

ХРОНИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ ТРАНСМИССИИ В ГИППОКАМPE КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ, ВЫЗВАННЫЕ МНОГОКРАТНЫМИ СУДОРОЖНЫМИ ПРИПАДКАМИ

© 2023 г. Е. П. Александрова¹, А. П. Ивлев¹, А. А. Куликов¹,
Л. С. Никитина¹, М. В. Глазова¹, Е. В. Черниговская^{1,*}

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

*e-mail: chern755@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.2023 г.

После доработки 17.07.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

Для височной эпилепсии характерно развитие сопутствующих неврологических нарушений и психических заболеваний. Одной из возможных причин их возникновения, очевидно, являются нарушения в балансе возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем гиппокампа. Хронические нарушения в молекулярных механизмах регуляции активности глутаматергической системы гиппокампа при височной эпилепсии в настоящее время малоизучены. В настоящей работе мы использовали крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ), подвергнутых многократным аудиогенным судорожным припадкам, для моделирования височной эпилепсии. Анализ молекулярных механизмов регуляции продукции глутамата нейронами гиппокампа был проведен через неделю после окончания стандартного (14 судорожных припадков) и длительного (21 судорожных припадков) киндлинга. В гиппокампе крыс КМ в результате киндлинга происходит активация ERK1/2-киназ, а также активация транскрипционного фактора CREB, усиление экспрессии глутаминазы и везикулярных транспортеров глутамата VGLUT1 и 2 и транскрипционного фактора Frl1, т.е. белков, отвечающих за продукцию глутамата. Эти данные свидетельствуют о повышении активности глутаматергических нейронов гиппокампа, сохраняющейся в течение недели после завершения последней аудиогенной стимуляции. Также показано усиление экспрессии mGluR1-рецепторов глутамата, активация которых приводит к высвобождению Ca^{2+} и может вызывать эксайтотоксичность. Долговременное усиление глутаматергической трансмиссии, вызванное многократными эпилептиформными припадками, является причиной не только дальнейшего эпилептогенеза, но и может лежать в основе развития нейродегенерации.

Ключевые слова: эпилепсия, крысы линии Крушинского–Молодкиной, аудиогенный киндлинг, глутамат, гиппокамп

DOI: 10.31857/S0044452923050029, **EDN:** KJRGJR

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия является широко распространенным неврологическим заболеванием. При этом для эпилепсии характерна высокая распространенность сопутствующих заболеваний, в том числе показано, что многочисленные психические и соматические заболевания чаще встречаются и более опасны у людей, больных эпилепсией. Наиболее серьезные патологические последствия эпилепсии включают структурные и функциональные заболевания центральной нервной системы, такие как инсульт, деменция и мигрень. Также среди больных эпилепсией часто встречаются сопутствующие психические заболевания — депрессия и повышенная тревожность [1, 2].

Подобные неврологические и психические нарушения выявлены и на экспериментальных моделях эпилепсии [3]. Одной из таких моделей эпилепсии является формирование киндлинга, когда ежедневная электрическая стимуляция определенных областей мозга, введение пороговых доз хемоконвульсантов или звуковая стимуляция животных, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии, приводят к постепенному развитию и усилению лимбических генерализованных судорог. При различных видах киндлинга также наблюдаются нарушения в пространственном ориентировании, снижение исследовательской активности, повышенная тревожность и депрессивно-подобное поведение, сохраняющиеся длительное время [4–8]. Причем даже формирование киндлинга при небольшом числе

стимуляций вызывает устойчивые изменения в эмоциональном поведении у крыс, выражающиеся в усилении тревожности и оборонительного поведения и сохраняющиеся, по крайней мере, в течение двух месяцев после последней стимуляции [9]. Таким образом, при моделировании развития височной эпилепсии наблюдаются длительно сохраняющиеся неврологические нарушения.

В основе неврологических нарушений при повторяющихся эпилептических припадках лежат прогрессирующие патологические и функциональные изменения в нервной системе, возникающие за счет нарушений молекулярных механизмов регуляции пластичности нейронов, обеспечивающих преобразование краткосрочной активности в долгосрочные изменения. При эпилепсии происходит кратковременная активация рецепторов, которая вызывает нарушения в работе внутриклеточных сигнальных каскадов, это приводит к изменению экспрессии генов в нейронах, что, вероятно, является причиной прогрессирующей патологии [10]. Активация генов, сопровождающаяся повышенной транскрипцией матричной РНК, в последующие часы приводит к усилению синтеза белков, что, в свою очередь, вызывает морфологические и анатомические изменения [10]. На пациентах и на экспериментальных моделях показаны аномальное прорастание мшистых волокон, синаптическая реорганизация, потеря нейронов и глиоз в различных отделах мозга, в частности, в гиппокампе [10–12]. На фармакологических моделях эпилепсии на животных гранулярные клетки зубчатой извилины гипербозбуждаются как сразу после развития эпилептического статуса [13], так и во время латентного периода, что было показано на модели развития височной эпилепсии [14]. Повышенная возбудимость гранулярных клеток также была зарегистрирована во время хронической формы височной эпилепсии в гиппокампе человека и на модели эпилепсии, сопровождающейся гиппокампальным склерозом [15].

Несмотря на очевидность существования многочисленных нарушений в активности вторичных сигнальных каскадов, отвечающих за состояние нейронов при эпилепсии, в настоящее время крайне мало данных о хронических нарушениях в молекулярных механизмах регуляции активности нейротрансмиттерных систем лимбической системы, в частности, гиппокампа. Однако очевидно, что возникновение подобных хронических нарушений может приводить к дальнейшему усилению тяжести заболевания, а также к развитию сопутствующих психических и соматических заболеваний. В настоящей работе мы использовали крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ), подвергнутых длительной ежедневной экспозиции действию звука, вызывающей феномен киндлинга, для моделирования височной эпилепсии, что приводило к развитию лимбических генерализованных судорог.

Анализ молекулярных механизмов регуляции продукции глутамата нейронами гиппокампа через неделю после окончания стандартного (14 судорожных припадков) и длительного (21 судорожный припадок) аудиогенного киндлинга позволил выявить хронические нарушения в состоянии нейронов, возможно, являющиеся субстратом не только дальнейшего эпилептогенеза, но и возникновения неврологических нарушений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В экспериментах использовали взрослых крыс КМ с полностью сформированной судорожной готовностью (Московский государственный университет, Россия). Крыс содержали по 4–5 животных в клетке при цикле день/ночь 12 ч/12 ч со свободным доступом к пище и воде.

Экспериментальные группы

Для оценки вызванных судорогами изменений в глутаматергической нейротрансмиссии в гиппокампе использовали аудиогенный киндлинг, модель лимбической эпилепсии. Аудиогенные судороги индуцировали один раз в день звуковой стимуляцией с частотой 10 кГц с помощью компьютерной программы NCH Tone Generator (© NCH Software, Австралия). Каждую крысу помещали в тестовую камеру для адаптации на 5 мин и затем подвергали воздействию акустического стимула. Проверяли на наличие и продолжительность стадий судорожного припадков, включающих латентный период, дикий бег, клонические и тонические судороги. Если в течение 1 мин стимуляции у животного не возникало судорог, его исключали из эксперимента, но доля таких животных составляла меньше одного процента. После повторных звуковых раздражений у животных появлялись дополнительная судорожная фаза, посттонический (лимбический) клонус, что свидетельствовало о возникновении лимбических припадков [16].

Было проведено два независимых эксперимента.

1. 14-дневная экспозиция действию звука. Крыс КМ подвергали 14 судорожным припадкам, что соответствует стадии развития лимбических генерализованных припадков. Крыс выводили из эксперимента через 7 дней (период отдыха) после последнего припадков ($n = 5$), группа 14 + 7.

2. 21-дневная экспозиция действию звука. Крыс КМ подвергали 21 судорожному припадку, что являлось моделью полностью развившейся лимбической эпилепсии со стабильными и тяжелыми лимбическими припадками. Крыс выводили из эксперимента через 7 дней (период отдыха) после последнего припадков ($n = 5$), группа 21 + 7.

3. Контрольные крысы КМ без опыта аудиогенных судорожных припадков ($n = 10$), наивная группа. Эти животные были выведены из эксперимента одновременно с экспериментальными крысами.

