

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ НИЖНИХ БУГРОВ
ЧЕТВЕРОХОЛМИЯ КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ
ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СУДОРОЖНОЙ ГОТОВНОСТИ

© 2019 г. Е. В. Черниговская^{1, *}, Н. А. Дорофеева¹, О. О. Лебеденко¹,
С. Д. Николаева¹, А. А. Наумова¹, Е. А. Лаврова¹, М. В. Глазова¹

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

*E-mail: chern755@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2019 г.

После доработки 05.04.2019 г.

Принята к публикации 12.04.2019 г.

Аудиогенные судороги у крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) возникают в ходе постнатального онтогенеза в конце третьего месяца жизни и осуществляются за счет активации ряда структур ствола мозга, включая нижние бугры четверохолмия. Для выявления особенностей формирования нижних бугров четверохолмия в постнатальном онтогенезе у крыс линии КМ при развитии у них рефлекторной аудиогенной эпилепсии проведен анализ нейрохимических маркеров состояния глутамат- и ГАМК-ергических нейронов – на 14-й, 30-й, 60-й и 120-й дни жизни. В качестве контроля использовали крыс линии Вистар соответствующих возрастов. В критические периоды развития судорожной готовности (P14, P30 и P60) показан значительно повышенный уровень активности ERK1/2 киназ у крыс линии КМ и усиление экспрессии ERK-зависимых белков GluN2B-субъединицы NMDA-рецепторов (NR2B) и VGLUT2, что может быть причиной возникновения дефектов в работе глутаматергических нейронов нижних бугров четверохолмия, приводящих к развитию эпилептиформной активности. У взрослых крыс линии КМ (P120) по сравнению с молодыми крысами линии КМ активность ERK1/2 киназ снижается, как и уровень экспрессии белков-маркеров активности глутаматергической системы NR2B и VGLUT2. Также у крыс линии КМ в ходе формирования судорожной готовности показано достоверно повышенное содержание маркеров активности ГАМК-ергической системы – парвальбумина и GAD67. При этом у взрослых крыс линии КМ экспрессия парвальбумина и GAD67 падает значительно ниже уровня, характерного для взрослых крыс линии Вистар, что является одним из механизмов завершения формирования судорожной готовности и возникновения стабильных судорог в ответ на звуковой стимул. Показанные нами нейрохимические нарушения в ходе формирования нижних бугров четверохолмия могут вызывать отставленные изменения, приводящие к возникновению рефлекторной аудиогенной эпилепсии.

Ключевые слова: эпилепсия, нижние бугры четверохолмия, онтогенез, глутамат, ГАМК, ERK1/2, крысы линии Крушинского–Молодкиной

DOI: 10.1134/S0869813919060013

Дефекты развития в онтогенезе и/или генетические нарушения могут приводить к различным патологиям, включая эпилепсию. Использование генетических моделей эпилепсии является наиболее адекватным методическим подходом для поиска мо-

лекулярных и клеточных механизмов развития эпилептиформной активности. Существует несколько линий крыс чувствительных к звуку. Характер протекания судорожных припадков у крыс линий GEPR-3 и 9, WAR [1–3] и Крушинского–Молодкиной (КМ) [4] сходен.

Ключевой пейсмейкерной структурой в запуске аудиогенного припадков являются нижние бугры четверохолмия, затем волна возбуждения поднимается к верхним буграм с активацией глубоких слоев которых связано начало дикого бега. После этого возбуждение охватывает периакведуктальное (центральное) серое вещество, ретикулярную формацию и черную субстанцию, взаимодействующие через стволые структуры со спинным мозгом, что соответствует клонико-тонической фазе судорог. На стадии постиктальной депрессии активность проявляет лишь периакведуктальное (центральное) серое вещество [5–7]. У крыс линии Вистар с аудиогенной эпилепсией WAR [8], грызунов после аудиогенного прайминга [9, 10] и крыс линии GEPR описана хроническая гипервозбудимость нижних бугров четверохолмия [1, 3]. Предполагается, что это может быть связано со сниженной активностью ГАМК-ергических нейронов, повышенным уровнем глутамата [11]. Пониженное содержание транспортеров ГАМК и глутамата отмечено у крыс линии GEPR во всех отделах мозга, включая четверохолмие [12]. У аудиогенно-чувствительных хомяков [13] и у крыс линии GEPR [14] показан низкий уровень ГАМК в нижних буграх четверохолмия, что возможно является триггерным механизмом для инициации судорог и является причиной возникновения повышенной судорожной готовности.

В нашем исследовании была использована инбредная линия крыс КМ с повышенной судорожной готовностью [15]. Судорожная готовность у крыс линии КМ развивается в ходе постнатального онтогенеза и полностью формируется только к концу третьего месяца жизни, что позволяет охарактеризовать различные этапы формирования эпилептиформной активности при анализе крыс разного возраста.

В качестве нейробиохимических маркеров состояния глутамат- и ГАМК-ергических нейронов нижних бугров четверохолмия в работе использованы везикулярный транспортер глутамата VGLUT2, GluN2B-субъединица NMDA-рецепторов (NR2B), GAD67 фермент синтеза ГАМК, парвальбумин – кальций-связывающий белок, маркер электрической и метаболической активности нейронов. Также была проведена оценка и уровня фосфорилирования ERK1/2 киназ. Уровень фосфорилирования ERK1/2 киназ позволяет судить об активности нейронов в нижних буграх четверохолмия [16, 17]. Повышение активности ERK1/2 киназ в нейронах указывает на активацию ряда внутриклеточных процессов, включая усиление синаптической передачи [17]. В качестве маркера экзоцитоза был использован синапсин 1, отвечающий за связь медиаторных везикул с цитоскелетом. Активность синапсина 1 зависит от уровня его фосфорилирования, в том числе обусловленного работой ERK1/2 киназ. Молекулярные механизмы нарушений нейрональной активности при эпилепсии, в том числе роль ERK1/2 киназ и их мишеней, хорошо изучены в вышележащих отделах мозга – в гиппокампе и в коре [18–21]. ERK1/2 киназы являются одним из факторов, участвующих в реализации судорожной активности и могут быть одним из молекулярных субстратов формирования эпилепсии [19]. Ранее мы показали участие ERK1/2 киназ в выведении глутамата за счет регуляции экспрессии белков экзоцитоза SNAP25 и синапсина 1 в ходе судорожных припадков как у интактных, так и у эпилептизированных крыс линии КМ [22]. Однако в четверохолмий роль ERK1/2 киназ и их мишеней в регуляции состояния глутамат- и ГАМК-ергических нейронов в ходе эпилептогенеза до настоящего времени не изучалась. Целью данного исследования было выявление нейробиохимических механизмов регуляции нейрональной активности в нижних буграх четверохолмия при развитии эпилепсии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе использовали крыс линий КМ и Вистар. Крыс содержали по пять животных в клетке при естественном освещении и свободном доступе к еде и воде. Все процедуры с использованием животных проводились в соответствии с Правилами обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, согласующимися с директивой Европарламента 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. Для выявления межлинейных различий в нейрохимической организации нижних бугров четверохолмия были использованы интактные крысы линий Вистар и КМ в возрасте 14 дней (P14), одного месяца (P30), двух месяцев (P60) и взрослые крысы (P120). В каждой экспериментальной группе было по 10 животных линии Вистар и 10 крыс линии КМ. Все группы крыс линий Вистар и КМ соответствующих возрастов были выведены из эксперимента в один день. Мозг разделяли на две половины в сагиттальной плоскости. Далее из одной половины иссекали нижние бугры четверохолмия для приготовления проб для Вестерн-блот анализа. Вторую половину мозга фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере для последующего иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимический метод. Чередующиеся серии срезов толщиной 10 мкм изготавливали на криостате. После стандартной предварительной обработки срезы инкубировали с первичными антителами к p-ERK1/2 (поликлональные кроличьи, Thr202/Tyr204, 1:250, 4376, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, США); ERK1/2 (поликлональные кроличьи, 1 : 1000; 9102 Cell Signaling), VGLUT2 (мышинные, 1 : 200, MAB5504, Abcam plc, Cambridge, Великобритания); GAD 67 (моноклональные мышинные, 1 : 750; MAB5406, Millipore, Temecula, США), парвальбумин (поликлональные кроличьи, 1 : 200, PA1-933, ThermoFisher scientific), NR2B (поликлональные кроличьи, 1 : 100, ab65875, Abcam plc, Cambridge, Великобритания), синапсин 1 (поликлональные кроличьи, 1 : 500, AB1543P, Millipore, Temecula, США), фосфосинапсин 1 (Ser62.67) (поликлональные кроличьи, 1 : 500, AB9848, Millipore, Temecula, США), в течение 12 ч при комнатной температуре. После промывки в фосфатном буфере срезы обрабатывали биотинилированными вторичными антителами в течение часа при комнатной температуре (Vector Labs) и стрептавидин-пероксидазным комплексом (Sigma Aldrich). Проявление реакции проводили с помощью диаминобензидина (0.05%) с добавлением перекиси водорода (0.01%). Иммуногистохимические реакции на каждый белок проводились одновременно на всех срезах одной серии в каждой экспериментальной группе животных в стандартных условиях. Для оценки специфичности иммунного окрашивания в каждом случае делали отрицательный контроль (выполнение иммуногистохимической реакции без первичных антител), результатом чего было отсутствие иммунного окрашивания. Анализ проводили с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Imager A1.

