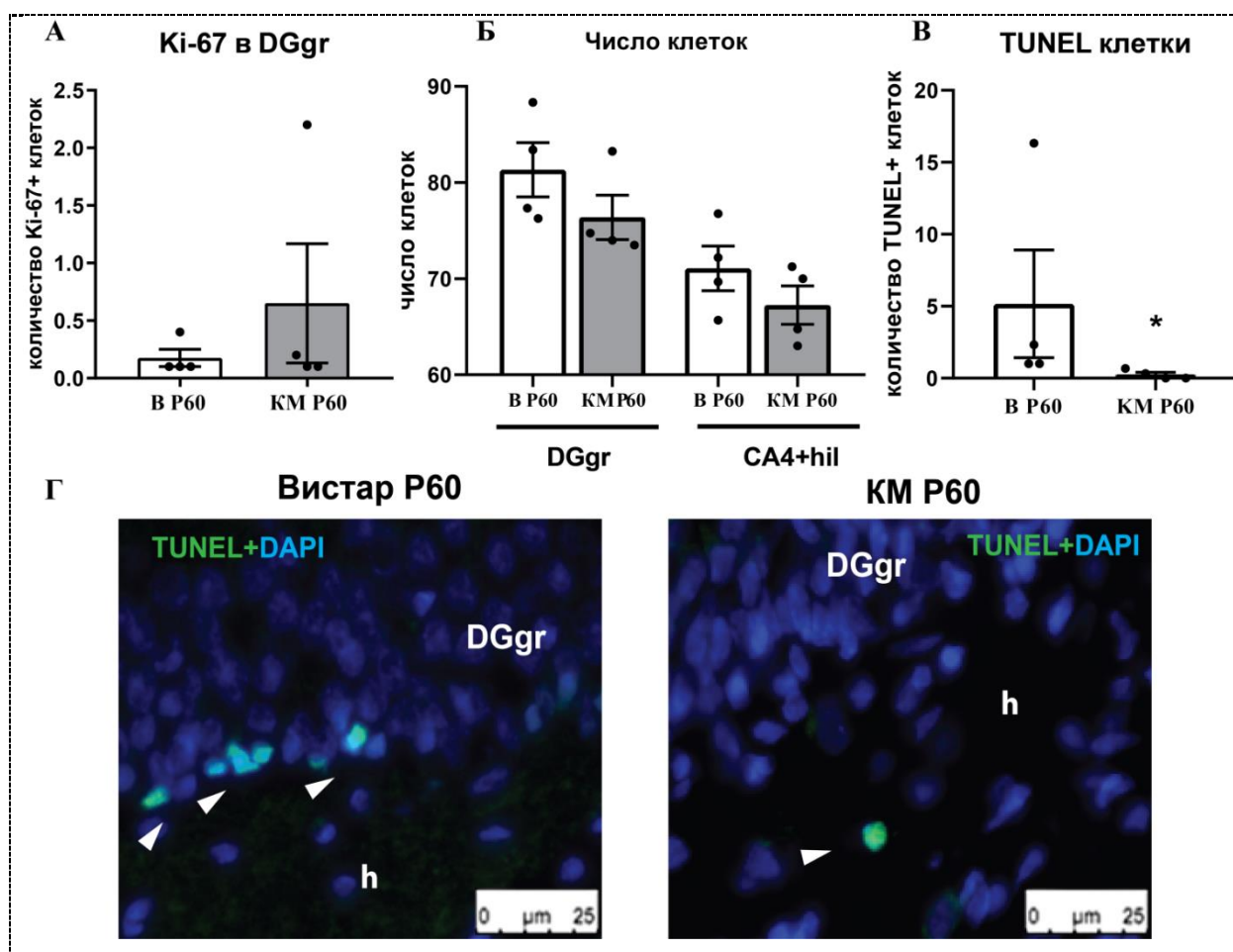
**Рисунок 23.** Репрезентативный вестерн-блот анализ содержания *proCasp9*, *cIcasp9*, *cIcasp3*, *p53* и *p-p53*, *Bcl2* и *p-Bcl2* в гиппокампе 30-дневных крыс линии Вистар и КМ. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали актин или *Poncae*.



**Рисунок 24.** Анализ аутофагии в гиппокампе на 30-й день постнатального развития. Уровень Beclin-1 (A), p62 (Б), LC3BI (B), LC3BII (Г) в гиппокампе 30-дневных крыс линии Вистар и КМ. (Д) - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p62, Beclin-1, LC3BI и II в гиппокампе 30-дневных крыс линии КМ и Вистар. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали Pонсеа. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

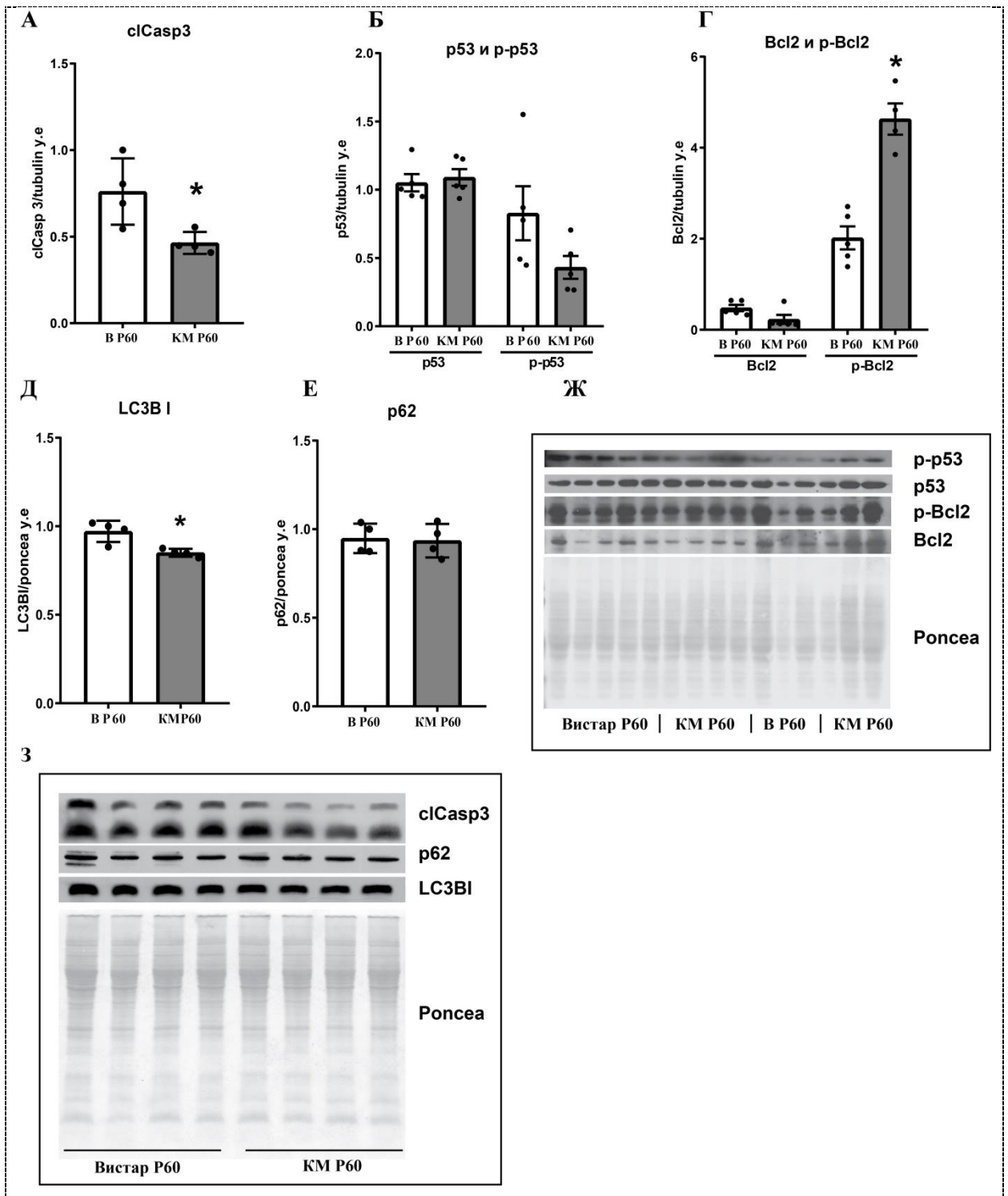
Анализ общего количества клеток в гиппокампе показал, что отличий в количестве клеток не наблюдается между крысами линии Вистар и КМ (рис. 25 Б). Уровень пролиферативной активности на 60-й день также не отличается между крысами Вистар и КМ (рис. 24 А). Исследование уровня апоптоза показало, что гибель клеток в гиппокампе крыс линии КМ ниже по сравнению с крысами Вистар (рис. 25 В, Г).

Вестерн-блотт анализ также показал снижение экспрессии проапоптотического белка *clCasp3* и повышение фосфорилирования антиапоптотического белка *p-Bcl2* (рис. 26 А, Г, Ж). Уровень экспрессии *p53* и *p-53* не отличался между крысами Вистар и КМ (рис. 26 Б, Ж). Показано снижение экспрессии белка аутофагии *LC3BI* у 60-дневных крыс КМ по сравнению с линией Вистар (рис. 26 Д, З). Экспрессия белка *p62* не отличалась между линиями (рис. 26 Е, З).



**Рисунок 25.** Анализ количества клеток и уровня пролиферации в гиппокампе на 60-й день постнатального развития. А – число Ki-67-иммунореактивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr); Б – число клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr), хилусе и в поле CA4 гиппокампа; В – число TUNEL-позитивных ядер в зубчатой извилине; Г – флуоресцентное выявление TUNEL-позитивных ядер зубчатой извилины 60-дневных крыс линии Вистар и КМ. Стрелки указывают на TUNEL-позитивные ядра (зеленые), ядра окрашены DAPI (синий). Данные

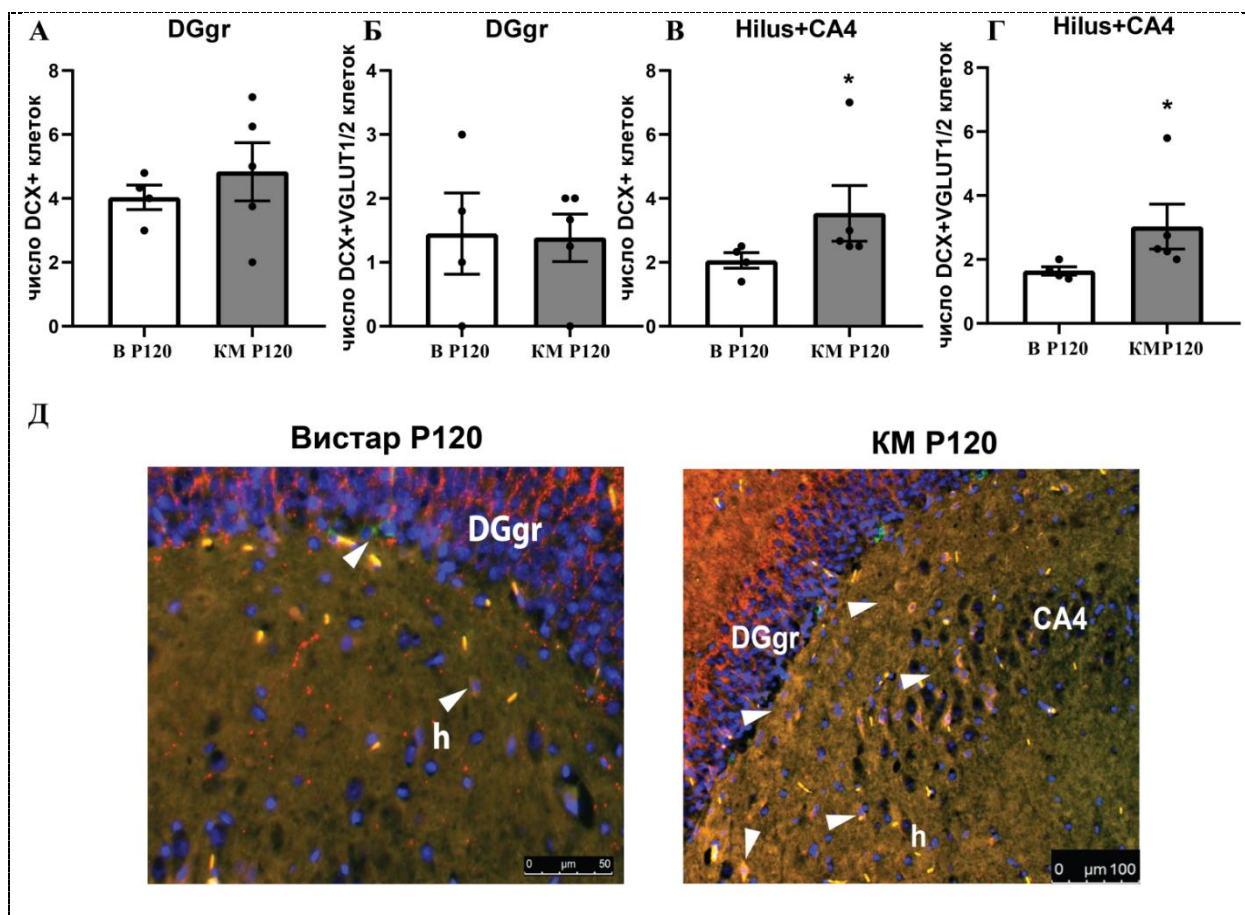
представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



**Рисунок 26.** Анализ апоптоза и аутофагии в гиппокампе на 60-й день постнатального развития. Уровень cIcasp3 (А), p53 и p-p53 (Б), Bcl2 и p-Bcl2 (Г); LC3BI (Д), p62 (Е) в гиппокампе 60-дневных крыс линии Вистар и КМ. Репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p53 и p-p53, Bcl2 и p-Bcl2, cIcasp3, p62 и LC3BI в гиппокампе 60-дневных крыс линии Вистар и КМ (Ж и З). В качестве загрузочного контроля в пробах использовали Poncea. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

Анализ общего числа клеток показал, что различия в количестве клеток не наблюдается у 120-дневных крыс линии КМ и Вистар (рис. 28 А). В хилусе и поле СА4 наблюдается повышенное число DCX-иммунореактивных клеток у крыс КМ 120-дневного возраста по сравнению с крысами линии Вистар (рис. 27 В, Д). Количество клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, также повышено у крыс линии КМ в хилусе и поле СА4, но не в гранулярном слое зубчатой извилины (рис. 27 Г, Д).

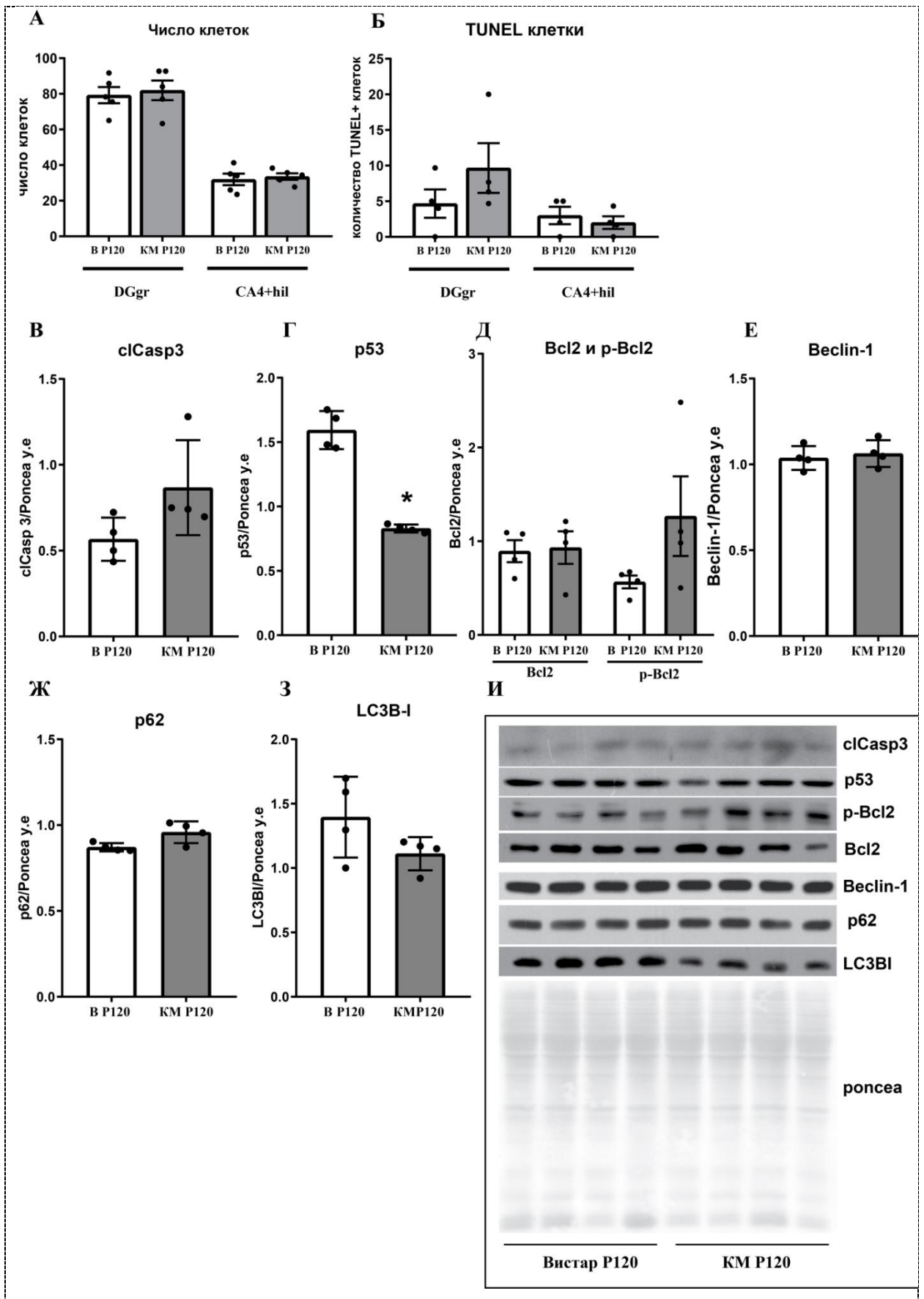
Метод TUNEL показал, что нет различий в количестве апоптотических клеток в гиппокампе между 120-дневными крысами линий Вистар и КМ (рис. 28 Б). Вестерн-блотт анализ белков апоптоза показал, что у крыс линии КМ понижена экспрессия белка p53, а экспрессия остальных белков (cIcasp3, p-Bcl2) не отличается между крысами КМ и Вистар в возрасте 120 дней (рис. 28 В, Г, Д, И). Также было показано, что различий в уровнях экспрессии белков аутофагии (Beclin-1, p62, LC3BI) нет между 120-дневными крысами Вистар и КМ (рис. 28 Е, Ж, З, И).



**Рисунок 27.** Анализ дифференцировки на 120-й день постнатального развития. А – число DCX-иммунореактивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr); Б – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, в гранулярном слое зубчатой извилины; В – число DCX-иммунореактивных клеток в поле СА4 и хилусе; Г – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2 в поле СА4 и хилусе; Д - иммунофлуоресцентное выявление DCX (зеленый) и VGLUT1/2 (красный) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки,



*коэкспрессирующие DCX и VGLUT1/2. Ядра окрашены DAPI (синий). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .*



**Рисунок 28.** Анализ апоптоза и аутофагии в гиппокампе на 120-день постнатального развития. А – число клеток в гранулярном слое зубчатой извины (DGgr) и в поле CA4 и хилусе. Б - число TUNEL-позитивных ядер в гранулярном слое зубчатой извины, в поле CA4 и хилусе. Уровень

*clCasp3 (B), p53 (Г), Bcl2 и p-Bcl2 (Ж), Beclin-1 (E), p62 (Ж), LC3BI (З) в гиппокампе 120-дневных крыс линии Вистар и КМ. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали Ронсеа. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ . (И) - Репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p53, clCasp3, Bcl2 и p-Bcl2, Beclin-1, p62 и LC3BI в гиппокампе 120-дневных крыс линии Вистар и КМ.*

## **Заключение**

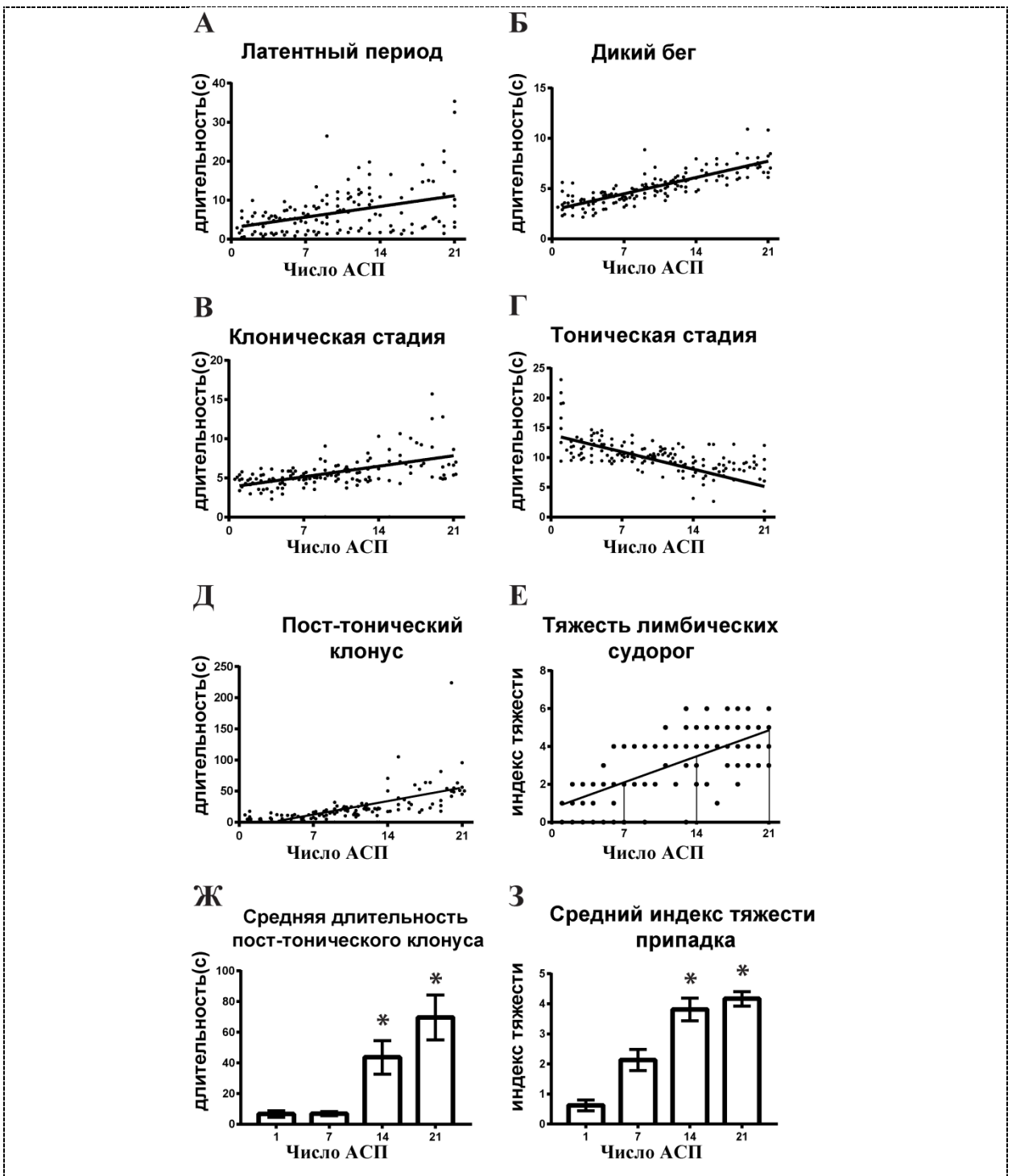
У крыс линии КМ наблюдается задержка развития нижних бугров четверохолмия и гиппокампа. На 15-й день постнатального развития в СИС наблюдается повышенный уровень апоптоза, нейрогенеза и сниженное число клеток. К 30-му дню постнатального развития количество клеток, уровень апоптоза и пролиферации в СИС не отличается между крысами линии Вистар и КМ.

В гиппокампе на 15-й день постнатального у крыс линии КМ также наблюдается повышенный уровень пролиферации и сниженное число клеток. На 30-й день постнатального развития продолжает наблюдаться повышенный уровень пролиферации и сниженное число клеток, также происходит повышение апоптотической гибели клеток в гиппокампе. Только к 60-му дню постнатального развития уровень апоптоза и пролиферации снижается, число клеток в гиппокампе у крыс линий КМ и Вистар не отличается.

## **3.2 Модель височной эпилепсии**

### *3.2.1 Поведенческие особенности аудиогенных судорожных припадков крыс КМ в ходе моделирования лимбических судорог.*

У крыс линии КМ с помощью аудиогенного киндлинга была сформирована височная эпилепсия. Был проведен анализ длительности стадий аудиогенного припадков и тяжести посттонического клонуса, которые являются поведенческими маркерами, показывающими вовлеченность лимбической системы в судорожную активность, и свидетельствуют о формировании височной эпилепсии (Vinogradova, 2017). В ходе развития височной эпилепсии (аудиогенного киндлинга) продолжительность латентного периода, дикого бега и клонических судорог возрастала (рис. 29 А, Б, В). В то же время продолжительность тонических судорог снижалась в процессе аудиогенного киндлинга (рис. 29 Г).



**Рисунок 29.** Анализ продолжительности фаз аудиогенного припадка, продолжительности и тяжести посттонического клонуса в течение аудиогенного киндлинга. А – продолжительность латентного периода; Б – продолжительность фазы дикого бега; В – продолжительность клонической фазы АСП; Г – продолжительность тонической фазы АСП; Д – продолжительность посттонического клонуса; Е – тяжесть посттонического клонуса; Ж – средняя продолжительность пост-клонуса после 1, 7, 14 и 21 АСП; З – средняя тяжесть пост-клонуса после 1, 7, 14 и 21 АСП. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ . Данные были проанализированы с помощью ANOVA

и проверены на линейную регрессию. Каждая линия представляет собой линейную регрессию (А - Е).

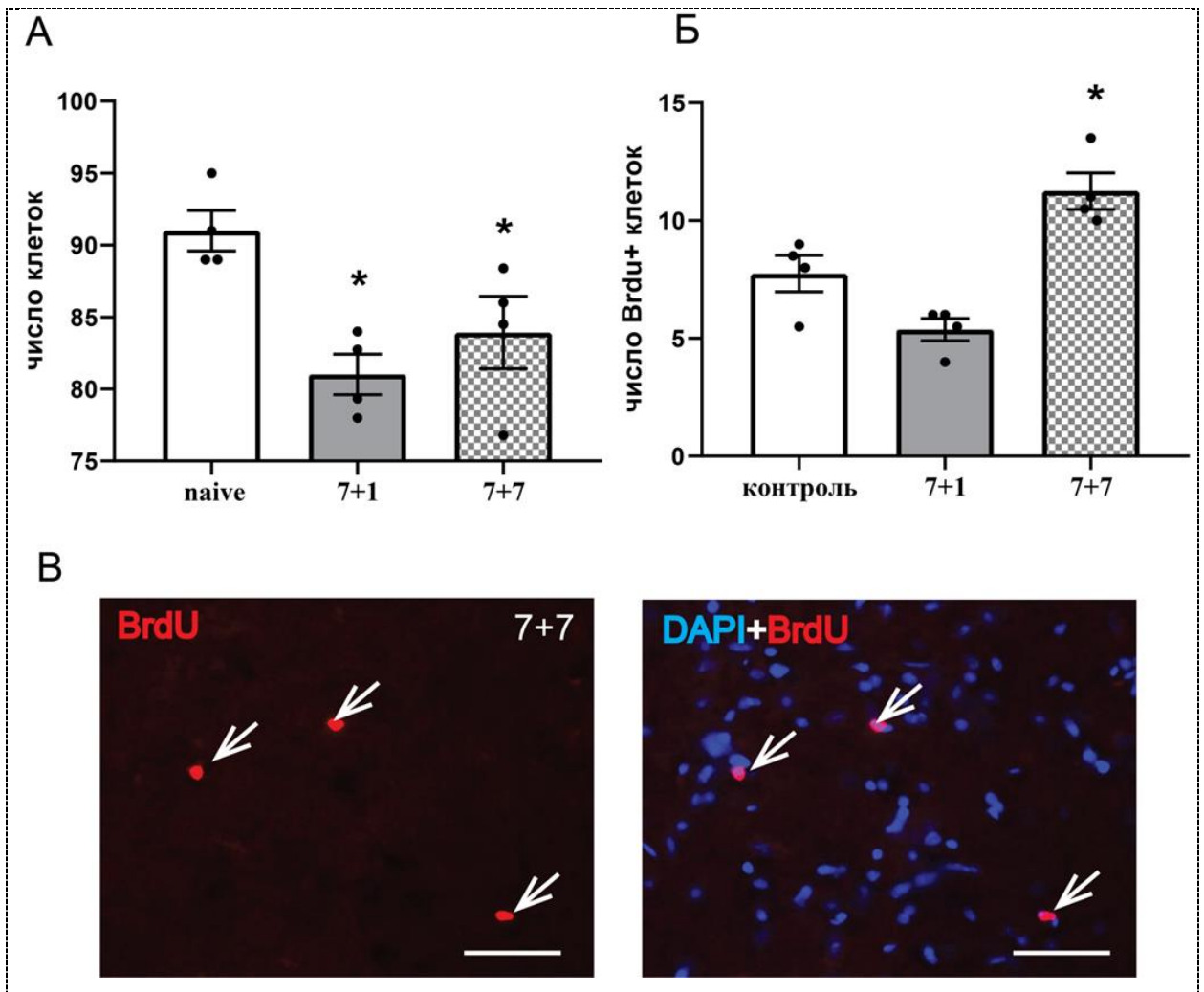
После первой судороги у некоторых животных наблюдались слабые проявления пост-тонического клонуса (1 балл по модифицированной шкале Racine) (рис. 29 Д). Мы выделили 3 этапа формирования посттонического клонуса: 1) в течение первых 7 судорожных припадков крысы линии КМ только начинают демонстрировать посттонического клонус, тяжесть клонуса варьирует от 0 до 4 баллов по модифицированной шкале Racine, а средняя продолжительность составляет  $4.9 \pm 0.7$  с; 2) к 14 АСП проявление посттонического клонуса становится стабильнее и продолжительнее, крысы демонстрируют более тяжёлый посттонический клонус (3 - 5 баллов по модифицированной шкале Racine), а средняя продолжительность составляет  $18.9 \pm 1.6$  с; 3) в течение заключительного этапа (к 21-му припадку) проявления посттонического клонуса становятся стабильными, каждый АСП заканчивается пост-клонусом, тяжесть судорог варьирует от 4 до 6 баллов по модифицированной шкале Racine, средняя продолжительность составляет  $40.0 \pm 5.3$  с (рис. 28 Д - З). Тяжесть и длительность пост-клонуса позитивно коррелировала с прогрессией аудиогенного киндлинга ( $r = 0.94$  и  $r = 0.92$  соответственно).

Однако небольшое число животных (8% от общего числа животных, перенесших множественные АСП) после 4 - 5 АСП перестало отвечать на звуковую стимуляцию, у них развилась устойчивость к аудиогенным судорогам (группа resistance).

### *3.2.2 Структурные нарушения нижних бугров на ранней стадии формирования височной эпилепсии*

Исследование влияния судорог на клеточную популяцию нижних бугров четверохолмия было проведено на первой стадии моделирования височной эпилепсии при звуковой экспозиции в течение 7 дней. Показано, что 7 АСП приводят к уменьшению количества клеток по сравнению с контрольными животными (рис. 30 А). Первоначально семикратные АСП не приводили к усилению уровня пролиферации в центральном ядре (рис. 30 Б). Однако после 7-дневного периода покоя было показано увеличение числа BrdU-позитивных клеток в нижнем двухолмии (рис. 30 Б, В).

Через сутки после 7 АСП не было обнаружено повышения уровня апоптотической гибели в нижнем двухолмии (рис. 31 А). Также у этой группы животных наблюдается увеличение уровня апоптотической гибели в нижнем двухолмии (рис. 31 А, Б).