Поведенческий анализ

Во время аудиогенного киндлинга все судорожные припадки записывались на видео с последующим анализом продолжительности и тяжести всех стадий. Для оценки тяжести лимбических судорог, развивающихся во время аудиогенного киндлинга, мы ранее модифицировали шкалу Расина для крыс КМ [17]. Считалось, что у животных развивается лимбическая эпилепсия после того, как они демонстрировали 7 и более последовательных лимбических припадков (не менее 2–3 балла по шкале) [17]. Крысы, подвергавшиеся аудиогенной стимуляции в течение 14 и 21 дня не отличались достоверно по представленности проявлений компонентов лимбических судорог (4–5 баллов), но продолжительность лимбических судорог значительно возросла после длительной экспозиции действию звука.

Материалы 1-го эксперимента использовали только для гистологического анализа, а материалы 2-го использовали для вестерн-блота и гистологического анализа эксперимента.

Подготовка материала для анализа

Крыс из 1-й группы ($n = 5$), половину крыс из 2-й группы ($n = 5$) и половину контрольных (наивных) крыс ($n = 5$) наркотизировали смесью золетил/ксилазин (60 мг/кг + 10 мг/кг; Virbac, Франция). Затем животных перфузировали транскардиально охлажденным 0.01 М фосфатно-буферным солевым раствором PBS, содержащим (в mM) 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na_2HPO_4 , 1.76 KH_2PO_4 , pH 7.4, затем 5%-ным раствором формалина и декапитировали. Мозг всех животных извлекали, постфиксировали в 5%-ном растворе формалина при 4°C в течение 5 дней, затем погружали в 20%-ный раствор сахарозы/PBS для криозащиты (4°C, 3 дня), далее замораживали и хранили при –80°C до дальнейшего использования.

Гистологический анализ

Срезы гиппокампа толщиной 10 мкм были изготовлены с помощью криостата (Leica, Германия). Изготавливали 15 чередующихся серий препаратов, содержащих фронтальные срезы дорсальных гиппокампов на одном уровне в росто-каудальном направлении. После стандартных предварительных процедур срезы одной из 15 серий инкубировали с первичными антителами к каждому исследуемому белку. Анализ глутаматергических клеток проводили с использованием антител против ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technolo-

gy, #4376; кроличьи, 1: 250); Fra1 (Invitrogen, # PA5-40361, кроличьи, 1: 100); CREB (Ser133, Novusbio, # NB300-273, кроличьи, 1:200); глутаминазы (Novusbio, #NBP2-67683, кроличьи, 1: 100); VGLUT1 (Millipore, # MAB5502, мышинные, 1: 500); VGLUT2 (Millipore, # MAB5504, мышинные, 1: 500); GAD67 (Millipore, # MAB5406, мышинные, 1–500); GluN2B (Invitrogen, # PA3-104, 1: 500). Затем срезы промывали в PBS и инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными вторичными антителами (1:300, Vector Laboratories Inc.), после чего следовала часовая инкубация со стрептавидин-пероксидазным комплексом (1: 500, Supelco, #S2438). Пероксидазную реакцию выявляли в буфере, содержащем 0.05% 3,3'-диаминобензидина (DAB, Sigma-Aldrich, #D5637) и перекись водорода (0.01%).

Для анализа уровня активности глутаматергических нейронов проводили двойное иммуноокрашивание с использованием первичных антител против GAD67 (Millipore, # MAB5406, мышинные, 1: 500) и Fra1 (Invitrogen, # PA5-40361, кроличьи, 1: 100), что позволило исключить из обчислений ГАМК-ергические нейроны. В этом случае после инкубации с первичными моноклональными антителами против GAD67 срезы промывали в PBS и подвергали стандартной обработке биотинилированными вторичными моноклональными антителами (1:300, Vector Laboratories Inc.), после чего следовала часовая инкубация со стрептавидин-пероксидазным комплексом (1:500, Supelco, #S2438). Пероксидазную реакцию выявляли в буфере, содержащем 0.05% 3,3'-диаминобензидина (DAB, Sigma-Aldrich, #D5637) и перекись водорода (0.01%). Затем срезы инкубировали с первичными поликлональными антителами против Fra1 и также проводили последующую иммуногистохимическую реакцию. В этом случае пероксидазную реакцию выявляли с помощью коммерческого набора SK4700 (Vector® SG Substrate Kit, Peroxidase (HRP), что позволяло получить синее окрашивание продукта иммуногистохимической реакции.

Вестерн-блот анализ

Половину крыс из 2 группы ($n = 5$) и половину наивных крыс ($n = 5$) декапитировали, гиппокампы препарировали и гомогенизировали для дальнейшего биохимического анализа. Экспрессию и активность белков, регулирующих активность глутаматергических нейронов, исследовали с помощью Вестерн-блот анализа. Гиппокампы гомогенизировали в буфере для лизиса при 4°C (20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА) с ингибиторами протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и фосфатаз (Roche, #04 906 837 001). Нерастворимый осадок удаляли центрифугированием. Общее содержание белка в образцах определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в качестве стандарта. Супернатант

смешивали в соотношении 2 : 1 с 3-загрузочным буфером (0.2 М Трис-НСl pH 6.7, 6% додецилсульфата натрия, 15% глицерина, 0.003% бромфенолового синего и 10% β -меркаптоэтанола) и инкубировали в течение 10 мин при 96°C. Равные количества проб (10 мкг белка на линию) загружали для электрофореза. Белки разделяли в 10%- или 12%-ном полиакриламидном геле, а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3718). Мембраны инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке или в 3%-ном БСА в Tris буфере с добавлением Tween (TBST; 0.1% Tween 20, 20 mM Tris, 137 mM NaCl; pH 7. 4) в течение 1 ч и затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами против актина (1:2000; Abcam, #ab3280,); mGluR1 (Invitrogen, # PA-4516, 1: 1000); mGluR5 (Invitrogen, # MA5-32155, 1: 1000); GluA1 (Millipore, # MAB-2263, 1: 1000); GluN2B (Invitrogen, # PA3-104, 1: 1000); GluN2A (Invitrogen, # PA5-35377, 1: 1000). Затем мембраны промывали в буфере TBST и инкубировали со вторичными поликлональными (1: 10000; Sigma-Aldrich, #A5420) или моноклональными (1: 40000; Sigma-Aldrich, #A9044) антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Специфические белки визуализировали с помощью хемилюминесцентной реакции с субстратом SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075) с использованием ChemiDoc MP Imaging System (#12003154, Bio-Rad). Относительную плотность каждой белковой полосы оценивали количественно с помощью программного обеспечения ImageLab (версия 6.0; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, США).

Оценка иммуногистохимической реакции и статистический анализ

Обработку срезов проводили в стандартных условиях в каждом эксперименте, т.е. контрольные и экспериментальные группы в каждом эксперименте собирали, фиксировали и обрабатывали одновременно. Для изучения специфичности иммуноокрашивания проводили отрицательный контроль (тот же протокол без первичных антител), который не показал иммунореактивности. Анализ срезов проводили с микроскопа Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Изменения, вызванные судорожной активностью, анализировали в гранулярном, внутреннем молекулярном слоях и в хилусе зубчатой извилины, а также в stratum lucidum поля CA3–4 гиппокампа. Для каждого животного анализировали пять срезов на одном уровне исследуемой зоны. Экспрессию интересующих белков при Вестерн-блот анализе оценивали по соотношению каждого исследуемого белка к актину или β -тубулину.

Статистическую обработку данных проводили с помощью U-теста Манна–Уитни и теста Краске-

ла–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна при $p < 0.05$. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., Сан-Диего, Калифорния). Все результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе мы провели анализ глутаматергических нейронов гиппокампа крыс, подвергнутых ежедневной экспозиции действию звука, через 7 дней после завершения последнего судорожного припадка, т.е. в период, когда острые нарушения в молекулярных механизмах регуляции активности нейронов, вызванные эпилептиформной активностью, сменяются хроническими, долговременными. Повышенное содержание pERK-киназ может быть одним из самых ранних иммуногистохимических индикаторов активации нейронов при эпилептиформной активности [18]. Однако мы показали значительную активацию киназ через неделю после окончания 14 и 21 ежедневной экспозиции действию звука во внутреннем молекулярном слое и в гранулярном слое зубчатой извилины, пирамидных нейронах CA4 поля гиппокампа, в хилусе и в области пролегания мшистых волокон CA3-4 поля (рис. 1a, 1b, 1c, 1d).