ERK1/2 и парвальбумин в глутамат- и ГАМК-ергических нейронах выявляли методом двойного иммунофлуоресцентного выявления VGLUT2 и GAD67 с помощью вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488 (1 : 1000) или Alexa Fluor 568 (1 : 1000) (Invitrogen). Ядра клеток выявляли с помощью DAPI (Sigma) в концентрации 1 : 2000.

Вестерн-блот. Для приготовления проб из мозга иссекали нижние бугры четверохолмия. Образцы гомогенизировали в лизирующем буфере, содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз. Лизаты центрифугировали 15 мин при 12000 g при комнатной температуре, затем отбирали супернатант, после чего к одной части отобранного супернатанта добавляли 2 части 3x SDS буфера (0.2 M Tris-HCl, pH 6.7; 6% SDS; 15% глицерина; 10% β-меркаптоэтанола и 0.003% бромфенолового синего) и инкубировали 10 мин при температуре 96°C. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE). Далее белковые

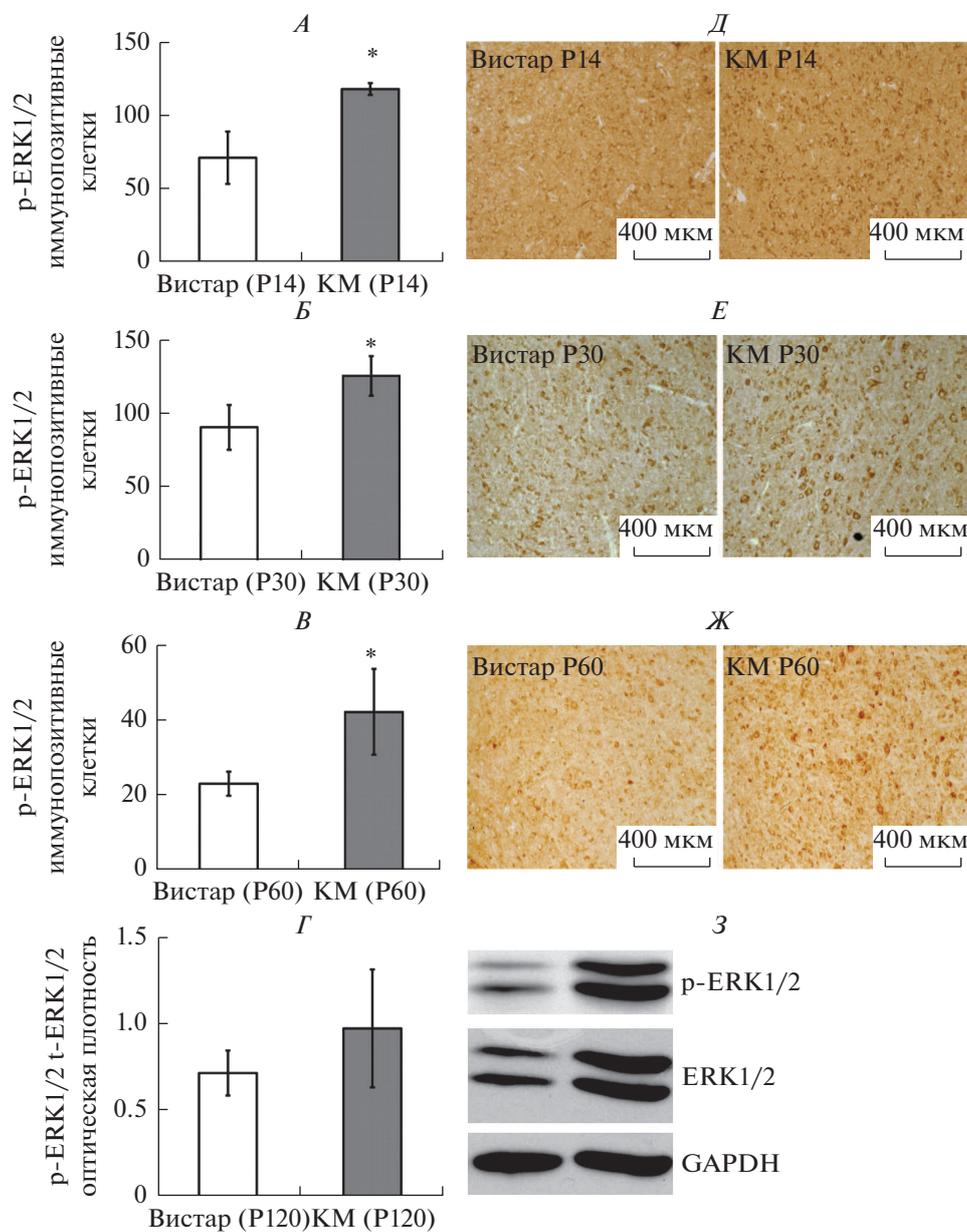


Рис. 1. Анализ содержания фосфо-ERK1/2 в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на разных стадиях формирования судорожной готовности. На графиках представлено число pERK1/2-иммунореактивных клеток в центральном ядре нижних бугров четверохолмия крыс линий КМ (белые столбики) и Вистар (серые столбики) на P14 (А), P30 (Б), P60 (В) и P120 (Г), среднее значение ± стандартное отклонение. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Иммуногистохимическое выявление фосфо-ERK1/2 в нижних буграх четверохолмия крыс линии КМ и Вистар на P14 (Д), P30 (Е), P60 (Ж) и P120 (З).

фракции переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences, Freiburg, Германия). Мембраны инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке или в 3%-ном растворе БСА в течение 40 мин. Затем в течение ночи мембраны инкубировали с первичными антителами p-ERK1/2 (поликлональные кроличьи, Thr202/Tyr204, 1 : 250, 4376, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, США); ERK1/2 (поликлональные кроличьи, 1 : 1000; 9102 Cell Signaling), VGLUT2 (мышинные, 1 : 2000, MAB5504, Abcam plc, Cambridge, Великобритания); GAD 67 (моноклональные мышинные, 1 : 1000; MAB5406, Millipore, Temecula, CA, США), парвальбумин (поликлональные кроличьи, 1 : 2000, PA1-933, ThermoFisher scientific), NR2B (поликлональные кроличьи, 1 : 750, ab65875, Abcam plc, Cambridge, Великобритания), синапсин 1 (поликлональные кроличьи, 1 : 1000, AB1543P, Millipore, Temecula, CA, США) и фосфо-синапсин 1 (Ser62.67) (поликлональные кроличьи, 1 : 1000, AB9848, Millipore, Temecula, CA, США). Для визуализации результатов использовали ECL plus-систему (Amersham Biosciences). Денситометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ. Уровень экспрессии специфических белков был скорректирован по сигналу GAPDH (моноклональные мышинные, 1 : 1000, ab8245, Abcam plc, Cambridge, Великобритания), выявляемого для определения уровня общего количества белка в пробах. Уровень фосфорилирования ERK1/2 киназ и синапсина был скорректирован по уровню общего количества этих белков в пробах.

Морфофункциональный анализ материала. Оценка содержания белков в нижних буграх четверохолмия проводилась с помощью измерения оптической плотности иммунопопозитивного вещества в телах клеток и в нейропиле. Также был проведен подсчет иммунореактивных нейронов на единицу площади на микрофотографиях пяти срезов от каждого животного с помощью программного обеспечения ВидеоТест (ООО “ВидеоТест”) и на пленках Вестерн-блот анализа с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health). Данные были выражены в условных единицах оптической плотности.