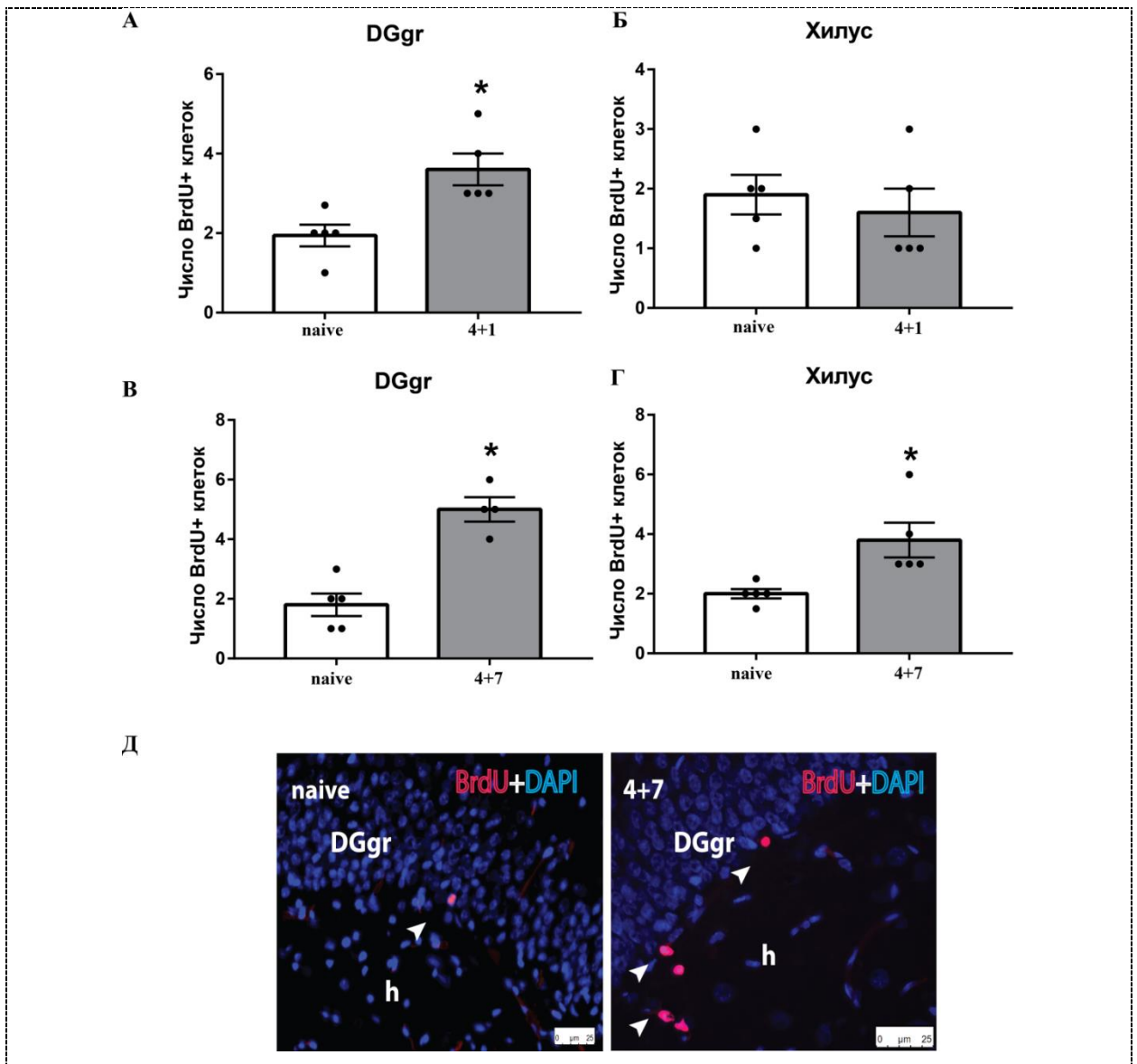


**Рисунок 30.** Анализ количества клеток и уровня пролиферации в СГС. А - число клеток после 7 АСП (7+1) и через неделю после 7 АСП (7+7); Б - число BrdU-позитивных клеток после 7 АСП (7+1) и через неделю после 7 АСП (7+7). В - иммунофлуоресцентное выявление BrdU-позитивных клеток в СГС крыс КМ через неделю после 7 АСП. Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на BrdU+ клетки. Шкала - 100 мкм. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



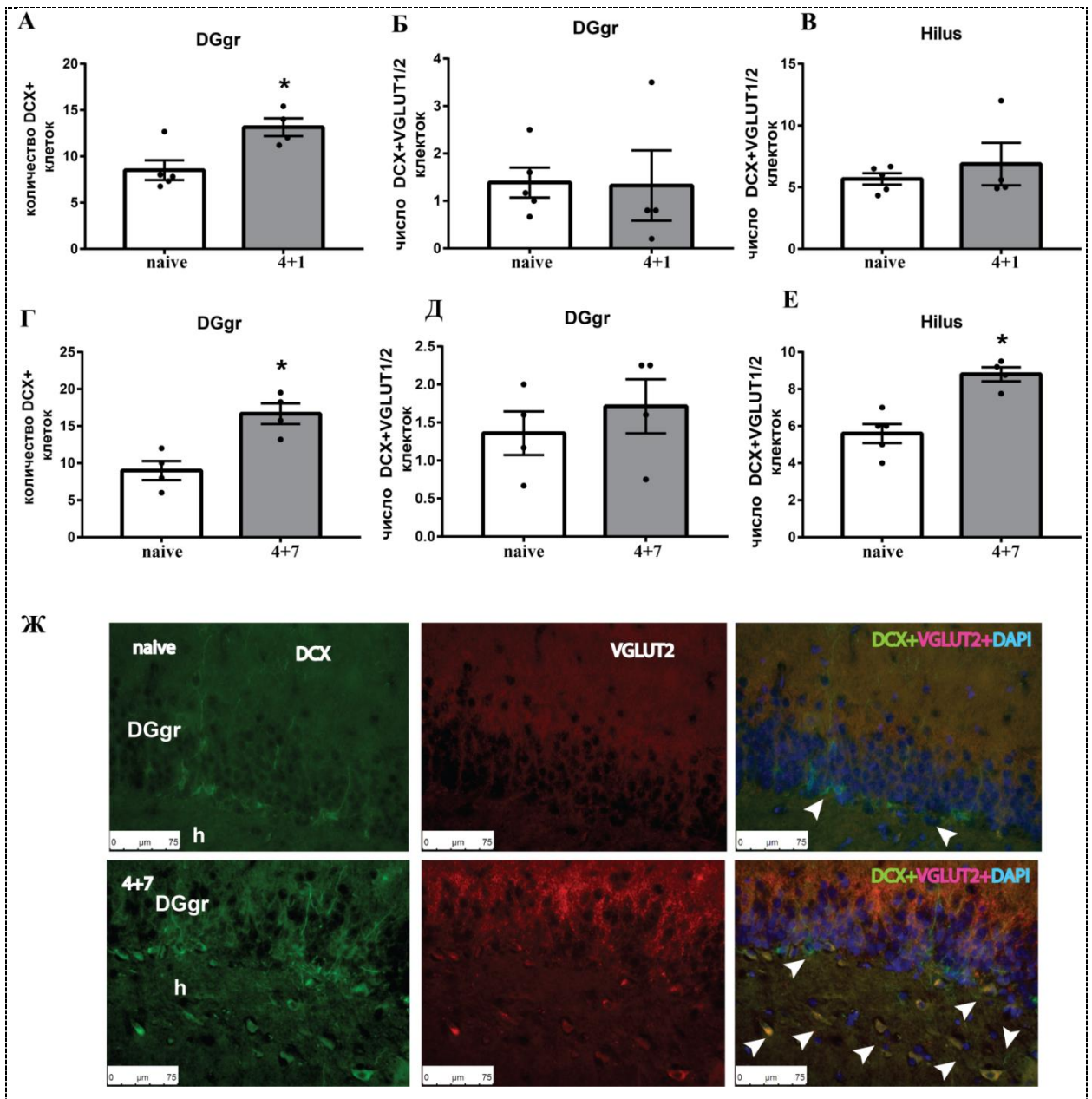
после судорожных припадков повышенное число делящихся клеток было обнаружено уже и в хилусе (рис. 32 А-Д). Дополнительно об увеличении пролиферации свидетельствует повышение количества клеток, экспрессирующих DCX (рис.33 А, Г). Через сутки после 4х АСП число дифференцированных по нейрональному типу клеток в зубчатой извилине, выявленных с помощью антител к DCX и VGLUT1/2, не отличалось от характерного для контроля (рис. 33 Б, В). Только через неделю после окончания 4х судорожных припадков иммуногистохимическое выявление маркера дифференцировки DCX и VGLUT1/2 показало увеличение числа дифференцирующихся по нейрональному типу клеток в хилусе зубчатой извилины (рис. 33 Д). Несмотря на увеличение числа пролиферирующих клеток в хилусе, мы не выявили клеток, экспрессирующих только DCX. Все дифференцирующиеся нейроны в хилусе уже экспрессируют VGLUT, о чем говорит увеличение количества дифференцированных нейронов, экспрессирующих DCX и маркер глутаматергических нейронов VGLUT (рис. 33 Е). Это свидетельствует об aberrantной миграции вновь образованных клеток в хилус и ускорении их дифференцировки в нейроны по глутаматергическому типу.



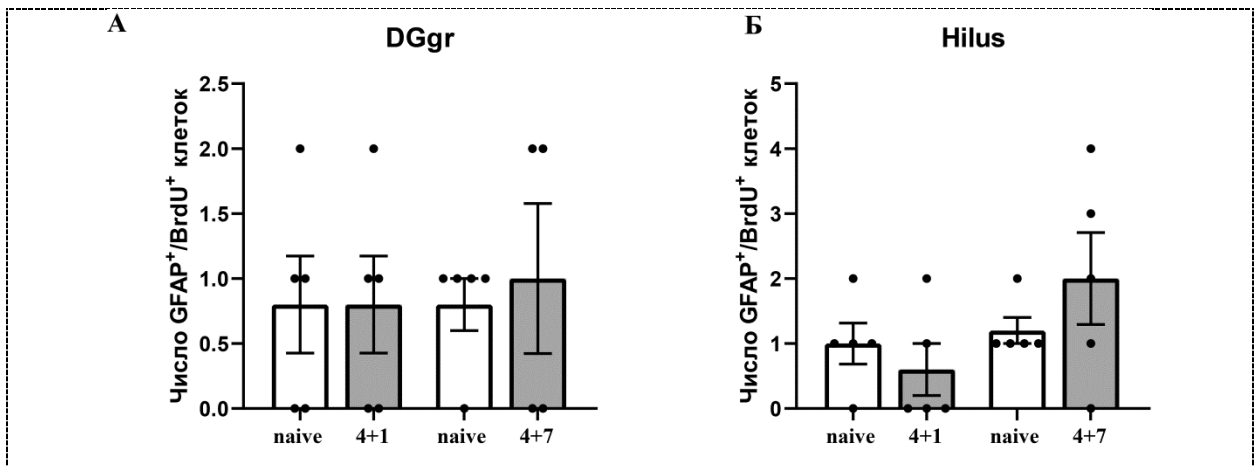


**Рисунок 32.** Анализ пролиферации в зубчатой извилине после 4 АСП. А – число BrdU-позитивных клеток после 4 АСП (4+1) в гранулярном слое зубчатой извилины; Б - число BrdU-позитивных клеток после 4 АСП (4+1) в хилусе; В - число BrdU-позитивных клеток через неделю после 4 АСП (4+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Г - число BrdU-позитивных клеток через неделю после 4 АСП (4+7) в хилусе; Д - иммунофлуоресцентное выявление BrdU-позитивных клеток в зубчатой извилине крыс КМ через неделю после 4 АСП. Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на BrdU+ клетки. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

Методом двойного иммуногистохимического мечения BrdU и GFAP было показано, что на начальных этапах формирования эпилепсии судорожные припадки не изменяют число вновь образованных клеток, которые коэкспрессирует GFAP в гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа и в хилусе (рис. 34). Таким образом, краткосрочный киндлинг не влияет на процессы глиогенеза в гиппокампе крыс линии КМ.



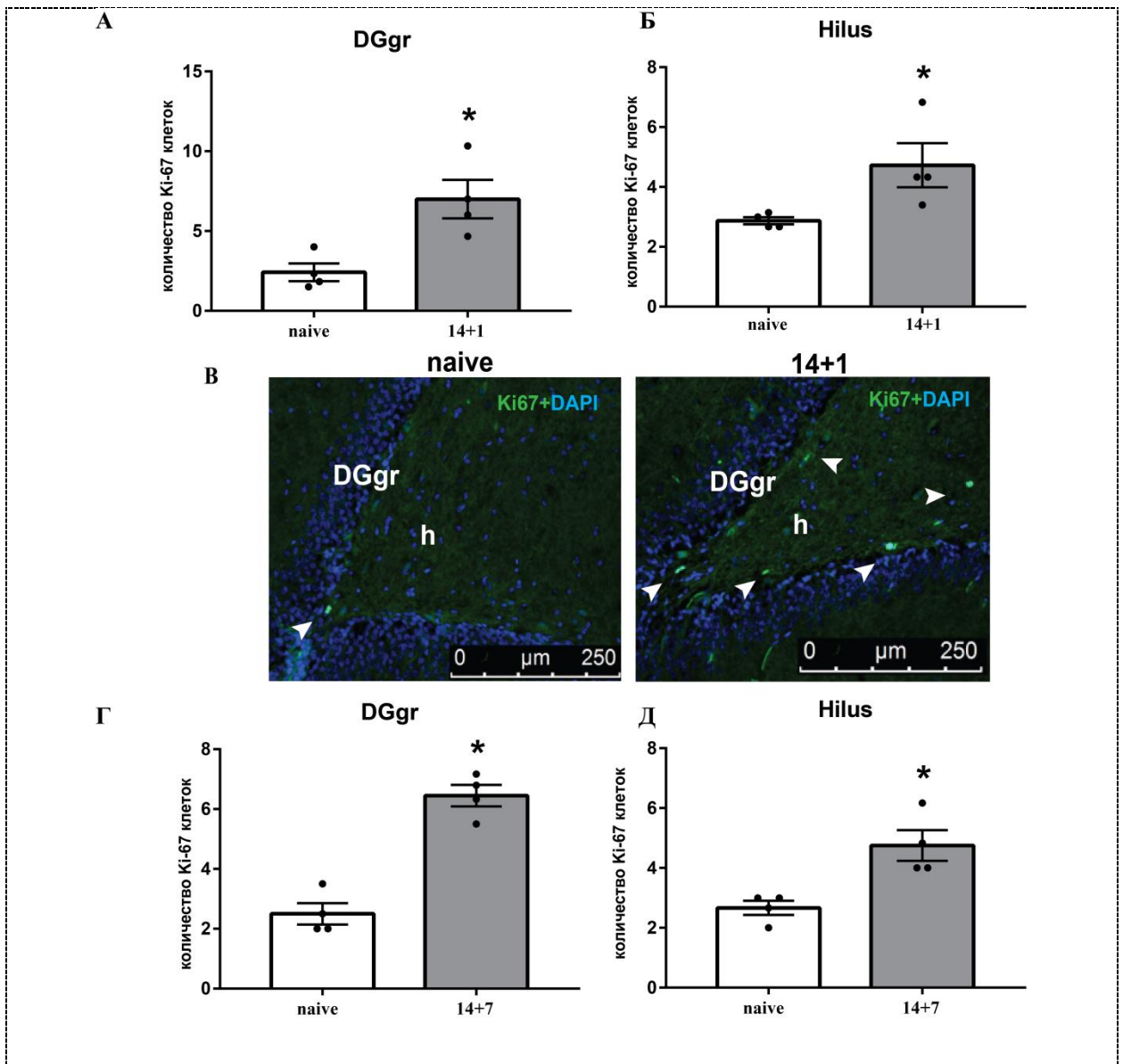
**Рисунок 33.** Анализ дифференцировки в зубчатой извилине после 4 АСП. А – число DCX-иммунореактивных клеток после 4 АСП (4+1) в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr); Б – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, после 4 АСП (4+1) в гранулярном слое зубчатой извилины; В – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, после 4 АСП (4+1) в хилусе; Г – число DCX-иммунореактивных клеток через неделю после 4 АСП (4+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Д – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, через неделю после 4 АСП (4+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Е – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, через неделю после 4 АСП (4+7) в хилусе; Ж - иммунофлуоресцентное выявление DCX (зеленый), VGLUT1/2 (красный) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки, коэкспрессирующие DCX и VGLUT1/2. Ядра окрашены DAPI (синий). Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



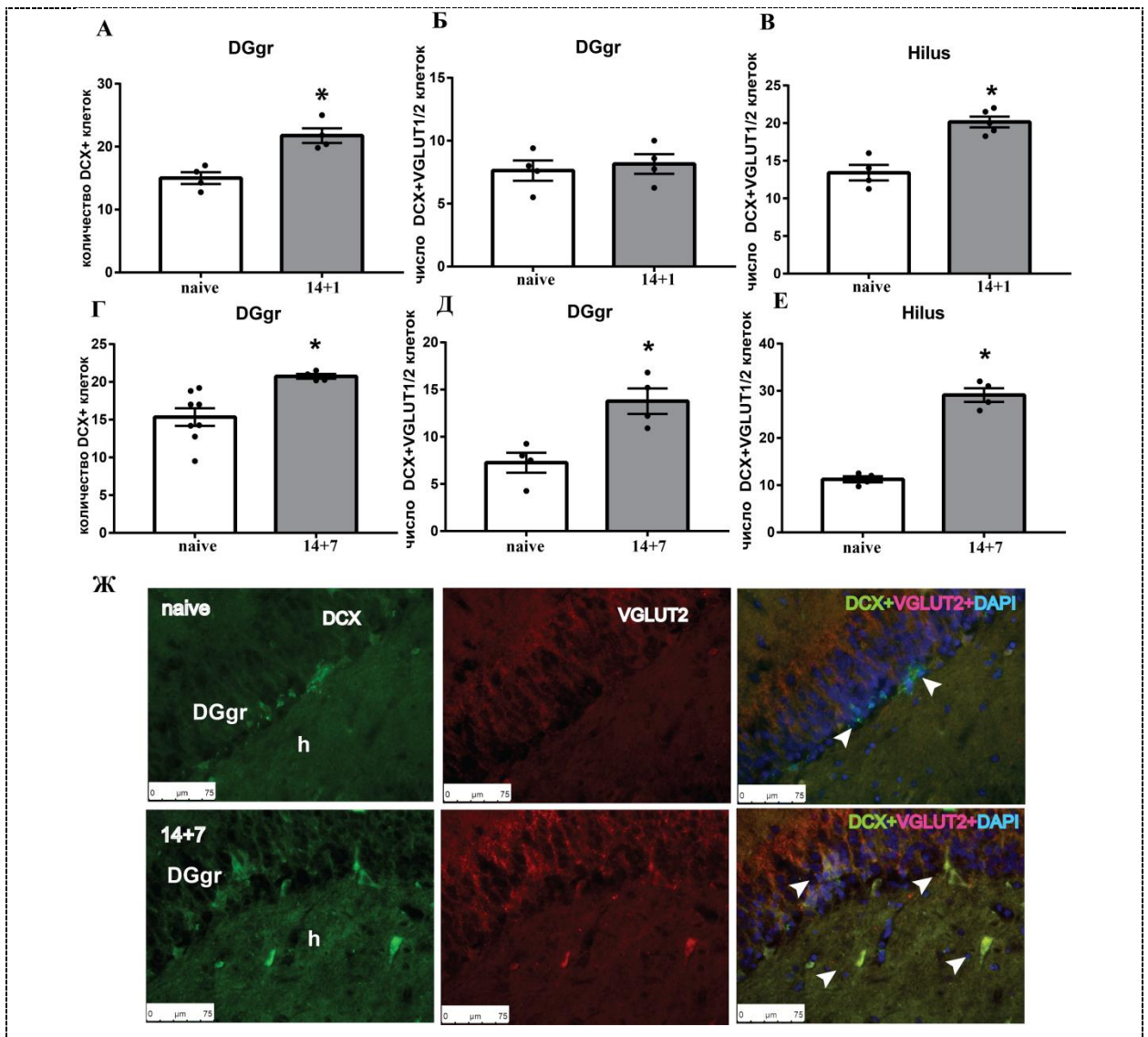
**Рисунок 34.** Анализ глиогенеза в зубчатой извилине после 4 АСП. ). А, Б – число клеток с BrdU-меткой, экспрессирующих GFAP, в гранулярном слое (А) и в хилусе (Б). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

#### 14 аудиогенных судорожных припадков

Анализ количества Ki-67-иммунореактивных клеток показал увеличение уровня пролиферации в зубчатой извилине и в хилусе как через 24 часа после 14-го АСП, так и через неделю после окончания судорог (рис. 35). Через сутки после 14 АСП повышенное количество DCX-иммунореактивных клеток было обнаружено в гранулярном слое (рис. 36 А). Однако число DCX-иммунопозитивных клеток, экспрессирующих VGLUT1/2, в это время не отличалось от характерного для контрольных животных (рис. 36 Б). Через сутки, через неделю после окончания 14 АСП мы выявили, что в хилусе все DCX-иммунопозитивные ко-экспрессируют VGLUT1/2 (рис. 36 В), при этом число дифференцированных новообразованных глутаматергических нейронов было повышено по сравнению с наивными крысами. Через неделю после окончания судорожных припадков повышенное число DCX/VGLUT-иммунореактивных клеток обнаруживалось не только в хилусе, но и в зубчатой извилине (рис. 36 Д - Ж).



**Рисунок 35.** Анализ пролиферации в зубчатой извилине после 14 АСП. А – число Ki-67-иммунореактивных клеток после 14 АСП (14+1) в гранулярном слое зубчатой извилины; Б - число Ki-67-иммунореактивных клеток после 14 АСП (14+1) в хилусе; В - иммунофлуоресцентное выявление Ki-67-иммунореактивных клеток в зубчатой извилине крыс КМ после 14 АСП. Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на Ki-67-иммунореактивные клетки. Г - число Ki-67-иммунореактивных клеток через неделю после 14 АСП (14+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Д - число Ki-67-иммунореактивных клеток через неделю после 14 АСП (14+7) в хилусе. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



**Рисунок 36.** Анализ дифференцировки в зубчатой извилине после 14 АСП. А – число DCX-иммунореактивных клеток после 14 АСП (14+1) в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr); Б – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, после 14 АСП (14+1) в гранулярном слое зубчатой извилины; В – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, после 14 АСП (14+1) в хилусе; Г – число DCX-иммунореактивных клеток через неделю после 14 АСП (14+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Д – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, через неделю после 14 АСП (14+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Е – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, через неделю после 14 АСП (14+7) в хилусе; Ж - иммунофлуоресцентное выявление DCX (зеленый), VGLUT1/2 (красный) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2. Ядра окрашены DAPI (синий). Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

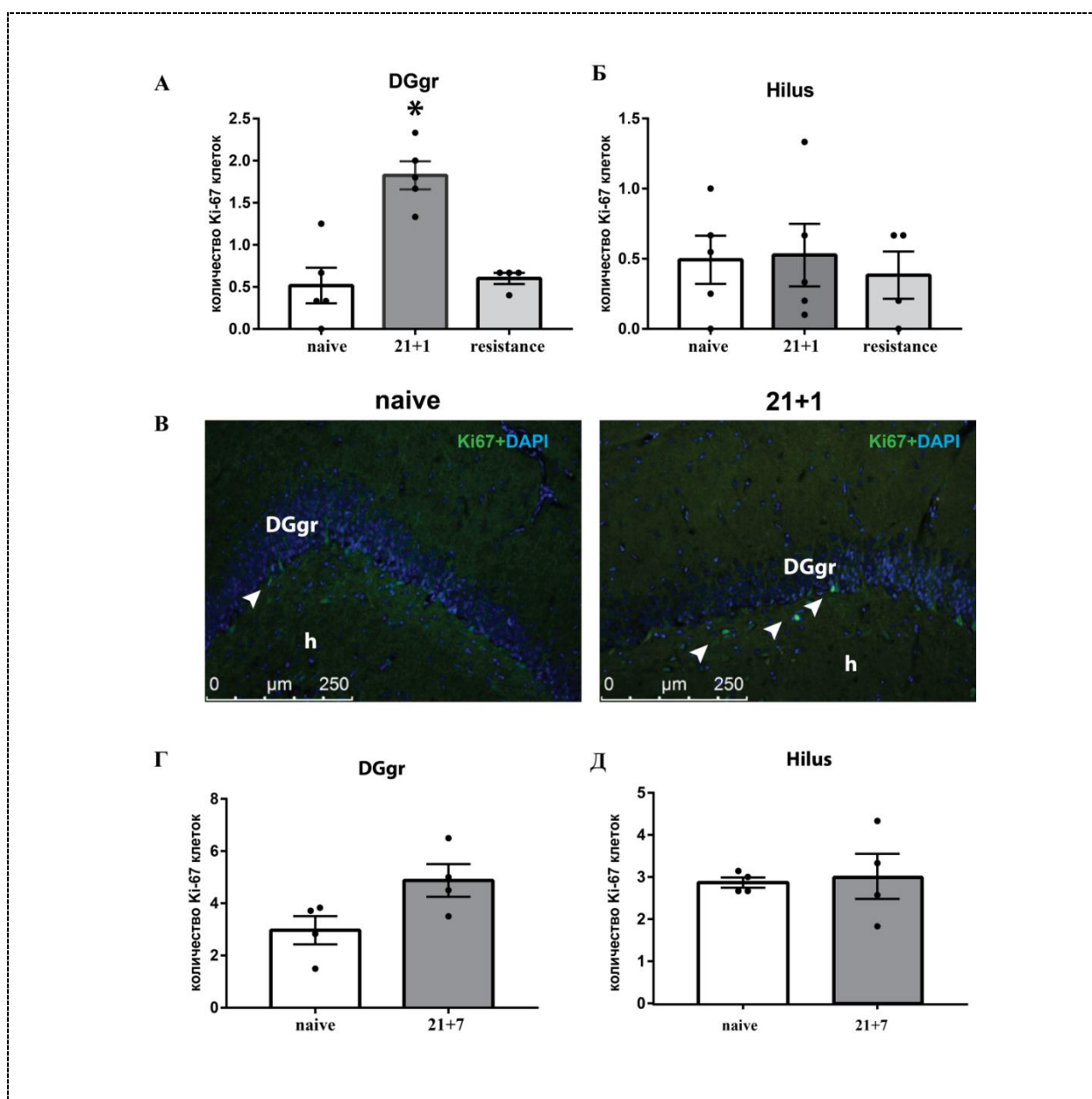
## 21 аудиогенный судорожный припадок

После завершения киндлинга в зубчатой извилине крыс линии КМ обнаруживается повышенное число Ki-67-позитивных клеток по сравнению с контрольными животными,

что свидетельствует о повышенной пролиферации (рис 37 А, В). Число пролиферирующих нейронов в хилусе при этом не увеличивалось (рис. 37 Б). Через 7 дней после завершения киндлинга уровень пролиферации в зубчатой извилине и хилусе не отличается от такого у контрольных животных (рис. 37 Г, Д).

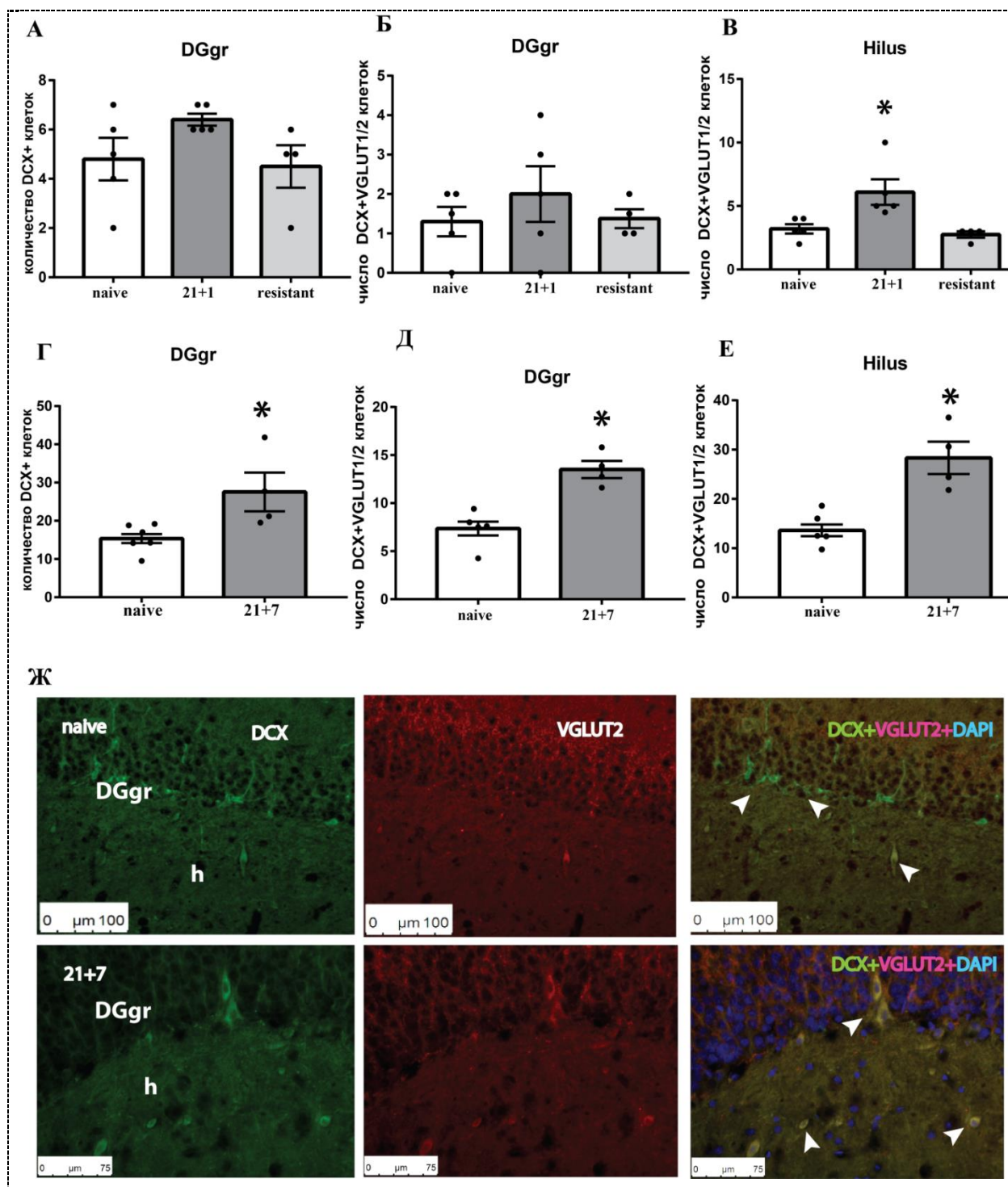
Число DCX позитивных клеток и число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, повышалось в гранулярном слое только через неделю после окончания киндлинга (рис. 38 Г, Д).

В хилусе повышение числа клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, наблюдалось как через 24 часа после окончания киндлинга, так и через 7 дней (рис 38 В, Е, Ж).



**Рисунок 37.** Анализ пролиферации в зубчатой извилине после 21 АСП. А – число Ki-67-иммунореактивных клеток после 21 АСП (21+1) в гранулярном слое зубчатой извилины; Б - число Ki-67-иммунореактивных клеток после 21 АСП (21+1) в хилусе; В - иммунофлуоресцентное выявление Ki-67-иммунореактивных клеток в зубчатой извилине крыс КМ после 21 АСП. Ядра

окрашены DAPI. Стрелки указывают на Ki-67-иммунореактивные клетки. Г - число Ki-67-иммунореактивных клеток через неделю после 21 АСП (21+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Д - число Ki-67-иммунореактивных клеток через неделю после 21 АСП (21+7) в хилусе. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

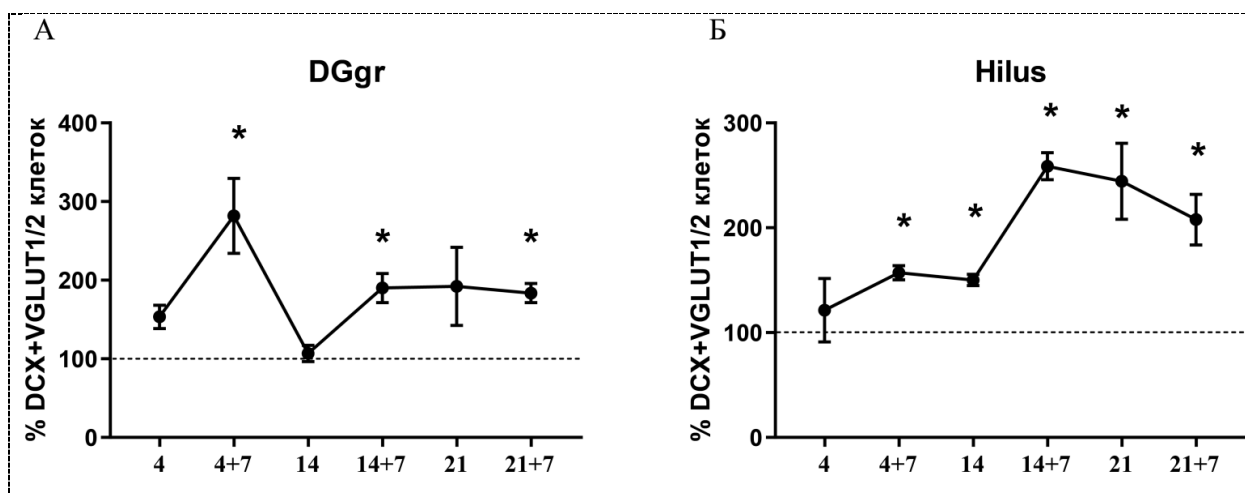


**Рисунок 38.** Анализ дифференцировки в зубчатой извилине после 21 АСП. А – число DCX-иммунореактивных клеток после 21 АСП (21+1) в гранулярном слое зубчатой извилины (DGgr); Б

– число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, после 21 АСП (21+1) в гранулярном слое зубчатой извилины; В – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, после 21 АСП (21+1) в хилусе; Г – число DCX-иммунореактивных клеток через неделю после 21 АСП (21+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Д – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, через неделю после 21 АСП (21+7) в гранулярном слое зубчатой извилины; Е – число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, через неделю после 21 АСП (21+7) в хилусе; Ж – иммунофлуоресцентное выявление DCX (зеленый), VGLUT1/2 (красный) коэкспрессирующих клеток в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки, коэкспрессирующие DCX и VGLUT1/2. Ядра окрашены DAPI (синий). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

У крыс с приобретённой устойчивостью к АСП число пролиферирующих клеток в зубчатой извилине и хилусе не отличается от такого у контрольных животных (рис. 37 А, Б). Также число DCX позитивных клеток и число клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, в хилусе и зубчатой извилине не отличалось между наивными животными и крысами с приобретённой устойчивостью к АСП (рис.38 А - В).