Одним из транскрипционных факторов, активно участвующим в развитии эпилептиформных состояний, является ERK1/2-зависимый белок CREB. Интересно отметить, что повышенная активность ERK1/2-киназ в гранулярных клетках и пирамидных нейронах CA4 поля после окончания 14 и 21 ежедневной экспозиции действию звука сопровождалась увеличением числа пирамидных нейронов поля CA4 и гранулярных клеток, содержащих фосфо-CREB-иммунопозитивные ядра (рис. 2a, 2b, 2c).

Также в глутаматергических нейронах гранулярного слоя зубчатой извилины и CA4-поля гиппокампа показано увеличение содержания другого ERK1/2-зависимого транскрипционного фактора Fra1 (рис. 3a, 3b, 3c).

Мы показали, что после 14-дневной экспозиции действию звука в хилусе наблюдается увеличение числа клеток, экспрессирующих глутаминазу (катализирует расщепление аминокислоты глутамината до аммиака и глютаминовой кислоты) (рис. 4c, 4d). Через неделю после окончания длительной, 21-дневной экспозиции действию звука, увеличение экспрессии глутаминазы наблюдалось не только в глутаматергических нейронах хилуса, но и в гранулярных клетках зубчатой извилины и в пирамидных нейронах CA3-CA4-полей гиппокампа (рис. 4a, b, c, d), что свидетельствует об усиливаю-

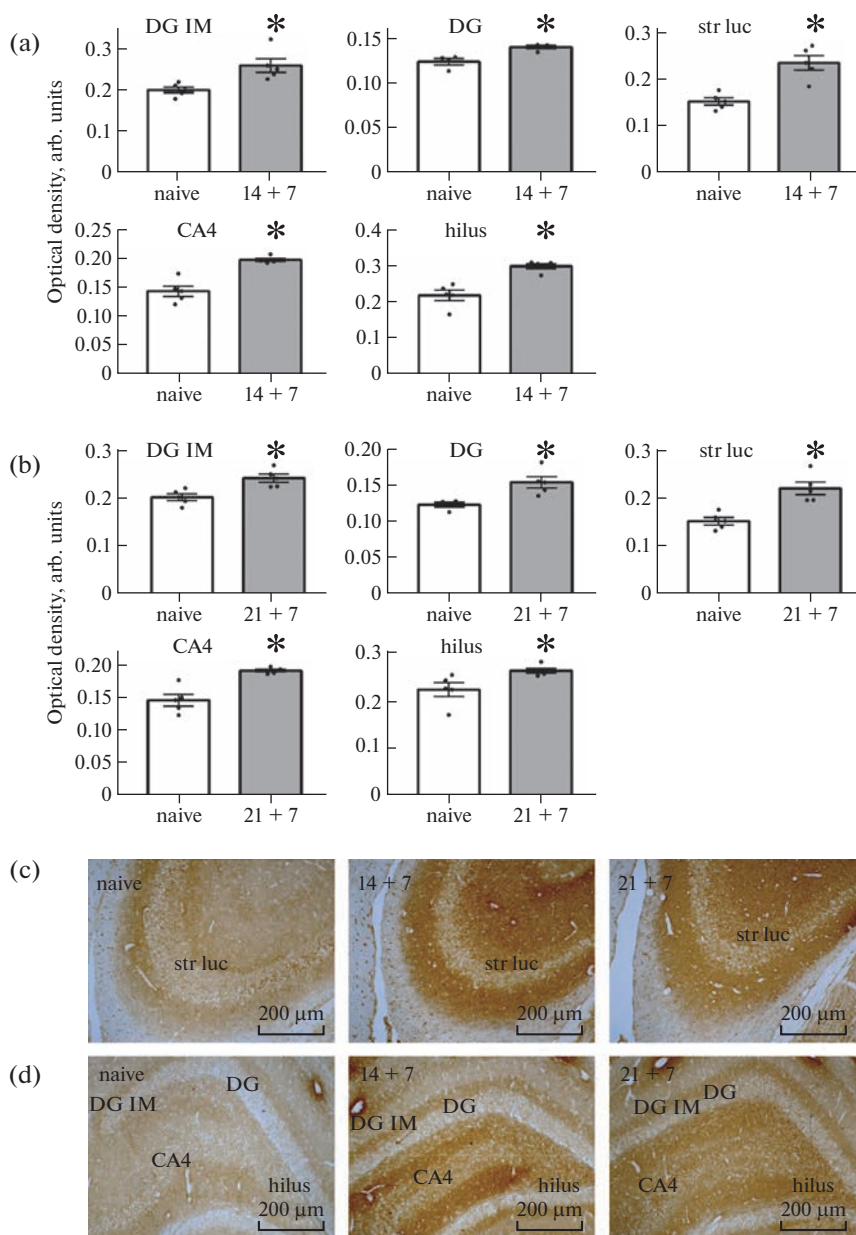


Рис. 1. Анализ ERK1/2-киназ в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (а) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение содержания фосфорилированных активных(Thr202/Tyr204) ERK1/2-киназ во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (DG IM), в гранулярном слое зубчатой извилины (DG), в stratum lucidum (str luc), в поле CA4 гиппокампа (CA4) и в хилусе (hilus) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го аудиогенного судорожного припадка. (б) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение содержания фосфорилированных активных(Thr202/Tyr204) ERK1/2-киназ во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (DG IM), в гранулярном слое зубчатой извилины (DG), в stratum lucidum (str luc), в CA4-поле гиппокампа (CA4) и в хилусе (hilus) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 21-го аудиогенного судорожного припадка. (с) — репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания ERK1/2(Thr202/Tyr204) в зубчатой извилине и гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (д, е) — репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания ERK1/2(Thr202/Tyr204) в stratum lucidum и в зубчатой извилине крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Графики (а) и (б) показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (а.у.). Иммуногистохимические данные представлены как среднее $\pm$ SEM. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

щейся по мере развития феноменов височной эпилепсии продукции глутамата.

Высокая экспрессия VGLUT1 после 14- и 21-дневного киндлинга была выявлена в грануляр-

ных клетках и в молекулярном слое зубчатой извилины, где была также показана повышенная активность ERK1/2-киназ (рис. 5а, 5б, 5с). Содержание VGLUT2 после 14-дневного киндлинга не отлича-