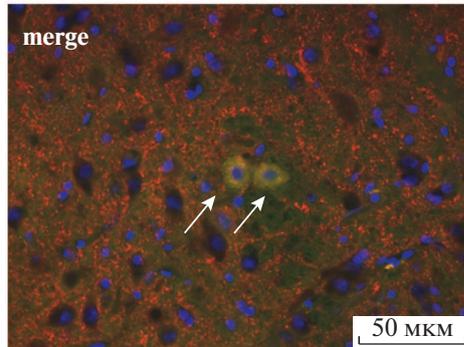
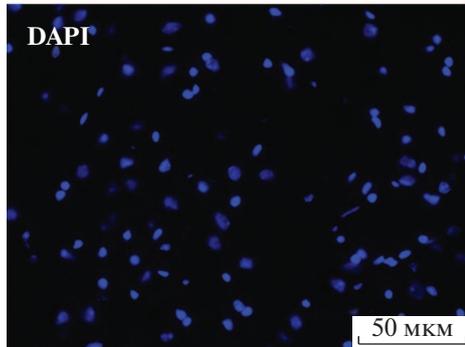
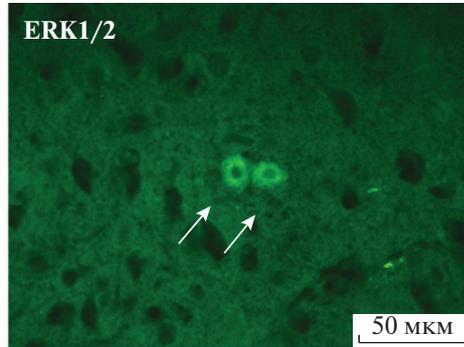
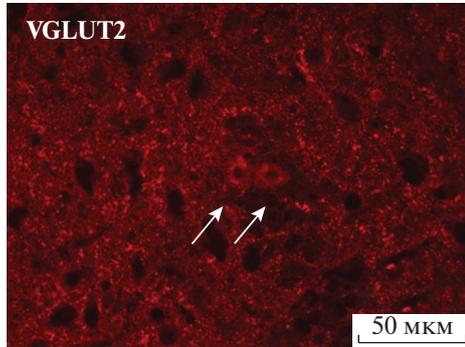
Статистический анализ результатов. Все полученные данные обрабатывались статистически по критерию Манна–Уитни. При оценке достоверности отличий между группами n равнялось количеству животных в группе. В каждой экспериментальной группе крыс было исследовано по 5 крыс методом иммуногистохимии и по пять крыс методом Вестерн-блота. Данные представлены в виде среднего значения по каждой группе животных \pm стандартное отклонение для среднего значения. Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В центральном ядре нижних бугров четверохолмия крыс линии КМ на 14-й день постнатального развития и у 1- и 2-месячных крыс по сравнению с крысами линии Вистар с помощью иммуногистохимического метода показано увеличение числа нейронов, содержащих активную фосфорилированную форму ERK1/2 киназ (рис. 1). У 4-месячных крыс КМ Вестерн-блот анализом было показано увеличение белка ERK1/2 (Вистар 1.0 ± 0.3 и КМ 1.6 ± 0.6 у.е., U-критерий, $p < 0.05$) и его активной формы (Вистар 0.9 ± 0.2 и КМ 1.6 ± 0.5 у.е., U-критерий, $p < 0.05$), однако активность киназ, оцененная по соотношению содержания активной и неактивной форм не отличалась от характерной для крыс линии Вистар.

Рис. 2. Флуоресцентные микрофотографии. Колокализация фосфо-ERK1/2 киназ (зеленая), VGLUT2 (красная) и DAPI (синяя) в центральном ядре нижних бугров четверохолмия взрослых крыс КМ (А). Колокализация парвальбумина (PV, зеленая), GAD67 (красная) и DAPI (синяя) в центральном ядре нижних бугров четверохолмия (Б).

A



B

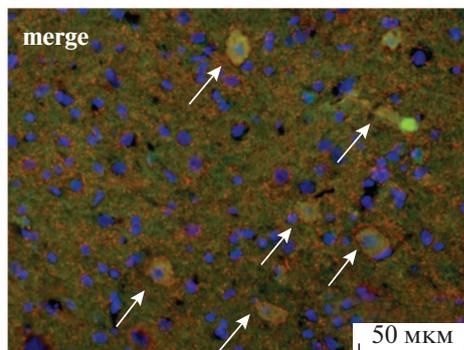
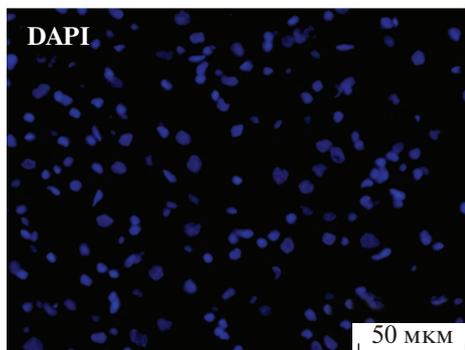
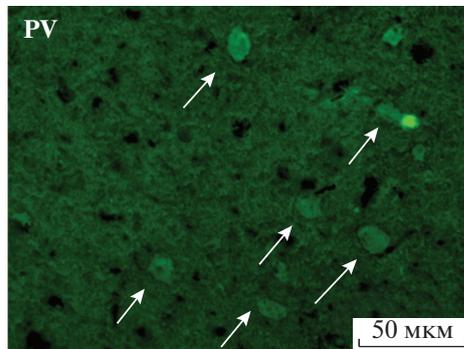
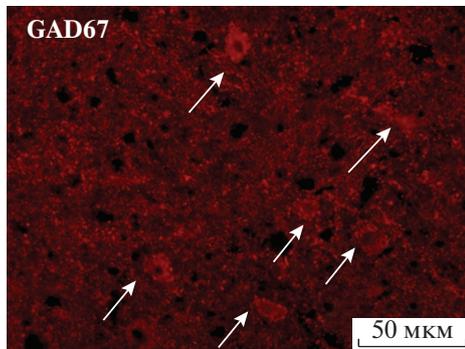


Рис. 3. Анализ содержания VGLUT2 в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на разных стадиях формирования судорожной готовности.

Содержание VGLUT2 оценивали по уровню иммунореактивности белка и числу позитивных клеток на гистологических препаратах (А, В, Г) и на пленках, полученных методом Вестерн-блота (Б, Е). На графиках представлена средняя оптическая плотность VGLUT2-иммунореактивного вещества или число клеток в центральном ядре нижних бугров четверохолмия крыс линий КМ (белые столбики) и Вистар (серые столбики) на P14 (А), P30 (Б), P60 (В) и P120 (Г), выраженная в условных единицах \pm стандартное отклонение. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Иммуногистохимическое выявление VGLUT2 в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на P14 (Д), P60 (Ж) и P120 (З). Выявление VGLUT2 методом Вестерн-блота на P30 (Е).

С помощью двойного иммунофлуоресцентного мечения было показано, что ERK1/2 киназы есть только в нейронах, экспрессирующих везикулярный транспортер глутамата – VGLUT2 (рис. 2), но не в ГАМК-ергических нейронах, экспрессирующих GAD67.