Таким образом, моделирование лимбической эпилепсии сопровождалось повышенной aberrантной миграцией новообразованных клеток в хилус и их дифференцировкой в глутаматергические нейроны. Через неделю после 14 АСП степень дифференцировки и миграции вновь образованных нейронов в хилус достигает максимума и выходит на плато (рис. 39 Б).



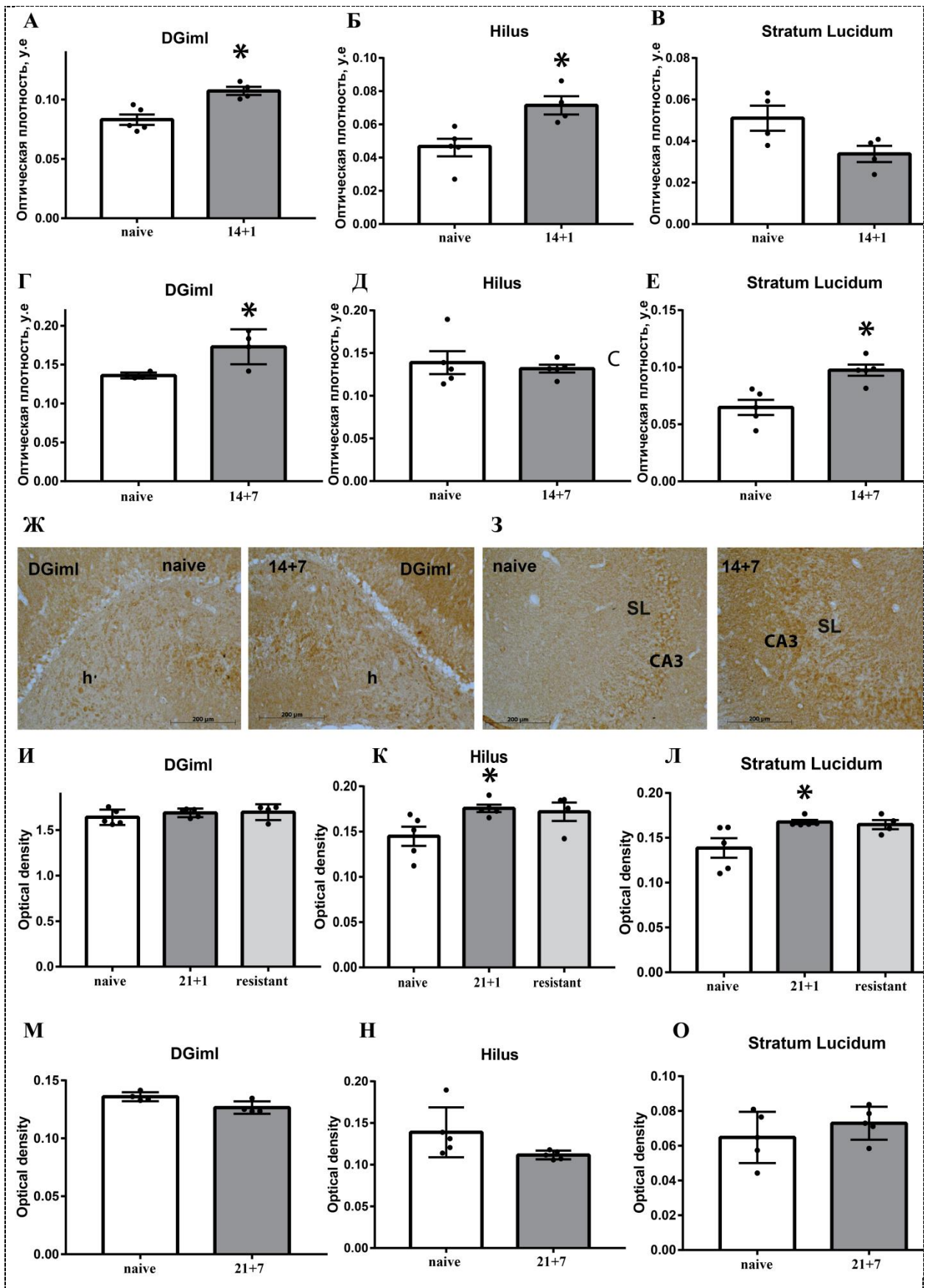
**Рисунок 39.** Анализ дифференцировки и aberrантной миграции новообразованных нейронов на протяжении аудиогенного киндинга. А, Б – процент клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, в гранулярном слое зубчатой извилины (А) и хилусе (Б).



### *3.2.3.2 Экспрессия синаптоподина и ветвление миштых волокон при аудиогенном киндлинге.*

Синаптоподин является белком дендритных шипиков. После 14 АСП было обнаружено повышение оптической плотности синаптоподин-иммунореактивного вещества во внутреннем молекулярном слое и в хилусе зубчатой извилины, но не в stratum lucidum (рис. 40 А, Б). Через неделю после 14 АСП повышение оптической плотности синаптоподин-иммунореактивного вещества было обнаружено в stratum lucidum и продолжало наблюдаться во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (рис. 40 Г, Е, Ж, З).

После 21 АСП повышение оптической плотности синаптоподин-иммунореактивного вещества было выявлено в хилусе зубчатой извилины и в stratum lucidum (рис. 40 К, Л). Разницы в оптической плотности синаптоподин-иммунореактивного вещества между наивными крысами и крысами с приобретённой устойчивостью к АСП обнаружено не было (рис. 40 И - Л). Через неделю после 21 АСП не было показано различий в содержании синаптоподина во внутреннем молекулярном слое, в хилусе зубчатой извилины и в stratum lucidum (рис. 40 М - О).

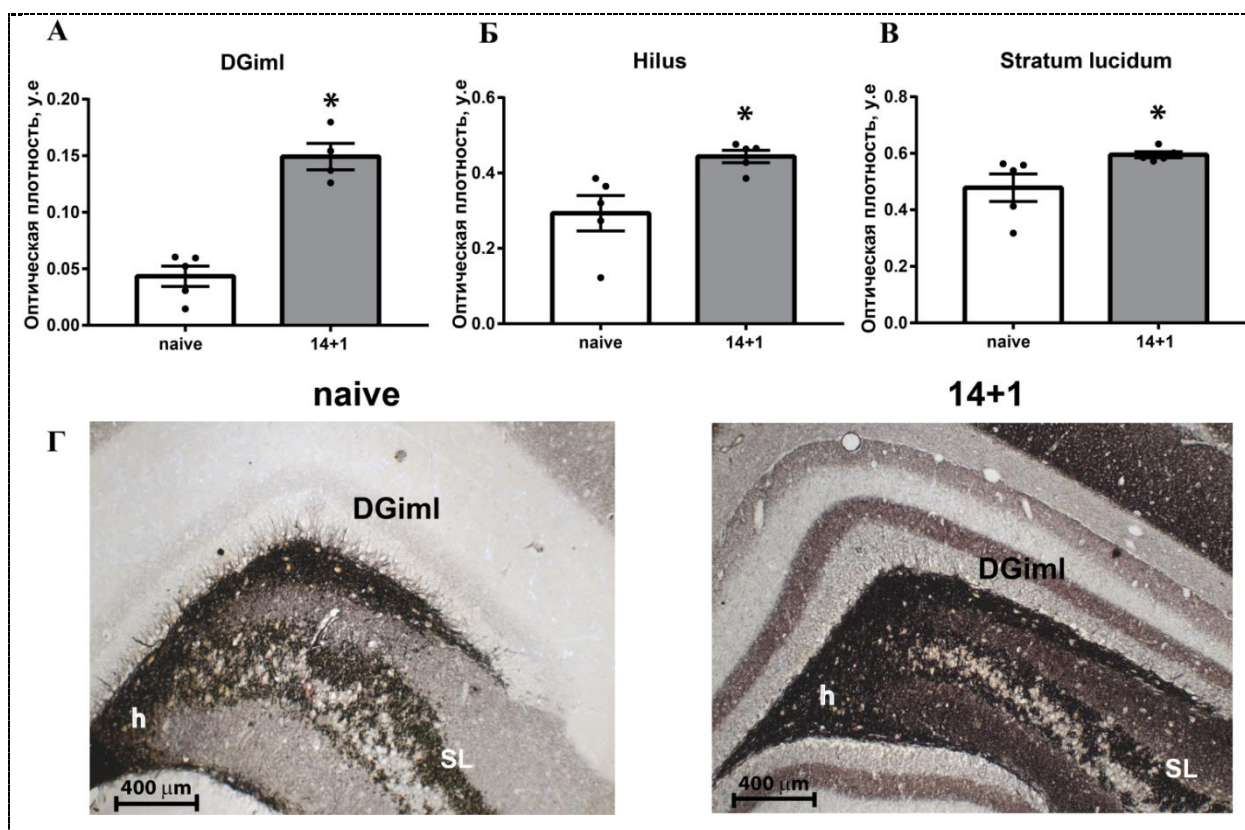


**Рисунок 40.** Иммуногистохимический анализ синаптоподина в гиппокампе крыс линии КМ после 14 и 21 АСП. А – В - оптическая плотность синаптоподин-иммунореактивного вещества во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (А), хилусе (Б), stratum lucidum (В) после 14 АСП

(14+1); Г – Е - оптическая плотность синаптодин-иммунореактивного вещества во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (Г), хилусе (Д), stratum lucidum (Е) через неделю после 14 АСП (14+7); Ж - иммуногистохимическое выявление синаптоподина в зубчатой извилине. DGiml – внутренний молекулярный слой зубчатой извилины, h – хилус. З - иммуногистохимическое выявление синаптоподина в гиппокампе. Ca3 - поле гиппокампа CA3, SL - stratum lucidum. И – Л - оптическая плотность синаптодин-иммунореактивного вещества во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (И), хилусе (К), stratum lucidum (Л) после 21 АСП (21+1); М – О - оптическая плотность синаптодин-иммунореактивного вещества во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (М), хилусе (Н), stratum lucidum (О) через неделю после 14 АСП (21+7).

После 14 АСП было показано усиление ветвления мшистых волокон. Повышение плотности Тимм-окрашивания было показано во внутреннем молекулярном слое гранулярного слоя, в хилусе зубчатой извилины и в stratum lucidum (рис. 41 А - Г).

Таким образом, после завершения аудиогенного киндлинга наблюдается только временное увеличение плотности дендритов и значительное усиление ветвления мшистых волокон.

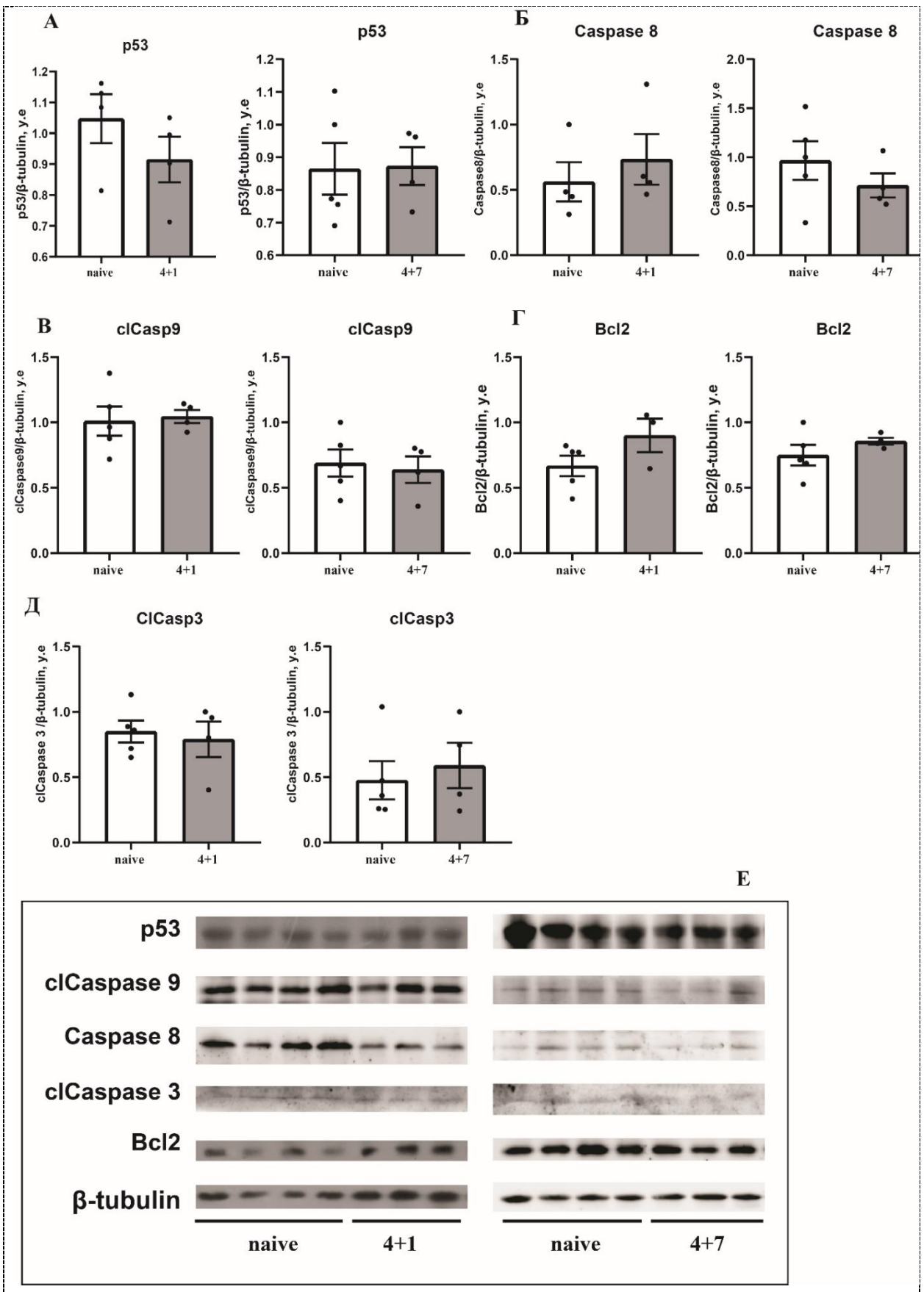


**Рисунок 41.** Визуализация мшистых волокон в гиппокампе крыс КМ после 14 и 21 АСП. А – В – содержание аргирофильного вещества во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (А), хилусе (Б), stratum lucidum (В) после 14 АСП (14+1). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. Г - гистохимическое окрашивание мшистых волокон после 14 АСП (14+1). Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

### *3.2.3.3 Апоптоз и аутофагия на разных стадиях аудиогенного киндлинга*

#### **4 аудиогенных судорожных припадков**

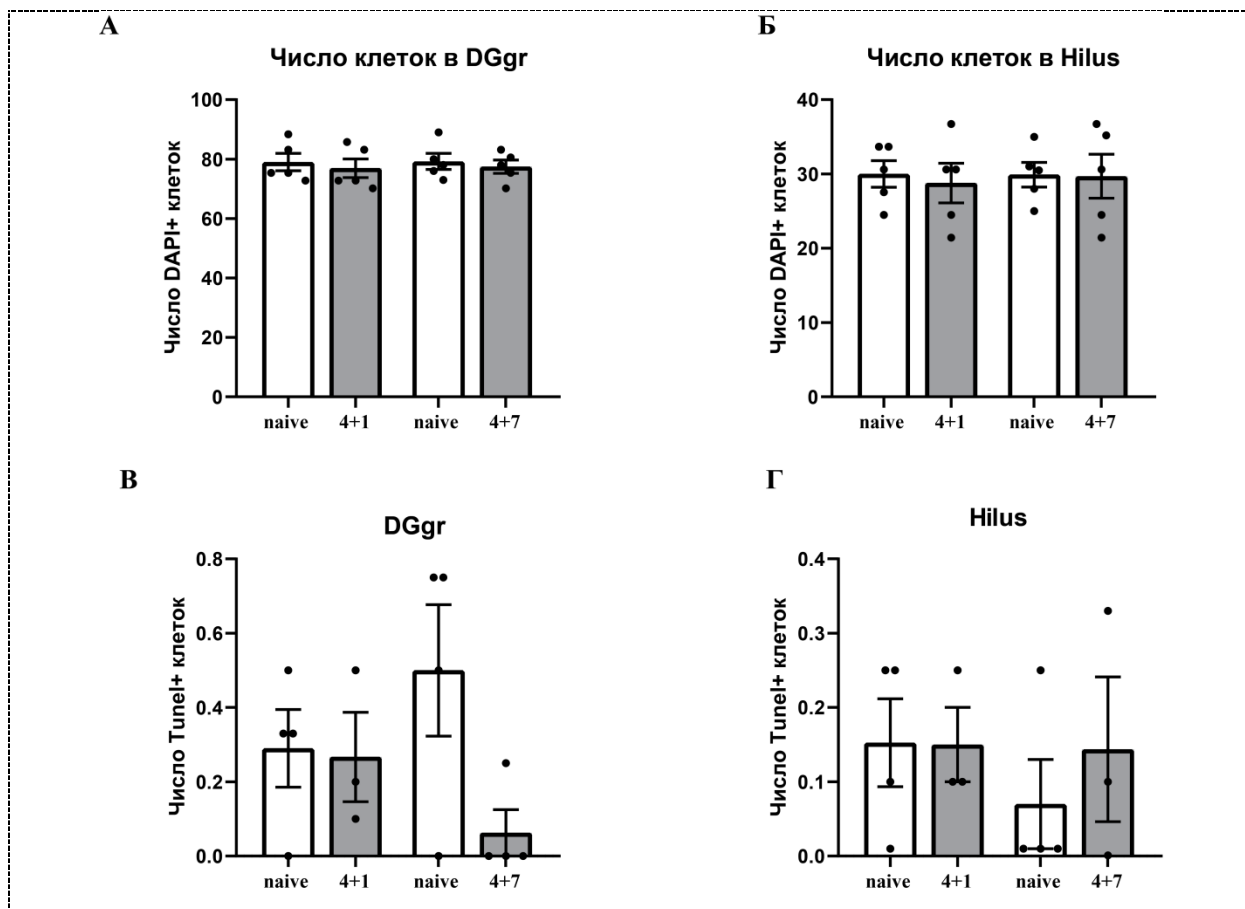
Вестерн-блот анализ показал, что 4 АСП не приводят к активации про- и антиапоптотических белков (clCasp9, clCasp3, p53 и Bcl2) в гиппокампе ни через сутки, ни через неделю после окончания припадков (рис. 42).



**Рисунок 42.** Вестерн-блот анализ гиппокампов крыс КМ после 4 АСП. Уровень p53 (А), Casp8 (Б), cIcasp9 (В), Bcl2 (Г), cIcasp3 (Д). Е - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p53, cIcasp9, Casp8, cIcasp3, Bcl2 в гиппокампе крыс линии КМ после 4 АСП. По оси ординат:

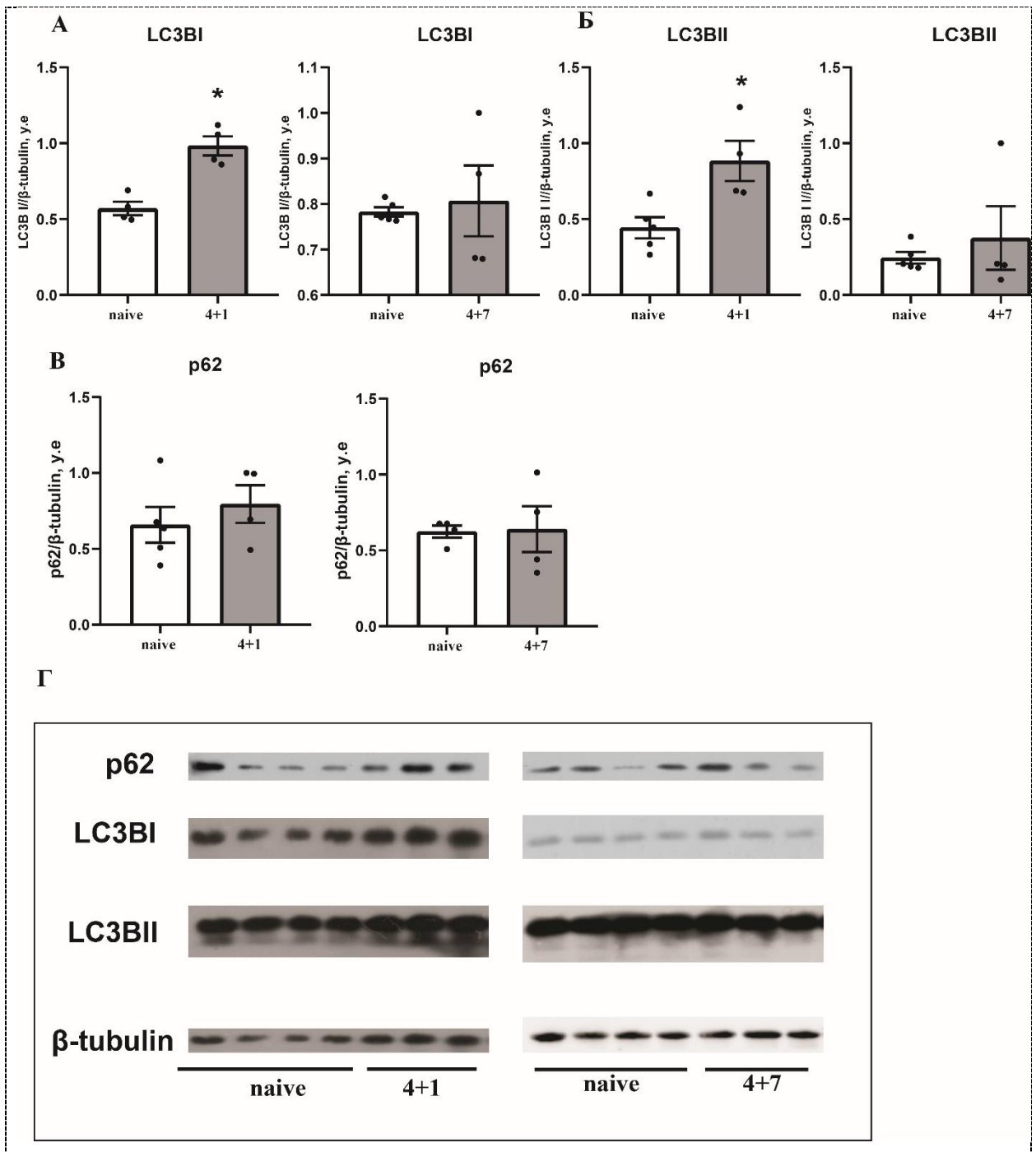
оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали тубулин. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

Также после 4 АСП методом TUNEL не было обнаружено повышения апоптотической гибели в гранулярном слое, хилусе зубчатой извилины и поле СА4 (рис. 43 В, Г). Подсчет количества ядер, окрашенных DAPI, подтверждает отсутствие активных процессов клеточной убыли на данном этапе моделирования височной эпилепсии (рис. 43 А, Б).



**Рисунок 43.** Анализ количества клеток и апоптоза в гиппокампе после 4 АСП. А, Б – количество клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (А) и хилусе (Б). В, Г – число TUNEL-позитивных ядер в гранулярном слое зубчатой извилины (В) и хилусе (Г). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

При анализе уровня белков аутофагии в гиппокампе было показано увеличение содержания LC3ВІ и LC3ВІІ через сутки после 4 АСП (рис. 44 А, Б, Г). Содержание р62 в гиппокампе животных после 4 АСП отличалось от наивных животных (рис.44 В, Г).

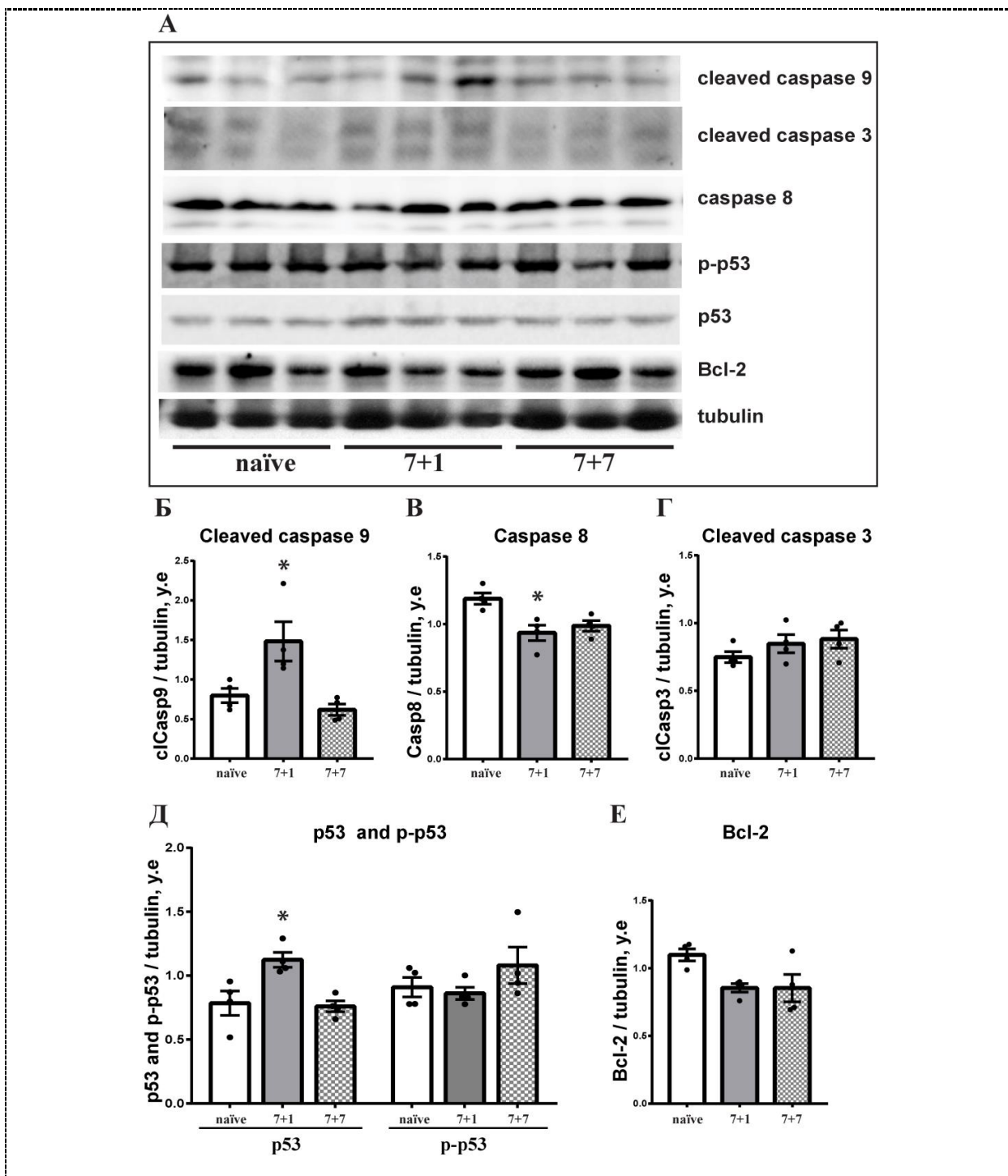


**Рисунок 44.** Анализ аутофагии в гиппокампе крыс линии КМ после 4 АСП. Уровень LC3BI (А), LC3BII (Б), p62 (В). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали  $\beta$ -тубулин. Г - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p62, LC3BI и II в гиппокампе крыс линии КМ после 4 АСП. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.. \* - достоверные различия при  $p < 005$ .

## 7 аудиогенных судорожных припадков

После 7 АСП вестерн-блоттинг показал активацию митохондриального и р53-зависимого путей активации апоптоза. Содержание cleaved caspase 9 и р53 увеличивалось

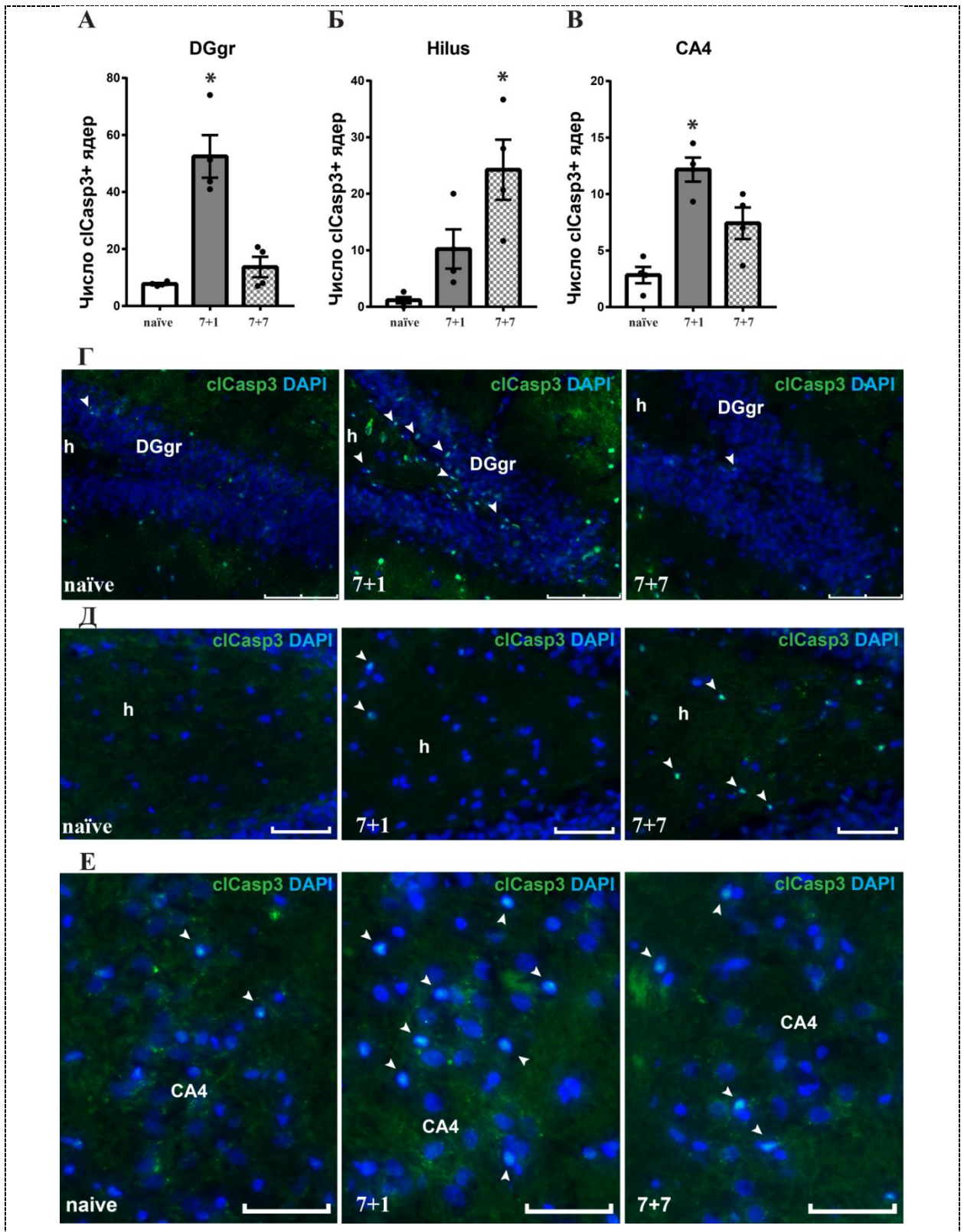
через сутки после 7 АСП (рис 45 А, Б, Д). Также было показано снижение содержания caspase 8 (рис. 45 А, В). Уровень других белков: Bcl2, cleaved caspase 3 и фосфорилированного p53 не изменялся (рис. 45 А, Г, Д, Е).



**Рисунок 45.** Вестерн-блотт анализ гиппокампов крыс после 7 АСП. А - репрезентативный вестерн-блот 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). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали тубулин. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$  naïve vs 7+1, 7+7.