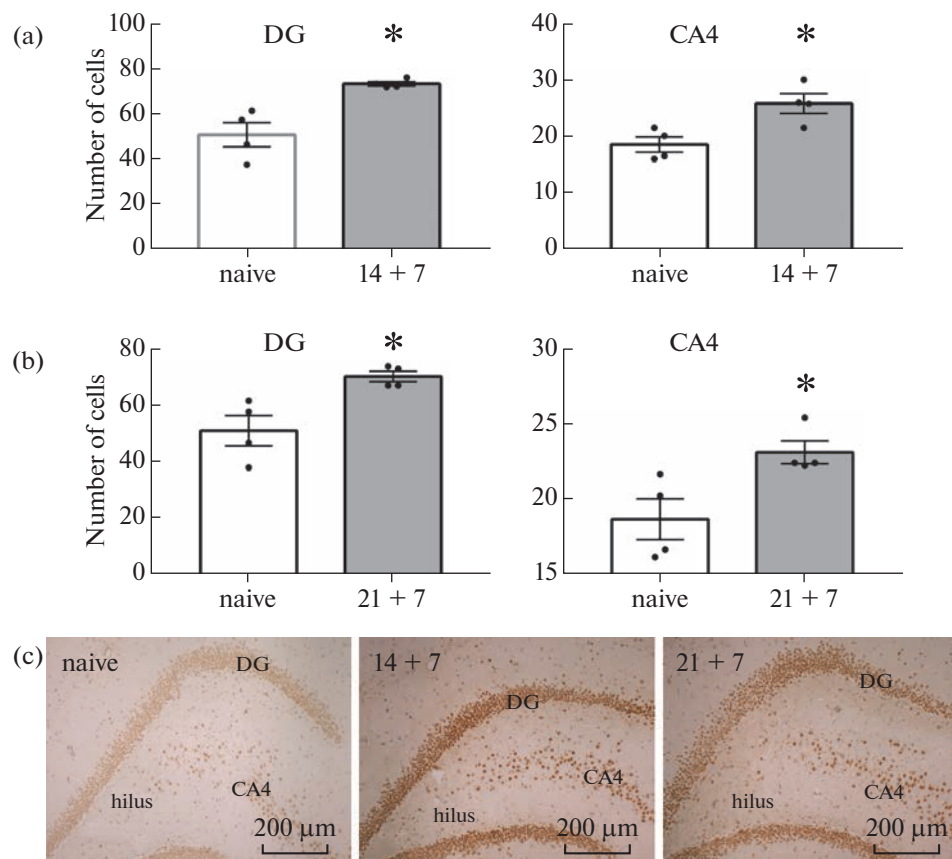


Рис. 2. Анализ транскрипционного фактора CREB в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (а) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, ядра которых содержат фосфорилированный активный (Ser133) CREB в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в CA4-поле гиппокампа (CA4) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го аудиогенного судорожного припадка. (б) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, ядра которых содержат фосфорилированный активный (Ser133) CREB в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в CA4-поле гиппокампа (CA4) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 21-го аудиогенного судорожного припадка. (с) — репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания CREB (Ser133) в зубчатой извилине и гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (е) — репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания (Ser133) CREB в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Графики (а) и (б) показывают число иммунопозитивных ядер нейронов (number of cells). Иммуногистохимические данные представлены как среднее $\pm$ SEM. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

лось от базального уровня, а после 21-дневной экспозиции действию звука было повышено только в хилусе (рис. 5d, 5e).

Мы оценили уровень экспрессии рецепторов глутамата через неделю после окончания 21-дневного киндлинга. Уровень экспрессии субъединицы GluA1 AMPA-рецепторов не отличался от контрольного уровня. Также не менялась экспрессия субъединиц GluN2A и GluN2B ионотропных NMDA-рецепторов и метаботропного рецептора mGluR5. Однако уровень mGluR1 был значительно выше через неделю после окончания киндлинга, что свидетельствует о длительном нарушении его экспрессии (рис. 6a–6g).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было показано, что аудиогенный киндлинг крыс линии КМ в течение 14 и 21 дня вы-

зывает появление лимбических генерализованных судорог [17], что позволяет говорить о развитии феномена, сходного с височной эпилепсией человека. В настоящей работе проведенный анализ глутаматергических нейронов гиппокампа крыс через 7 дней после завершения последнего судорожного припадка показал хронические нарушения в молекулярных механизмах регуляции активности нейронов, возникающих в результате формирования феномена, сходного с височной эпилепсией человека.

В регуляции глутаматергических нейронов активное участие принимают ERK1/2-киназы, вовлеченные в контроль за транскрипцией различных генов и отвечающие за фосфорилирование многих белков, участвующих на разных этапах в регуляции глутаматергической трансмиссии [19]. Участие этих киназ в реализации эпилептиформной активности хорошо доказано. В частности, по-

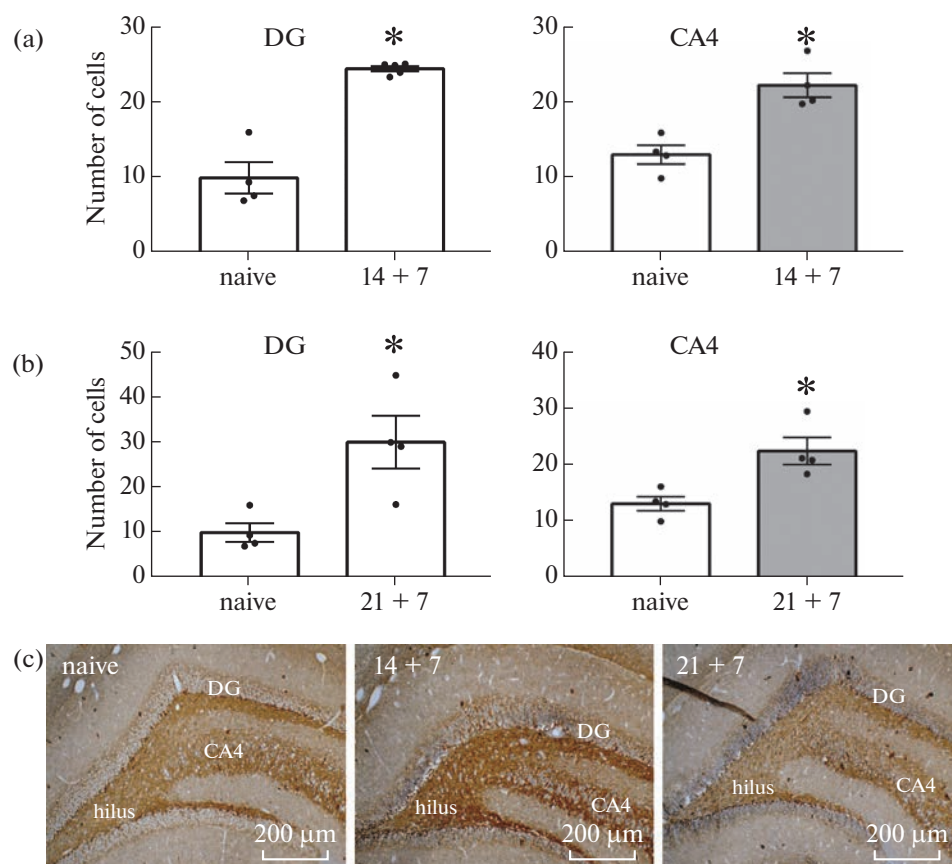


Рис. 3. Анализ транскрипционного фактора Fra1 в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (а) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, ядра которых содержат Fra1 в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в СА4-поле гиппокампа (CA4) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го аудиогенного судорожного припадка. (б) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, ядра которых содержат Fra1 в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в СА4-поле гиппокампа (CA4) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 21-го аудиогенного судорожного припадка. (с) — репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания Fra1 (голубой цвет иммуногистохимической реакции) в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Графики (а) и (б) показывают число иммунопозитивных ядер нейронов (number of cells). Иммуногистохимические данные представлены как среднее $\pm$ SEM. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

вышенная экспрессия ERK1/2 показана с помощью транскриптомного анализа нижних бугров четверохолмия крыс линии КМ [20]. Повышенная активность киназ у трансгенных мышей приводила к формированию у них судорожных состояний [21], а ингибирование ERK1/2 вызывало торможение судорожной активности у крыс линии КМ, приводившее к отмене судорожных припадков в ответ на звуковую стимуляцию [22]. Также в экспериментах с использованием пилокарпина, во время спонтанных судорог было показано значительное увеличение фосфорилирования pERK в гранулярных клетках, во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины и в области, содержащей мшистые волокна, при этом через 30 мин после спонтанного припадка уровень фосфорилирования pERK практически снижался до контрольных значений [18]. Эти данные позволяют предположить, что повышенное содержание pERK может быть одним из самых ранних иммуногистохимических ин-

дикаторов активации нейронов во время спонтанного припадка. Однако наши данные свидетельствуют о значительной активации ERK1/2-киназ через неделю после окончания как краткосрочной, так и длительной ежедневной экспозиции действию звука в пирамидных нейронах СА4-поля гиппокампа, в хилусе и в области пролегания мшистых волокон СА3-4 поля. Активация ERK1/2-киназ во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины, где расположены дендриты гранулярных клеток, контактирующие с аксонами глутаматергических нейронов перфорантного пути [23], позволяет говорить об усиленном возбуждающем входе из энторинальной коры, что приводит к длительно сохраняющейся активации гранулярных клеток. Повышение содержания активной формы ERK1/2 в мшистых волокнах позволяет предположить усиление выведения глутамата гранулярными клетками и соответственно активацию пирамидных нейронов поля СА4, где активность ERK1/2-киназ также

