
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
В НИЖНИХ БУГРАХ ЧЕТВЕРОХОЛМИЯ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ
АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2023 г. С. Д. Николаева¹, А. П. Ивлев¹, А. А. Наумова¹, А. А. Куликов¹,
М. В. Глазова^{1, *}, Е. В. Черниговская¹

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

*E-mail: mglazova@iephb.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Эпилепсия тесно связана с нарушением функции тормозной ГАМК-нейротрансмиссии. В данном исследовании использовались крысы Крушинского–Молодкиной (КМ), генетически склонные к аудиогенным припадкам (АГП). Для крыс КМ характерно развитие аудиогенной эпилепсии в постнатальном онтогенезе, с началом АГП в возрасте 1.5–2 мес. и полным развитием экспрессии АГП к 3 месяцам. Мы проанализировали ГАМК-ергическую систему нижних бугров четверохолмия (НБЧ) крыс КМ на разных стадиях постнатального развития. В качестве контроля использовали крыс линии Вистар. В НБЧ молодых крыс линии КМ экспрессия $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ котранспортера 1 (NKCC1) была увеличена, в то время как K^+/Cl^- котранспортер 2 (KCC2) был неизменен, что указывает на нарушение постсинаптического действия ГАМК на ранних стадиях постнатального развития. Более того, мы выявили увеличение экспрессии везикулярного транспортера ГАМК (VGAT) в НБЧ, что дополнительно указывает на более высокую активность высвобождения ГАМК. У взрослых крыс, напротив, выявлено снижение экспрессии транспортера KCC2, что указывает на снижение ГАМК-опосредованного торможения в клетках-мишенях. Таким образом, восприимчивость к судорогам у взрослых крыс КМ может быть вызвана нарушениями регуляции ГАМК в НБЧ.

Ключевые слова: крысы Крушинского–Молодкиной, аудиогенные судороги, нижняя колликула, постнатальный онтогенез

DOI: 10.31857/S0869813923070105, **EDN:** XMXKRZ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время появляется все больше доказательств того, что нарушение тормозной нейротрансмиссии γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в головном мозге является одним из ключевых механизмов развития эпилепсии [1]. Так, исследования клинического материала от пациентов с эпилепсией и экспериментальных моделей продемонстрировали утрату ГАМК-ергических нейронов, ослабление синтеза ГАМК и снижение количества рецепторов ГАМК на мембранах клеток-

Сокращения: КМ – крысы Крушинского–Молодкиной; НБЧ – нижние бугры четверохолмия; АГП – аудиогенный припадок; KCC2 – K^+/Cl^- котранспортер 2; NKCC1 – $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ котранспортер; VGAT – везикулярный транспортер ГАМК; GABAAR(α) – $\alpha 1$ -субъединица рецептора ГАМК-A.

мишеней [2–5]. Более того, эпилептиформная активность может быть связана с изменением экспрессии транспортеров Cl^- – K^+/Cl^- котранспортера 2 (KCC2) и $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ котранспортера 1 (NKCC1) в нейронах, что приводит к нарушению баланса Cl^- и, как следствие, к ослаблению ГАМК-ергического торможения и даже переключению эффекта ГАМК с торможения на возбуждение [6, 7].

Перспективным экспериментальным подходом для выявления генетически обусловленных механизмов эпилептогенеза является использование животных с генетической предрасположенностью к рефлекторным (аудиогенным) припадкам. В настоящее время существует несколько хорошо изученных линий крыс с аудиогенной чувствительностью, включая генетически предрасположенных к эпилепсии крыс (GEPR), аудиогенных крыс Вистар (WAR), аудиогенных крыс Вистар из Страсбурга (WAS) и крыс Крушинского–Молодкиной (KM) [8]. Повышенная восприимчивость к судорогам развивается у таких животных в постнатальном онтогенезе, что делает эти модели особенно удобными для изучения механизмов и динамики развития наследственной эпилепсии у человека.