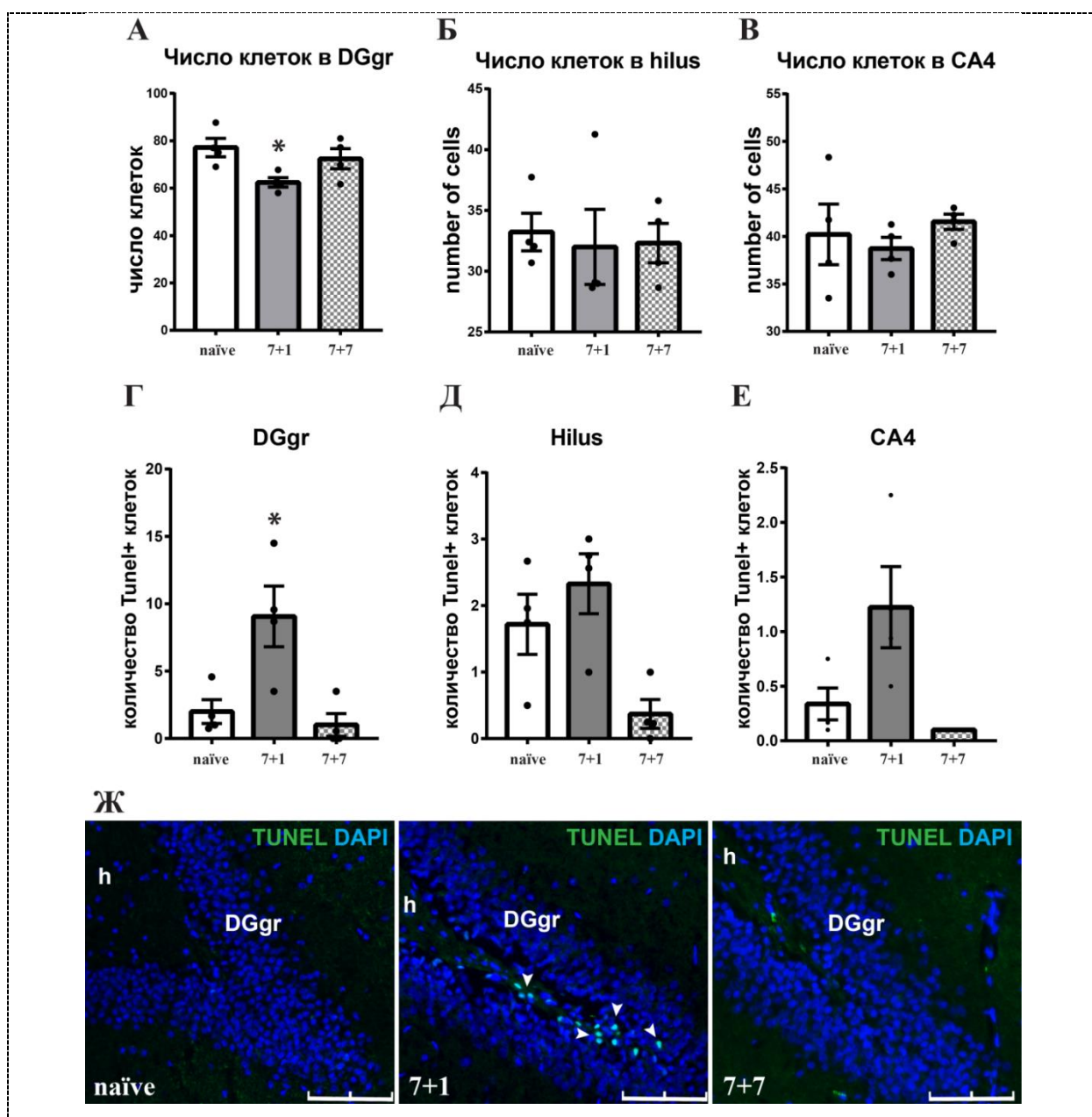
Хотя вестерн-блот анализ не показал изменений в уровне cIcasp3, иммуногистохимическое окрашивание показало значительное увеличение количества cIcasp3-иммунопозитивных ядер в поле CA4 гиппокампа и в гранулярном слое зубчатой извилины (рис. 46 А, В, Г, Е).



**Рисунок 46.** Иммуногистохимический анализ cIcasp3 после 7 АСП. А – Б – число cIcasp3-иммунореактивных ядер после 7 АСП (7+1) в гранулярном слое зубчатой извилины (А), хилусе (Б),

поле гиппокампа СА4 (В). Г - Е - иммунофлуоресцентное выявление *clCasp3* в зубчатой извилине(Г), хилусе (Д) и поле СА4 (Е). *clCasp3* (зеленый), стрелки указывают на клетки, экспрессирующие *clCasp3* в ядре. Масштаб: 100 мкм (Г) и 50 мкм (Д, Е). Ядра окрашены DAPI (синий). DGgr – гранулярный слой зубчатой извилины, h(hilus) – хилус, СА4 – поле СА4 гиппокампа. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$  naïve vs 7+1, 7+7.

Метод TUNEL показал апоптотическую гибель клеток в гранулярном слое зубчатой извилины, и подсчет количества ядер, окрашенных DAPI, подтвердил снижение числа клеток через сутки после 7 АСП (рис. 47 А, Г, Ж). Спустя неделю после окончания экспозиции звука уровень апоптоза снижался до контрольных значений, а число нейронов восстанавливалось (рис. 47 А, Г).

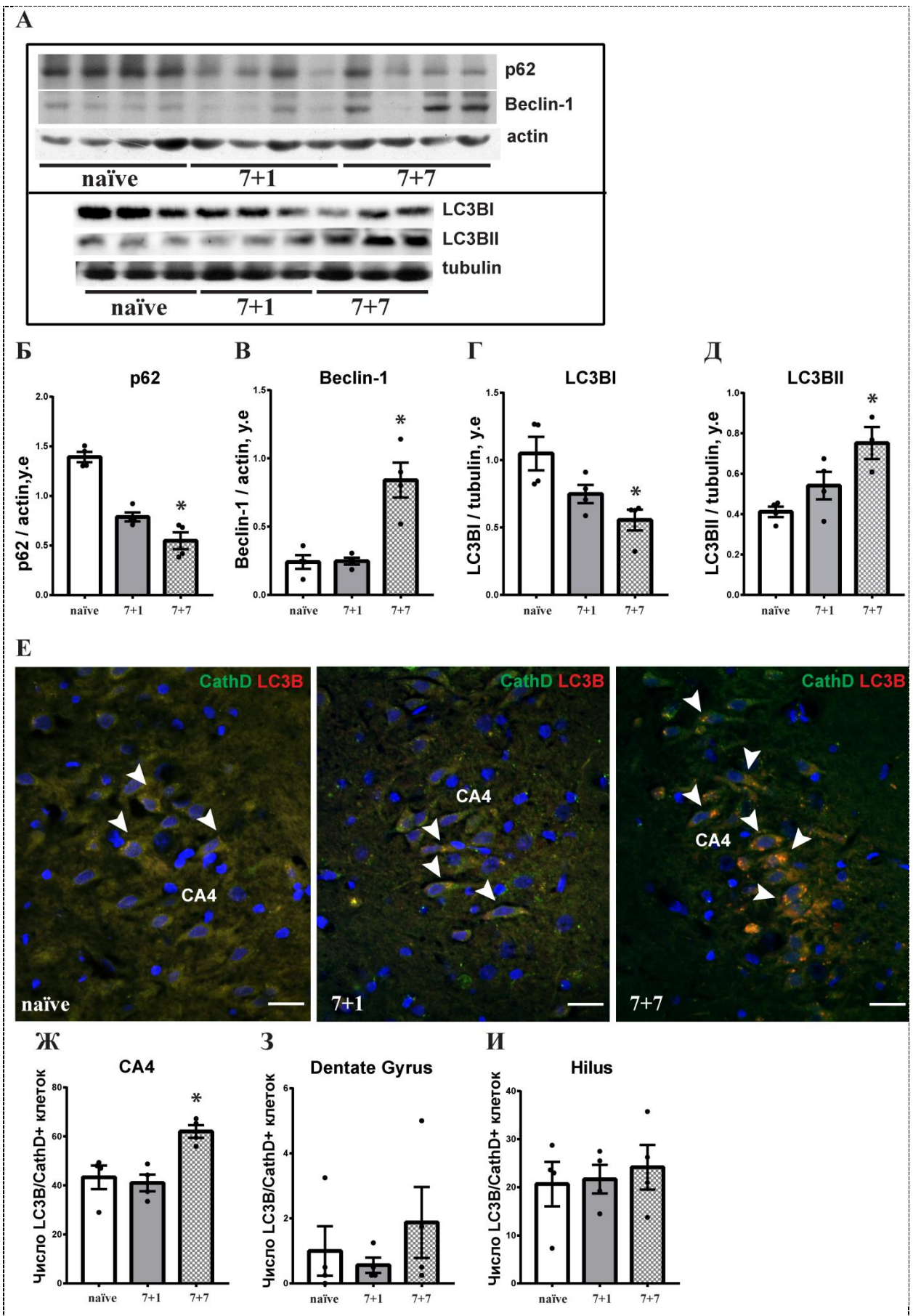


**Рисунок 47.** Анализ апоптоза в гиппокампе крыс КМ после 7 АСП. А - В – число клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (А), хилусе (Б), поле СА4 (В). Г – Е – число TUNEL-позитивных ядер в гранулярном слое (Г), хилусе (Д), поле СА4 (Е) после 7 АСП. Ж - иммунофлуоресцентное выявление TUNEL-позитивных ядер в зубчатой извилине(зеленый), стрелки указывают на TUNEL-позитивные ядра. Масштаб: 100 мкм. Ядра окрашены DAPI (синий). DGgr – гранулярный слой зубчатой извилины, h (hilus) – хилус. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$  naïve vs 7+1, 7+7.

Не было обнаружено изменений в уровнях белков аутофагии (p62, Beclin-1, LC3BI, LC3BII) через день после 7 АСП по сравнению с наивными животными (рис.48 А - Д).

Через неделю после 7 АСП изменения в уровнях проапоптотических белков (p53, p-p53, cleaved caspase 9 и 3, caspase 8) и Bcl2 не отличалась от характерной для контрольных животных (рис. 46). Метод TUNEL показал, что уровень апоптотической гибели в гиппокампе через неделю после 7 АСП не отличался от характерного для наивных животных (рис. 47 Г - Е). Однако иммуногистохимическое выявление cIcasp 3 показало повышенное число окрашенных ядер в хилусе зубчатой извилины через неделю после 7 АСП (рис. 46 Б, Д). Число клеток в гранулярном слое не отличалось между данной экспериментальной группой и наивными животными (рис. 47 А).

Через неделю поле 7 АСП была показана активация аутофагии. Вестерн-блот анализ показал увеличение содержания Beclin-1, LC3BII и уменьшение содержания LC3BI и p62 через неделю после 7 АСП по сравнению с наивными крысами линии КМ (рис. 48 А - Д). Также через неделю после 7 АСП двойное иммуногистохимическое окрашивание против CathD/LC3B показало увеличение числа клеток в поле СА4, коэкспрессирующих CathD и LC3B, по сравнению с наивными крысами (рис. 48 Е - И).

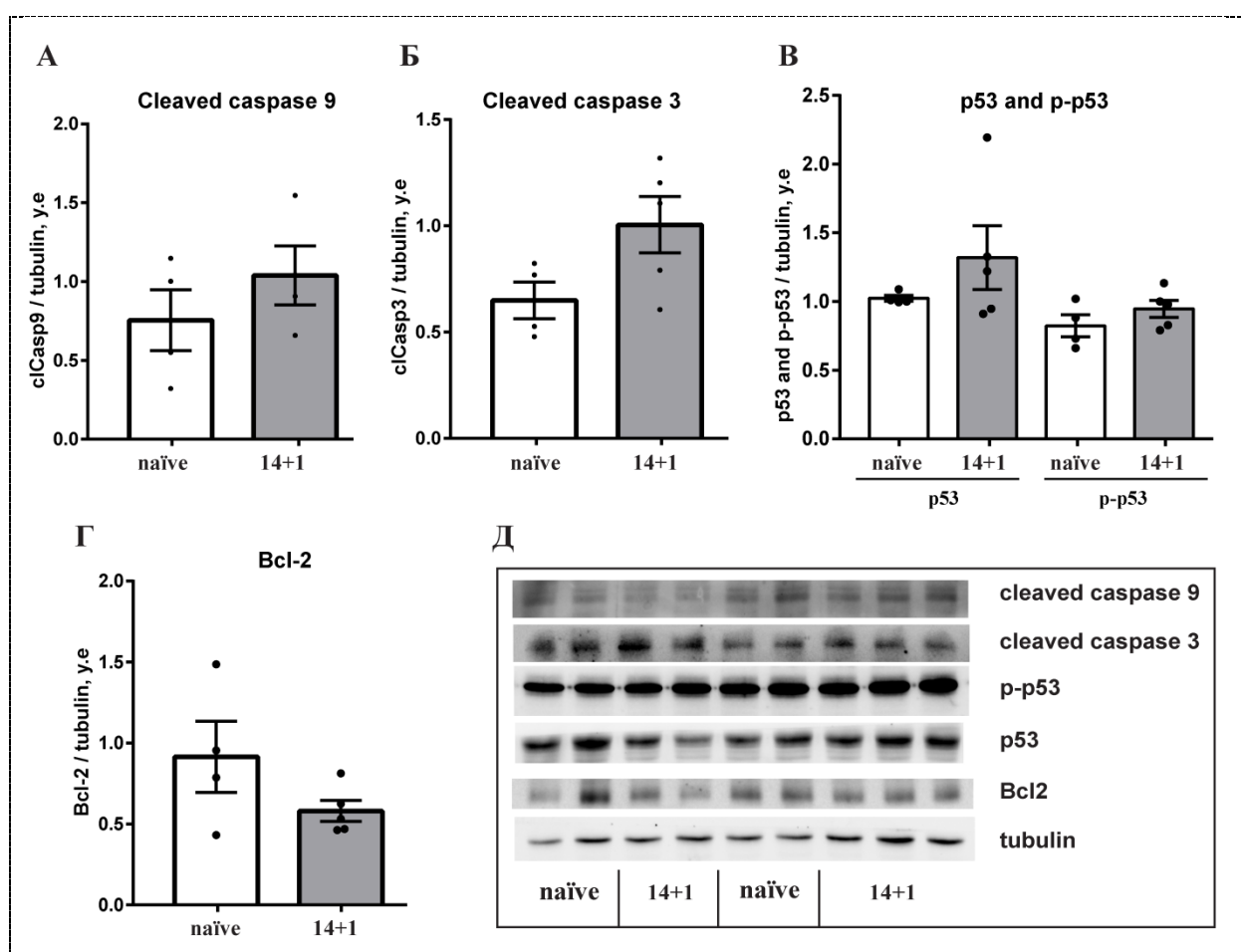


**Рисунок 48.** Анализ аутофагии в гиппокампе крыс линии КМ после 7 АСП. А - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p62, Beclin-1, LC3BI и II в гиппокампе крыс линии КМ после 7

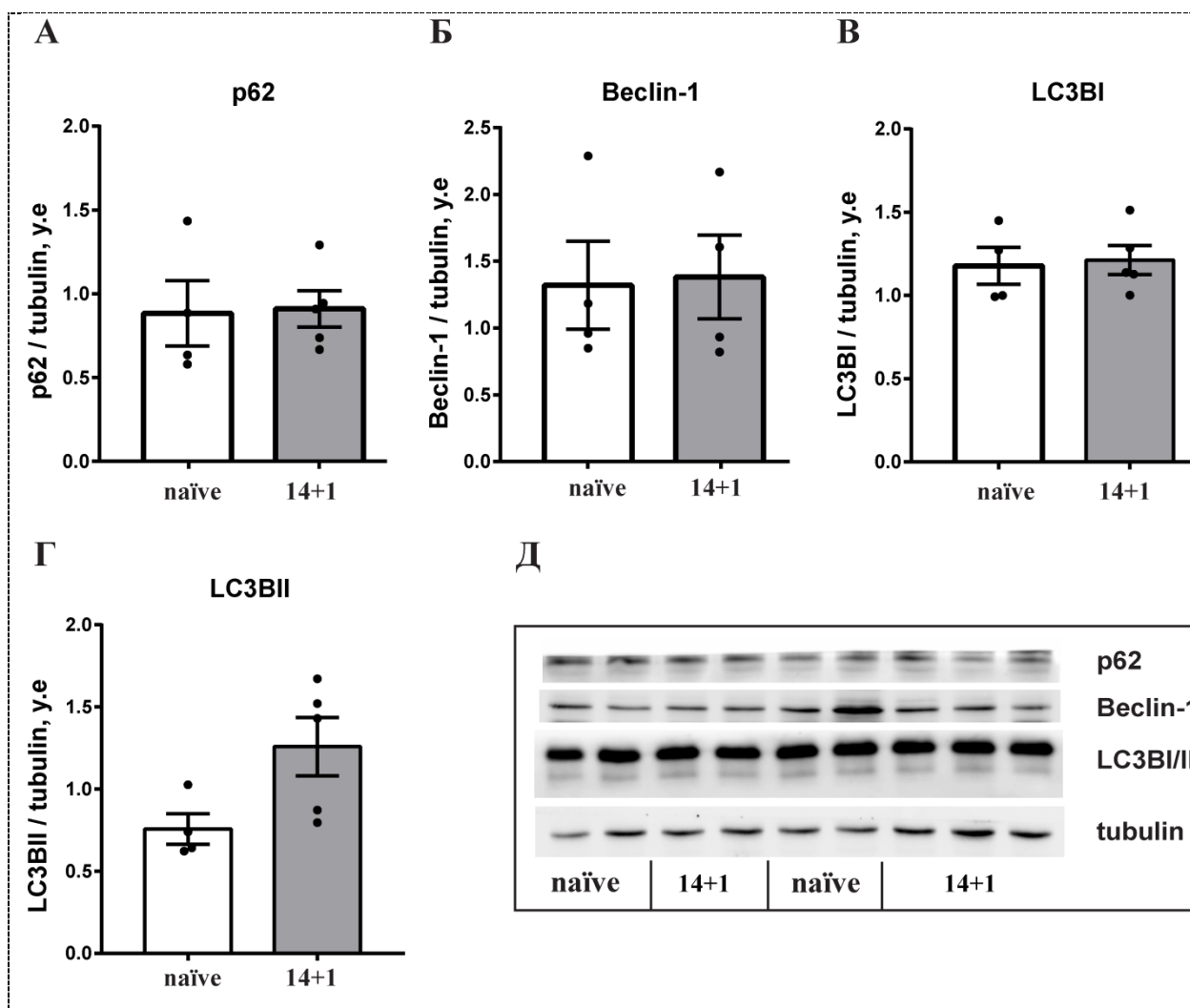
АСП. Уровень p62 (Б), Beclin-1 (В), LC3BI (Г), LC3BII (Д). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали тубулин и актин. Е - иммунофлуоресцентное выявление CathD (зеленый), LC3B (красный) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки, коэкспрессирующие CathD и LC3B (желтые). Масштаб: 50 мкм. Ж - И – число клеток, коэкспрессирующих CathD и LC3B, в поле СА4 (Ж), гранулярном слое зубчатой извилины (З), хилусе (И). Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$  naïve vs 7+1, 7+7.

#### 14 аудиогенных судорожных припадков

Согласно данным вестерн-блоттинга через сутки после 14 АСП не наблюдается изменений в уровнях белков, отвечающих за регуляцию апоптоза и аутофагии (рис. 49, 50).

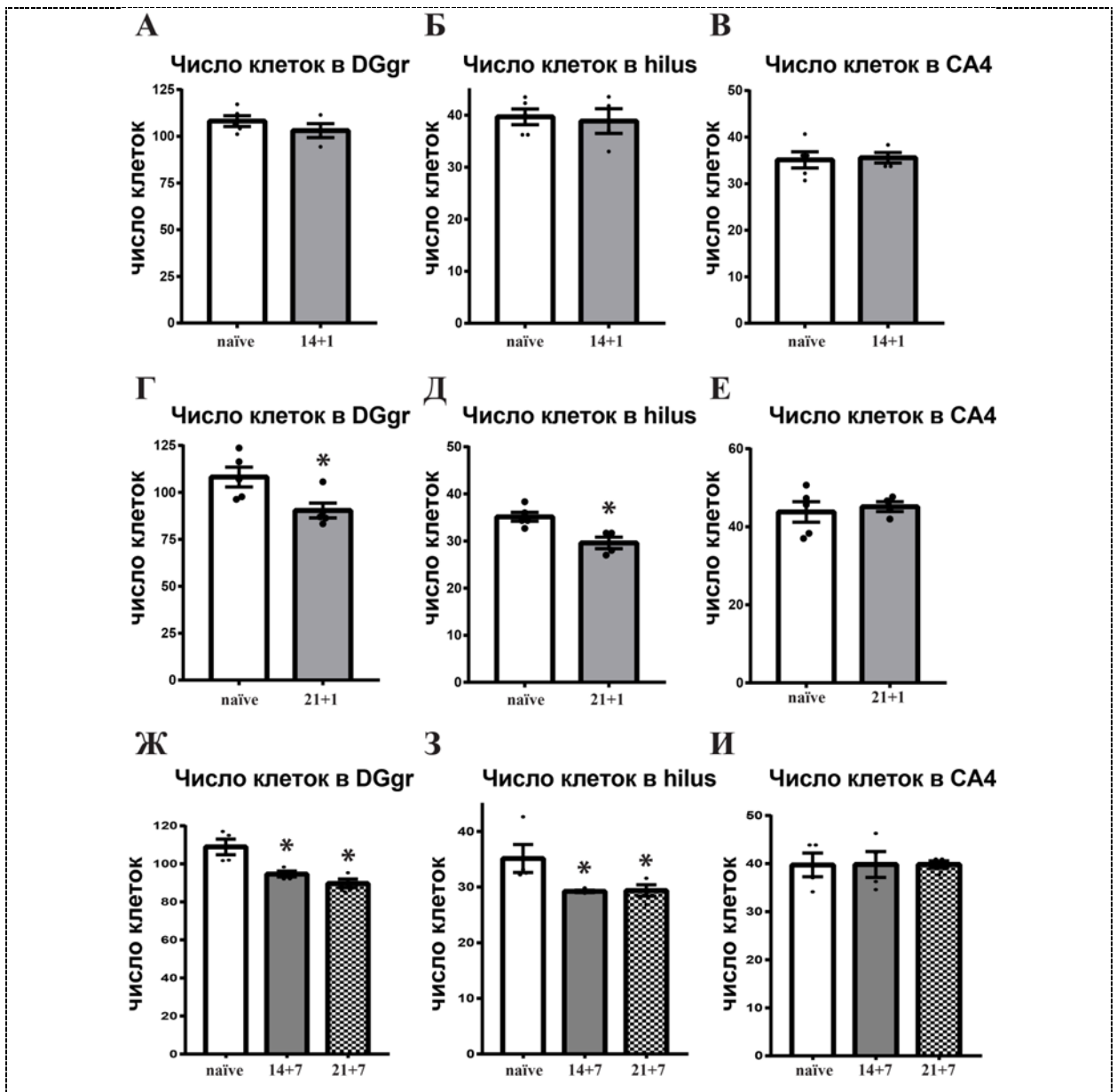


**Рисунок 49.** Вестерн-блот анализ гиппокампов крыс после 14 АСП. Уровень cIcasp9 (А), cIcasp3 (Б), p53 и p-p53 (В), Bcl2 (Г). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали тубулин. Д - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания cIcasp9, cIcasp3, p53 и p-p53, Bcl2 в гиппокампе крыс линии КМ после 14 АСП. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .



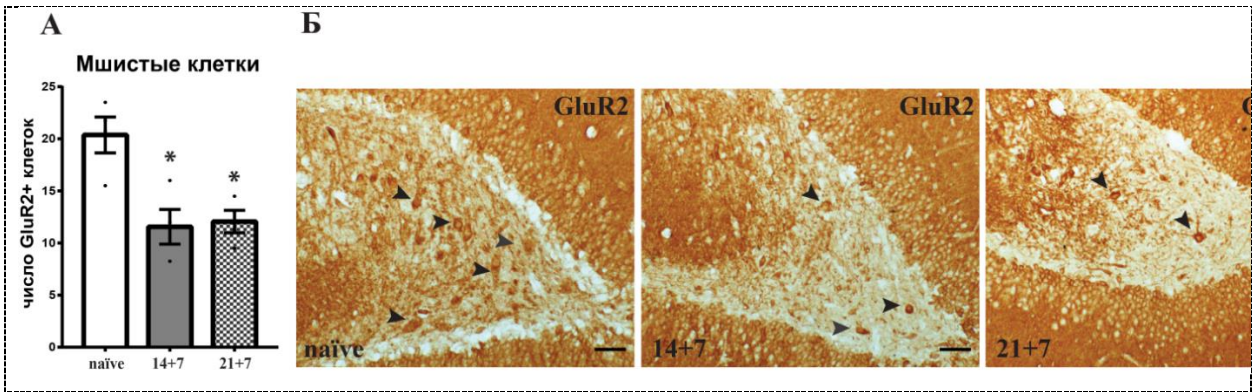
**Рисунок 50.** Анализ аутофагии в гиппокампе крыс линии КМ после 7 АСП. Уровень p62 (А), Beclin-1 (Б), LC3BI (В), LC3BII (Г). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали тубулин. Д - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p62, Beclin-1, LC3BI и II в гиппокампе крыс линии КМ после 7 АСП. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

Анализ общего числа клеток показал, что различия в числе клеток не наблюдается у наивных и экспериментальных крыс в исследованных зонах гиппокампа (рис. 51 А - В). Метод TUNEL не выявил увеличения апоптотической гибели в гиппокампе через сутки после 14 АСП по сравнению с наивными животными.



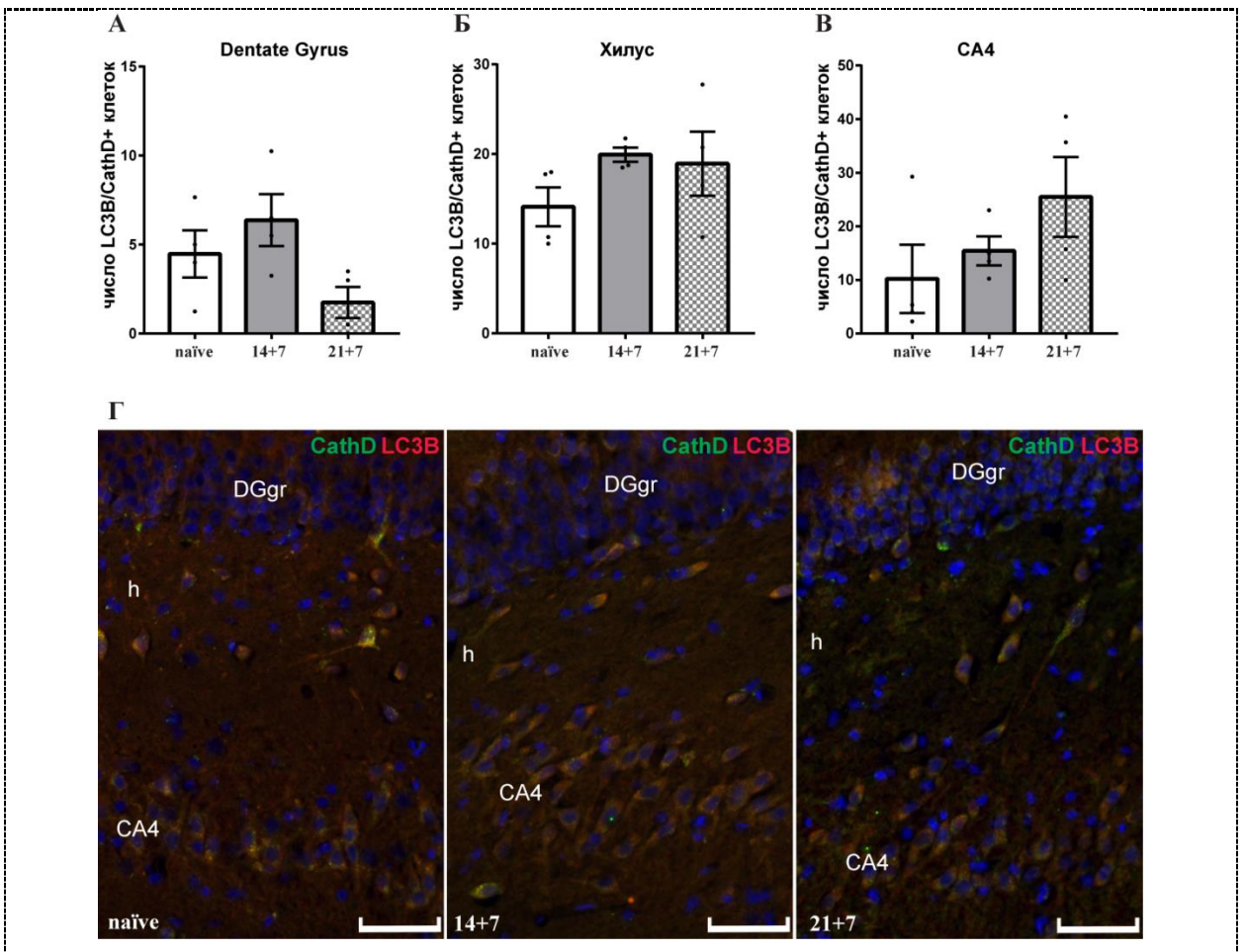
**Рисунок 51** Анализ числа клеток в гиппокампе крыс КМ после 14 и 21 АСП. А - В – число клеток в гранулярном слое зубчатой извины (А), хилусе (Б), поле СА4 (В) после 14 АСП (14+1). Г - Е - число клеток в гранулярном слое зубчатой извины (Г), хилусе (Д), поле СА4 (Е) после 21 АСП (21+1). Ж - И - число клеток в гранулярном слое зубчатой извины (Ж), хилусе (З), поле СА4 (И) через неделю после 14 (14+7) и 21 (21+7) АСП. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$  naïve vs экспериментальные группы.

Через неделю после 14 АСП было показано снижение числа клеток в гранулярном слое и хилусе зубчатой извины (рис. 51 Ж, З). Более того, было показано снижение количества мшистых клеток в хилусе зубчатой извины (рис. 52).



**Рисунок 52.** Мшистые клетки в гиппокампе. А – число GluR2-иммунопозитивных клеток в хилусе через неделю после 14 (14+7) и 21 (21+7) АСП. Б – 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 ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$  naïve vs 14+7, 21+7.

Но с другой стороны, метод TUNEL также не детектировал повышенной апоптотической гибели в гиппокампе через неделю после 14 АСП по сравнению с наивными крысами. Анализ клеток, коэкспрессирующих CathD/LC3B, не показал активации аутофагии через неделю после 14 АСП (рис. 53).