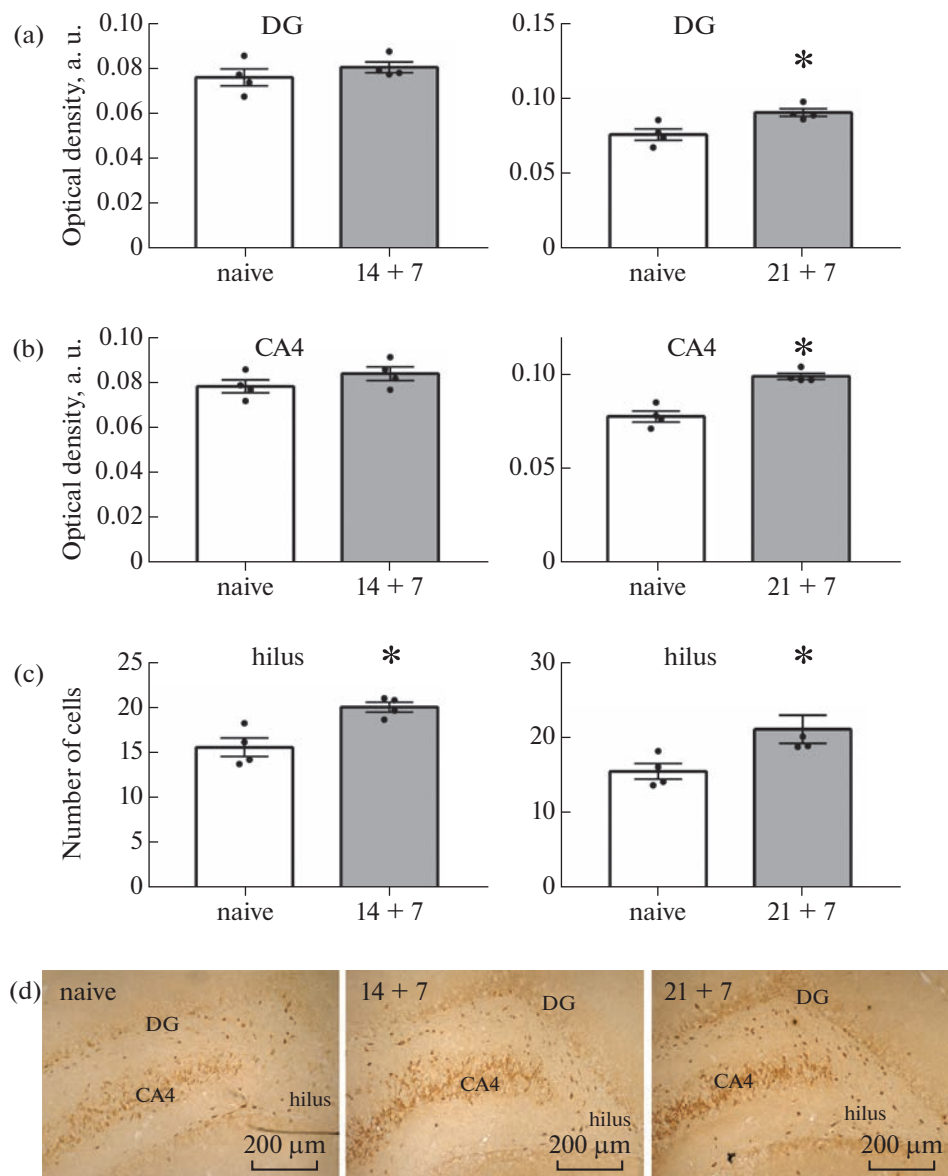


Рис. 4. Анализ глутаминазы в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (а, б) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение содержания глутаминазы в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в СА4-поле гиппокампа крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го или 21-го аудиогенных судорожных припадков. (с) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, содержащих глутаминазу крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го или 21-го аудиогенных судорожных припадков. Графики (а) и (б) показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (а. у.). График (с) показывает число иммунопозитивных нейронов (number of cells). (d) — репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания глутаминазы в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Иммуногистохимические данные представлены как среднее $\pm$ SEM. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

оставалась повышенной через неделю после окончания киндлинга. Известно, что активация ERK1/2-киназ вызывает усиление активности транскрипционного фактора CREB [23, 24]. Транскрипционный фактор CREB активно участвует в развитии эпилептиформных состояний. Повышенная активность CREB приводит к повышенной возбудимости гиппокампа, провоцирует приступы и вызывает хронические эпилептические судорожные

расстройства [25]. Повышенная активность ERK1/2-киназ в гранулярных нейронах зубчатой извилины и в пирамидных нейронах СА4 поля гиппокампа после окончания 14- и 21-дневной экспозиции действию звука сопровождалась увеличением содержания фосфорилированной активной формы CREB в этих клетках, что свидетельствует о длительно сохраняющейся повышенной транскрипционной активности в этих клетках. Транскрипционный фак-