Электрофизиологические исследования животных, генетически склонных к аудиогенным припадкам, показали, что одиночные звуковые стимулы вызывают эпилептиформную активность в стволе мозга, а ключевой структурой, ответственной за запуск АГП, являются нижние бугры четверохолмия (НБЧ) [9–11]. В то же время предыдущие исследования показали, что животные, склонные к аудиогенным припадкам, демонстрируют ряд изменений в ГАМК-ергической системе НБЧ, включая аномально низкий синтез ГАМК и снижение экспрессии KCC2 [12–15]. Действительно, такие изменения могут способствовать повышенной возбудимости этой структуры мозга и развитию рефлекторной эпилепсии. Однако дисбаланс ГАМК наблюдался в основном у животных, подвергавшихся звуковой стимуляции, что затрудняет разграничение наследственных и вызванных судорогами изменений. Тем не менее, разумно предположить, что у крыс, склонных к аудиогенной эпилепсии, постнатальное развитие связано с аномальным формированием нейронных связей, которое опосредовано наличием генетически обусловленных аберраций в ГАМК-ергической системе, что обуславливает восприимчивость к судорогам во взрослом возрасте.

У грызунов первые недели постнатального развития являются критическим периодом для становления ГАМК-ергической системы в НБЧ. В НБЧ здоровых крыс ГАМК-ергические клетки обнаруживаются с 8-го дня постнатального периода (P8), а к концу первого месяца жизни их количество уже не отличается от взрослых животных [16]. Более того, раннее постнатальное развитие связано с постепенным увеличением экспрессии KCC2 в нейронах, что необходимо для установления тормозного (гиперполяризующего) действия ГАМК, которое наблюдается к концу второй недели жизни [17, 18]. С другой стороны, практически нет данных о развитии ГАМК-ергической системы у лабораторных грызунов с наследственной эпилепсией. Чтобы хотя бы частично восполнить недостающую информацию, мы проанализировали созревание этой системы в НБЧ крыс KM в постнатальном онтогенезе.

Аудиогенная рефлекторная эпилепсия у крыс KM полностью формируется к 3-му месяцу жизни [19]. На более ранних стадиях постнатального развития крысы KM либо не реагируют на звуковую стимуляцию, либо демонстрируют неполный паттерн припадков, который обычно включает в себя только фазу дикого бега. Ранее мы продемонстрировали задержку постнатального морфогенеза НБЧ аудиогенных крыс KM по сравнению с контрольными крысами Вистар [20]. Более того, анализ GAD67, парвальбумина (PV) и синапсина 1 выявил аномальное функционирование ГАМК-ергических нейронов в НБЧ крыс KM как в молодом, так и во

взрослом состоянии [21]. В настоящем исследовании мы продолжили изучение НБЧ крыс КМ, уделяя особое внимание ГАМК-ергической трансмиссии. Полученные результаты позволяют выявить генетически обусловленные изменения в созревании тормозных цепей в НБЧ и предположить вклад наблюдаемых изменений в формирование повышенной судорожной готовности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В наших экспериментах использовались самцы и самки крыс КМ (Московский государственный университет, Россия). Эти крысы были выведены путем близкородственного скрещивания крыс Вистар, и в настоящее время все животные демонстрируют клонико-тонические судороги в ответ на интенсивную (10 кГц) звуковую стимуляцию. Предрасположенность к аудиогенной эпилепсии крыс КМ развивается в постнатальном онтогенезе и полностью формируется в возрасте 3–3.5 мес.

Для выявления генетически обусловленных aberrаций в ГАМК-ергической системе НБЧ мы использовали наивных крыс КМ, которые ранее не подвергались звуковой стимуляции и не имели опыта АГП до окончания эксперимента. Были исследованы три возрастные группы крыс КМ: 1) животные в возрасте 15 дней (P15, $n = 8$), когда происходит активный морфогенез НБЧ; 2) двухмесячные животные (P60, $n = 8$) с завершенным развитием НБЧ; 3) четырехмесячные животные (P120, $n = 8$), которые демонстрируют полностью развитую предрасположенность к АГП. В качестве контроля использовали крыс Вистар соответствующего возраста ($n = 8$ для каждой возрастной группы). Все животные содержались в стандартных клетках вивария при свето-темновом цикле 12/12 и свободном доступе к пище и воде.