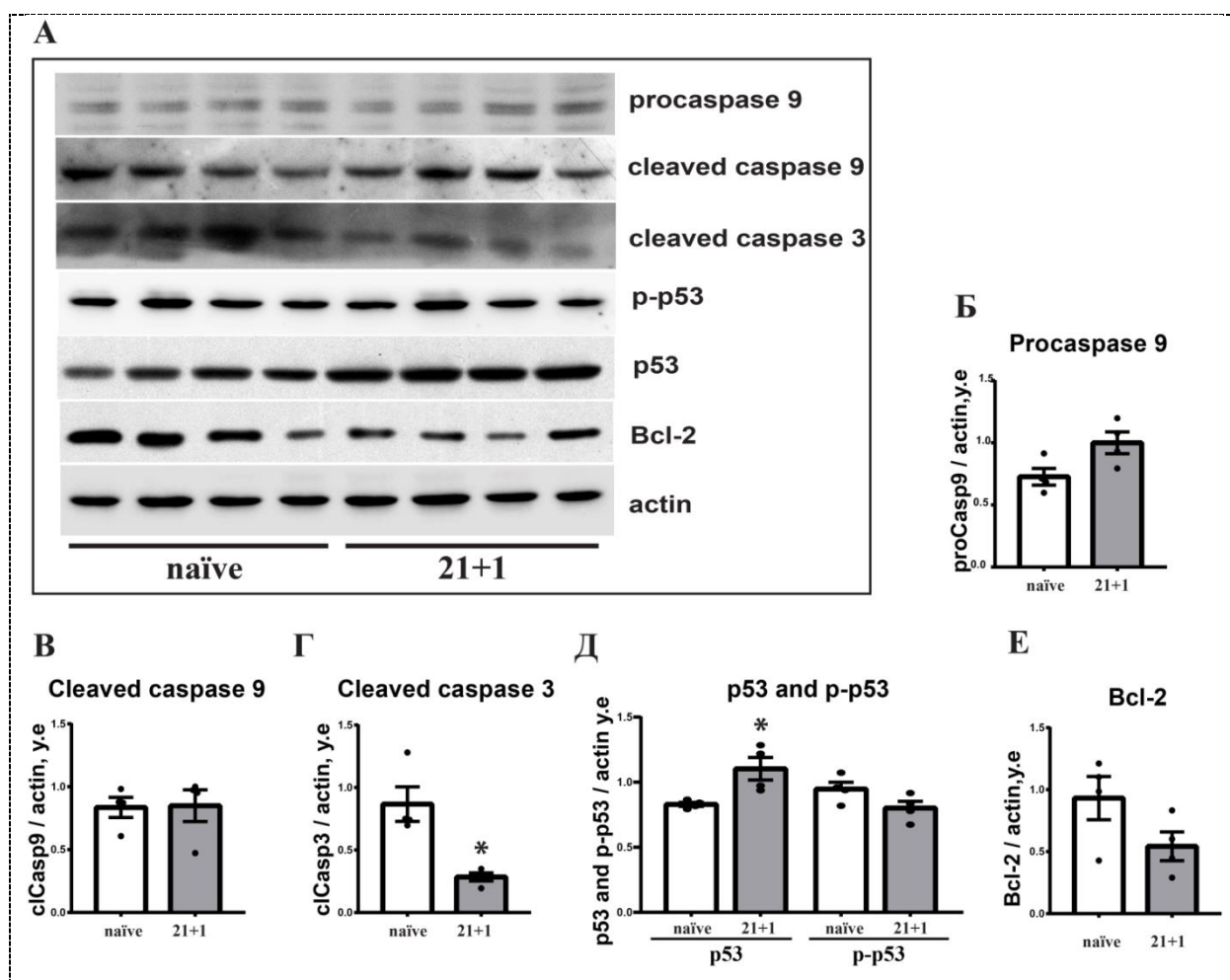




**Рисунок 53.** Анализ аутофагии в гиппокампе крыс линии КМ через неделю после 14 и 21 АСП. А - В - число клеток, коэкспрессирующих *CathD* и *LC3B*, в гранулярном слое зубчатой извилины (А), хилусе (Б), СА4 (В). Г - иммунофлуоресцентное выявление *CathD* (зеленый), *LC3B* (красный) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине, стрелки указывают на клетки, коэкспрессирующие *CathD* и *LC3B* (желтые). Масштаб: 50μm. Ядра окрашены DAPI (синий). *DGgr* – гранулярный слой зубчатой извилины, *h*(hilus) – хилус, СА4 – поле СА4 гиппокампа. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$  naïve vs 14+7, 21+7.

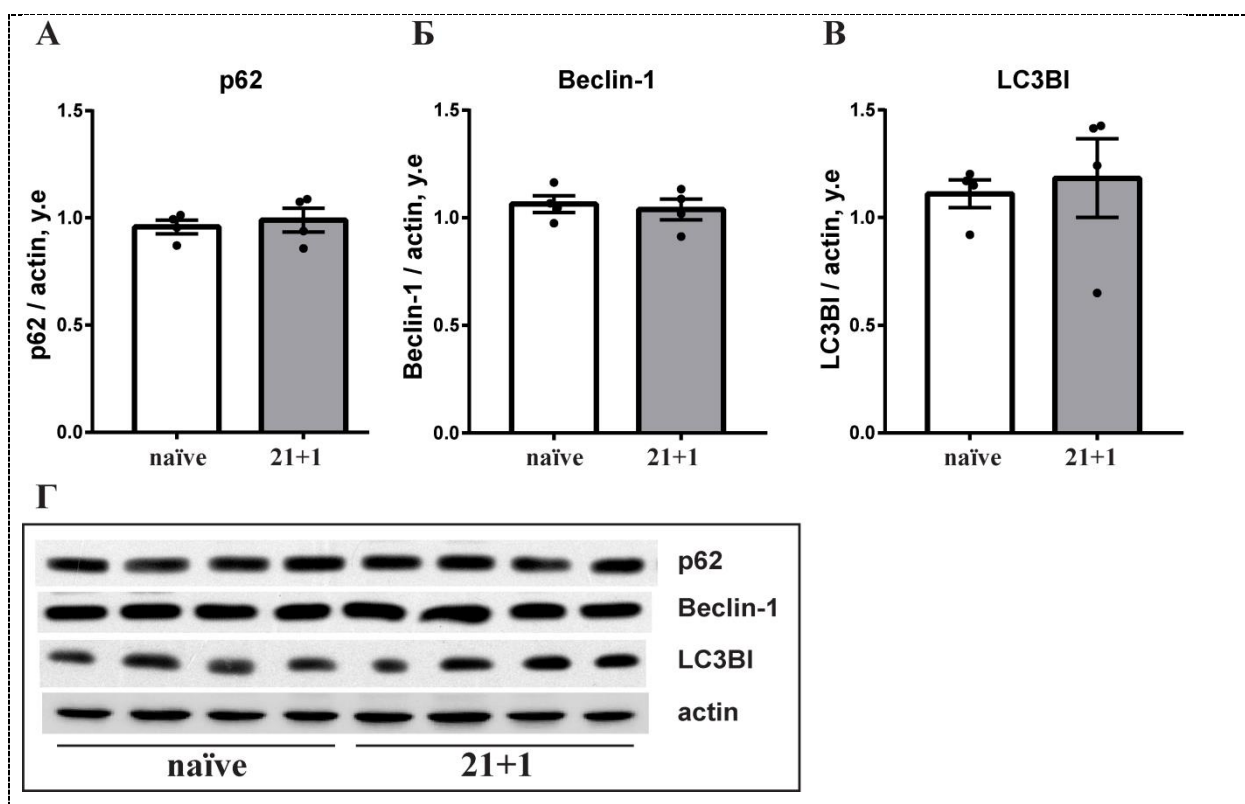
## 21 аудиогенный судорожный припадок

Вестерн-блоттинг показал увеличение содержания белка p53 и снижение содержания cIcasp3 через сутки после 21 АСП по сравнению с наивными животными (рис. 54 А, Г, Д).



**Рисунок 54.** Вестерн-блот анализ гиппокампов крыс после 21 АСП. А - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания *proCasp9*, *cIcasp9*, *cIcasp3*, *Casp8*, *p53* и *p-p53*, *Bcl2* в гиппокампе крыс линии КМ после 21 АСП. Уровень *proCasp9* (Б), *cIcasp9* (В), *cIcasp3* (Г), *p53* и *p-p53* (Д), *Bcl2* (Е). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали актин. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$  naïve vs 21+1.

Подсчет общего числа клеток показал снижение плотности клеток в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины (рис. 51 Г, Д). Метод TUNEL не выявил повышенной клеточной гибели в гиппокампе через сутки чутки после 21 АСП. Вестерн-блоттинг не обнаружил изменений в уровнях белков, отвечающих за активацию аутофагии (рис. 55).



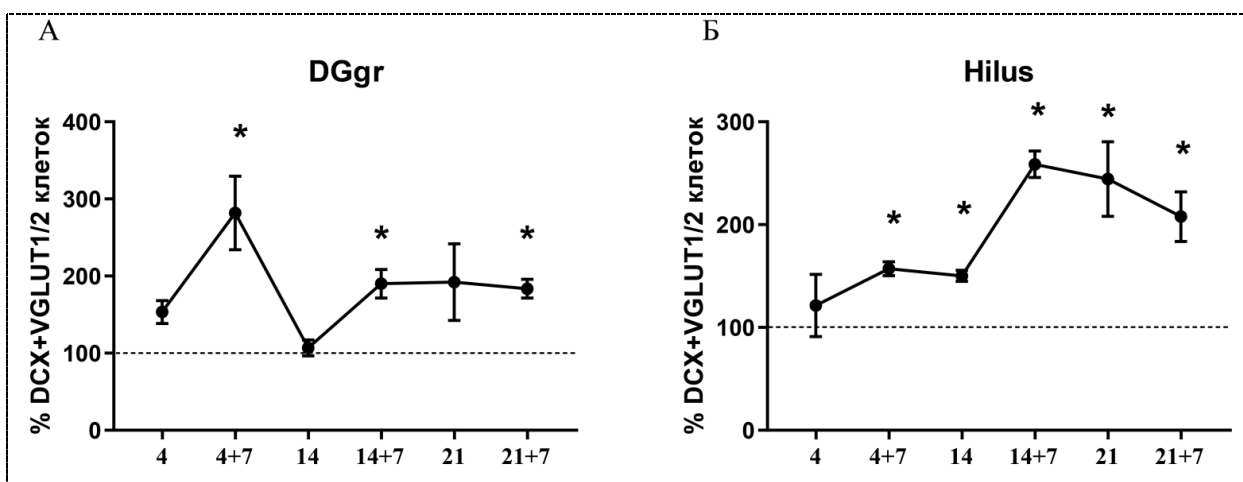
**Рисунок 55.** Анализ аутофагии в гиппокампе крыс линии КМ после 21 АСП. Уровень p62 (А), Beclin-1 (Б), LC3BI (В). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали актин. Г - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p62, Beclin-1, LC3BI и  $\beta$ -тубулина в гиппокампе крыс линии КМ после 7 АСП. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ .

Через неделю после 21 АСП показано снижение числа клеток в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины (рис. 51 Ж, З). В хилусе зубчатой извилины количество мшистых клеток было ниже, чем у наивных животных (рис. 52). Метод TUNEL не детектировал повышенной апоптотической гибели в гиппокампе через неделю после 21 АСП по сравнению с наивными крысами. Анализ клеток, коэкспрессирующих CathD/LC3B, не показал увеличения активации аутофагии через неделю после 21 АСП (Рис.53).

### Заключение

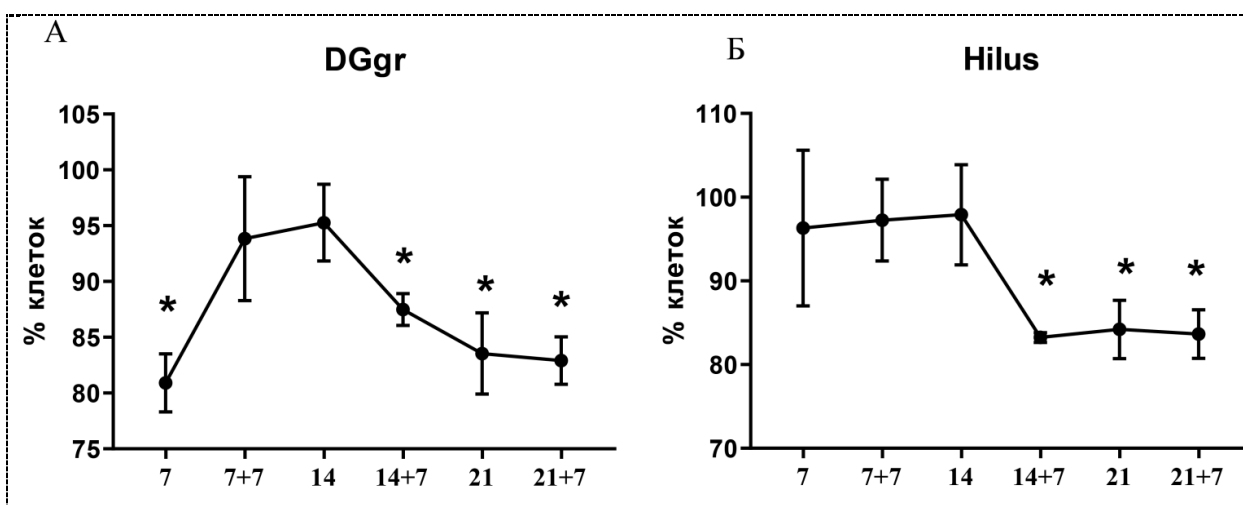
С одной стороны, моделирование лимбических судорог сопровождалось повышенной аберрантной миграцией новообразованных клеток в хилус и их дифференцировкой в глутаматергические нейроны. Через неделю после 14 АСП степень

дифференцировки и миграция вновь образованных нейронов в хилусе достигает максимума и выходит на плато. (рис. 55 Б).



**Рисунок 56.** Анализ дифференцировки и aberrантной миграции новообразованных нейронов на протяжении аудиогенного киндлинга. А, Б – процент клеток, коэкспрессирующих DCX и VGLUT1/2, в гранулярном слое зубчатой извилины (А) и хилусе (Б).

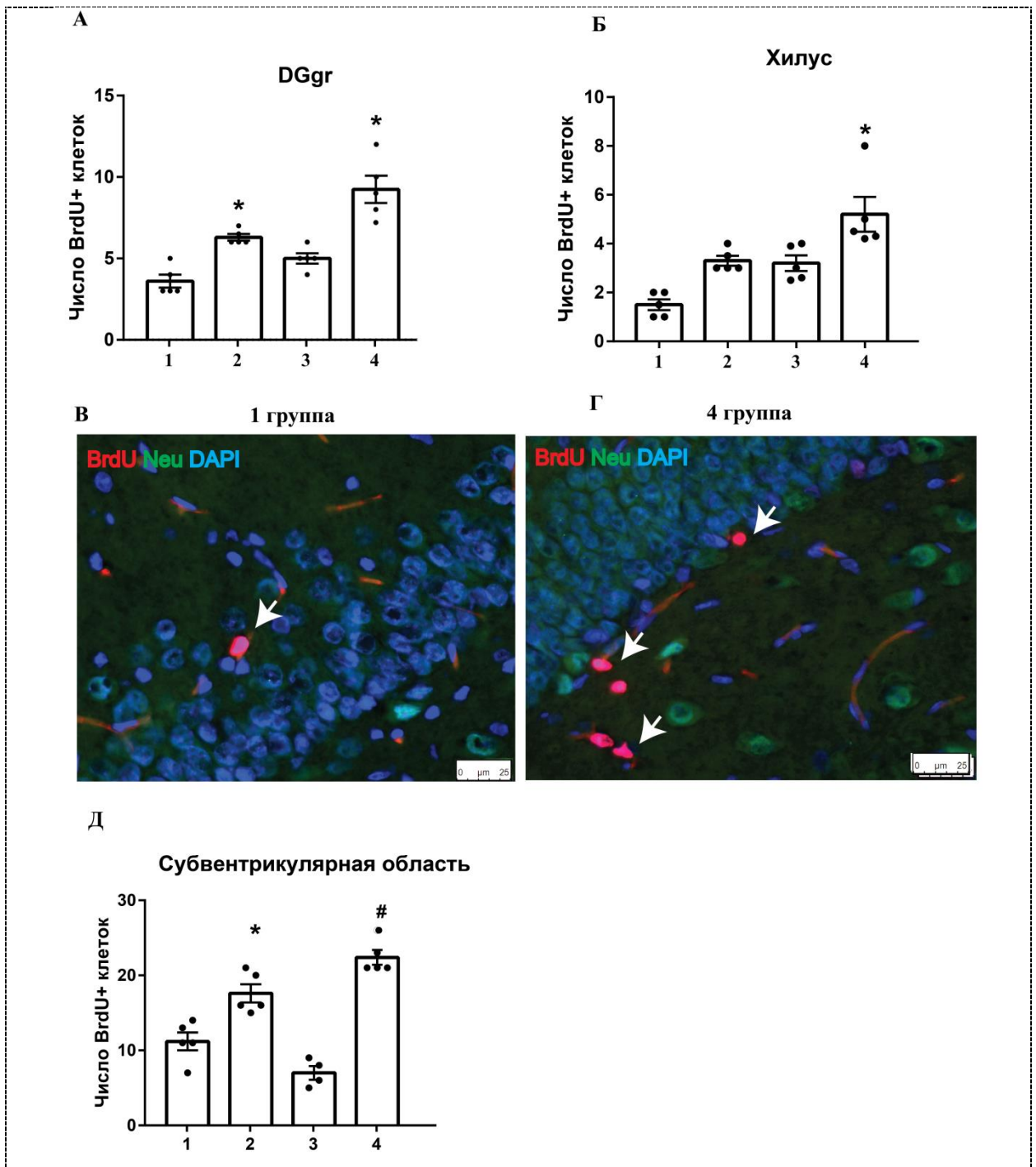
С другой стороны, при моделировании височной эпилепсии наблюдаются нейродегенеративные процессы. В зубчатой извилине происходит 2 волны клеточной гибели. 7 АСП сопровождаются апоптотической гибелью клеток и снижением числа нейронов в гранулярном слое зубчатой извилины. Через неделю после 7 АСП и после 14 АСП численность клеток в гранулярном слое восстанавливается (рис. 57 А). Однако через неделю после 14 АСП наблюдается вторая волна гибели клеток, убыль клеток наблюдается не только в гранулярном слое, но и в хилусе (рис. 57 Б). Было показано, что в хилусе наиболее уязвимыми к аудиогенным судорогам нейронами оказались мшистые клетки. Нейродегенерация после второй волны клеточной гибели не была скомпенсирована aberrантным нейрогенезом (рис. 57).



**Рисунок 57.** Анализ количества клеток на протяжении аудиогенного киндлинга. А, Б – процент клеток у экспериментальных животных в гранулярном слое зубчатой извилины (А) и хилусе (Б) относительно наивного контроля.

### **3.3 Влияние пифитрина- $\alpha$ на процессы нейрогенеза, дифференцировки, апоптоза и аутофагии**

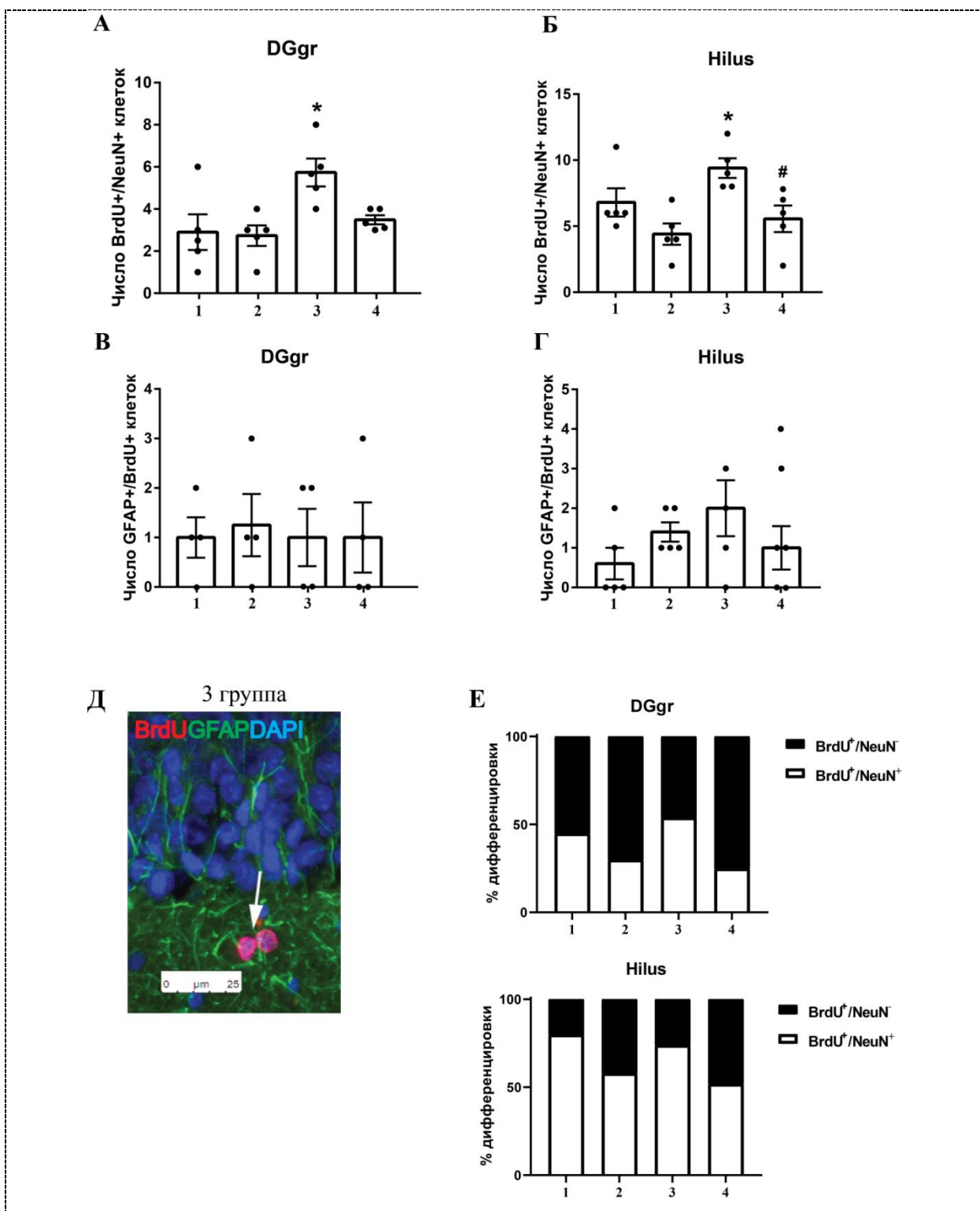
Введение пифитрина- $\alpha$  привело к статистически значимому увеличению числа делящихся клеток в гранулярном слое зубчатой извилины после 4 АСП. Через 7 дней после окончания судорог повышенное число пролиферирующих клеток было показано в гранулярном слое и в хилусе зубчатой извилины (рис. 58 А, Б, В). Также увеличение количества новообразованных клеток наблюдалось в субвентрикулярной зоне (рис. 58 Г). Однако при введении пифитрина- $\alpha$  степень дифференцировки по нейрональному типу не отличалась от характерной для контрольных животных во всех изученных отделах гиппокампа и в субвентрикулярной зоне, в отличие от показанного увеличения у животных под действием краткой звуковой экспозицией.



**Рисунок 58.** Анализ пролиферации в гиппокампе и субвентрикулярной зоне при введении пифитрина- $\alpha$ . А, Б – число BrdU-позитивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (А) и в хилусе (Б). В – иммунофлуоресцентное выявление BrdU (красный), NeuN (зеленый) экспрессирующих клеток в зубчатой извилине. Ядра окрашены DAPI (синий). Стрелки указывают на BrdU-позитивные клетки. Д - число BrdU-позитивных клеток в субвентрикулярной области. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ , группа 1 vs группа x. # - достоверные различия при  $p < 0.05$ , группа 3 vs группа 4.

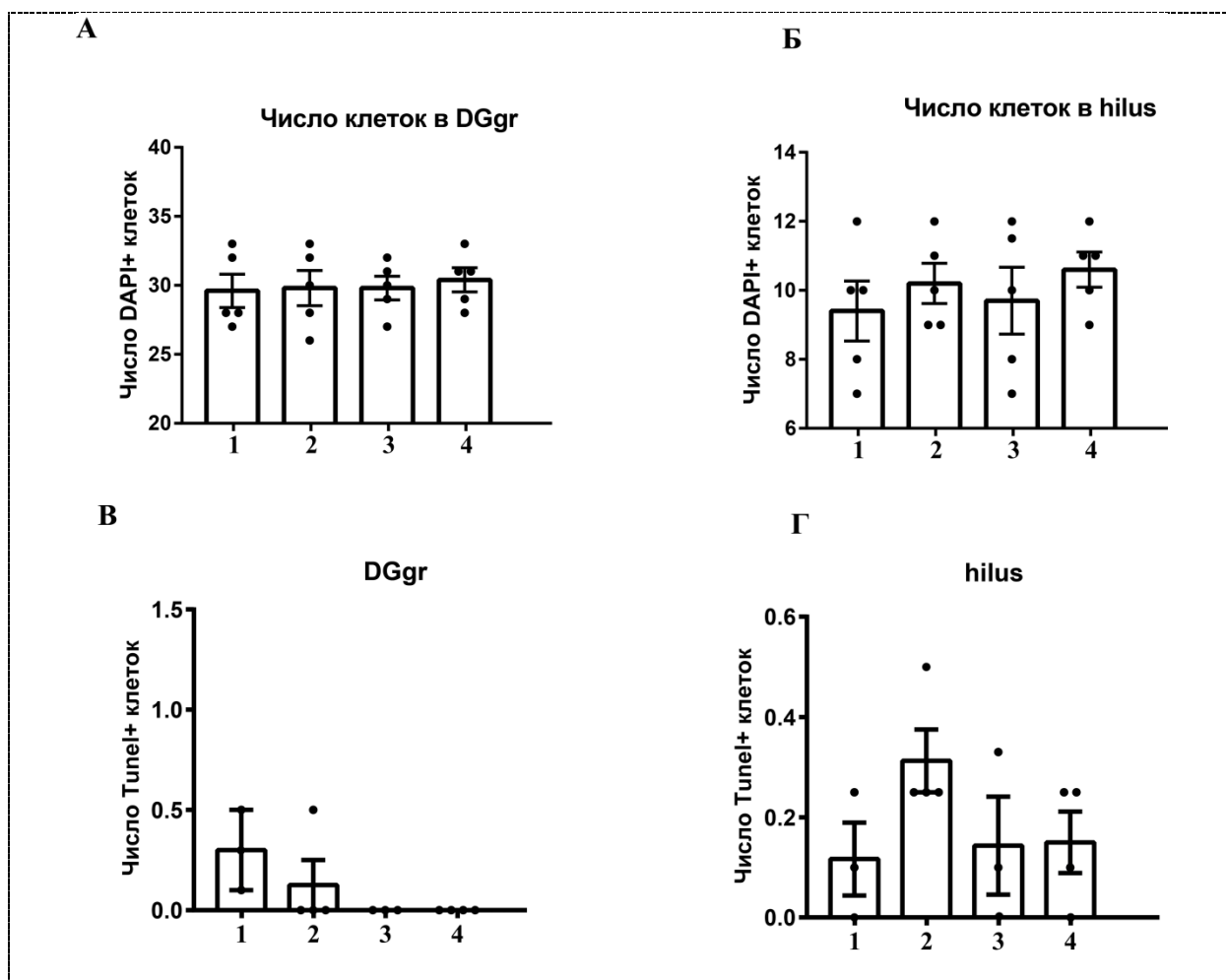
Более того, под действием пифитрина- $\alpha$  число дифференцированных нейронов в хилусе снижалось через неделю после окончания судорог по сравнению с крысами, которым вводили ДМСО (рис. 59 А, Б). Введение пифитрина- $\alpha$  снижало уровень

нейрональной дифференцировки новообразованных клеток (рис. 59 Е). При этом было обнаружено, что пифитрин- $\alpha$  не влияет на дифференцировку вновь образованных клеток по глиальному типу (рис. 59 В, Г). Эти данные свидетельствуют о подавлении дифференцировки по нейрональному типу при ингибировании белка p53.



**Рисунок 59.** Анализ дифференцировки в гиппокампе после введения пифитрина- $\alpha$ . А, Б – число нейронов с BrdU-меткой, и экспрессирующих NeuN, в гранулярном слое (А) и в хилусе (Б). В, Г – число клеток с BrdU-меткой, экспрессирующих GFAP, в гранулярном слое (В) и в хилусе (Г). Д –

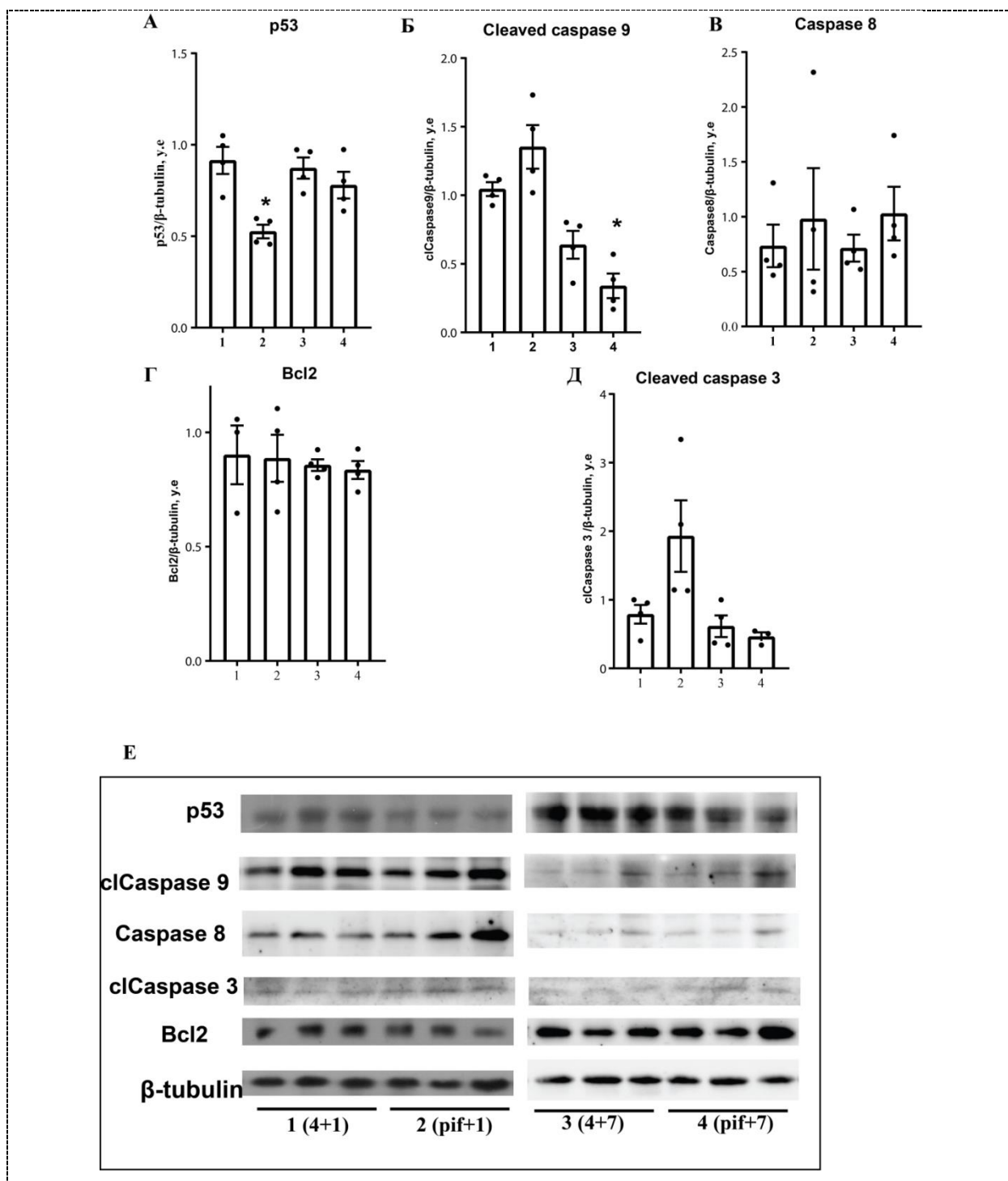
иммунофлуоресцентное выявление клеток, коэкспрессирующих BrdU и GFAP, в гиппокампе крыс линии КМ через неделю после 4 АСП, BrdU (красный) GFAP (зеленый). Ядра окрашены DAPI. Е – соотношение дифференцированных ( $BrdU^+/NeuN^+$ ) новообразованных клеток к недифференцированным ( $BrdU^+/NeuN^-$ ) при действии пифитрина- $\alpha$ . Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ , группа 1 vs группа 1. # - достоверные различия при  $p < 0.05$ , группа 3 vs группа 4.



**Рисунок 60.** Анализ общего количества клеток и апоптотических клеток в гиппокампе после введения пифитрина- $\alpha$ . А, Б – количество клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (А) и хилусе (Б). В, Г – число TUNEL-позитивных ядер в гранулярном слое зубчатой извилины (А) и хилусе (Б). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ , группа 1 vs группа 1.