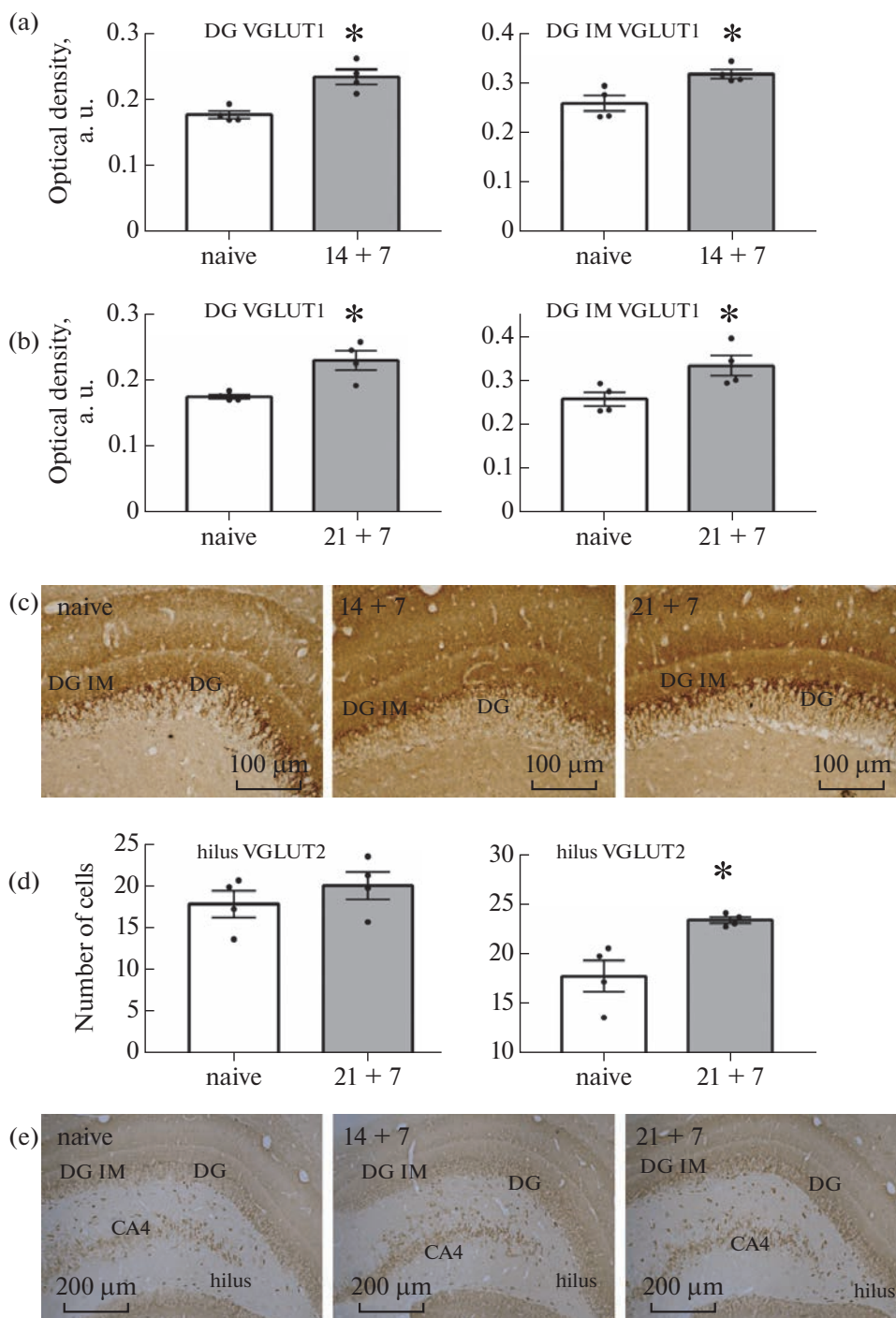


Рис. 5. Анализ везикулярных транспортеров глутамата VGLUT1 и VGLUT2 в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (a, b) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение содержания VGLUT1 в гранулярном и во внутреннем молекулярном слоях зубчатой извилины крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го или 21-го аудиогенных судорожных припадков. Графики (a) и (b) показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (a.u.). (c) – репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания VGLUT1 в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Иммуногистохимические данные представлены как среднее $\pm$ SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Масштабные линейки: 100 мкм. (d) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, содержащих VGLUT2 в хилусе (hilus) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го или 21-го аудиогенных судорожных припадков. График (d) показывает число иммунопозитивных нейронов (number of cells). (e) – репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания VGLUT2 в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Иммуногистохимические данные представлены как среднее $\pm$ SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

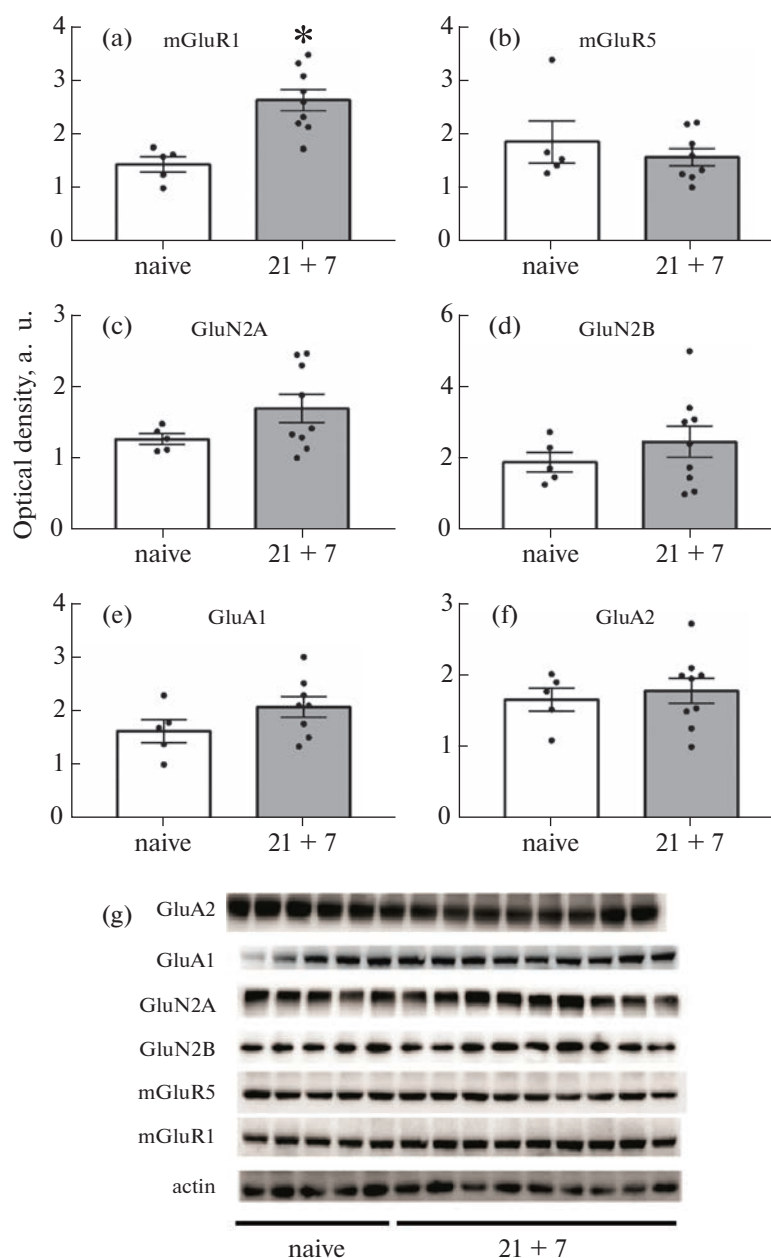


Рис. 6. Анализ рецепторов глутамата в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (a) — экспрессия mGluR1 в гиппокампе крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 21-го аудиогенного судорожного припадка была значительно выше, чем в контроле. Экспрессия mGluR5 (b), GluN2A (c), GluN2B (d), GluA1 (e) и GluA2 (f) не отличалась от контроля. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Графики показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (a.u.). (g) — репрезентативные изображения иммуноблота mGluR1, mGluR5, GluN2A, GluN2B, GluA1, GluA2 и актина в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу.

тор Fra1, входящий в состав AP1 комплекса, относится к семейству белков, регулируемых генами раннего ответа и активируется при эпилептиформных состояниях и, следовательно, вовлечен в регуляцию эпилептиформной активности [26, 27]. В регуляции экспрессии Fra1 также принимают участие ERK1/2-киназы [24, 28, 29]. Детальный анализ активности транскрипционного фактора Fra1 пока-

зал значительное повышение его экспрессии в ядрах глутаматергических нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины и пирамидных нейронах СА4-поля гиппокампа как после окончания 14-, так и 21-дневной экспозиции действию звука. Полученные данные об усилении активности ERK1/2-киназ и увеличении содержания ERK1/2-зависимых транскрипционных факторов в глутаматергических ней-

ронах гиппокампа через неделю после завершения киндлинга свидетельствуют о длительно сохраняющейся повышенной активности этих нейронов.

При височной эпилепсии показано, что увеличению высвобождения глутамата из нейронов способствует активация глутаминазы, фермента, расщепляющего глутамин [30]. Мы показали, что после 14-дневной звуковой стимуляции наблюдается увеличение числа клеток, экспрессирующих глутаминазу в хилусе, где в этот период наблюдается значительное увеличение числа вновь образованных эктопических глутаматергических нейронов [31]. Эктопические гранулярные клетки хилуса характеризуются постоянно повышенной активностью по сравнению с гранулярными клетками зубчатой извилины [32–36]. Эти клетки образуют аномальные связи с пирамидными нейронами СА3 [32, 37, 38], что может способствовать распространению эпилептиформной активности [36]. Через неделю после окончания длительной, 21-дневной стимуляции увеличение экспрессии глутаминазы наблюдалось не только в глутаматергических нейронах хилуса, но и в пирамидных нейронах СА3–СА4-полей гиппокампа и в гранулярных клетках зубчатой извилины, что свидетельствует об усиливающейся по мере развития феноменов, сходных с височной эпилепсией человека, продукции глутамата.

Известно, что повышенное содержание везикулярных транспортеров глутамата (VGLUT) коррелирует с усилением судорожной активности и гиперактивацией гранулярных клеток зубчатой извилины у хомячков, чувствительных к аудиогенной стимуляции [39]. Мы показали повышенное содержание VGLUT1 через неделю после завершения киндлинга после 14-дневной стимуляции в гранулярных клетках и в молекулярном слое зубчатой извилины, где наблюдалась повышенная активность ERK1/2-киназ, участвующих в регуляции синтеза транспортеров, что свидетельствует о длительно сохраняющейся активации глутаматергической трансмиссии. После 21-дневной стимуляции повышенное содержание VGLUT1 было показано только в телах клеток хилуса. Содержание VGLUT2 после 14- и 21-дневного киндлинга было повышено также только в хилусе, что свидетельствует о повышенной активности вновь образованных эктопических клеток.