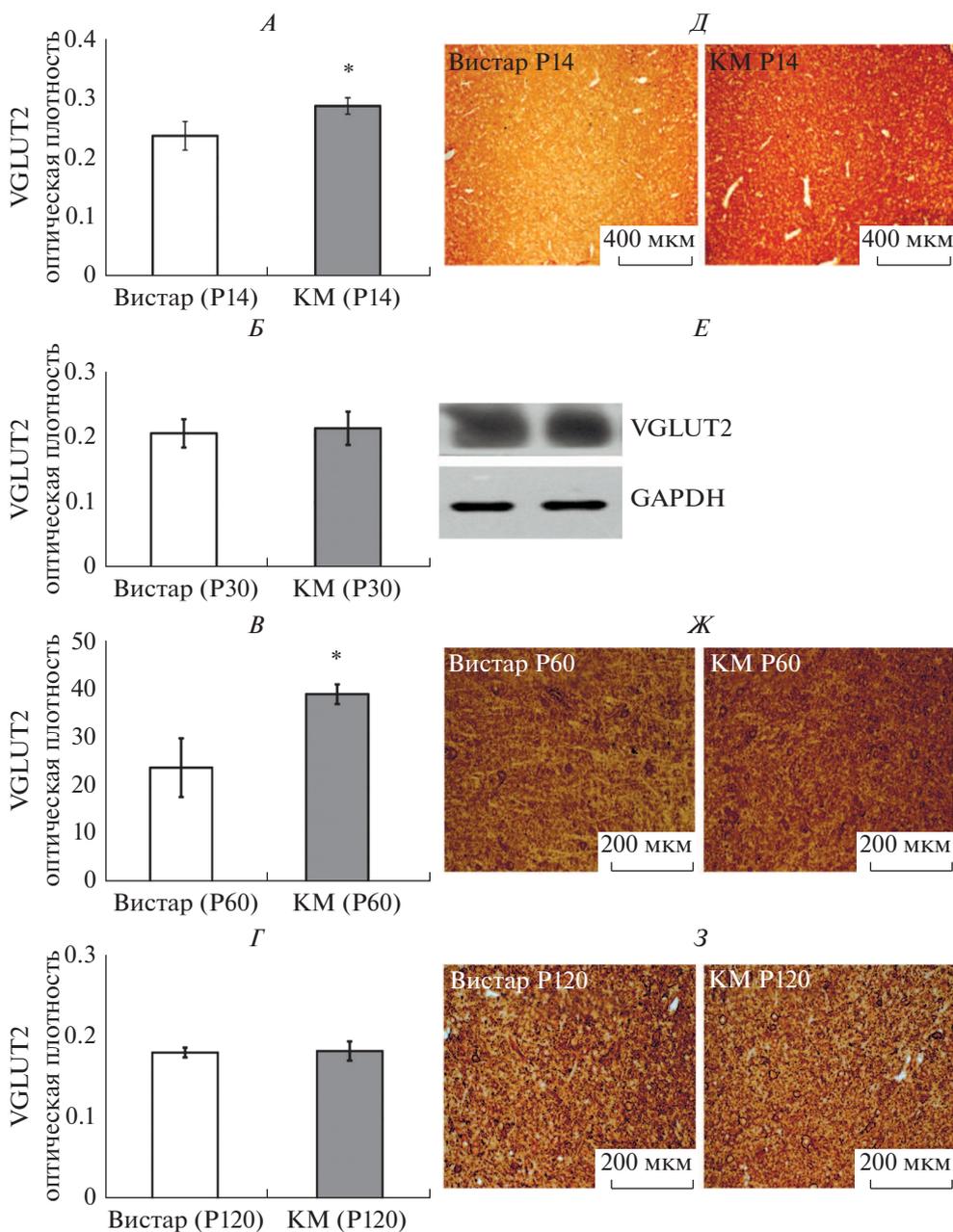
Содержание белка VGLUT2, определенного методом иммуногистохимии (P14, P60 и P120) или Вестерн-блот анализом (P30), было выше у крыс линии КМ, чем у крыс линии Вистар в возрасте 14 и 60 дней, однако не различалось в возрасте 30 дней и у взрослых 4-месячных крыс (рис. 3). Подобная динамика изменений наблюдалась в содержании другого маркера активности глутаматергических нейронов в нижних буграх четверохолмия – NR2B (рис. 4).

Состояние ГАМК-ергических нейронов нижних бугров четверохолмия было оценено по двум показателям, являющихся нейрохимическим коррелятом активности этих нейронов – по содержанию фермента синтеза ГАМК GAD67 и кальций-связывающего белка парвальбумина. Высокая экспрессия парвальбумина является показателем повышенного уровня метаболической и функциональной активности нейрона. Было показано, что практически все ГАМК-ергические клетки экспрессировали кальций-связывающий белок – парвальбумин (рис. 2). Содержание GAD67 на P14 у крыс КМ не отличалось от такового у крыс линии Вистар (рис. 5). Затем, на P30 и P60 оно значительно возрастало по сравнению с крысами Вистар. У 4-месячных крыс линии КМ количество фермента было ниже, чем у крыс Вистар. Экспрессия парвальбумина в ходе развития изменялась сходным образом с GAD67, за исключением 14-дневных крысят, у которых содержание парвальбумина было достоверно ниже, чем у крысят линии Вистар (рис. 6).

Еще одним маркером активности нейронов нижних бугров четверохолмия служил белок, отвечающий за выделение нейромедиаторов – синапсин 1, активность которого зависит от его фосфорилирования, в том числе ERK1/2 киназами. На P14 у крыс КМ уровень его фосфорилирования и соответственно активность были достоверно ниже, чем у крыс линии Вистар (рис. 7). Затем, на P60, содержание синапсина 1 у крыс линии КМ возрастало выше уровня характерного для крыс линии Вистар, а у взрослых крыс КМ и Вистар не отличалось, несмотря на высокий уровень активности ERK1/2 киназ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Было проведено исследование возраст-зависимых изменений в состоянии глутамат- и ГАМК-ергических нейронов нижних бугров четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на протяжении первых 4-х месяцев жизни. Формирование аудиогенной рефлекторной эпилепсии у крыс линии КМ заканчивается к концу 3-го мес. постнатальной жизни [23]. На более ранних этапах развития крысы или не реагируют на звук судорожным припадком или припадок не является полным (обычно представлена только стадия дикого бега). В возрасте 14-ти дней происходит фор-



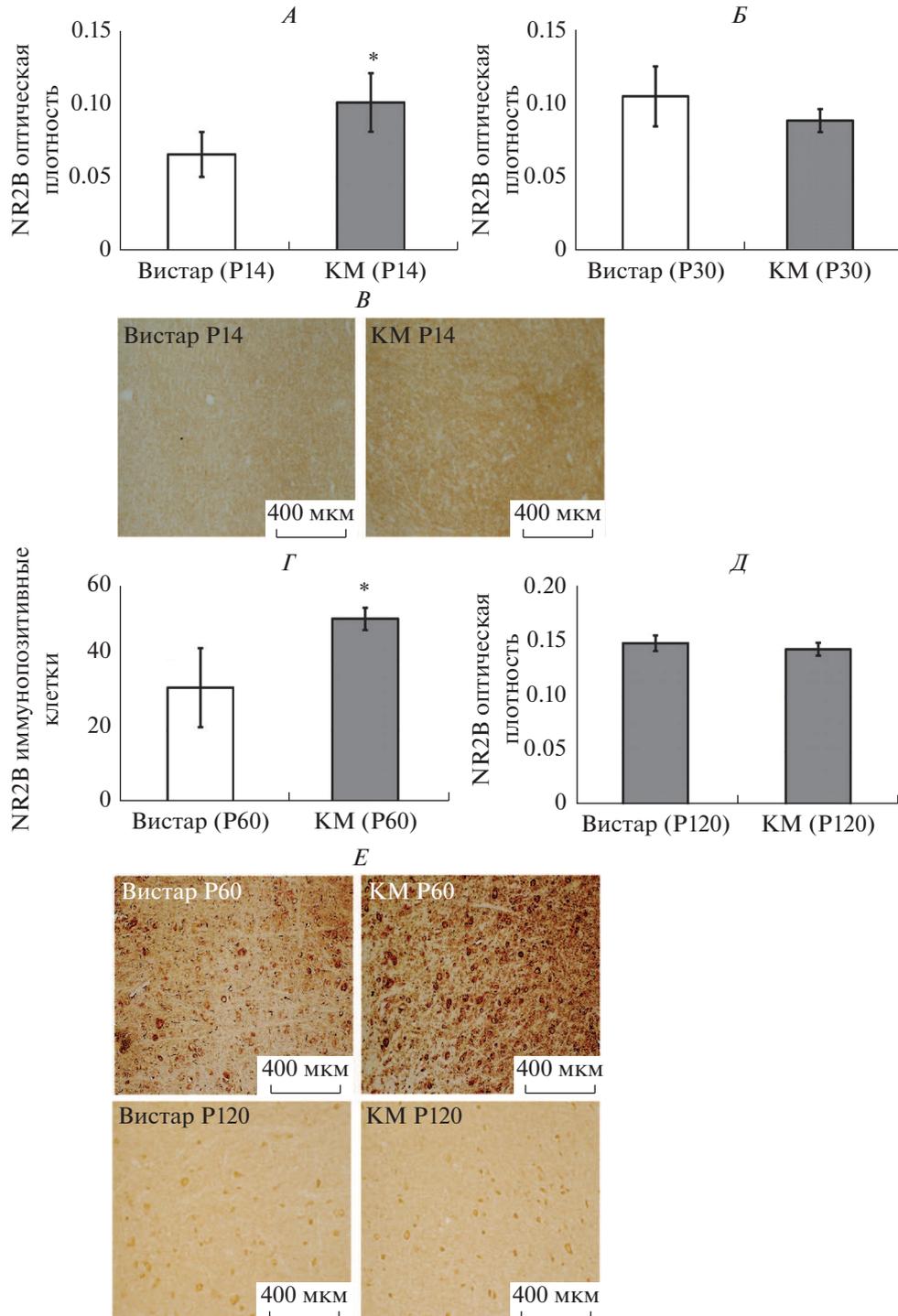
мирование нейрональных связей в слуховой сенсорной системе мозга, включая нижние бугры четверохолмия [24]. В этот критический период слуховая сенсорная система наиболее чувствительна к внешним и внутренним факторам [25, 26]. Показано, что нарушение каких-либо факторов, участвующих в регуляции формирования слуховых путей, приводит к изменениям в структурной организации и функциональной активности слуховых отделов мозга у взрослых животных [27–30].