Вестерн-блот анализ показал, что введение пифитрина- $\alpha$  приводит к снижению содержания p53 через 4 часа после 4 АСП и к снижению содержания cleaved caspase 9 через 7 дней после 4 АСП, но не влияет на другие белки, участвующие в апоптозе (cleaved caspase 3, caspase 8, Bcl2) (рис. 61). Не было выявлено изменений в количестве клеток в различных зонах гиппокампа при действии пифитрина- $\alpha$  (рис. 60 А, Б). Повышения апоптотической

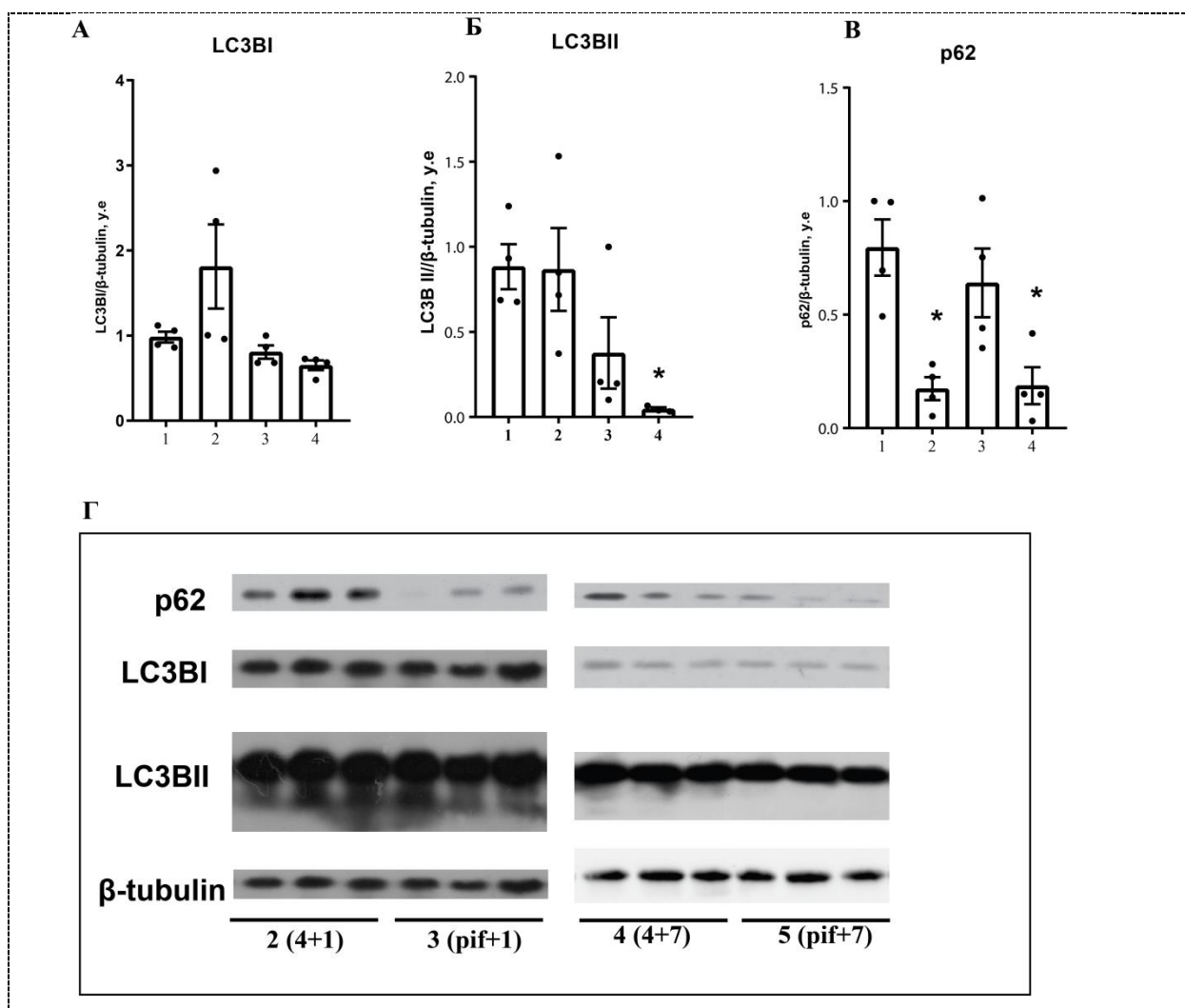
гибели клеток, выявленной методом TUNEL в гиппокампе при введении пифитрина- $\alpha$  обнаружено не было (рис. 60 В, Г). Анализ белков аутофагии показал, что под действием пифитрина- $\alpha$  после 4 АСП наблюдается снижение содержания p62, а через неделю после АСП вместе с p62 снижается LC3ВІІ (рис. 62).



**Рисунок 61.** Вестерн-блот анализ гиппокампов крыс после введения пифитрина- $\alpha$ . Уровень p53 (А), cIcasp9 (Б), Casp8 (В), cIcasp3(Г), Bcl2 (Д). Е - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p53, cIcasp9, Casp8, cIcasp3, Bcl2 в гиппокампе крыс линии КМ после введения пифитрина- $\alpha$ . По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали тубулин. Данные представлены в виде



средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 005$ , группа 1 vs группа x.



**Рисунок 62.** Анализ аутофагии в гиппокампе крыс линии КМ после введения пифитрина- $\alpha$ . Уровень LC3BI (А), LC3BII (Б), p62 (В). По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах. В качестве загрузочного контроля в пробах использовали  $\beta$ -тубулин. Г - репрезентативный вестерн-блот анализ содержания p62, LC3BI и II в гиппокампе крыс линии КМ введения пифитрина- $\alpha$ . Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней. \* - достоверные различия при  $p < 0.05$ , группа 1 vs группа x.

### Заключение

Как было показано нами ранее в других экспериментах, повторяющаяся судорожная активность приводит к aberrantному нейрогенезу в зубчатой извилине. Введение пифитрина- $\alpha$  на ранних этапах формирования лимбической эпилепсии вызывает снижение уровня дифференцировки новообразованных клеток по нейрональному типу в хилусе зубчатой извилины. При этом пифитрин- $\alpha$  приводит к снижению содержания белка p62, что может свидетельствовать об активации аутофагии. Таким образом, уменьшение числа дифференцированных нейронов в хилусе и изменение содержания p62 позволяет

рассматривать пифитрин- $\alpha$  как потенциальный терапевтический агент для коррекции нарушений при эпилепсии.

## Глава 4. Обсуждение результатов

### 4.1 Аудиогенная эпилепсия

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 формирования рефлекторной эпилепсии у крыс разного возраста.

На крысах линий GEPR и WAR показано, что IC является критической структурой, осуществляющей инициацию и распространение АСП (Faingold, 1999). В IC взрослых крыс, которые не являются классической нейрогенной нишей, был показан нейрогенез, значительно падающий ко времени полового созревания (P48) (Engert et al., 2021). У взрослых (P120) крыс линии Вистар и КМ мы также показали пролиферирующие клетки в IC. Отличий в организации IC у взрослых животных линии Вистар и КМ с уже сформированной судорожной готовностью, обнаружено не было. Однако в нашей работе в ходе постнатального развития, при формировании аудиогенной эпилепсии были показаны существенные различия между крысами Вистар и КМ, предположительно связанные с формированием аудиогенной эпилепсии. У крыс линии КМ на 15-й день постнатального развития наблюдается повышение активности ERK1/2-киназы, которая может участвовать как в повышении судорожной готовности, так и в опосредовании увеличения пролиферации у этих крыс в CIC (Черниговская и др., 2019), так как показано участие ERK1/2 киназ в регуляции развития мозга (Albert-Gascó et al., 2020; Mebratu and Tesfagzi, 2009). Действительно, на 15-й день постнатального развития в четверохолмии у крыс линии КМ наблюдается значительное повышение уровня пролиферации по сравнению с крысами линии Вистар. Одновременно с этим у крыс линии КМ в CIC число клеток оказалось ниже, чем у крыс Вистар, а также обнаружена повышенная апоптотическая гибель. Эти данные можно рассматривать как индикатор задержки развития IC у крыс линии КМ. К концу первого месяца жизни число клеток, уровень пролиферации и апоптоза не отличается между крысами КМ и Вистар, и задержка развития нивелируется.

У крыс, не предрасположенных к АСП, звуковая экспозиция в раннем онтогенезе ведет к появлению АСП в более позднем возрасте (процедура прайминга) (Henry, 1972). Во время критического периода (P15) нарушения в IC могут приводить к неполному развитию тонотопической организации двуххолмия и повышению судорожной готовности у крыс в

зрелом возрасте (Pierson and Snyder-Keller, 1994). Согласно этим данным, можно предположить, что задержка развития IC у крыс линии KM приводит к нарушению тонотопической организации или образованию аберрантных связей в IC, которые способствуют формированию повышенной судорожной готовности у половозрелых крыс линии KM.

Гиппокамп первоначально не участвует в реализации аудиогенных судорог, он играет роль в дальнейшем распространении судорожной активности. Удаление гиппокампа у крыс приводило к повышению судорожной готовности и возникновению аудиогенных припадков у нелинейных крыс (Kim and Kim, 1962). Развитие гиппокампа у аудиогенно-чувствительных крыс до настоящего времени не изучали, хотя можно было предположить существование нарушений в его формировании, так как ранее были выявлены некоторые особенности в работе глутаматергических нейронов в ходе онтогенеза крыс линии KM (Chernigovskaya et al., 2019). В данной работе нами было показано, что гиппокамп у крыс KM претерпевает похожие нарушения в развитии, что и IC. 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 считаются полностью сформированными. У крыс линии KM на 15-й и 30-й дни постнатального развития активность ERK1/2 киназ значительно повышена в гранулярном слое зубчатой извилины, а к 60-му дню (P60) она снижается и не различается между крысами линий Вистар и KM. На 120-й день у крыс KM уровень активности ERK1/2 остается повышенным только во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины уровень активности ERK1/2 остается повышенным. ERK1/2 киназы являются многофункциональными белками, они принимают участие в регуляции пролиферации, апоптоза и дифференцировки нейронов (Albert-Gascó et al., 2020; Mebratu and Tesfaigzi, 2009). Действительно, на 15-й и 30-й день постнатального развития у крыс линии KM в гранулярном слое зубчатой извилины, хилусе и поле CA4 гиппокампа показан повышенный уровень пролиферации. Наличие пролиферирующих клеток в хилусе и поле CA4 может быть связано, с одной стороны, с тем, что у крыс линии KM в хилусе сохраняются прогениторы, которые должны были мигрировать в гранулярный слой, а с другой стороны, с тем, что у крыс линии KM происходит аберрантная миграция гранулярных клеток в хилус, где эти клетки еще могут делиться. Одновременно с этим в этих структурах наблюдается меньшее число клеток по сравнению с крысами линии Вистар того же возраста, что свидетельствует о неоконченном формировании гиппокампа у крыс KM. К концу второго месяца (P60) жизни уровень пролиферации и число клеток в гиппокампе крыс линии KM

стабилизируются и не отличаются от таковых у крыс линии Вистар, и это позволяет предположить, что к этому возрасту формирование структуры гиппокампа завершается.

Известно, что судорожная активность может приводить к aberrантному нейрогенезу и к 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 (Koyama 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 молодых и зрелых крыс линии КМ значительно больше дифференцирующихся эГК (клетки экспрессируют DCX), чем в хилусе крыс линии Вистар того же возраста. Более того, у крыс линии КМ всех изученных возрастов 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 НСК крыс КМ *in vitro* была также показана преимущественная дифференцировка в глутаматергические нейроны, в то время как НСК, полученные от крыс Вистар, дифференцировались также 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.

В онтогенезе пролиферация и дифференцировка нейронов сопровождаются процессами апоптоза. У 15-дневных крыс КМ в гиппокампе TUNEL методом не найдено повышения уровня апоптоза по сравнению с крысами Вистар. При этом наблюдалось снижение уровня проапоптотического белка p53 и антиапоптотического Bcl2. Известно, что у белков p53 и Bcl-2 есть множество функций, связанных не только с апоптозом. Одной из этих функций является контроль клеточной пролиферации. Как было показано, снижение количества Bcl-2 и p53 ведет к увеличению пролиферативной активности нейронов (Belyaeva et al., 2015; Liu et al., 2012). Возможно, пониженный уровень p53 и Bcl2 является одной из причин усиления пролиферативной активности у крысят линии КМ.

У 30-дневных крыс КМ, наоборот, происходит активация апоптоза, которая заключалась в увеличении уровня клеточной гибели и в увеличении содержания про- и антиапоптотических белков. В частности, увеличение уровня белка p53 и clCasp3, говорит нам об активации p53-зависимого митохондриального пути запуска апоптоза. Повышение уровня апоптоза и интенсивности пролиферации при меньшем числе клеток в зубчатой извилине и СА4 поле гиппокампа свидетельствует о задержке развития гиппокампа у крыс

линии КМ. Только к концу второго месяца жизни уровень апоптоза начинает падать, а число клеток уже не отличается от характерного для крыс родительской линии Вистар.

У крыс КМ на 120-й день постнатального развития наблюдается снижение уровня p53. У мышей нокаутных по гену p53 происходит увеличение продолжительности эпилептического статуса и спонтанных судорог, хотя процессы клеточной гибели в гиппокампе снижены (Engel et al., 2010). Таким образом, сниженная экспрессия p53 может обуславливать повышенную судорожную готовность у взрослых крыс линии КМ, у которых также проявляется повышенная чувствительность к хемоконвульсантам (Chuvakova et al., 2021; Ватаев, 2019).

Аутофагия - один из основных механизмов утилизации макромолекул и органелл в клетке, и она играет существенную роль в формирующемся мозге. Нокаут генов, отвечающих за аутофагию, может привести к смерти эмбриона (Mizushima and Levine, 2010). Аутофагия вовлечена в формирование нейрональных сетей, синаптогенез и нейрогенез через регуляцию Notch и Wnt сигнальных каскадов (Casares-Crespo et al., 2018; Menzies et al., 2017). Снижение аутофагии может приводить к возникновению эпилептических припадков (Menzies et al., 2017), а изменение регуляции этих процессов могут приводить к формированию эпилепсии (Cavarsan et al., 2018; Cho et al., 2015; Yamawaki et al., 2015). Апоптоз и аутофагия взаимосвязаны и играют ключевую роль в вопросах клеточной гибели и выживания, и некоторые белки участвуют как в апоптозе, так и в аутофагии: p53, Bcl2, Beclin-1, p62 и каспазы. Все эти факты позволили предположить возможное нарушение аутофагии в гиппокампе в постнатальном онтогенезе, что может являться одним из механизмов формирования повышенной судорожной готовности. Мы оценили различия в уровнях аутофагии между крысами линии КМ и Вистар. Было показано, что экспрессия белков аутофагии у взрослых крыс КМ и на 15-й день постнатального развития не отличалась от характерной для крысят линии Вистар. На 30-й день жизни постнатального развития экспрессия белка LC3BI повышена, а на 60-й день понижена. Отличий по другим белкам обнаружено не было. Хотя уровень аутофагии нельзя оценивать только с помощью одного белка, нужно учитывать уровни других белков регуляторов аутофагии (Klionsky et al., 2021), однако можно предположить, что базальный уровень аутофагии не отличается между линиями КМ и Вистар в течение всего исследуемого периода.

Таким образом, в первый месяц жизни у крыс линии КМ наблюдается повышенный уровень фосфорилированных ERK1/2 киназ, повышенный уровень пролиферации и апоптоза, сниженное число клеток, что свидетельствует о задержке развития гиппокампа. К концу второго месяца жизни уровень пролиферации, апоптоза и число клеток в

гиппокампе стабилизируется. Однако у взрослых животных продолжает наблюдаться повышенный уровень миграция новообразованных глутаматергических нейронов в хилус и СА4 поле гиппокампа.

#### **4.2 Модель височной эпилепсии (аудиогенный киндлинг)**

В настоящей работе АК использовался в качестве модели развития височной эпилепсии (Nirwan et al., 2018). Известно, что в ходе АК 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: лимбический припадок. Для различных типов киндлинга характерны различные проявления лимбических припадков. У крыс с высокой восприимчивостью к аудиогенным припадкам (крысы линии КМ и GEPR-9) лимбический припадок проявляется в виде посттонического клонуса (Naritoku et al., 1992; Romanova et al., 1993) и в завершённой форме представляют собой клоническую судорогу всех конечностей. Шкала Racine была разработана на модели электрического киндлинга. Так как развитие посттонического клонуса у крыс линии КМ отличается от описанных ранее лимбических припадков, в нашей работе для описания тяжести посттонической стадии мы модифицировали шкалу Racine.

В наших экспериментах при аудиогенном киндлинге у некоторых крыс КМ слабые проявления потс-клонуса наблюдались уже после первого припадка, что согласуется с более ранними наблюдениями (Romanova et al., 1993). В течение первых 4 - 7 судорожных припадков появление посттонического клонуса было нестабильным и непродолжительным, к 14-м АГС все крысы линии КМ демонстрировали пост-клонус, к 21-му припадку проявление пост-клонуса выражалось в более продолжительных, тяжёлых и стабильных клонических судорогах. 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. Исследованные группы крыс линии КМ при киндлинге различной продолжительности представляли собой различные этапы формирования височной эпилепсии.

#### **4.3 Структурные нарушения нижних бугров четверохолмия при аудиогенном киндлинге**

В процессе АК изменяется продолжительность некоторых фаз АСП, что позволило предположить существование структурных перестроек в стволовой части мозга, которая

ответственна за проявление АСП. Для проверки этого предположения мы проанализировали процессы апоптоза и пролиферации в IC. Известно, что интенсивная звуковая стимуляция (~ 3ч) нормальных животных приводит к активации апоптоза в IC и нейродегенерации, что свидетельствует об уязвимости нейронов IC к гипервозбуждению (Coordes et al., 2011). В IC крыс КМ через 24 ч и через неделю после 7 АСП было показано снижение числа клеток. Однако сразу после 7 АСП не удалось показать активацию апоптотической гибели, она наблюдается через неделю после 7 АСП. Это может быть связано с тем, что в IC имеется 2 волны активации апоптоза, одна из которых происходит на более ранних этапах киндлинга.

Ранее мы показали наличие пролиферирующих клеток в IC наивных крыс линии КМ. Интересно отметить, что при некоторых патологических состояниях (дефицит тиамина) наблюдается индукция пролиферации в IC, что свидетельствует о наличии 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 SIC. Усиление пролиферации может носить компенсаторный характер и являться ответом на активацию апоптоза после АСП.

#### **4.4 Аберрантный нейрогенез в ходе аудиогенного киндлинга**

Наблюдения за больными эпилепсией и моделирование этого заболевания на животных свидетельствуют о влиянии эпилептической активности на нейрогенез гиппокампа. Даже одиночные и редкие припадки приводят к активации нейрогенеза и дифференцировки в зубчатой извилине (Benzon et al., 1997; Uemori et al., 2017). При этом короткий АК не приводил к изменениям в глиогенезе. Повышенный уровень нейрогенеза был показан при продолжительном АК на крысах линии WAR (Romcy-Pereira and Garcia-Cairasco, 2003).

Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют, что уже после 4 судорожных припадков на начальной стадии формирования височной эпилепсии происходит значительное усиление пролиферации в субгранулярном слое зубчатой извилины крыс линии КМ. Активная пролиферация не уменьшается в ходе аудиогенного киндлинга. После 14 судорожных припадков, когда крысы линии КМ уже демонстрируют признаки височной эпилепсии, и у крыс со сформированной височной эпилепсией после 21 судорожного припадка, число новообразованных клеток также значительно превышает характерное для наивных крыс. Полученные нами данные указывают на то, что длительный аудиогенный киндлинг, приводящий к формированию височной эпилепсии у крыс линии КМ, вызывает длительное усиление пролиферации также, как и при моделировании

височной эпилепсии введением хемоконвульсантов (Cha et al., 2004; Overstreet-Wadiche et al., 2006).

Считается, что дифференцировка вновь образованных клеток является длительным процессом и занимает около 4 недель (Jessberger and Parent, 2015; Vivar and van Praag, 2013). Судорожная активность ускоряет дифференцировку и созревание вновь образованных ГК зубчатой извилины (Kralic et al., 2005; Overstreet-Wadiche et al., 2006; Ueno et al., 2019). Действительно, мы показали, что уже после 4 судорог на ранних стадиях формирования височной эпилепсии в гранулярном слое зубчатой извилины число дифференцированных по нейрональному типу клеток увеличивается. Однако только при 14- и 21-дневном длительном киндлинге после латентного периода около 40% этих новообразованных нейронов экспрессируют везикулярный транспортер глутамата VGLUT2.

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 называются 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. Результаты протеомного и иммуногистохимического анализа показали, что экспрессия Rho GTPases вызывает аномальную миграцию ГК в хилус (Liu et al., 2020). Также известно, что ключевую роль в аномальной миграции и интеграции новообразованных нейронов играет белок *reelin* (Orcinha et al., 2016). Показано, что длительный электрический киндлинг вызывает уменьшение экспрессии *reelin* и *DISC1*, что коррелирует с увеличением числа эктопических нейронов хилуса и aberrantным ростом дендритов новообразованных незрелых нейронов (Fournier et al., 2010; Haas and Frotscher, 2010).

Мы показали, что через сутки после 4 судорожных припадков число пролиферирующих клеток в хилусе не отличается от характерного для наивных крыс. После латентного периода число новообразованных клеток достоверно увеличивается на 50%, и все эти нейроны уже являются глутаматергическими. После длительного киндлинга в течение 14 и 21 дня уже через сутки после последнего припадка в хилусе число новообразованных глутаматергических нейронов значительно выше, чем в контроле, а после латентного периода их количество еще возрастает. Очевидно, под действием длительного киндлинга новообразованные клетки в субгранулярном слое зубчатой извилины начинают быстро дифференцироваться в глутаматергические нейроны и мигрировать в хилус. Причем, скорость дифференцировки усиливается по мере развития



височной эпилепсии, и уровень aberrантной миграции в хилус увеличивается, что совпадает с данными других авторов, полученными на каинатной модели эпилепсии (Parent and Kron, 2012; Scharfman, 2019; Scharfman et al., 2000; Sugaya et al., 2010). 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 (Kulikov et al., 2021). Наши данные соотносятся с результатами, полученными на других моделях височной эпилепсии, в которых при эпилептогенезе наблюдается повышение нейрогенеза и aberrантная миграция ГК в хилус (Cho et al., 2015; Romcy-Pereira and Garcia-Cairasco, 2003). Таким образом, длительный АК приводит к aberrантной миграции новообразованных клеток в хилус и их быстрой дифференцировке в глутаматергические нейроны.

#### **4.5 Перестройки нейрональной сети**

Усиление aberrантного нейрогенеза сопровождается реорганизацией нейрональных связей в гиппокампе. При эпилептиформных состояниях при увеличении возбуждения нейронов активируется aberrантный спрутинг МВ, что обусловлено повышенной экспрессией BDNF (Cavarsan et al., 2018). За усиление ветвления МВ отвечают как зрелые, так и новообразованные нейроны. Новообразованные нейроны могут вносить свой вклад и в увеличение плотности синаптических контактов. Показано, что при лимбическом киндлинге значительно увеличивается число новообразованных DCX-позитивных нейронов в хилусе, образующих большее количество базальных дендритов (Botterill et al., 2015).

Вопрос о роли спрутинга МВ остается спорным (Cavarsan et al., 2018). Известно, что aberrантные 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). Эпилептическая активность, с другой стороны, приводит к увеличению плотности МВ в хилусе и *stratum lucidum*, прорастанию аксонов во внутренний молекулярный слой зубчатой извилины, где они контактируют с апикальными дендритами ГК (Godale and Danzer, 2018). Предполагают, что спонтанные судороги во время хронической фазы ЭС могут быть связаны с увеличением спрутинга МВ в гиппокампе (Fan et al., 2019).

Помимо контактов с гранулярными клетками МВ иннервируют ГАМКергические нейроны, таким образом, вызывая активацию ингибирующих сетей гиппокампа. Однако

есть данные, что вклад этого тормозного механизма в общее состояние гиппокампа при эпилепсии ниже, чем вклад возбуждающего влияния МВ (Botterill et al., 2019).

Усиление спрутинга, показанное на разных моделях эпилепсии, наблюдается уже через 4 дня после начала киндлинга, усиливается в ходе эпилептогенеза и сохраняется вплоть до 8 месяцев после последних стимуляций (Cavazos et al., 1991).

В настоящей работе на стадии формирования височной эпилепсии после 14 судорожных припадков мы также показали значительное увеличение плотности МВ во внутреннем молекулярном слое гранулярного слоя зубчатой извилины, где локализованы дендриты гранулярных глутаматергических клеток и оканчиваются МВ гранулярных клеток (Amaral et al., 2007a). Увеличение спрутинга коррелировало с увеличением содержания синаптоподина. Синаптоподин отвечает за рост дендритных шипиков и является маркером синаптического дендритного аппарата (Segal et al., 2010). Также на этой стадии увеличивался уровень ветвления МВ и в хилусе, где гранулярные клетки зубчатой извилины контактируют с дендритами мшистых клеток (Botterill et al., 2019). Мы показали, что плотность дендритных окончаний в хилусе на этой стадии формирования височной эпилепсии также значительно увеличена. Известно, что мшистые клетки хилуса при введении пилокарпина демонстрируют повышенную возбудимость и сильнее возбуждают ГК. Это соответственно приводит к постоянному сильному возбуждению пирамидных нейронов поля СА3, активация которых вовлекает другие пирамидные нейроны в эпилептиформную активность (Botterill et al., 2019). Stratum lucidum поля СА3 содержит апикальные дендриты пирамидных нейронов, которые характеризуются формированием больших комплексов дендритных шипиков, являющихся постсинаптической мишенью МВ гранулярных клеток и аксонов мшистых клеток (Blackstad and Kjaerheim, 1961). После 14 судорог в stratum lucidum поля СА3 также наблюдалось увеличение спрутинга МВ. Однако увеличение плотности синаптических контактов сразу после окончания судорог не происходило. После латентного периода в stratum lucidum поля СА3 наблюдается увеличение плотности синаптических контактов МВ и апикальных дендритов пирамидных нейронов поля СА3.

Можно заключить, что на начальном этапе формирования височной эпилепсии происходит ремоделирование синаптических аксо-дендритных контактов в гиппокампе, что приводит к формированию циклических связей между гранулярными клетками зубчатой извилины и мшистыми клетками полиморфного слоя и пирамидными нейронами поля СА3, что вызывает дальнейшее усиление эпилептиформной активности.

После длительного киндлинга в течение 21 дня через сутки после окончания последних судорог увеличение содержания синаптоподина также наблюдалось в stratum

lucidum, polymorphic layer и в поле СА3, в области, где локализованы МВ. То есть, у крыс со сформированной височной эпилепсией было показано увеличение содержания синаптоподина, свидетельствующее о формировании новых синаптических контактов, что является признаком реактивного синаптогенеза. Однако после периода покоя при длительном киндлинге содержание синаптоподина возвращается к исходному уровню и увеличения плотности синаптических контактов уже не наблюдается. Это может быть связано с начинающимися повреждениями дендритного аппарата, которые в дальнейшем могут привести к синаптопатии и еще большим нарушениям в работе гиппокампа. Снижение содержания синаптоподин-содержащих кластеров и снижение способности коллатералей Шаффера поля СА1 индуцировать долговременную потенциацию было также показано при пилокарпин-индуцированном ЭС и вызывало нарушения в ассоциативной синаптической пластичности (Lenz et al., 2017). При эпилепсии происходят перестройки в нейронных сетях мозга, эти перестройки подобны перестройкам, которые происходят при обучении, поэтому эпилепсию можно рассматривать как процесс аномального обучения (Hsu et al., 2008). В норме синапсы постоянно образуются и элиминируются, при обучении скорость образования синапсов значительно возрастает, далее новые активные синапсы стабилизируются, а неактивные или неэффективные элиминируются, что позволяет поддерживать ключевые функциональные связи (Bernardinelli et al., 2014). И таким образом, возвращение в норму содержания синаптоподина через неделю после завершения киндлинга может свидетельствовать о стабилизации синапсов и окончательном формировании эпилептической нейрональной сети.

В течение 21-дневного киндлинга часть животных перестала демонстрировать судорожные припадки в ответ на звуковую стимуляцию. У этих животных не было обнаружено изменений в пролиферации, дифференцировке и уровне синаптоподина по сравнению с наивными крысами линии КМ. Эти данные подтверждают, что аберрантный нейрогенез и перестройки нейрональной сети были вызваны продолжительным АК.

#### **4.6 Апоптоз и аутофагия в гиппокампе**

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. Было показано отсутствие клеточной гибели в дорсальном гиппокампе, периформной коре и амигдале при моделировании фебрильных судорог (Dubé et al., 2004). На электрическом киндлинге 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).

Однако при использовании хемоконвульсантов гибель нейронов наблюдалась в различных отделах гиппокампа: при PTZ-киндлинге апоптотическая гибель обнаруживалась в полях CA1, CA3 (Sun et al., 2019), при действии каиновой кислоты наибольшая нейродегенерация происходила в поле CA3/CA4 и в хилусе (Liang et al., 2016; Pollard et al., 1994; Volz et al., 2011), при ЭС, вызванном пилокарпином, потеря клеток наблюдалась в гранулярном слое и в хилусе зубчатой извилины, в поле CA1 и CA3 (Covolani et al., 2000b; Fujikawa et al., 1999; Roux et al., 1999).

В данной работе мы показали, что на начальных этапах развития височной эпилепсии, после 4 судорожных припадков, когда у животных не наблюдалось сильно выраженного посттонического клонуса, не происходило увеличения содержания маркеров апоптоза и клеточной гибели. Через сутки после 7 АСП, мы обнаружили апоптотическую гибель, в гранулярном слое зубчатой извилины, где при этом было установлено уменьшение числа клеток. Дополнительным маркером апоптотической гибели клеток является изменение субклеточной локализации cIcasp 3. Локализация Casp3 в ядре свидетельствует об активации ее апоптотических функций (Kamada et al., 2005). Мы показали, что после 7 судорожных припадков Casp3 локализуется в ядрах гранулярных клеток зубчатой извилины и пирамидных нейронов CA4 поля гиппокампа, однако уменьшение числа клеток отмечено только в гранулярном слое.

У человека и на животных моделях эпилепсии была показана активация p53-зависимого, митохондриального и рецепторного пути запуска апоптоза. У больных медиальной височной эпилепсией зарегистрировано повышение экспрессии белков p53, Bcl-2, Fas-рецептора и Casp3 (Xu et al., 2007). При исследовании путей запуска апоптоза в пилокарпиновой модели удалось показать, что после эпилептического статуса увеличивалась экспрессия нейротрофического рецептора p75, относящегося к семейству TNF-рецепторов, полагают, что апоптоз происходит с помощью этого рецептора (Roux et al., 1999). При введении каиновой кислоты была показана активация caspase 8, 9, Bid, Fadd, которые указывают на активацию как рецепторного пути запуска апоптоза, так и митохондриального пути (Henshall et al., 2001a; Henshall et al., 2001b; Schindler et al., 2004).

После 7 АСП мы показали, что гибель нейронов происходила за счет активация митохондриального пути запуска апоптоза, на что указывало увеличение экспрессии cleaved caspase9. Мы не выявили активации рецепторного пути, о чем свидетельствует отсутствие повышения экспрессии caspase 8. Также мы показали увеличение экспрессии

проапоптотического белка p53, что предполагает активацию p53-зависимого пути запуска апоптоза. Известно, что повреждение ДНК приводит к фосфорилированию p53 по Ser15, увеличению времени полужизни p53 и запуску апоптоза. В наших экспериментах не было выявлено увеличения фосфорилирования p53 по данному сайту, поэтому можно предположить, что стабилизация p53 происходит из-за фосфорилирования по другим сайтам (Ser20, Ser37, Ser46) (Liu et al., 2019).

Необходимо отметить, что при транскриптомном анализе четверохолмий крыс линии КМ была показана повышенная экспрессия белка p53, что свидетельствует о генетических нарушениях в регуляции уровня данного белка (Chuvakova et al., 2021). На 30-й день постнатального развития у крыс линии КМ наблюдался p53-зависимый запуск апоптоза, который сопровождался увеличением гибели нейронов, что также свидетельствует о генетически детерминированном повышенном уровне экспрессии p53 у крыс этой линии. Кроме генетически детерминированных нарушений в экспрессии p53 возможной причиной увеличения его уровня при 7-кратных припадках является ишемия мозга, которая наблюдается у крыс линии КМ (Halterman and Federoff, 1999; Semiokhina et al., 2006) .

Таким образом, мы выявили, что у крыс линии КМ механизмы инициации апоптоза на начальной стадии формирования височной эпилепсии несколько отличаются от показанных на клиническом материале и на фармакологических моделях эпилепсии. Активация апоптоза при аудиогенном киндлинге происходит митохондриальным и p53-зависимыми путями. Причем очевидно, что p53 является ключевым белком, участвующим в запуске апоптоза у крыс линии КМ как в онтогенезе (при формировании рефлекторной эпилепсии), так и во время формирования височной эпилепсии.

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). Имеются данные свидетельствующие как о снижении, так и о повышении активности аутофагии при эпилепсии. При болезни Лафора (форма наследственной прогрессирующей миоклонической эпилепсии) происходит накопление агрегатов белков, что говорит о торможении аутофагии (Giorgi et al., 2015). Делеция гена Atg7, протеина, необходимого для индукции аутофагии, в переднем мозге мыши приводит к возникновению спонтанных судорог (McMahon et al., 2012). Инактивация генов Atg5 или Atg7 (основные белки, необходимые для формирования аутофагосом) вызывает расширение аксонов и гибель нейронов (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Введение рапамицина (активатора аутофагии) перед началом судорог, индуцированных каиновой кислотой, приводило к

уменьшению частоты спонтанных судорог, снижению клеточной смерти и уменьшению спрутинга (Zeng et al., 2009). Эти данные свидетельствуют о протективной роли аутофагии при судорожной активности. Однако на пентилентетразоловой модели были показано увеличение маркеров аутофагии при киндлинге в гиппокампе (Wang et al., 2018). Также индукцию аутофагии показали при использовании каиновой кислоты в кортексе: происходило увеличение соотношения LC3II к LC3I, экспрессии Beclin-1 и уменьшение экспрессии p62 и Bcl-2 (Li et al., 2018), и в этом случае активация аутофагии приводила к клеточной гибели.

В связи с разнообразием данных литературы, касающихся роли аутофагии при эпилепсии, представлялось целесообразным проанализировать уровень экспрессии белков-регуляторов аутофагии при формировании височной эпилепсии у крыс линии КМ и охарактеризовать роль аутофагии в поддержании целостности структуры гиппокампа.