На различных моделях височной эпилепсии было показано кратковременное нарушение экспрессии субъединиц GluA1 и GluA3 AMPA-рецепторов и субъединиц GluN2A и GluN2B NMDA-рецепторов [40–43]. Мы показали, что через неделю после окончания 21-дневной стимуляции уровень экспрессии AMPA-рецепторов глутамата GluA1 не отличался от контрольного уровня. Также не менялась экспрессия ионотропных рецепторов NMDA субъединицы GluN2A и метаболитного рецептора

mGluR5. Это можно также объяснить возвращением экспрессии этих рецепторов к базальному уровню через 7 дней после последнего судорожного припадка. При этом ежедневная звуковая стимуляция в течение 21 дня приводила к значительному повышению уровня метаболитного рецептора mGluR1, что свидетельствует о длительном нарушении его экспрессии. Известно, что активация рецепторов Gp1 (mGluR) в гиппокампе может трансформировать нормальную активность нейронов в пролонгированные эпилептиформные разряды, что приводит к развитию височной эпилепсии человека [44]. Гиперэкспрессия mGluR1 вызывает хронические эпилептиформные приступы у трансгенных мышей [45]. Активация глутаматергических нейронов при эпилептиформных состояниях приводит к усилению связывания рецепторов Gp1, что вызывает активацию ERK-киназ [46]. Кроме того, ингибирование фосфорилирования ERK1/2 предотвращает икталоподобные разряды, это позволяет предположить, что индуцированный активацией mGluR1 эпилептогенез также зависит от активности ERK-киназ [47]. Кроме того, показано, что активация mGluR1 приводит к высвобождению Ca^{2+} и усилению эксайтотоксичности [47, 48]. Ранее мы показали, что длительный киндлинг вызывает значительную гибель нейронов гиппокампа путем апоптоза [17], что, возможно, связано с увеличением содержания внутриклеточного Ca^{2+} , вызванного показанной нами длительной активацией mGluR1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что длительно сохраняющаяся повышенная активность ERK1/2-киназ, участвующих в регуляции большинства изученных нами маркеров регуляции глутаматергических нейронов у крыс линии КМ, может быть причиной повышенного уровня трансмиссии глутамата при длительной ежедневной экспозиции действию звука, приводящей к развитию феномена, сходного с височной эпилепсией человека, что позволяет говорить о хроническом характере выявленных нарушений. Повышенная активность глутаматергических нейронов гиппокампа, очевидно, приводит к дальнейшему развитию заболевания, усилению тяжести припадков и возникновению спонтанных судорог, характерных для височной эпилепсии. Известно, что активация глутаматергической трансмиссии приводит к возникновению эксайтотоксичности [49, 50]. Эксайтотоксичность является причиной многих нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Гентингтона, которые проявляются в снижении памяти, обучения и нейропластичности [51]. Мы предполагаем, что выявленные нами нарушения работы глутаматергических нейронов гиппокампа, приводящие к усилению продукции глутамата, яв-

ляются причиной сопутствующих дегенеративных и неврологических заболеваний. Показанные нами нарушения молекулярных механизмов регуляции продукции глутамата имеют важное значение, так как на сегодняшний день основное внимание сосредоточено на создании терапевтических средств на основе регуляции рецепторов и синаптической передачи. Меньшее внимание уделяется анализу внутриклеточных механизмов регуляции продукции нейротрансмиттеров. Выяснение точных молекулярных механизмов регуляции функционирования нейронов, дефекты которых носят хронический характер, может послужить основой для разработки новых подходов лечения не только височной эпилепсии, но и коррекции сопутствующих неврологических и дегенеративных заболеваний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с крысами проводились в соответствии с Директивой ЕС 86/609/ЕЕС по проведению экспериментов на животных и были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова (Протокол № 1-21 /2023 от 26.01.2023 комиссии по биоэтике, утвержденной Приказом Директора Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова № 8 от 24.01.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация — Е.В.Ч., А.П.Ф.; методология — Е.В.Ч., А.П.А., Л.С.Н.; формальный анализ — А.П.А., А.П.И., А.А.К.; исследование — А.П.А., А.П.И.; курирование данных — Е.В.Ч.; написание, подготовка первоначального проекта — А.П.А., Е.В.Ч.; написание — рецензирование и редактирование — Е.В.Ч., М.В.Г.; визуализация — А.П.И., Л.С.Н., А.А.К.; контроль — Е.В.Ч.; получение финансирования — Е.В.Ч. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00101).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keezer MR, Sisodiya SM, Sander JW (2016) Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol* 15: 106–115. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00225-2)
2. Vrinda M, Arun S, Srikumar BN, Kuttu BM, Shankararayan Rao BS (2019) Temporal lobe epilepsy-induced neurodegeneration and cognitive deficits: Implications for aging. *J Chem Neuroanat* 95: 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.02.005>
3. Epps SA, Weinshenker D (2013) Rhythm and blues: animal models of epilepsy and depression comorbidity. *Biochem Pharmacol* 85: 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.016>
4. Kanner AM (2008) Mood disorder and epilepsy: a neurobiologic perspective of their relationship. *Dialogues Clin Neurosci* 10: 39–45.
5. Barnes SJ, Pinel JP (2001) Conditioned effects of kindling. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 745–751. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00054-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00054-9)
6. Hannesson DK, Howland J, Pollock M, Mohapel P, Wallace AE, Corcoran ME (2001) Dorsal hippocampal kindling produces a selective and enduring disruption of hippocampally mediated behavior. *J Neurosci* 21: 4443–4450.
7. Kalinina A, Krekhno Z, Yee J, Lehmann H, Fournier NM (2022) Effect of repeated seizures on spatial exploration and immediate early gene expression in the hippocampus and dentate gyrus. *IBRO Neurosci Rep* 12: 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2021.12.008>
8. Mazarati A, Shin D, Auvin S, Caplan R, Sankar R (2007) Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. *Epilepsy Behav* 10: 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2007.02.001>
9. Kalynchuk LE (2000) Long-term amygdala kindling in rats as a model for the study of interictal emotionality in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 691–704. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00031-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00031-2)
10. Cole AJ (2000) Is epilepsy a progressive disease? The neurobiological consequences of epilepsy. *Epilepsia* 41 Suppl 2: S13–S22. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb01520.x>
11. Blumcke I (2009) Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. *Epilepsy Behav* 15: 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.02.033>
12. Hsu PW, Chang CN, Tseng CK, Wei KC, Wang CC, Chuang CC, Huang YC (2007) Treatment of epileptogenic cavernomas: surgery versus radiosurgery. *Cerebrovasc Dis* 24: 116–120; discussion 121. <https://doi.org/10.1159/000103126>
13. Zappone CA, Sloviter RS (2004) Translaminar disinhibition in the rat hippocampal dentate gyrus after seizure-induced degeneration of vulnerable hilar neurons. *J Neurosci* 24: 853–864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1619-03.2004>
14. Kobayashi M, Buckmaster PS (2003) Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 23: 2440–2452.
15. Navidhamidi M, Ghasemi M, Mehranfar N (2017) Epilepsy-associated alterations in hippocampal excitability. *Rev Neurosci* 28: 307–334. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0059>
16. Vinogradova LV (2008) Audiogenic kindling in Wistar and WAG/Rij rats: kindling-prone and kindling-resistant subpopulations. *Epilepsia* 49: 1665–1674. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01617.x>
17. Kulikov AA, Naumova AA, Dorofeeva NA, Ivlev AP, Glazova MV, Chernigovskaya EV (2022) Dynamics of neurodegeneration in the hippocampus of Krushinsky–Molodki-