Известно, что экспрессия белка VGLUT2 зависит от активности ERK1/2 киназ [31]. При подавлении активности ERK1/2 киназ наблюдаются изменения в содержании VGLUT2 в нейронах гиппокампа у крыс KM [32]. Ранее ERK1/2 были выявлены в глутаматергических нейронах гиппокампа, экспрессирующих VGLUT2 [32]. В нижних буграх четверохолмия мы также показали колокализацию ERK1/2 и VGLUT2, что свидетельствует об участии ERK1/2 киназ в регуляции активности глутаматергических нейронов. Известно, что в нижних буграх четверохолмия экспрессируются оба транспортера глутамата VGLUT2 и VGLUT1. Глутаматергические проекции, содержащие VGLUT1, приходят из коры, в то время как источником VGLUT2 являются нижележащие отделы мозга и глутаматергические нейроны нижних бугров четверохолмия [33]. Высокая активность глутаматергических нейронов нижних бугров четверохолмия у крыс линии KM в возрасте P14, P30 и P60, о которой можно судить на основании повышенной активности ERK1/2 киназ в этих нейронах и увеличении содержания VGLUT2, может объясняться функциональными перестройками слуховой системы в ходе онтогенеза, носящими патологический характер. Возможно, эти перестройки связаны с установлением новых взаимосвязей между нейронами и аномальным завершением формирования тонотопических плоскостей, очевидно заканчивающимися к концу третьего месяца, когда и возникает стабильная аудиогенная чувствительность к звуку частотой 10 кГц. В этом возрасте у интактных крыс линии KM, со сформировавшейся судорожной готовностью, происходит некоторое уменьшение числа фосфо-ERK1/2 иммунопозитивных клеток, не отличающееся достоверно от уровня контрольной группы крыс линии Вистар. При этом уровень фосфорилирования ERK1/2 киназ остаются повышенными по сравнению с контрольными животными. Снижение активности киназ в нейронах у 4-месячных интактных крыс KM может означать завершение установления новых нейрональных связей. Можно предположить, что в ходе онтогенетического развития при формировании судорожной готовности в нижних буграх четверохолмия изменяется состояние нейромедиаторных систем, механизмы внутриклеточной регуляции которых зависят от активности ERK1/2 киназ.

Высокое содержание VGLUT2 в нижних буграх четверохолмия на ранних стадиях постнатального онтогенеза позволяет предположить более интенсивную глутаматергическую восходящую стимуляцию. С другой стороны, несмотря на повышенную активность ERK1/2 у крысят линии KM, содержание активной формы синаптического белка синапсина 1, фосфорилирование которого осуществляется ERK, ниже, чем у крысят линии Вистар. Ранее было показано, что вызванные введением канината длительные судороги сопровождаются активацией ERK1/2 и усилением активности глутаматергических нейронов. При этом наблюдалось значительное снижение содержания фосфорилированного ERK по 3/4 сайтам синапсина I, что, возможно, связано с увеличением экспрессии фосфатаз [34]. Пониженная активность синапсина 1 может препятствовать интенсивному выбросу глутамата у крысят, что, очевидно, является причиной отсутствия проявлений судорожной активности, несмотря на высокое содержание ERK1/2 киназ.

Рис. 4. Анализ содержания NR2B в нижних буграх четверохолмия крыс линий KM и Вистар на разных стадиях формирования судорожной готовности.

На графиках представлена средняя оптическая плотность NR2B-иммунореактивного вещества (А, Б, Д) и число клеток (Г) в центральном ядре нижних бугров четверохолмия крыс линий KM (белые столбики) и Вистар (серые столбики) на P14 (А), P30 (Б), P60 (Г) и P120 (Д), выраженная в условных единицах \pm стандартное отклонение. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Иммуногистохимическое выявление NR2B в нижних буграх четверохолмия крыс линий KM и Вистар на P14 (Б) и P60 (Е).



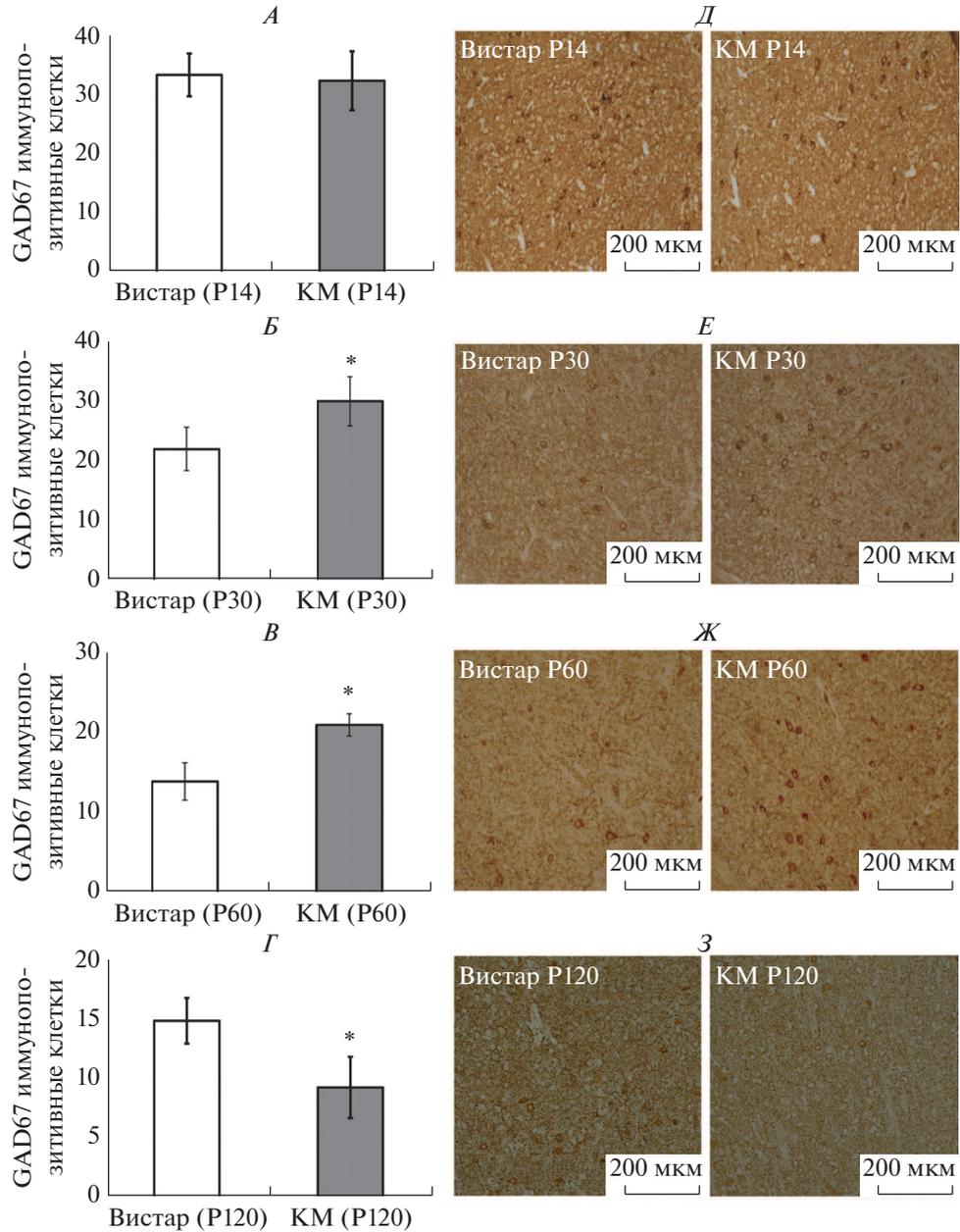


Рис. 5. Анализ содержания GAD67 в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на разных стадиях формирования судорожной готовности.

На графиках представлено среднее число GAD67-иммунореактивных клеток в центральном ядре нижних бугров четверохолмия крыс линий КМ (белые столбики) и Вистар (серые столбики) на P14 (A), P30 (Б), P60 (В) и P120 (Г), среднее число клеток \pm стандартное отклонение. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Иммуногистохимическое выявление GAD67 в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на P14 (Д), P30 (Е), P60 (Ж) и P120 (З).