После 4 АСП наблюдается увеличение содержания LC3BI и LC3BII, это может свидетельствовать о накоплении аутофагосом при действии судорог (Jiang and Mizushima, 2015). Через неделю после 7 АСП наблюдается активация процессов деградации аутофагосом, так как было выявлено увеличение экспрессии Beclin-1, отвечающего за инициацию аутофагии, и превращение LC3BI в LC3BII, которое коррелирует с образованием аутофагосом. При этом происходит снижение содержания p62, который связан с мембраной аутофагосом. Снижение содержания p62 вызвано его деградацией в аутолизосоме, и таким образом, коррелирует со скоростью 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. 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.

Интересно отметить, что при периоде покоя после семи АСП экспрессия проапоптотических белков снижается до контрольных значений, также происходит восстановление числа клеток в гранулярном слое зубчатой извилины. Восстановление числа клеток в гранулярном слое зубчатой извилины, скорее всего, связано с активацией нейрогенеза после множественных АСП на фоне активации аутофагии.

На более поздних сроках киндлинга при продолжительных посттонических припадках (14 АГС и 21 АГС) мы не наблюдали активации аутофагии, в отличие от ранних этапов формирования височной эпилепсии.

Через сутки после 14 судорожных припадков мы не показали активации апоптотических процессов, при этом не наблюдается снижения количества клеток в различных отделах гиппокампа. Однако через неделю после окончания 14 АСП припадков, мы показали снижение числа клеток в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины. В этот период не происходило активных процессов клеточной гибели, на что указывает отсутствие TUNEL-позитивных клеток. Отсутствие TUNEL-позитивных клеток можно объяснить методическими сложностями детекции гибнущих клеток, выявление которых возможно только в короткий промежуток времени (Dingledine et al., 2014). Таким образом нейродегенерация, скорее всего, происходит между 1-м и 7-м днем после 14 АСП. Активация клеточной гибели, очевидно, связана с увеличением продолжительности и тяжести пост-клонуса между 7 АСП и 14 АСП. Хотя в этот период показано значительное увеличение пролиферации в гранулярном слое, хилусе и миграции клеток в хилус, аберрантный нейрогенез не смог компенсировать потерю клеток в этих областях зубчатой извилины.

При 21 АСП наблюдается сниженное число клеток в хилусе и зубчатой извилине, хотя уровень нейродегенерации не увеличивается по сравнению с 14 АСП. Метод TUNEL не выявил увеличения числа клеток, гибнущих путем апоптоза. После 21 АСП мы наблюдали повышение экспрессии проапоптотического белка p53 и одновременно с этим уменьшение уровня cCasp3, увеличение содержания proCasp 9. У белка p53 есть множество функций, не связанных с апоптозом. Одной из этих функций является контроль клеточной пролиферации и дифференцировки. Было показано, что активация p53 ведет к повышению уровня дифференцировки клеток PC12 и НСК (Brynczka et al., 2007; Glazova, 2016; Lookeren Campagne and Gill, 1998). Таким образом, повышенный уровень p53 скорее связан с повышением числа дифференцирующихся клеток в зубчатой извилине. Однако после 14 АСП аберрантный нейрогенез не смог компенсировать уменьшения числа в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины.

#### **4.7 Гибель мшистых клеток после АСП**

Хилус, в отличие от гранулярного слоя, отличается большим разнообразием типов клеток. Наиболее распространёнными клетками хилуса являются мшистые клетки (Amaral et al., 2007b). Мшистые клетки являются глутаматергическими интернейронами, которые дают возбуждающие проекции к гранулярным клеткам и ГАМК-ергическим нейронам. 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. Однако в другой модели височной эпилепсии у мышей нокауты по  $p35^{-/-}$ , в зубчатой извилине которых не было обнаружено потери мшистых клеток, тем не менее наблюдался спрутинг МВ (Volz et al., 2011). На модели фебрильных судорог также не была показана гибель мшистых клеток (Bender et al., 2003). 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. Связь между потерей мшистых клеток и разрастанием МВ при моделировании височной эпилепсии в гиппокампе крыс КМ требует дополнительного исследования, так как нельзя сказать однозначно, что они коррелируют.

#### 4.8 Пифитрин- $\alpha$

Показанное нами усиление aberrантного нейрогенеза при развитии рефлекторной эпилепсии, усугубляющееся при моделировании височной эпилепсии, а также усиление клеточной гибели апоптотическим путем, 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). Белок p53 контролирует пролиферацию и дифференцировку НСК как *in vitro*, так и *in vivo*, главным образом, путем регуляции экспрессии нескольких регуляторов клеточного цикла, не влияя на экспрессию канонических нейрональных маркеров (Niklison-Chirou et al., 2020). Данные, касающиеся участия p53 в дифференцировке, противоречивы. Так, в *in vitro* исследованиях ингибирование p53 с помощью пифитрина- $\alpha$  или интерферирующими РНК приводило к снижению уровня дифференцировки клеток по нейрональному типу. Активация дифференцировки клеток PC12 с помощью NGF приводило к усилению экспрессии белка p53, а ингибирование экспрессии p53 к блокировке NGF-зависимой дифференцировки клеток PC12 (Glazova, 2016). В исследованиях *in vivo* ингибирование p53 вызывало повышение уровня пролиферации и увеличение скорости дифференцировки в субвентрикулярной зоне (Gil-Perotin et al., 2006; Luo et al., 2009). Более того, ингибирование p53 пифитрином- $\alpha$  при ишемии приводило не только к увеличению дифференцировки НСК в SVZ, но и способствовало их миграции в поврежденные участки коры (Luo et al., 2009). Также было показано, что нокаут p53 и его ингибирование вызывало активацию пролиферации астроцитов (Li et al., 2019).



Противоречивость данных и многофункциональность p53, а именно: участие белка в регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировки стали предпосылками в исследовании влияния ингибирования p53 на развитие нарушений в гиппокампе при формировании лимбической эпилепсии. Было показано, что ингибирование p53 при судорожной активности (4 АСП) приводило к повышению пролиферации в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины после. Через неделю после окончания серии АСП и введения пифитрина- $\alpha$  пролиферация в этих отделах мозга оставалась повышенной. Также интересно отметить, что при введении пифитрина- $\alpha$  повышение пролиферации наблюдалось также и в другой нейрогенной нише – субвентрикулярной области. Ингибирование p53 с помощью пифитрина- $\alpha$  не приводило к изменениям в глиогенезе в зубчатой извилине. Несмотря на увеличение числа пролиферирующих клеток, введение пифитрина- $\alpha$  не приводило к увеличению числа дифференцирующихся нейронов в гранулярном слое и хилусе зубчатой извилины как после 4 АСП, так и через неделю после окончания серии АСП по сравнению с контрольными животными. Это свидетельствует о том, что ингибирование p53 приводит к подавлению дифференцировки в зубчатой извилине вновь образованных клеток по нейральному пути.

Ингибирование p53 могло привести к снижению процессов апоптоза при нейрогенезе, препятствуя гибели вновь образованных клеток, что могло быть причиной увеличения числа BrdU-позитивных клеток. Однако пифитрин- $\alpha$  не приводил к изменениям в общем количестве клеток и не привел к нарушениям в уровне апоптоза в зубчатой извилине и гиппокампе. Пифитрин- $\alpha$  также не повлиял на экспрессию проапоптотических и антиапоптотических белков. Исключением был только p53, уровень которого значительно снижался в гиппокампе под действие пифитрина- $\alpha$ .

Известно, что хотя p53 может как активировать, так и подавлять аутофагию, нокаут гена p53 приводил к повышению уровня аутофагии, увеличению числа аутофагосом и к клеточной гибели. Можно предположить, что снижение уровня p53 под действием пифитрина- $\alpha$  приводит к активации аутофагии. Увеличение экспрессии LC3ВІІ свидетельствовало о массовом формировании фагофоров и аутофагосом (Gómez-Sánchez et al., 2015). В нашей работе мы показали, что у крыс, подвергнутых множественным АСП, при ингибировании p53 с помощью пифитрина- $\alpha$  не наблюдалось дополнительного увеличения содержания LC3ВІ и LC3ВІІ через четыре часа после окончания последнего припадка по сравнению с крысами, получавшими инъекцию растворителя. При этом содержание p62 снижалось. Белок p62 связан с мембраной аутофагосом, он деградирует вместе с ней, поэтому его снижение говорит об активации аутофагии. Однако через неделю

покоя при введении пифитрин- $\alpha$  наблюдалось снижение как LC3ВІІ, так и уровня р62. Таким образом, можно предположить, что непосредственно после окончания серии АСП происходит накопление аутофагосом, и пифитрин- $\alpha$  способствует их деградации. Однако об уровне аутофагии после периода покоя нельзя однозначно судить на основании полученных результатов, для более точного выяснения путей влияния пифитрин- $\alpha$  на аутофагию необходимо использовать несколько методик.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У наивных крыс линии КМ было показано, что нижние бугры четверохолмия и гиппокамп претерпевают похожие нарушения в ходе постнатального развития. В первые месяцы жизни в этих отделах мозга крыс линии КМ наблюдается 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: 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. Также мы показали, что в ходе постнатального развития у крыс КМ повышен уровень aberrантной миграции и дифференцировки новообразованных клеток по глутаматергическому типу в хилус. Такой 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. Aberrантный нейрогенез является одним из патологических процессов, приводящих к развитию лимбической эпилепсии у человека, так как приводит к формированию aberrантных связей и усилению эпилептиформной активности в гиппокампе (Bielefeld et al., 2014b; Cavarsan et al., 2018).



**Рисунок 63.** 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.

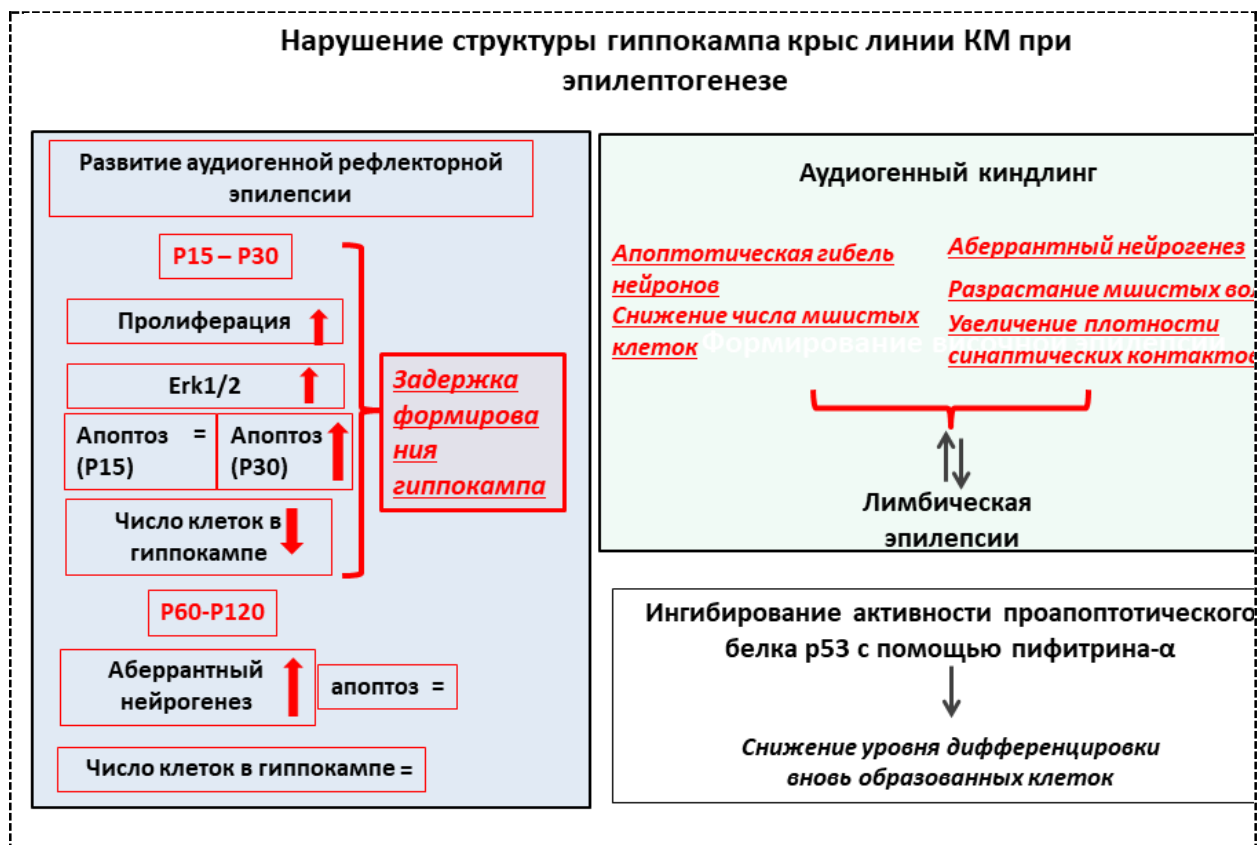
При помощи аудиогенного киндлинга у крыс линии КМ удалось смоделировать вовлечение лимбической системы в эпилептическую сеть. В ходе моделирования лимбической эпилепсии происходит возникновение новых очагов эпилептической активности в гиппокампе, новой коре и амигдале. Мы показали, что в процессе киндлинга 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 гиппокампа.

Одновременно с распространением эпилептической активности в новые области (передний мозг), в нижних буграх четверохолмия также были выявлены структурные изменения. В работе показано, что на ранних этапах моделирования височной эпилепсии в нижних буграх показана активация процессов апоптоза и пролиферации, хотя в норме для этой структуры не характерно наличие постнатального нейрогенеза. Пролиферация в нижних буграх может носить компенсаторный характер.

При аудиогенном киндлинге у крыс линии КМ в гиппокампе происходит усиление уже существующей аберрантной миграции новообразованных клеток в хилус и их дифференцировки в глутаматергические нейроны. Повторные АСП и пост-клонические судороги приводит 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 обнаруживаются нейродегенеративные процессы. Полученные в работе данные свидетельствуют, что в зубчатой извилине наблюдается 2 волны клеточной гибели. Первая волна апоптотической гибели клеток происходит на ранней стадии развития височной эпилепсии р53-зависимым и митохондриальным путями. Однако после недели покоя наблюдается восстановление числа клеток в зубчатой извилине, которое очевидно было связано с активацией нейрогенеза. На поздних стадиях моделирования 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 после второй волны клеточной гибели является необратимой - после периода покоя восстановления числа клеток не происходит.



**Рисунок 64.** *Схема, отображающая особенности формирования гиппокампа в ходе формирования рефлেকторной эпилепсии и механизмы структурной реорганизации в ходе формирования височной эпилепсии. Стрелки указывают на направленность изменений.*

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- $\alpha$  - блокатор белка p53, который участвует в регуляции клеточного цикла, играя важную роль в процессах дифференцировки, пролиферации и апоптоза. Внутривентрикулярное введение пифитрин- $\alpha$  после многократных судорожных припадков приводило к снижению числа дифференцированных клеток в хилусе. Уменьшение аберрантного нейрогенеза, приводящего к формированию аномальных гипервозбудимых нейрональных связей при эпилепсии, позволяет рассматривать пифитрин- $\alpha$  как потенциальный терапевтический агент для коррекции структурных нарушений гиппокампа.

## ВЫВОДЫ

1. В дорсальном гиппокампе и в нижних буграх четверохолмия крыс линии КМ в ходе формирования рефлекторной 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 у крыс линии КМ наблюдается повышенная аберрантная миграция вновь образованных клеток в хилус и их дифференцировка по глутаматергическому типу, сохраняющаяся у взрослых животных со сформированной рефлекторной эпилепсией. Таким образом, аберрантный нейрогенез у наивных крыс линии КМ носит генетически детерминированный характер.
3. При аудиогенном киндлинге происходит дальнейшее повышение аберрантной миграции вновь образованных клеток в хилус и их дифференцировка по глутаматергическому пути, а также усиление ветвления мшистых волокон и увеличение содержания маркера шипикового аппарата синаптоподина в дендритных полях гиппокампа, что свидетельствует о реорганизации нейрональных связей гиппокампа.
4. На ранней стадии моделирования височной эпилепсии показана апоптотическая гибель нейронов, опосредуемая р53-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 формирования височной эпилепсии показана массовая гибель нейронов и при этом после периода покоя восстановления числа клеток не происходит.
5. На ранней стадии формирования височной эпилепсии внутрибрюшинное введение ингибитора белка р53 пифитрин- $\alpha$  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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ватаев, С., Мальгина, Н., Оганесян, Г. (2014). Эффекты стимуляции нижних бугров четверохолмия у крыс линии Крушинского-Молодкиной. Российский физиологический журнал им ИМ Сеченова 100, 699-709.
2. Ватаев, С.И. (2019). Специфические особенности крыс линии Крушинского-Молодкиной как генетической модели генерализованных судорожных припадков. Российский физиологический журнал им ИМ Сеченова 105, 667-679.
3. Виноградова, Л.В. (2014). Нейрофизиологические механизмы рефлекторной аудиогенной эпилепсии. Москва
4. Крушинский, А., Рясина, Т., Кошелев, В., Сотская, М., Бебинов, Е., Белых, А., Стрелков, Р., Коршунова, Т., Ларский, Э. (1989). Протекторное действие разных видов и режимов адаптации к гипоксии на развитие стрессорных повреждений у крыс линии КМ. Физиологический журнал СССР 75, 1576-1584.
5. Крушинский, Л.В. (1960). Формирование поведения животных в норме и патологии (МГУ).
6. Полетаева, И.И., Сурина, Н.М., Федотова, И.Б. (2019). Влияние вдыхания паров толуола на интенсивность аудиогенного судорожного припадка у крыс линии Крушинского-Молодкиной. Российский физиологический журнал им ИМ Сеченова 105, 742-748.
7. Ревещин, А., Солюс, Г., Полетаева, И., Павлова, Г. (2018). Аудиогенная эпилепсия и особенности строения верхнего двуххолмия у крыс линии Крушинского-Молодкиной. Доклады Академии наук 478, 6, 712-715.
8. Романова, Л., Полетаева, И., Ремус, Б. (1976). Анализ чувствительности к звуку у крыс методом диаллельного скрещивания. Журн высш нервн деят-сти им ИП Павлова 26, 772-777.
9. Семиохина, А., Федотова, И., Полетаева, И. (2006). Крысы линии Крушинского-Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. Журнал высшей нервной деятельности им ИП Павлова 56, 298-316.
10. Черниговская, Е.В., Дорофеева, Н.А., Лебеденко, О.О., Николаева, С.Д., Наумова, А.А., Лаврова, Е.А., Глазова, М.В. (2019). Нейрохимические особенности организации нижних бугров четверохолмия крыс линии Крушинского-Молодкиной при формировании судорожной готовности. Российский физиологический журнал им ИМ Сеченова 105, 724-741.

11. Ahmed, S., Gan, H., Lam, C.S., Poonepalli, A., Ramasamy, S., Tay, Y., Tham, M., and Yu, Y.H. (2009). Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *J Cell adhesion migration* 3, 412-424.
12. Albert-Gascó, H., Ros-Bernal, F., Castillo-Gómez, E., and Olucha-Bordonau, F.E. (2020). MAP/ERK Signaling in Developing Cognitive and Emotional Function and Its Effect on Pathological and Neurodegenerative Processes. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 4471.
13. Althaus, A.L., Sagher, O., Parent, J.M., and Murphy, G.G. (2015). Intrinsic neurophysiological properties of hilar ectopic and normotopic dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy and a rat model. *Journal of Neurophysiology*. 113, 1184-1194.
14. Althaus, A.L., Zhang, H., and Parent, J.M. (2016). Axonal plasticity of age-defined dentate granule cells in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* 86, 187-196.
15. Altman, J., and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology* 124, 319-335.
16. Amaral, D.G., Scharfman, H.E., and Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). In *Progress in brain research*, H.E. Scharfman, ed. (Elsevier), pp. 3-790.
17. Ambrogini, P., Torquato, P., Bartolini, D., Albertini, M.C., Lattanzi, D., Di Palma, M., Marinelli, R., Betti, M., Minelli, A., Cuppini, R., *et al.* (2019). Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865, 1098-1112.
18. Ammothumkandy, A., Ravina, K., Wolseley, V., Tartt, A.N., Yu, P.N., Corona, L., Zhang, N., Nune, G., Kalayjian, L., Mann, J.J., *et al.* (2022). Altered adult neurogenesis and gliogenesis in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Nature Neuroscience* 25, 493-503.
19. Andres-Mach, M., Fike, J.R., and Łuszczki, J.J. (2011). Neurogenesis in the epileptic brain: a brief overview from temporal lobe epilepsy. *Pharmacological Reports* 63, 1316-1323.
20. Andrew, D.L.E., and Paterson, J.A. (1989). Postnatal development of vascularity in the inferior colliculus of the young rat. *American Journal of Anatomy* 186, 389-396.
21. Armesilla-Diaz, A., Bragado, P., del Valle, I., Cuevas, E., Lazaro, I., Martin, C., Cigudosa, J.C., and Silva, A. (2009). p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. *Neuroscience* 158, 1378-1389.



22. Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., and Han, D.K. (2003). Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Developmental Cell* 4, 587-598.
23. Bandeira, F., Lent, R., and Herculano-Houzel, S.J. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 14108-14113.
24. Bayer, S.A., and Altman, J.J. (1974). Hippocampal development in the rat: Cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *Journal of Comparative Neurology* 158, 55-79.
25. Belyaeva, Y.S., Nikitina, L.S., Chernigovskaya, E.V., and Glazova, M.V. (2015). Inhibition of Bcl-2 Stimulates Neural Stem Cell Proliferation in Organotypic Cultures of Mouse Hippocampus. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 45, 517-522.
26. Bender, R.A., Dubé, C., Gonzalez-Vega, R., Mina, E.W., and Baram, T.Z. (2003). Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 13, 399-412.
27. Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmér, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M., and Lindvall, O. (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 10432-10437.
28. Bernardinelli, Y., Nikonenko, I., and Muller, D. (2014). Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroanatomy* 8, 113
29. Bertram, E.H. (2009). Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy & behavior* 14 Suppl 1, 32-37.
30. Bielefeld, P., van Vliet, E.A., Gorter, J.A., Lucassen, P.J., and Fitzsimons, C.P. (2014). Different subsets of newborn granule cells: a possible role in epileptogenesis? *European Journal of Neuroscience* 39, 1-11.
31. Blackstad, T.W., and Kjaerheim, A. (1961). Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *The Journal of Comparative Neurology* 117, 133-159.
32. Blümcke, I., Suter, B., Behle, K., Kuhn, R., Schramm, J., Elger, C.E., and Wiestler, O.D. (2000). Loss of Hilar Mossy Cells in Ammon's Horn Sclerosis. *Epilepsia* 41, S174-S180.
33. Bond, Allison M., Ming, G.-l., and Song, H. (2015). Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell stem cell* 17, 385-395.

34. Bonde, S., Ekdahl, C.T., and Lindvall, O.J. (2006). Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation. *European Journal of Neuroscience* 23, 965-974.
35. Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., and Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 5, 21-26.
36. Botterill, J.J., Brymer, K.J., Caruncho, H.J., and Kalynchuk, L.E. (2015). Aberrant hippocampal neurogenesis after limbic kindling: Relationship to BDNF and hippocampal-dependent memory. *Epilepsy & behavior* 47, 83-92.
37. Botterill, J.J., Lu, Y.L., LaFrancois, J.J., Bernstein, H.L., Alcantara-Gonzalez, D., Jain, S., Leary, P., and Scharfman, H.E. (2019). An Excitatory and Epileptogenic Effect of Dentate Gyrus Mossy Cells in a Mouse Model of Epilepsy. *Cell Reports* 29, 2875-2889 e2876.
38. Brandt, C., Ebert, U., and Löscher, W. (2004). Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Research* 62, 135-156.
39. Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., and Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 26159-26165.
40. Brynczka, C., Labhart, P., and Merrick, B.A. (2007). NGF-mediated transcriptional targets of p53 in PC12 neuronal differentiation. *BMC Genomics* 8, 139.
41. Buckmaster, P.S. (2014). Does mossy fiber sprouting give rise to the epileptic state? *Advances in Experimental Medicine and Biology* 813, 161-168.
42. Buckmaster, P.S., and Lew, F.H. (2011). Rapamycin suppresses mossy fiber sprouting but not seizure frequency in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 31, 2337-2347.
43. Casares-Crespo, L., Calatayud-Baselga, I., García-Corzo, L., and Mira, H. (2018). On the Role of Basal Autophagy in Adult Neural Stem Cells and Neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12, 339.
44. Cavarsan, C.F., Malheiros, J., Hamani, C., Najm, I., and Covolan, L. (2018). Is Mossy Fiber Sprouting a Potential Therapeutic Target for Epilepsy? *Frontiers in Neurology* 9, 1023.
45. Cavazos, J.E., Das, I., and Sutula, T.P. (1994). Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *The Journal of Neuroscience* 14, 3106-3121.

46. Cavazos, J.E., Golarai, G., and Sutula, T.P. (1991). Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *The Journal of Neuroscience* *11*, 2795-2803.
47. Cha, B.H., Akman, C., Silveira, D.C., Liu, X., and Holmes, G.L. (2004). Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis. *Brain & Development* *26*, 394-397.
48. Chen, Y.-H., Bae, E., Chen, H., Yu, S.-J., Harvey, B.K., Greig, N.H., and Wang, Y. (2019). Pifithrin-Alpha Reduces Methamphetamine Neurotoxicity in Cultured Dopaminergic Neurons. *Neurotoxicity Research* *36*, 347-356.
49. Cheng, Q., and Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle* *9*, 472-478.
50. Chernigovskaya, E., Lebedenko, O., Nidenfyur, A., Nikitina, L., and Glazova, M. (2017). Analysis of ERK1/2 kinases in the inferior colliculus of rats genetically prone to audiogenic seizures during postnatal development. *Doklady Biochemistry and Biophysics* *476*, 296-298.
51. Chernigovskaya, E.V., Korotkov, A.A., Dorofeeva, N.A., Gorbacheva, E.L., Kulikov, A.A., and Glazova, M.V. (2019). Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with overactivation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling. *Epilepsy & Behavior* *99*, 106494.
52. Cho, K.-O., Lybrand, Z.R., Ito, N., Brulet, R., Tafacory, F., Zhang, L., Good, L., Ure, K., Kerner, S.G., Birnbaum, S.G., *et al.* (2015). Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nature Communications* *6*, 6606.
53. Chuvakova, L.N., Funikov, S.Y., Rezyvkh, A.P., Davletshin, A.I., Evgen'ev, M.B., Litvinova, S.A., Fedotova, I.B., Poletaeva, I.I., and Garbuz, D.G. (2021). Transcriptome of the Krushinsky-Molodkina Audiogenic Rat Strain and Identification of Possible Audiogenic Epilepsy-Associated Genes. *Frontiers in Molecular Neuroscience* *14*, 254
54. Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* *326*, 1-16.
55. Coordes, A., Gröschel, M., Ernst, A., and Basta, D. (2011). Apoptotic Cascades in the Central Auditory Pathway after Noise Exposure. *Journal of Neurotrauma* *29*, 1249-1254.
56. Covolan, L., and Mello, L.E. (2006). Assessment of the progressive nature of cell damage in the pilocarpine model of epilepsy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* *39*, 915-924.
57. Covolan, L., Ribeiro, L., Longo, B.M., and Mello, L.E. (2000a). Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine-or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus* *10*, 169-180.

58. Covolán, L., Smith, R.L., and Mello, L.E. (2000b). Ultrastructural identification of dentate granule cell death from pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Research* 41, 9-21.
59. Crain, B., Cotman, C., Taylor, D., and Lynch, G. (1973). A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Research* 63, 195-204.
60. Crespel, A., Rigau, V., Coubes, P., Rousset, M.C., De Bock, F., Okano, H., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., and Lerner-Natoli, M.J.N.o.d. (2005). Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* 19, 436-450.
61. Culmsee, C., Zhu, X., Yu, Q.-S., Chan, S.L., Camandola, S., Guo, Z., Greig, N.H., and Mattson, M.P. (2001). A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid  $\beta$ -peptide. *Journal of Neurochemistry*. 77, 220-228.
62. Dam, A.M. (1980). Epilepsy and Neuron Loss in the Hippocampus. *Epilepsia* 21, 617-629.
63. Danzer, S. (2017). Mossy Fiber Sprouting in the Epileptic Brain: Taking on the Lernaean Hydra. *Epilepsy Currents* 17, 50-51.
64. Debnath, J., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2005). Does Autophagy Contribute To Cell Death? *Autophagy* 1, 66-74.
65. Degtarev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
66. Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience* 11, 339-350.
67. Deng, X., Gao, F., Flagg, T., Anderson, J., and May, W.S. (2006). Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Molecular and Cellular Biology* 26, 4421-4434.
68. Dingledine, R., Varvel, N.H., and Dudek, F.E. (2014). When and How Do Seizures Kill Neurons, and Is Cell Death Relevant to Epileptogenesis? In *Issues in Clinical Epileptology: A View from the Bench*, H.E. Scharfman, and P.S. Buckmaster, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 109-122.
69. Dubé, C., Yu, H., Nalcioglu, O., and Baram, T.Z. (2004). Serial MRI after experimental febrile seizures: Altered T2 signal without neuronal death. *Annals of Neurology* 56, 709-714.
70. Dutra Moraes, M.F., Galvis-Alonso, O.Y., and Garcia-Cairasco, N. (2000). Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Research* 39, 251-259.
71. Dyomina, A.V., Zubareva, O.E., Smolensky, I.V., Vasilev, D.S., Zakharova, M.V., Kovalenko, A.A., Schwarz, A.P., Ischenko, A.M., and Zaitsev, A.V. (2020). Anakinra

- Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy. *Pharmaceuticals* 13, 340.
72. Eleftheriadis, T., Pissas, G., Liakopoulos, V., and Stefanidis, I. (2016). Cytochrome c as a Potentially Clinical Useful Marker of Mitochondrial and Cellular Damage. *Frontiers in Immunology* 7, 279.
73. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35, 495-516.
74. Engel, T., and Henshall, D.C. (2009). Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 1, 97-115.
75. Engel, T., Tanaka, K., Jimenez-Mateos, E.M., Caballero-Caballero, A., Prehn, J.H.M., and Henshall, D.C. (2010). Loss of p53 results in protracted electrographic seizures and development of an aggravated epileptic phenotype following status epilepticus. *Cell Death & Disease* 1, 79-79.
76. Engert, J., Rak, K., Bieniussa, L., Scholl, M., Hagen, R., and Voelker, J. (2021). Evaluation of the Neurogenic Potential in the Rat Inferior Colliculus from Early Postnatal Days Until Adulthood. *Molecular Neurobiology* 58, 719-734.
77. Faherty, C.J., Xanthoudakis, S., and Smeyne, R.J. (1999). Caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Molecular Brain Research* 70, 159-163.
78. Faingold, C.L. (1999). Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Advances in neurology. Advances in Neurology* 79, 311-321.
79. Faingold, C.L. (2004). Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action. *Progress in Neurobiology* 72, 55-85.
80. Fan, J., Shan, W., Yang, H., Zhu, F., Liu, X., and Wang, Q. (2019). Neural Activities in Multiple Rat Brain Regions in Lithium-Pilocarpine-Induced Status Epilepticus Model. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12, 323.
81. Fathke, R.L., and Gabriele, M.L. (2009). Patterning of multiple layered projections to the auditory midbrain prior to experience. *Hearing Research* 249, 36-43.
82. Fedotova, I.B., and Semiokhina, A.F. (2002). [Developmental changes in audiogenic epilepsy and myoclonus in KM rats]. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova* 52, 261-265.
83. Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell research* 24, 24-41.