- na rats correlates with the progression of limbic seizures. *Epilepsy Behav* 134: 108846.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2022.108846>
18. *Houser CR, Huang CS, Peng Z* (2008) Dynamic seizure-related changes in extracellular signal-regulated kinase activation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 156: 222–237.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.010>
19. *Sun J, Nan G* (2017) The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review). *Int J Mol Med* 39: 1338–1346.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2962>
20. *Chuvakova LN, Funikov SY, Rezykh AP, Davletshin AI, Evgen'ev MB, Litvinova SA, Fedotova IB, Poletaeva, II, Garbuz DG* (2021) Transcriptome of the Krushinsky-Molodkina Audiogenic Rat Strain and Identification of Possible Audiogenic Epilepsy-Associated Genes. *Front Mol Neurosci* 14: 738930.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.738930>
21. *Nateri AS, Raivich G, Gebhardt C, Da Costa C, Naumann H, Vreugdenhil M, Makwana M, Brandner S, Adams RH, Jefferys JG, Kann O, Behrens A* (2007) ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J* 26: 4891–4901.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601911>
22. *Glazova MV, Nikitina LS, Hudik KA, Kirillova OD, Dorofeeva NA, Korotkov AA, Chernigovskaya EV* (2015) Inhibition of ERK1/2 signaling prevents epileptiform behavior in rats prone to audiogenic seizures. *J Neurochem* 132: 218–229.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12982>
23. *Roskoski R, Jr* (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66: 105–143.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
24. *Lu N, Malemud CJ* (2019) Extracellular Signal-Regulated Kinase: A Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression. *Int J Mol Sci* 20.
<https://doi.org/10.3390/ijms20153792>
25. *Wang G, Zhu Z, Xu D, Sun L* (2020) Advances in Understanding CREB Signaling-Mediated Regulation of the Pathogenesis and Progression of Epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg* 196: 106018.
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106018>
26. *Gass P, Herdegen T* (1995) Neuronal expression of AP-1 proteins in excitotoxic-neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesions. *Prog Neurobiol* 47: 257–290.
27. *Pozas E, Aguado F, Ferrer I* (1999) Fra-1 immunoreactivity in the rat brain during normal postnatal development and after injury in adulthood. *Neurosci Res* 33: 137–145.
[https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(98\)00123-0](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(98)00123-0)
28. *Jiang X, Xie H, Dou Y, Yuan J, Zeng D, Xiao S* (2020) Expression and function of FRA1 protein in tumors. *Mol Biol Rep* 47: 737–752.
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-05123-9>
29. *Sobolev VV, Khashukoeva AZ, Evina OE, Geppe NA, Chebysheva SN, Korsunskaya IM, Tchepourina E, Mezentshev A* (2022) Role of the Transcription Factor FOSL1 in Organ Development and Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 23.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031521>
30. *Albrecht J, Zielinska M* (2017) Mechanisms of Excessive Extracellular Glutamate Accumulation in Temporal Lobe Epilepsy. *Neurochem Res* 42: 1724–1734.
<https://doi.org/10.1007/s11064-016-2105-8>
31. *Kulikov AA, Naumova AA, Aleksandrova EP, Glazova MV, Chernigovskaya EV* (2021) Audiogenic kindling stimulates aberrant neurogenesis, synaptopodin expression, and mossy fiber sprouting in the hippocampus of rats genetically prone to audiogenic seizures. *Epilepsy Behav* 125: 108445.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108445>
32. *Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL* (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. *J Neurosci* 20: 6144–6158.
33. *Danzer SC* (2019) Adult Neurogenesis in the Development of Epilepsy. *Epilepsy Curr* 19: 316–320.
<https://doi.org/10.1177/1535759719868186>
34. *Dashtipour K, Tran PH, Okazaki MM, Nadler JV, Ribak CE* (2001) Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Res* 890: 261–271.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03119-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03119-x)
35. *Bielefeld P, van Vliet EA, Gorter JA, Lucassen PJ, Fitzsimons CP* (2014) Different subsets of newborn granule cells: a possible role in epileptogenesis? *Eur J Neurosci* 39: 1–11.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12387>
36. *Althaus AL, Moore SJ, Zhang H, Du X, Murphy GG, Parent JM* (2019) Altered Synaptic Drive onto Birthdated Dentate Granule Cells in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci* 39: 7604–7614.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0654-18.2019>
37. *Scharfman HE* (2019) The Dentate Gyrus and Temporal Lobe Epilepsy: An “Exciting” Era. *Epilepsy Curr* 19: 249–255.
<https://doi.org/10.1177/1535759719855952>
38. *Parent JM, Kron MM* (2012) Neurogenesis and Epilepsy. In: *Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV* (Eds) *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Bethesda (MD).
39. *Kang TC, Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Kim DW, Kang JH, Won MH, Kwon OS, Choi SY* (2005) Valproic acid reduces enhanced vesicular glutamate transporter immunoreactivities in the dentate gyrus of the seizure prone gerbil. *Neuropharmacology* 49: 912–921.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.08.007>
40. *Szczurowska E, Mares P* (2013) NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiol Res* 62: S21–S38.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.932662>
41. *Chen Q, He S, Hu XL, Yu J, Zhou Y, Zheng J, Zhang S, Zhang C, Duan WH, Xiong ZQ* (2007) Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis. *J Neurosci* 27: 542–552.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-06.2007>
42. *Di Maio R, Mastroberardino PG, Hu X, Montero L, Greenamyre JT* (2011) Pilocarpine alters NMDA receptor ex-

- pression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. *Neurobiol Dis* 42: 482–495.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.012>
43. Ahmed MM, Carrel AJ, Cruz Del Angel Y, Carlsen J, Thomas AX, Gonzalez MI, Gardiner KJ, Brooks-Kayal A (2021) Altered Protein Profiles During Epileptogenesis in the Pilocarpine Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol* 12: 654606.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.654606>
 44. Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, van Veelen CW, van Rijen PC, Ramkema M, Troost D (2003) Expression and cell distribution of group I and group II metabotropic glutamate receptor subtypes in taylor-type focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 44: 785–795.
<https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.54802.x>
 45. Pitsch J, Schoch S, Gueler N, Flor PJ, van der Putten H, Becker AJ (2007) Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 26: 623–633.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.03.003>
 46. Ribeiro FM, Paquet M, Cregan SP, Ferguson SS (2010) Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9: 574–595.
<https://doi.org/10.2174/187152710793361612>
 47. Kano M, Watanabe T (2017) Type-1 metabotropic glutamate receptor signaling in cerebellar Purkinje cells in health and disease. *F1000Res* 6: 416.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.10485.1>
 48. Ferraguti F, Crepaldi L, Nicoletti F (2008) Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol Rev* 60: 536–581.
<https://doi.org/10.1124/pr.108.000166>
 49. Duman RS, Sanacora G, Krystal JH (2019) Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron* 102: 75–90.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.013>
 50. Murrough JW, Abdallah CG, Mathew SJ (2017) Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. *Nat Rev Drug Discov* 16: 472–486.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.16>
 51. McGrath T, Baskerville R, Rogero M, Castell L (2022) Emerging Evidence for the Widespread Role of Glutamatergic Dysfunction in Neuropsychiatric Diseases. *Nutrients* 14.
<https://doi.org/10.3390/nu14050917>

CHRONIC DYSREGULATION OF GLUTAMATERGIC TRANSMISSION IN THE HIPPOCAMPUS OF KRUSHINSKY–MOLODKINA RATS INDUCED BY REPEATED EPILEPTIFORM SEIZURES

E. P. Aleksandrova^a, A. P. Ivlev^a, A. A. Kulikov^a, L. S. Nikitina^a,
M. V. Glazova^a, and E. V. Chernigovskaya^{a, #}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: chern755@mail.ru*

Temporal lobe epilepsy is characterised by the development of associated neurological and psychiatric disorders. One of the possible causes is obviously a disturbance in the balance of the excitatory and inhibitory neurotransmitter systems of the hippocampus. Chronic abnormalities in the molecular mechanisms of regulation of hippocampal glutamatergic system activity in temporal lobe epilepsy are currently poorly understood. In the present study, we used Krushinsky–Molodkina (KM) rats subjected to repeated audiogenic seizures to simulate temporal lobe epilepsy. Molecular mechanisms of regulation of glutamate production by hippocampal neurons were analysed one week after the end of short-term (14 seizures) and long-term (21 seizures) kindling. In the hippocampus of KM rats, kindling results in activation of ERK1/2 kinases as well as activation of the transcription factor CREB and increased expression of the transcription factor Fra1, glutaminase and the vesicular glutamate transporters VGLUT1 and 2, that is proteins responsible for glutamate production. These data indicate increased activity of glutamatergic hippocampal neurons persisting for a week at rest after the completion of the last audiogenic stimulation. Enhanced expression of mGluR1 glutamate receptors, whose activation is known to result in Ca²⁺ release and increased excitotoxicity, is also shown. Long-term enhancement of glutamatergic transmission induced by repeated epileptiform seizures is not only responsible for further epileptogenesis, but may also underlie the development of neurodegenerative complications.

Keywords: epilepsy, Krushinsky–Molodkina rats, audiogenic kindling, glutamate, hippocampus