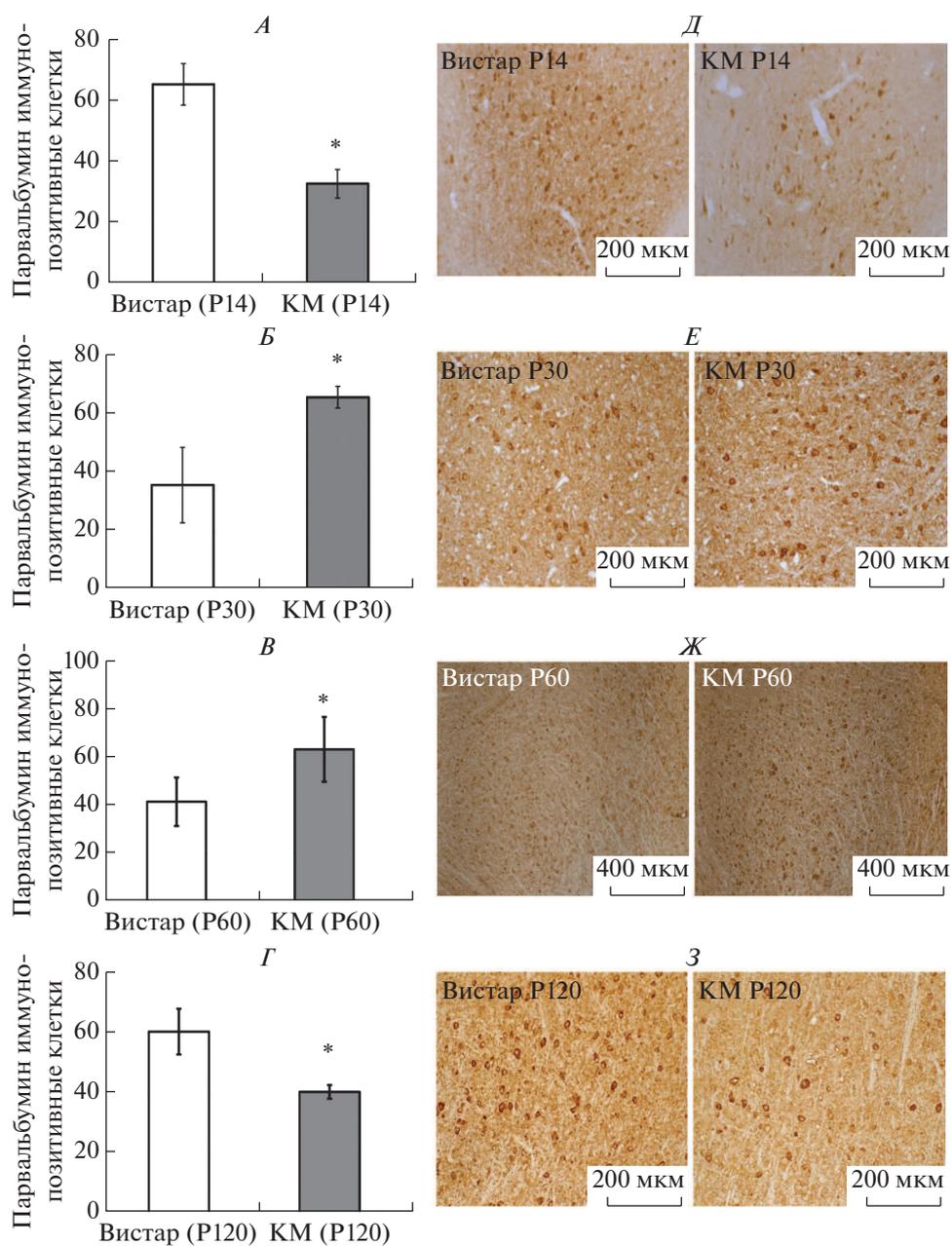


Рис. 6. Анализ содержания парвальбумина в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на разных стадиях формирования судорожной готовности.

На графиках представлено среднее число парвальбумин-иммунореактивных клеток в центральном ядре нижних бугров четверохолмия крыс линий КМ (белые столбики) и Вистар (серые столбики) на P14 (A), P30 (Б), P60 (В) и P120 (Г), среднее число клеток ± стандартное отклонение. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Иммуногистохимическое выявление парвальбумина в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на P14 (D), P30 (E), P60 (Ж) и P120 (З).

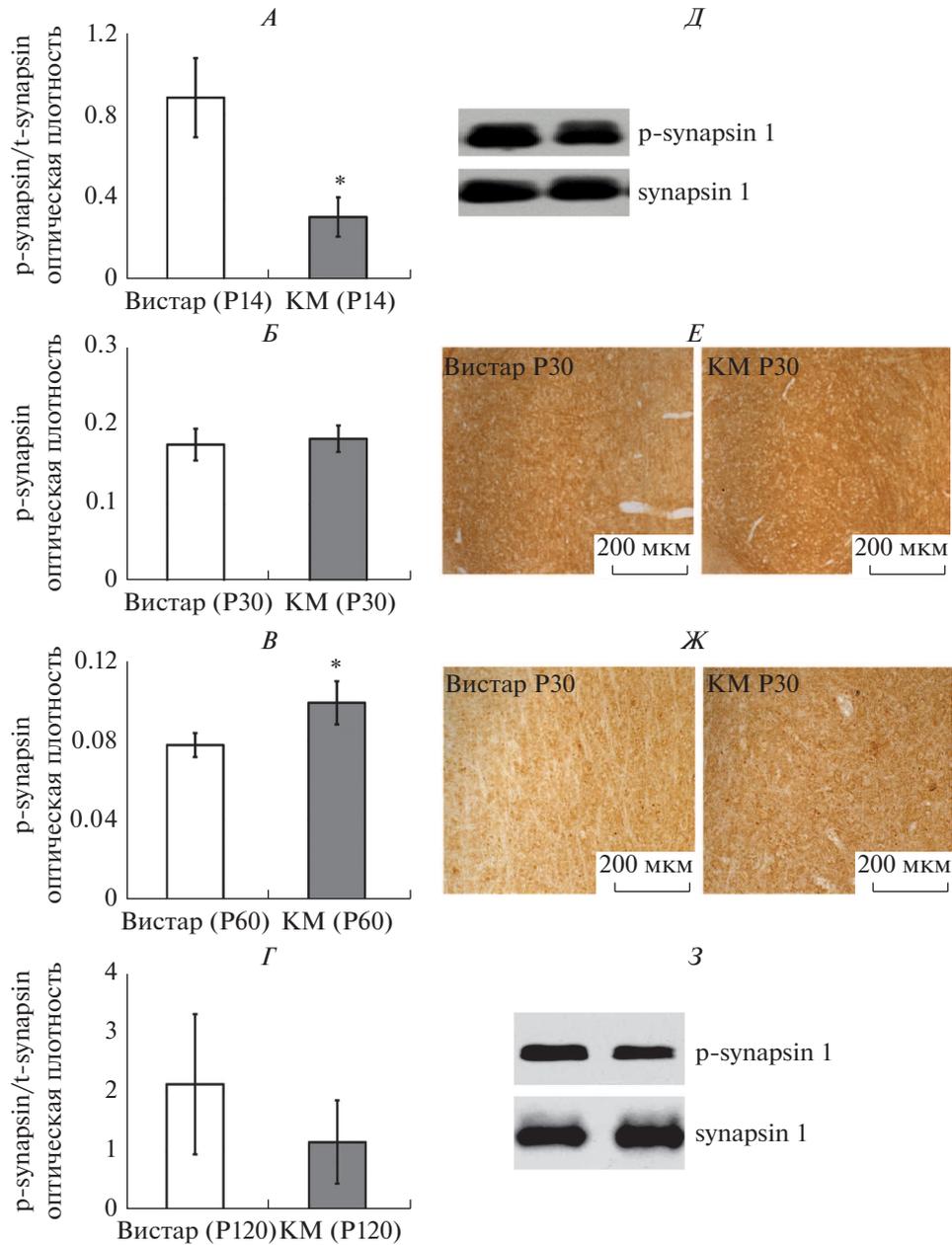


Рис. 7. Анализ содержания фосфо-синапсина 1 в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на разных стадиях формирования судорожной готовности.

Содержание фосфо-синапсина 1 оценивали по уровню иммунореактивности белка на гистологических препаратах (E, F) и на пленках полученных методом Вестерн-блота (A, G). На графиках представлена средняя оптическая плотность фосфо-синапсин 1-иммунореактивного вещества в центральном ядре нижних бугров четверохолмия крыс линий КМ (белые столбики) и Вистар (серые столбики) на P14 (A), P30 (B), P60 (F) и P120 (G), выраженная в условных единицах \pm стандартное отклонение. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Иммуногистохимическое выявление фосфо-синапсина 1 в нижних буграх четверохолмия крыс линий КМ и Вистар на P30 (E) и P60 (F). Выявление фосфо-синапсина 1 методом Вестерн-блота на P14 (A) и на P120 (G).