84. Flint, P.W., Haughey, B.H., Robbins, K.T., Thomas, J.R., Niparko, J.K., Lund, V.J., and Lesperance, M.M. (2020). Cummings Otolaryngology: Head and Neck Surgery, 3-Volume Set (Elsevier Health Sciences).
85. Fournier, N.M., Andersen, D.R., Botterill, J.J., Sterner, E.Y., Lussier, A.L., Caruncho, H.J., and Kalynchuk, L.E. (2010). The effect of amygdala kindling on hippocampal neurogenesis coincides with decreased reelin and DISC1 expression in the adult dentate gyrus. *Hippocampus* 20, 659-671.
86. Fujikawa, D.G., Shinmei, S.S., and Cai, B. (1999). Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. *European Journal of Neuroscience* 11, 1605-1614.
87. Gaarskjaer, F.B. (1985). The development of the dentate area and the hippocampal mossy fiber projection of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 241, 154-170.
88. Galvis-Alonso, O., De Oliveira, J.C., and Garcia-Cairasco, N. (2004). Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience* 125, 787-802.
89. Gao, F., Song, X., Zhu, D., Wang, X., Hao, A., Nadler, J.V., and Zhan, R.-Z. (2015). Dendritic morphology, synaptic transmission, and activity of mature granule cells born following pilocarpine-induced status epilepticus in the rat. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9.
90. Garbuz, D.G., Davletshin, A.A., Litvinova, S.A., Fedotova, I.B., Surina, N.M., and Poletaeva, I.I. (2022). Rodent Models of Audiogenic Epilepsy: Genetic Aspects, Advantages, Current Problems and Perspectives. *Biomedicines* 10, 2934.
91. Garcia-Cairasco, N., Umeoka, E.H.L., and Cortes de Oliveira, J.A. (2017). The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy & Behavior* 71, 250-273.
92. Garcia-Cairasco, N., Wakamatsu, H., Oliveira, J.A.C., Gomes, E.L.T., Del Bel, E.A., and Mello, L.E.A.M. (1996). Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Research* 26, 177-192.
93. Geske, F.J., Nelson, A.C., Lieberman, R., Strange, R., Sun, T., and Gerschenson, L.E. (2000). DNA repair is activated in early stages of p53-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 7, 393-401.
94. Gil-Perotin, S., Marin-Husstege, M., Li, J., Soriano-Navarro, M., Zindy, F., Roussel, M.F., Garcia-Verdugo, J.M., and Casaccia-Bonnel, P. (2006). Loss of p53 induces changes in the

- behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *The Journal of Neuroscience* 26, 1107-1116.
95. Giorgi, F.S., Biagioni, F., Lenzi, P., Frati, A., and Fornai, F. (2015). The role of autophagy in epileptogenesis and in epilepsy-induced neuronal alterations. *Journal of Neural Transmission* 122, 849-862.
  96. Glazova, M.V. (2016). The Role of p53 Protein in the Regulation of Neuronal Differentiation. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 46, 984-991.
  97. Glazova, M.V., Nikitina, L.S., Hudik, K.A., Kirillova, O.D., Dorofeeva, N.A., Korotkov, A.A., and Chernigovskaya, E.V. (2015). Inhibition of ERK1/2 signaling prevents epileptiform behavior in rats prone to audiogenic seizures. *Journal of Neurochemistry* 132, 218-229.
  98. Gómez-Sánchez, R., Pizarro-Estrella, E., Yakhine-Diop, S.M., Rodríguez-Arribas, M., Bravo-San Pedro, J.M., Fuentes, J.M., and González-Polo, R.A. (2015). Routine Western blot to check autophagic flux: cautions and recommendations. *Analytical Biochemistry* 477, 13-20.
  99. Graham, D.K., DeRyckere, D., Davies, K.D., and Earp, H.S. (2014). The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nature reviews Cancer* 14, 769-785.
  100. Guerin, M.B., McKernan, D.P., O'Brien, C.J., and Cotter, T.G. (2006). Retinal ganglion cells: dying to survive. *The International Journal of Developmental Biology* 50, 665-674.
  101. Haas, C.A., and Frotscher, M. (2010). Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Experimental Brain Research* 200, 141-149.
  102. Halterman, M.W., and Federoff, H.J. (1999). HIF-1 $\alpha$  and p53 Promote Hypoxia-Induced Delayed Neuronal Death in Models of CNS Ischemia. *Experimental Neurology* 159, 65-72.
  103. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., *et al.* (2006). Suppression of Basal Autophagy In Neural Cells Causes Neurodegenerative Disease In Mice. *Nature* 441, 885-889.
  104. Hatami, M., Conrad, S., Naghsh, P., Alvarez-Bolado, G., and Skutella, T.J.F.i.C.N. (2018). Cell-biological requirements for the generation of dentate gyrus granule neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscienc* 12, 402.
  105. Hattiangady, B., Rao, M.S., and Shetty, A.K. (2004). Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. *Neurobiology of Disease* 17, 473-490.
  106. Hattiangady, B., and Shetty, A.K. (2010). Decreased neuronal differentiation of newly generated cells underlies reduced hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 20, 97-112.

107. Hayashi, K., Kubo, K.-i., Kitazawa, A., and Nakajima, K.J.F.i.n. (2015). Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Frontiers in neuroscience* 9, 135.
108. Hazell, A.S., Wang, D., Oanea, R., Sun, S., Aghourian, M., and Yong, J.J. (2014). Pyriithiamine-induced thiamine deficiency alters proliferation and neurogenesis in both neurogenic and vulnerable areas of the rat brain. *Metabolic Brain Disease* 29, 145-152.
109. Hendricks, W.D., Westbrook, G.L., and Schnell, E. (2019). Early detonation by sprouted mossy fibers enables aberrant dentate network activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, 10994-10999.
110. Henry, K.R. (1972). Pinna reflex thresholds and audiogenic seizures: developmental changes after acoustic priming. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 79, 77-81.
111. Henshall, D.C., Bonislowski, D.P., Skradski, S.L., Araki, T., Lan, J.Q., Schindler, C.K., Meller, R., and Simon, R.P. (2001a). Formation of the Apaf-1/cytochrome c complex precedes activation of caspase-9 during seizure-induced neuronal death. *Cell Death & Differentiation* 8, 1169-1181.
112. Henshall, D.C., Bonislowski, D.P., Skradski, S.L., Lan, J.-Q., Meller, R., and Simon, R.P. (2001b). Cleavage of Bid May Amplify Caspase-8-Induced Neuronal Death Following Focally Evoked Limbic Seizures. *Neurobiology of Disease* 8, 568-580.
113. Henshall, D.C., Chen, J., and Simon, R.P. (2000). Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. *Journal of Neurochemistry* 74, 1215-1223.
114. Henshall, D.C., and Meldrum, B.S. (2012). Cell death and survival mechanisms after single and repeated brief seizures. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, and A.V. Delgado-Escueta, eds. (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information ).
115. Heysieattalab, S., and Sadeghi, L. (2021). Dynamic structural neuroplasticity during and after epileptogenesis in a pilocarpine rat model of epilepsy. *Acta Epileptologica* 3, 3.
116. Hirsch, E., Danober, L., Simler, S., Pereira de Vasconcelos, A., Maton, B., Nehlig, A., Marescaux, C., and Vergnes, M. (1997). The amygdala is critical for seizure propagation from brainstem to forebrain. *Neuroscience* 77, 975-984.
117. Hsieh, J. (2012). Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Development* 26, 1010-1021.
118. Hsu, D., Chen, W., Hsu, M., and Beggs, J.M. (2008). An open hypothesis: is epilepsy learned, and can it be unlearned? *Epilepsy & behavior* 13, 511-522.



119. Huang, X., Zhang, H., Yang, J., Wu, J., McMahon, J., Lin, Y., Cao, Z., Gruenthal, M., and Huang, Y. (2010). Pharmacological inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway suppresses acquired epilepsy. *Neurobiology of Disease* *40*, 193-199.
120. Huang, Y.-N., Yang, L.-Y., Greig, N.H., Wang, Y.-C., Lai, C.-C., and Wang, J.-Y. (2018). Neuroprotective effects of pifithrin- $\alpha$  against traumatic brain injury in the striatum through suppression of neuroinflammation, oxidative stress, autophagy, and apoptosis. *Scientific Reports* *8*, 2368.
121. Iida, K., Sasa, M., Serikawa, T., Noda, A., Kumatoshi, I., Akimitsu, T., Hanaya, R., Arita, K., and Kurisu, K. (1998). Induction of convulsive seizures by acoustic priming in a new genetically defined model of epilepsy (Noda epileptic rat: NER). *Epilepsy Research* *30*, 115-126.
122. Jessberger, S., and Parent, J.M. (2015). Epilepsy and Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *7*.
123. Jessberger, S., Zhao, C., Toni, N., Clemenson, G.D., Li, Y., and Gage, F.H. (2007). Seizure-Associated, Aberrant Neurogenesis in Adult Rats Characterized with Retrovirus-Mediated Cell Labeling. *27*, 9400-9407.
124. Jiang, P., and Mizushima, N. (2015). LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods* *75*, 13-18.
125. Jiao, Y., and Nadler, J.V. (2007). Stereological analysis of GluR2-immunoreactive hilar neurons in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: Correlation of cell loss with mossy fiber sprouting. *Experimental Neurology* *205*, 569-582.
126. Jimenez-Mateos, E.M., Hatazaki, S., Johnson, M.B., Bellver-Estelles, C., Mouri, G., Bonner, C., Prehn, J.H.M., Meller, R., Simon, R.P., and Henshall, D.C. (2008). Hippocampal transcriptome after status epilepticus in mice rendered seizure damage-tolerant by epileptic preconditioning features suppressed calcium and neuronal excitability pathways. *Neurobiology of disease* *32*, 442-453.
127. Juricek, L., and Coumoul, X. (2018). The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences* *19*, 2504.
128. Jurkowski, M.P., Bettio, L., K. Woo, E., Patten, A., Yau, S.-Y., and Gil-Mohapel, J. (2020). Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Frontiers in cellular neuroscience* *14*, 576444.
129. Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y., and Hunter, T. (2005). Nuclear Translocation of Caspase-3 Is Dependent on Its Proteolytic Activation and Recognition of a Substrate-like Protein(s). *Journal of Biological Chemistry* *280*, 857-860.

130. Kantari, C., and Walczak, H. (2011). Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 558-563.
131. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257.
132. Khurgel, M., Switzer, R.C., 3rd, Teskey, G.C., Spiller, A.E., Racine, R.J., and Ivy, G.O. (1995). Activation of astrocytes during epileptogenesis in the absence of neuronal degeneration. *Neurobiology of Disease* 2, 23-35.
133. Kim, C., and Kim, C.U. (1962). Effect of hippocampal ablation on audiogenic seizure in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 55, 288-292.
134. Kim, J.-Y., Ahn, H.-J., Ryu, J.-H., Suk, K., and Park, J.-H. (2003). BH3-only Protein Noxa Is a Mediator of Hypoxic Cell Death Induced by Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$ . *Journal of Experimental Medicine* 199, 113-124.
135. Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., and Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology* 37, 8471-8486.
136. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO Journal* 14, 5579-5588.
137. Klionsky, D.J., Abdel-Aziz, A.K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M.H., Abudu, Y.P., Acevedo-Arozena, A., *et al.* (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy* 17, 1-382.
138. Komarova, E.A., Chernov, M.V., Franks, R., Wang, K., Armin, G., Zelnick, C.R., Chin, D.M., Bacus, S.S., Stark, G.R., and Gudkov, A.V. (1997). Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. *EMBO Journal*. 16, 1391-1400.
139. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.
140. Kook, S.-H., Son, Y.-O., Chung, S.-W., Lee, S.-A., Kim, J.-G., Jeon, Y.-M., and Lee, J.-C. (2007). Caspase-independent death of human osteosarcoma cells by flavonoids is driven by p53-mediated mitochondrial stress and nuclear translocation of AIF and endonuclease G. *Apoptosis* 12, 1289-1298.

141. Kotti, T., Riekkinen, P.J., Sr., and Miettinen, R. (1997). Characterization of target cells for aberrant mossy fiber collaterals in the dentate gyrus of epileptic rat. *Experimental Neurology* *146*, 323-330.
142. Koyama, R., Tao, K., Sasaki, T., Ichikawa, J., Miyamoto, D., Muramatsu, R., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2012). GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy. *Nature Medicine* *18*, 1271-1278.
143. Kralic, J.E., Ledergerber, D.A., and Fritschy, J.M. (2005). Disruption of the neurogenic potential of the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *The European Journal of Neuroscience* *22*, 1916-1927.
144. Kruse, J.P., and Gu, W. (2008). SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell* *133*, 930-930.e931.
145. Kulikov, A.A., Naumova, A.A., Aleksandrova, E.P., Glazova, M.V., and Chernigovskaya, E.V. (2021). Audiogenic kindling stimulates aberrant neurogenesis, synaptopodin expression, and mossy fiber sprouting in the hippocampus of rats genetically prone to audiogenic seizures. *Epilepsy & Behavior* *125*, 108445.
146. Kuruba, R., Hattiangady, B., and Shetty, A.K. (2009). Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior* *14 Suppl 1*, 65-73.
147. Labbé, K., and Saleh, M. (2008). Cell death in the host response to infection. *Cell Death & Differentiation* *15*, 1339-1349.
148. Lazarini-Lopes, W., Do Val-da Silva, R.A., da Silva-Júnior, R.M.P., Cunha, A.O.S., and Garcia-Cairasco, N. (2021). Cannabinoids in Audiogenic Seizures: From Neuronal Networks to Future Perspectives for Epilepsy Treatment. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* *15*, 611902.
149. LeBlanc, H.N., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death & Differentiation* *10*, 66-75.
150. Lenz, M., Ben Shimon, M., Deller, T., Vlachos, A., and Maggio, N. (2017). Pilocarpine-Induced Status Epilepticus Is Associated with Changes in the Actin-Modulating Protein Synaptopodin and Alterations in Long-Term Potentiation in the Mouse Hippocampus. *Neural Plasticity* *2017*, 2652560.
151. Lévesque, M., and Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* *37*, 2887-2899.
152. Li, J., Khankan, R.R., Caneda, C., Godoy, M.I., Haney, M.S., Krawczyk, M.C., Bassik, M.C., Sloan, S.A., and Zhang, Y. (2019). Astrocyte-to-astrocyte contact and a positive feedback loop of growth factor signaling regulate astrocyte maturation. *Glia* *67*, 1571-1597.

- 153.Li, Q., Han, Y., Du, J., Jin, H., Zhang, J., Niu, M., and Qin, J. (2018). Alterations of apoptosis and autophagy in developing brain of rats with epilepsy: Changes in LC3, P62, Beclin-1 and Bcl-2 levels. *Neuroscience Research* 130, 47-55.
- 154.Li, Y., Mu, Y., and Gage, F.H. (2009). Development of Neural Circuits in the Adult Hippocampus. In *Current Topics in Developmental Biology* 87, 149-174.
- 155.Liang, S., Zhang, L., Yu, X., Zhang, S., Zhang, G., and Ding, P. (2016). Neuroprotective Effect of Electric Conduction Treatment on Hippocampus Cell Apoptosis in KA Induced Acute Temporal Lobe Epileptic Rats. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation* 9, 933-939.
- 156.Liu, H., Jia, D., Li, A., Chau, J., He, D., Ruan, X., Liu, F., Li, J., He, L., and Li, B. (2012). p53 Regulates Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation via BMP-Smad1 Signaling and Id1. *Stem Cells and Development* 22, 913-927.
- 157.Liu, J.Y.W., Dzurova, N., Al-Kaaby, B., Mills, K., Sisodiya, S.M., and Thom, M. (2020). Granule Cell Dispersion in Human Temporal Lobe Epilepsy: Proteomics Investigation of Neurodevelopmental Migratory Pathways. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14, 53.
- 158.Liu, Y., Tavana, O., and Gu, W. (2019). p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. *Journal of Molecular Cell Biology* 11, 564-577.
- 159.Lockesley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- 160.Lookeren Campagne, M.V., and Gill, R. (1998). Tumor-suppressor p53 is expressed in proliferating and newly formed neurons of the embryonic and postnatal rat brain: Comparison with expression of the cell cycle regulators p21Waf1/Cip1, p27Kip1, p57Kip2, p16Ink4a, cyclin G1, and the proto-oncogene bax. *Journal of Comparative Neurology* 397, 181-198.
- 161.López-López, D., Gómez-Nieto, R., Herrero-Turrión, M.J., García-Cairasco, N., Sánchez-Benito, D., Ludeña, M.D., and López, D.E. (2017). Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. *Epilepsy & Behavior* 71, 226-237.
- 162.Luo, Y., Kuo, C.C., Shen, H., Chou, J., Greig, N.H., Hoffer, B.J., and Wang, Y. (2009). Delayed treatment with a p53 inhibitor enhances recovery in stroke brain. *Annals of Neurology* 65, 520-530.
- 163.Macias, M., Blazejczyk, M., Kazmierska, P., Caban, B., Skalecka, A., Tarkowski, B., Rodo, A., Konopacki, J., and Jaworski, J. (2013). Spatiotemporal characterization of mTOR kinase activity following kainic acid induced status epilepticus and analysis of rat brain response to chronic rapamycin treatment. *PloS One* 8, e64455.

164. Marucci, G., Giulioni, M., Rubboli, G., Paradisi, M., Fernández, M., Del Vecchio, G., and Pozzati, E. (2013). Neurogenesis in temporal lobe epilepsy: Relationship between histological findings and changes in dentate gyrus proliferative properties. *Clinical Neurology and Neurosurgery* *115*, 187-191.
165. Mathern, G.W., Leiphart, J.L., De Vera, A., Adelson, P.D., Seki, T., Neder, L., and Leite, J.P.J.E. (2002). Seizures decrease postnatal neurogenesis and granule cell development in the Human Fascia tDentata. *Epilepsia* *43*, 68-73.
166. McMahan, J., Huang, X., Yang, J., Komatsu, M., Yue, Z., Qian, J., Zhu, X., and Huang, Y. (2012). Impaired autophagy in neurons after disinhibition of mammalian target of rapamycin and its contribution to epileptogenesis. *The Journal of Neuroscience* *32*, 15704-15714.
167. Mebratu, Y., and Tesfaigzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* *8*, 1168-1175.
168. Meletis, K., Wirta, V., Hede, S.-M., Nistér, M., Lundeberg, J., and Frisén, J. (2006). p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* *133*, 363-369.
169. Meller, R., Schindler, C.K., Chu, X.P., Xiong, Z.G., Cameron, J.A., Simon, R.P., and Henshall, D.C. (2003). Seizure-like activity leads to the release of BAD from 14-3-3 protein and cell death in hippocampal neurons in vitro. *Cell Death & Differentiation* *10*, 539-547.
170. Meng, X.F., Yu, J.T., Song, J.H., Chi, S., and Tan, L. (2013). Role of the mTOR signaling pathway in epilepsy. *Journal of the Neurological Sciences* *332*, 4-15.
171. Menzies, F.M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C.F., Andrews, S.P., Ashkenazi, A., Füllgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., *et al.* (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* *93*, 1015-1034.
172. Merrill, M.A., Clough, R.W., Jobe, P.C., and Browning, R.A. (2005). Brainstem Seizure Severity Regulates Forebrain Seizure Expression in the Audiogenic Kindling Model. *Epilepsia* *46*, 1380-1388.
173. Min, Z., Ting, Y., Mingtao, G., Xiaofei, T., Dong, Y., Chenguang, Z., and Wei, D. (2018). Monitoring autophagic flux using p62/SQSTM1 based luciferase reporters in glioma cells. *Experimental Cell Research* *363*, 84-94.
174. Mineyeva, O.A., Enikolopov, G., and Koulakov, A.A.J.S.r. (2018). Spatial geometry of stem cell proliferation in the adult hippocampus. *Scientific Reports* *8*, 1-12.
175. Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology* *12*, 823-830.

176. Nagao, M., Campbell, K., Burns, K., Kuan, C.-Y., Trumpp, A., and Nakafuku, M. (2008). Coordinated control of self-renewal and differentiation of neural stem cells by Myc and the p19ARF–p53 pathway. *Journal of Cell Biology* *183*, 1243-1257.
177. Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell* *7*, 683-694.
178. Naritoku, D.K., Mecozzi, L.B., Aiello, M.T., and Faingold, C.L. (1992). Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Experimental Neurology* *115*, 317-324.
179. Narkilahti, S. (2005). Expression and activation of caspases in the brain during epileptogenesis: experimental study in rat (Kuopion yliopisto).
180. Narkilahti, S., Nissinen, J., and Pitkänen, A. (2003). Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacology* *44*, 1068-1088.
181. Naumova, A.A., Oleynik, E.A., Chernigovskaya, E.V., and Glazova, M.V. (2020). Glutamatergic fate of neural progenitor cells of rats with inherited audiogenic epilepsy. *Brain Science* *10*, 311.
182. Nicola, Z., Fabel, K., and Kempermann, G.J. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Frontiers in neuroanatomy* *9*, 53.
183. Niklison-Chirou, M.V., Agostini, M., Amelio, I., and Melino, G. (2020). Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain. *International Journal of Molecular Sciences* *21*, 4869.
184. Nikolettou, V., Papandreou, M.E., and Tavernarakis, N. (2015). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death & Differentiation* *22*, 398-407.
185. Nirwan, N., Vyas, P., and Vohora, D. (2018). Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Reviews in the Neurosciences* *29*, 757-770.
186. O'keefe, J., Nadel, L.J.B., and Sciences, B. (1979). The cognitive map as a hippocampus. *Behavioral and Brain Sciences* *2*, 520-533.
187. Oberoi-Khanuja, T.K., Murali, A., and Rajalingam, K. (2013). IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration. *Cell Death & Disease* *4*, 784-784.
188. Okudan, Z.V., and Özkara, Ç. (2018). Reflex epilepsy: triggers and management strategies. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* *14*, 327-337.
189. Orcinha, C., Munzner, G., Gerlach, J., Kiliyas, A., Follo, M., Egert, U., and Haas, C.A. (2016). Seizure-Induced Motility of Differentiated Dentate Granule Cells Is Prevented by the Central Reelin Fragment. *Frontiers in Cellular Neuroscience* *10*, 183.

190. Osawa, M., Uemura, S., Kimura, H., Sato, and Mitumoto (2001). Amygdala kindling develops without mossy fiber sprouting and hippocampal neuronal degeneration in rats. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 55, 549-557.
191. Ostrakhovitch, E.A., and Semenikhin, O.A. (2011). p53-mediated regulation of neuronal differentiation via regulation of dual oxidase maturation factor 1. *Neuroscience Letters* 494, 80-85.
192. Overstreet-Wadiche, L.S., Bromberg, D.A., Bensen, A.L., and Westbrook, G.L. (2006). Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *The Journal of Neuroscience* 26, 4095-4103.
193. Paradisi, M., Fernández, M., Del Vecchio, G., Lizzo, G., Marucci, G., Giulioni, M., Pozzati, E., Antonelli, T., Lanzoni, G., Bagnara, G.P., *et al.* (2010). Ex vivo study of dentate gyrus neurogenesis in human pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36, 535-550.
194. Parent, J.M., and Kron, M.M. (2012). Neurogenesis and Epilepsy. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, th, J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, and A.V. Delgado-Escueta, eds. (Bethesda (MD)).
195. Pavlova, T.V., Yakovlev, A.A., Stepanichev, M.Y., Mendzheritskii, A.M., and Gulyaeva, N.V. (2004). Pentylentetrazole Kindling Induces Activation of Caspase-3 in the Rat Brain. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 34, 45-47.
196. Pierce, J.P., Melton, J., Punsoni, M., McCloskey, D.P., and Scharfman, H.E. (2005). Mossy fibers are the primary source of afferent input to ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. *Experimental Neurology* 196, 316-331.
197. Pierson, M., and Snyder-Keller, A. (1994). Development of frequency-selective domains in inferior colliculus of normal and neonatally noise-exposed rats. *Brain Research* 636, 55-67.
198. Pitkänen, A. (2010). Therapeutic approaches to epileptogenesis—Hope on the horizon. *Epilepsia* 51, 2-17.
199. Poletaeva, I.I., Surina, N.M., Kostina, Z.A., Perepelkina, O.V., and Fedotova, I.B. (2017). The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65years. *Epilepsy & Behavior* 71, 130-141.
200. Pollard, H., Charriaut-Marlangue, C., Cantagrel, S., Represa, A., Robain, O., Moreau, J., and Ben-Ari, Y. (1994). Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 63, 7-18.
201. Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 32, 281-294.

202. Rogel, A., Popliker, M., Webb, C.G., and Oren, M. (1985). p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Molecular and Cellular Biology*. 5, 2851-2855.
203. Romanova, L.G., Zorina, Z.A., and Korochkin, L.I. (1993). A genetic, physiological, and biochemical investigation of audiogenic seizures in rats. *Behavior Genetics* 23, 483-489.
204. Romcy-Pereira, R.N., and Garcia-Cairasco, N. (2003). Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or fluoro-jade staining. *Neuroscience* 119, 533-546.
205. Roth, S.U., Sommer, C., Mundel, P., and Kiessling, M. (2001). Expression of synaptopodin, an actin-associated protein, in the rat hippocampus after limbic epilepsy. *Brain Pathology* 11, 169-181.
206. Roux, P.P., Colicos, M.A., Barker, P.A., and Kennedy, T.E. (1999). p75 Neurotrophin Receptor Expression Is Induced in Apoptotic Neurons After Seizure. *Journal of Neuroscience* 19, 6887-6896.
207. Scharfman, H., Goodman, J., and McCloskey, D. (2007). Ectopic granule cells of the rat dentate gyrus. *Developmental Neuroscience* 29, 14-27.
208. Scharfman, H.E. (2016). The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nature reviews Neuroscience* 17, 562-575.
209. Scharfman, H.E. (2019). The Dentate Gyrus and Temporal Lobe Epilepsy: An "Exciting" Era. *Epilepsy Currents* 19, 249-255.
210. Scharfman, H.E., Goodman, J.H., and Sollas, A.L. (2000). Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *The Journal of Neuroscience* 20, 6144-6158.
211. Scharfman, H.E., and Pierce, J.P. (2012). New insights into the role of hilar ectopic granule cells in the dentate gyrus based on quantitative anatomic analysis and three-dimensional reconstruction. *Epilepsia* 53 Suppl 1, 109-115.
212. Schindler, C.K., Pearson, E.G., Bonner, H.P., So, N.K., Simon, R.P., Prehn, J.H.M., and Henshall, D.C. (2005). Caspase-3 Cleavage and Nuclear Localization of Caspase-Activated DNase in Human Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26, 583-589.
213. Schindler, C.K., Shinoda, S., Simon, R.P., and Henshall, D.C. (2004). Subcellular distribution of Bcl-2 family proteins and 14-3-3 within the hippocampus during seizure-induced neuronal death in the rat. *Neuroscience Letters* 356, 163-166.



- 214.Segal, M., Vlachos, A., and Korkotian, E. (2010). The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *The Neuroscientist* 16, 125-131.
215. Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T.R., Matsuda, F., and Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* 344, 1164-1168.
- 216.Semiokhina, A.F., Fedotova, I.B., and Poletaeva, II (2006). [Rats of Krushinsky-Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, vascular pathology, and behavior]. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova* 56, 298-316.
- 217.Shakeri, R., Kheirollahi, A., and Davoodi, J. (2017). Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie* 135, 111-125.
- 218.Simpson, J.N., Zhang, W.Q., Bing, G., and Hong, J.S. (1997). Kainic acid-induced sprouting of dynorphin- and enkephalin-containing mossy fibers in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Brain Research* 747, 318-323.
- 219.Singh, S.P., He, X., McNamara, J.O., and Danzer, S.C. (2013). Morphological changes among hippocampal dentate granule cells exposed to early kindling-epileptogenesis. *Hippocampus* 23, 1309-1320.
- 220.Sirven, J.I. (2015). Epilepsy: A Spectrum Disorder. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5, a022848.
- 221.Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 7320-7326.
222. Snyder, J.S., Choe, J.S., Clifford, M.A., Jeurling, S.I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J.F., and Cameron, H.A. (2009). Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *Journal of Neuroscience* 29, 14484-14495.
- 223.Sugaya, Y., Maru, E., Kudo, K., Shibasaki, T., and Kato, N. (2010). Levetiracetam suppresses development of spontaneous EEG seizures and aberrant neurogenesis following kainate-induced status epilepticus. *Brain Research* 1352, 187-199.
- 224.Sun, G.J., Sailor, K.A., Mahmood, Q.A., Chavali, N., Christian, K.M., Song, H., and Ming, G.-I.J.J.o.N. (2013). Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *Journal of Neuroscience* 33, 11400-11411.
- 225.Sun, Z.Q., Meng, F.H., Tu, L.X., and Sun, L. (2019). Myricetin attenuates the severity of seizures and neuroapoptosis in pentylenetetrazole kindled mice by regulating the of

- BDNF-TrkB signaling pathway and modulating matrix metalloproteinase-9 and GABAA. *Experimental and Therapeutic Medicine* 17, 3083-3091.
226. Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prévost, M.-C., *et al.* (2000). Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 192, 571-580.
227. Sutula, T., Cascino, G., Cavazos, J., Parada, I., and Ramirez, L. (1989). Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Annals of Neurology* 26, 321-330.
228. Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 231-241.
229. Tedeschi, A., and Di Giovanni, S. (2009). The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO reports* 10, 576-583.
230. Thom, M., Martinian, L., Williams, G., Stoeber, K., Sisodiya, S.M. (2005). Cell proliferation and granule cell dispersion in human hippocampal sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 64, 194-201.
231. Tuunanen, J., and Pitkänen, A. (2000). Do seizures cause neuronal damage in rat amygdala kindling? *Epilepsy Research* 39, 171-176.
232. Uemori, T., Toda, K., and Seki, T. (2017). Seizure severity-dependent selective vulnerability of the granule cell layer and aberrant neurogenesis in the rat hippocampus. *Hippocampus* 27, 1054-1068.
233. Ueno, M., Sugimoto, M., Ohtsubo, K., Sakai, N., Endo, A., Shikano, K., Imoto, Y., and Segi-Nishida, E. (2019). The effect of electroconvulsive seizure on survival, neuronal differentiation, and expression of the maturation marker in the adult mouse hippocampus. *Neurochem* 149, 488-498.
234. Urbán, N., and Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, 396.
235. Varma, P., Brulet, R., Zhang, L., and Hsieh, J. (2019). Targeting Seizure-Induced Neurogenesis in a Clinically Relevant Time Period Leads to Transient But Not Persistent Seizure Reduction. *Journal of Neuroscience* 39, 7019-7028.
236. Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et biophysica acta. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1787, 414-420.
237. Victor, T.R., and Tsirka, S.E. (2020). Microglial contributions to aberrant neurogenesis and pathophysiology of epilepsy. *Neuroimmunology and Neuroinflammation* 7, 234-247.
238. Vinogradova, L.V. (2017). Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. *Epilepsy & Behavior* 71, 142-153.

239. Vivar, C., and van Praag, H. (2013). Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Frontiers in Neural Circuits* 7, 15.
240. Volz, F., Bock, H.H., Gierthmuehlen, M., Zentner, J., Haas, C.A., and Freiman, T.M. (2011). Stereologic estimation of hippocampal GluR2/3- and calretinin-immunoreactive hilar neurons (presumptive mossy cells) in two mouse models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52, 1579-1589.
241. Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.
242. Walker, M. (2007). Neuroprotection in epilepsy. *Epilepsia* 48, 66-68.
243. Wang, B.H., Hou, Q., Lu, Y.Q., Jia, M.M., Qiu, T., Wang, X.H., Zhang, Z.X., and Jiang, Y. (2018). Ketogenic diet attenuates neuronal injury via autophagy and mitochondrial pathways in pentylenetetrazol-kindled seizures. *Brain Research* 1678, 106-115.
244. Wang, C., Liang, C.C., Bian, Z.C., Zhu, Y., and Guan, J.L. (2013). FIP200 is required for maintenance and differentiation of postnatal neural stem cells. *Nature Neuroscience* 16, 532-542.
245. Weidberg, H., Shvets, E., and Elazar, Z. (2011). Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes. *Annual Review of Biochemistry* 80, 125-156.
246. Weise, J., Engelhorn, T., Dörfler, A., Aker, S., Bähr, M., and Hufnagel, A. (2005). Expression time course and spatial distribution of activated caspase-3 after experimental status epilepticus: Contribution of delayed neuronal cell death to seizure-induced neuronal injury. *Neurobiology of Disease* 18, 582-590.
247. White, L., Barone, S (2001). Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death & Differentiation* 8, 345-356.
248. Wolf, P. (2017). Reflex epileptic mechanisms in humans: Lessons about natural ictogenesis. *Epilepsy & Behavior* 71, 118-123.
249. Wu, Z., Deshpande, T., Henning, L., Bedner, P., Seifert, G., and Steinhäuser, C. (2021). Cell death of hippocampal CA1 astrocytes during early epileptogenesis. *Epilepsia* 62, 1569-1583.
250. Xu, S., Pang, Q., Liu, Y., Shang, W., Zhai, G., and Ge, M. (2007). Neuronal apoptosis in the resected sclerotic hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of Clinical Neuroscience* 14, 835-840.
251. Yamawaki, R., Thind, K., and Buckmaster, P.S. (2015). Blockade of excitatory synaptogenesis with proximal dendrites of dentate granule cells following rapamycin treatment in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of Comparative Neurology* 523, 281-297.

252. Yu, X., Guan, Q., Wang, Y., Shen, H., Zhai, L., Lu, X., and Jin, Y. (2019). Anticonvulsant and anti-apoptosis effects of salvianolic acid B on pentylenetetrazole-kindled rats via AKT/CREB/BDNF signaling. *Epilepsy Research* 154, 90-96.
253. Zeng, L.-H., Rensing, N.R., and Wong, M. (2009). The Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Mediates Epileptogenesis in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuroscience* 29, 6964-6972.
254. Zhang, X., Wu, S., Guo, C., Guo, K., Hu, Z., Peng, J., Zhang, Z., and Li, J. (2022). Vitamin E Exerts Neuroprotective Effects in Pentylenetetrazole Kindling Epilepsy via Suppression of Ferroptosis. *Neurochemical Research* 47, 739-747.
255. Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G.-l., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 26, 3-11.
256. Zhu, J., Singh, M., Selivanova, G., and Peugot, S. (2020). Pifithrin- $\alpha$  alters p53 post-translational modifications pattern and differentially inhibits p53 target genes. *Scientific Reports* 10, 1049.