Увеличение содержания фосфорилированного ERK1/2 киназами синапсина 1 наблюдалось и у 2-месячных крыс, что также коррелирует с повышенной активностью ERK1/2 киназ. При этом наблюдалось и увеличение VGLUT2, что, очевидно, свидетельствует об усилении глутаматергической трансмиссии, приводящей к завершению формирования судорожной готовности. Однако показанное нами снижение активности ERK1/2 киназ в нейронах у 4-месячных интактных крыс КМ сопровождается уменьшением VGLUT2 и фосфо-синапсина 1 до уровня, характерного для взрослых крыс линии Вистар. Однонаправленные изменения в активности ERK1/2 и VGLUT2, выявленные в ходе формирования судорожной готовности у крыс P14, P60 и у взрослых животных, коррелирует с показанными нами изменениями в экспрессии NR2B субъединицы NMDA рецепторов, экспрессирующейся в том числе в ГАМК-ергических нейронах. В опытах на трансгенных мышцах *saMEK1ΔN* с конститутивно высоким уровнем экспрессии MEK-ERK1/2 киназ, характеризующихся спонтанными судорожными припадками, было показано увеличение количества белка NR2B при неизменном уровне мРНК [19]. Таким образом, повышенная активность ERK1/2 у молодых крыс КМ в ходе формирования повышенной судорожной готовности может быть причиной увеличения содержания VGLUT2 и усиления синтеза белка NR2B у крыс линии КМ ГАМК-ергическими нейронами, так как известно, что активность ГАМК-ергических нейронов нижних бугров четверохолмия зависит от уровня экспрессии NR2B субъединицы NMDA рецепторов [35, 36]. Однако число ГАМК-ергических нейронов в нижних буграх четверохолмия крысят линии КМ в возрасте P14 не отличается от характерного для крысят линии Вистар, когда активность глутаматергических нейронов повышена. Однако к концу первого месяца жизни число ГАМК-ергических клеток увеличивается и остается повышенным у 2-х месячных крыс. К концу 4-го месяца жизни число ГАМК-ергических нейронов у крыс с сформированной судорожной готовностью снижается ниже уровня, характерного для крыс Вистар. Таким образом, у крыс линии КМ выявлены также отклонения в числе ГАМК-ергических нейронов по сравнению с их родительской линией, частично совпадающие по направленности с таковыми у линии GEPR. У молодых наивных крыс линии GEPR наблюдается значительно большее число мелких ГАМК-ергических нейронов, чем у крыс Спрег-Доули. При завершении формирования судорожной готовности их число снижается, но остается также значительно большим по сравнению с крысами Спрег-Доули как на уровне иммуногистохимического выявления фермента синтеза GAD67, так и на уровне мРНК фермента [37]. Причем показано, что это увеличение у взрослых крыс GEPR коррелирует с интенсивностью судорожных припадков [38]. Авторы полагают, что подобное нарушение в состоянии ГАМК-ергической системы у крыс линии GEPR является генетически детерминированным. Таким образом, нарушения в развитии и функции ГАМК-ергической системы характерны для обеих линий крыс с аудиогенной эпилепсией, при этом они генетически детерминированы, но характер этих различий несколько отличается.

Известно, что все ГАМК-ергические нейроны в центральном ядре нижних бугров четверохолмия содержат парвальбумин [39]. У взрослых крыс парвальбумин-иммунореактивные клетки локализованы в центральном ядре нижних бугров четверохолмия, но у крысят они не выявляются вплоть до P8. Затем к P28 их число увеличивается до характерного для взрослых животных [40]. Мы показали, что в возрасте P14 в значительном числе нейронов центрального ядра нижних бугров четверохолмия крыс обеих линий выявляется парвальбумин. При этом у крыс линии КМ на P14 число парвальбумин-иммунопозитивных клеток значительно меньше, чем у крыс линии Вистар, но начиная с P30 и до конца второго месяца жизни, число нейронов достоверно превышает таковое у крыс Вистар. У взрослых крыс линии КМ со сформировавшейся судорожной готовностью число парвальбумин-иммуно-

позитивных интернейронов значительно меньше, чем у крыс линии Вистар. Таким образом, при анализе нижних бугров четверохолмия в ходе постнатального развития и формирования судорожной готовности мы показали однонаправленные изменения в числе ГАМК- и парвальбумин-позитивных клеток у крыс линии КМ в сравнении с крысами линии Вистар. Высокий уровень экспрессии парвальбумина в ГАМК-ергических нейронах у молодых крыс может быть связан с протективной ролью кальций-связывающих белков. С другой стороны, высокий уровень экспрессии парвальбумина может свидетельствовать о повышенной метаболической активности этих клеток [41–43]. Эти данные позволяют предположить высокий уровень тормозного ГАМК-ергического влияния в ходе развития аудиогенной рефлекторной эпилепсии, очевидно, препятствующий развитию судорожной активности при предъявлении звукового сигнала, несмотря на повышенную активность глутаматергической системы. Снижение содержания парвальбумина и GAD67 в нижних буграх четверохолмия у взрослых крыс со сформировавшейся судорожной готовностью, возможно, является причиной развития эпилептиформных припадков в ответ на звуковую стимуляцию. Наше предположение подтверждает усиление чувствительности к судорожной стимуляции у мышей-нокаутов по гену парвальбумина [44]. Авторы предполагают снижение ингибиторного контроля ГАМК-ергической популяции нейронов при отсутствии парвальбумина, что подтверждается нашими результатами.

Значительно повышенный уровень активности ERK1/2 киназ у крыс линии КМ в критический период развития, приводящий к нарушениям в экспрессии и активности ERK-зависимых белков, может быть причиной возникновения дефектов в работе нейронов нижних бугров четверохолмия (и других структур мозга), приводящих к развитию эпилептиформной активности. Активация ERK в онтогенезе в предположительно глутаматергических нейронах исчезает по достижении крысами возраста, когда судорожная готовность окончательно формируется, но изменения в состоянии белков-мишеней, вызванные длительно повышенным уровнем активности ERK1/2 киназ, могут приводить к нарушениям других внутриклеточных механизмов, обеспечивающих снижение активности ГАМК-ергических нейронов и соответственно повышенную чувствительность крыс к звуку. У взрослых крыс линии КМ фосфорилирование ERK1/2 снижается, как и активность глутаматергических нейронов, но при этом показано уменьшение содержания маркеров активности ГАМК-ергической системы (парвальбумин и GAD67), что, очевидно, является одним из механизмов завершения формирования судорожной готовности и возникновения стабильного судорожного ответа на звуковой стимул. Показанные нами нейрохимические нарушения в ходе развития нейрональных взаимодействий в нижних буграх четверохолмия могут вызывать отставленные изменения, приводящие к возникновению эпилептиформной активности.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Гос. задания по теме № АААА-А18-118012290371-3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chakravarty D.N., Faingold C.L.* Differential roles in the neuronal network for audiogenic seizures are observed among the inferior colliculus subnuclei and the amygdala. *Exp. Neurol.* 157(1): 135–141. 1999.
2. *Naritoku D.K., Mecozzi L.B., Aiello M.T., Faingold C.L.* Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp. Neurol.* 115(3): 317–324. 1992.

3. Faingold C.L., Naritoku D.K., Copley C.A., Randall M.E., Riaz A., Anderson C.A., Arneric S.P. Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role in audiogenic seizure initiation. *Epilepsy Res.* 13(2): 95–105. 1992.
4. Poletaeva, I.I., Surina N.M., Kostina Z.A., Perepelkina O.V., Fedotova I.B. The Krushinsky–Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy Behav.* 71(B): 130–141. 2017.
5. Faingold C.L. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Adv. Neurol.* 79: 311–321. 1999.
6. Ribak C.E. An abnormal GABAergic system in the inferior colliculus provides a basis for audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Behav.* 71(B): 160–164. 2017.
7. Ribak C.E., Morin C.L. The role of the inferior colliculus in a genetic model of audiogenic seizures. *Anat. Embryol. (Berl)*. 191(4): 279–295. 1995.
8. Bagri A., Sandner G., Di Scala G. Aversive effects elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus in normal and audiogenic seizure susceptible rats. *Neurosci. Lett.* 379(3): 180–184. 2005.
9. Ross K.C., Coleman J.R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24(6): 639–653. 2000.
10. Iida K., Sasa M., Serikawa T., Noda A., Ishihara K., Akimitsu T., Hanaya R., Arita K., Kurisu K. Induction of convulsive seizures by acoustic priming in a new genetically defined model of epilepsy (Noda epileptic rat: NER). *Epilepsy Res.* 30(2): 115–126. 1998.
11. Holmes G.L. Pathogenesis of epilepsy: the role of excitatory amino acids. *Cleve. Clin. J. Med.* 62(4): 240–247. 1995.
12. Akbar M.T., Rattray M., Williams R.J., Chong N.W., Meldrum B.S. Reduction of GABA and glutamate transporter messenger RNAs in the severe-seizure genetically epilepsy-prone rat. *Neuroscience.* 85(4): 1235–1251. 1998.
13. Fuentes-Santamaria V., Alvarado J.C., Herranz A.S., Garcia-Atares N., Lopez D.E. Decreased levels of GABA in the inferior colliculus of the epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res.* 79(2–3): 224–227. 2008.
14. Lasley S.M. Roles of neurotransmitter amino acids in seizure severity and experience in the genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res.* 560(1–2): 63–70. 1991.
15. Semiokhina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva, I.I. Rats of Krushinsky–Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, vascular pathology, and behavior. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova.* 56(3): 298–316. 2006.
16. Cavanaugh J.E., Ham J., Hetman M., Poser S., Yan C., Xia Z. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J. Neurosci.* 21(2): 434–443. 2001.
17. Thomas G.M., Huganir R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience.* 5(3): 173–183. 2004.
18. Houser C.R., Huang C.S., Peng Z. Dynamic seizure-related changes in extracellular signal-regulated kinase activation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 156(1): 222–237. 2008.
19. Nateri A.S., Raivich G., Gebhardt C., Da Costa C., Naumann H., Vreugdenhil M., Makwana M., Brandner S., Adams R.H., Jefferys J.G., Kann O., Behrens A. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J.* 26(23): 4891–4901. 2007.
20. Longuet C., Broca C., Costes S., Hani E.H., Bataille D., Dalle S. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology.* 146(2): 643–654. 2005.
21. Li Y., Peng Z., Xiao B., Houser C.R. Activation of ERK by spontaneous seizures in neural progenitors of the dentate gyrus in a mouse model of epilepsy. *Exp. Neurol.* 224(1): 133–145.
22. Glazova M.V., Nikitina L.S., Hudik K.A., Kirillova O.D., Dorofeeva N.A., Korotkov A.A., Chernigovskaya E.V. Inhibition of ERK1/2 signaling prevents epileptiform behavior in rats prone to audiogenic seizures. *J. Neurochem.* 132(2): 218–229.
23. Fedotova I.B., Semiokhina A.F. Developmental changes in audiogenic epilepsy and myoclonus in KM rats. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova.* 52(2): 261–265. 2002.
24. Geal-Dor M., Freeman S., Li G., Sohmer H. Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res.* 69(1–2): 236–242. 1993.
25. Gabriele M.L., Brunso-Bechtold J.K., Henkel C.K. Development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat: projection from the dorsal nucleus of the lateral lemniscus. *J. Comp. Neurol.* 416(3): 368–382. 2000.
26. Kandler K. Activity-dependent organization of inhibitory circuits: lessons from the auditory system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14(1): 96–104. 2004.
27. Chang E.H., Kotak V.C., Sanes D.H. Long-term depression of synaptic inhibition is expressed postsynaptically in the developing auditory system. *J. Neurophysiol.* 90(3): 1479–1488. 2003.
28. Zhang L.J., Bao S., Merzenich M.M. Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(4): 2309–2314. 2002.

29. Chang E.F., Bao S., Imaizumi K., Schreiner C.E., Merzenich M.M. Development of spectral and temporal response selectivity in the auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(45): 16460–16465. 2005.
30. Zhou X., Nagarajan N., Mossop B.J., Merzenich M.M. Influences of un-modulated acoustic inputs on functional maturation and critical-period plasticity of the primary auditory cortex. *Neuroscience.* 154(1): 390–396. 2008.
31. Doyle S., Pyndiah S., De Gois S., Erickson J.D. Excitation-transcription coupling via calcium/calmodulin-dependent protein kinase/ERK1/2 signaling mediates the coordinate induction of VGLUT2 and Narp triggered by a prolonged increase in glutamatergic synaptic activity. *J. Biol. Chem.* 285(19): 14366–14376. 2010.
32. Glazova M.B. Role of p53 in the regulation of neuronal differentiation. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* 101(6): 633–646. 2015.
33. Ito T., Oliver D.L. Origins of Glutamatergic Terminals in the Inferior Colliculus Identified by Retrograde Transport and Expression of VGLUT1 and VGLUT2 Genes. *Front. Neuroanat.* 4: 135. 2010.
34. Yamagata Y., Nairn A.C. Contrasting features of ERK1/2 activity and synapsin I phosphorylation at the ERK1/2-dependent site in the rat brain in status epilepticus induced by kainic acid *in vivo.* *Brain Res.* 1625: 314–323. 2015.
35. Kinney J.W., Davis C.N., Tabarean I., Conti B., Bartfai T., Behrens M.M. A specific role for NR2A-containing NMDA receptors in the maintenance of parvalbumin and GAD67 immunoreactivity in cultured interneurons. *J. Neurosci.* 26(5): 1604–1615. 2006.
36. Ishida Y., Nakahara D., Hashiguchi H., Nakamura M., Ebihara K., Takeda R., Nishimori T., Niki H. Fos expression in GABAergic cells and cells immunopositive for NMDA receptors in the inferior and superior colliculi following audiogenic seizures in rats. *Synapse.* 46(2): 100–107. 2002.
37. Ribak C.E. An abnormal GABAergic system in the inferior colliculus provides a basis for audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Behav.* 71(B): 160–164. 2015.
38. Roberts R.C., Kim H.L., Ribak C.E. Increased numbers of neurons occur in the inferior colliculus of the young genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res.* 355(2): 277–281. 1985.
39. Ouda L., Syka J. Immunocytochemical profiles of inferior colliculus neurons in the rat and their changes with aging. *Front. Neural. Circuits.* 6: 68. 2012.
40. Lohmann C., Friauf E. Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J. Comp. Neurol.* 367 (1): 90–109. 1996.
41. Kawaguchi Y., Katsumaru H., Kosaka T., Heizmann C.W., Hama K. Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res.* 416(2): 369–374. 1987.
42. Celio M.R., Heizmann C.W. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature.* 293(5830): 300–302. 1981.
43. Celio M.R. Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science.* 231(4741): 995–997. 1986.
44. Schwaller B., Teiko I.V., Tandon P., Silveira D.C., Vreugdenhil M., Henzi T., Potier M.C., Celio M.R., Villa A.E. Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Mol. Cell Neurosci.* 25(4): 650–663. 2004.

Neurochemical Organization of the Inferior Colliculus in Audiogenic Krushinsky–Molodkina Rats during Development of Seizure Susceptibility

**E. V. Chernigovskaya^{a,*}, N. A. Dorofeeva^a, O. O. Lebedenko^a, S. D. Nikolaeva^a,
A. A. Naumova^a, E. A. Lavrova^a, M. V. Glazova^a**

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

^{*}*e-mail: chern755@mail.ru*

Abstract—To reveal abnormalities in the inferior colliculus during postnatal development of seizure susceptibility in audiogenic rats, an analysis of neurochemical markers, which characterized a functional state of glutamate and GABA neurons, was done. Krushinsky–Molodkina rats (KM) were used in the experiments. These rats demonstrate age-dependent development of audiogenic seizures (AGS), which expression is regulated by brain stem structures such as inferior colliculus. In the critical period of the development of AGS susceptibility (P14, P30, and P60) in KM rats, the activity of ERK1/2 kinase was significantly increased. Also, we observed upregulation of ERK-dependent proteins GluN2B and VGLUT2 that can mediate pathological alterations in the gluta-

mate neurotransmission and subsequently initiate the development of epileptiform activity. In adult KM rats, the activity of ERK1/2 and expression of GluN2B and VGLUT2 was decreased. Also, our data showed enhanced expression of parvalbumin and GAD67, which are the markers of the GABAergic system, during the development of seizure susceptibility. While in adult KM rats expression levels of parvalbumin and GAD67 were significantly lower in comparison with Wistar rats that is one of the possible mechanisms for the completion of the formation of seizure susceptibility and the development of stable expression of AGS. Thus, we demonstrated neurochemical aberrations in the inferior colliculus during the development of neuronal interactions in postnatal ontogenesis that can cause delayed alterations leading to expression of epileptiform activity.

Keywords: epilepsy, inferior colliculus, ontogenesis, glutamate, GABA, ERK1/2, Krushinsky–Molodkina rats

ЦИТИРОВАТЬ:

Черниговская Е.В., Дорофеева Н.А., Лебеденко О.О., Николаева С.Д., Наумова А.А., Лаврова Е.А., Глазова М.В. Нейрохимические особенности организации нижних бугров четверохолмия крыс линии Крушинского-Молодкиной при формировании судорожной готовности. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 105(6): 724–741.

DOI: 10.1134/S0869813919060013

TO CITE THIS ARTICLE:

Chernigovskaya E.V., Dorofeeva N.A., Lebedenko O.O., Nikolaeva S.D., Naumova A.A., Lavrova E.A., Glazova M.V. Neurochemical Organization of the Inferior Colliculus in Audiogenic Krushinsky-Molodkina Rats During Development of Seizure Susceptibility. *Russian Journal of Physiology*. 105(6): 724–741.

DOI: 10.1134/S0869813919060013