Пробоподготовка

Четырех животных из каждой экспериментальной группы глубоко анестезировали путем внутривенной инъекции смеси золетил/ксилазин (60 мг/кг + 10 мг/кг; Virbac, Франция), перфузировали транскардиально фосфатно-буферным солевым раствором (PBS), затем 4%-ным параформальдегидом (PFA) и декапитировали. Мозг всех животных был извлечен, постфиксирован в 4%-ном PFA при +4°C (5 дней), затем погружен в 15%-ный раствор сахарозы для криозащиты (3 дня), затем заморожен и хранился при –80°C для дальнейшего иммуногистохимического анализа.

Других четырех животных из каждой группы декапитировали, мозг извлекали, делили на полушария, а затем препарировали НБЧ. НБЧ из обоих полушарий всех этих животных использовали для Вестерн-блот анализа.

Иммуногистохимия

Серии срезов мозга (во фронтальной плоскости) толщиной 10 мкм изготавливали с помощью криостата Leica. Иммуногистохимический анализ проводили в соответствии со стандартным протоколом с биотин-стрептавидином. Криосрезы (10 мкм), содержащие НБЧ, инкубировали с первичными антителами (табл. 1) в течение ночи при комнатной температуре. Затем срезы промывали в PBS, инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными вторичными антителами (табл. 1) с последующей инкубацией с комплексом стрептавидин-пероксидаза (1 : 500, Supelco, #S2438) в течение 1 ч. Пероксидазную реакцию выявляли в буфере, содержащем 3,3'-диаминобензидин (ДАБ, Sigma-Aldrich, #D5637) и перекись водорода (0.01%). Чтобы проверить специфичность окрашивания, мы провели отрицательный контроль (тот же протокол без первичных антител), который показал отсутствие окрашивания. Наконец, срезы обезвоживали и накрывали покровным стеклом.

Таблица 1. Используемые антитела для иммуногистохимии (ИГХ) и Вестерн-блот анализа (WB)

Антитела	Производитель	Разведение для ИГХ	Разведение для WB
Первичные антитела			
KCC2 Polyclonal Antibody	Invitrogen, #PA5-78544	1 : 250	1 : 1000
Na-K-Cl cotransporter Monoclonal Antibody	DSHB Hybridoma Product, # t4	1 : 100	1 : 500
GABA-AR alpha 1 Antibody	Novusbio, #NB300-191	1 : 100	1 : 1000
VGAT Polyclonal Antibody	Invitrogen, #PA-27569	—	1 : 1000
Actin Monoclonal antibody	Abcam, #ab3280	—	1 : 2000
Вторичные антитела			
Goat Anti-Mouse IgG antibody (H + L), biotinylated	Vector Laboratories, #BA-9200	1 : 500	—
Goat anti-rabbit IgG antibody (H + L), biotinylated	Vector Laboratories, #BA-1000	1 : 500	—
Anti-rabbit IgG (whole molecule)—peroxidase antibody produced in goat	Sigma-Aldrich, #A0545	—	1 : 10000
Anti-Mouse IgG (whole molecule)—Peroxidase antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich, #A9044	—	1 : 40000

Обработка срезов

Обработку срезов проводили в стандартных условиях в каждом эксперименте, т.е. контрольные и экспериментальные группы в каждом эксперименте собирали, фиксировали и обрабатывали для анализа одновременно. Анализ иммуноокрашивания в НБЧ проводили с использованием изображений, полученных с помощью объектива 20×/0.5 на микроскопе Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Для анализа каждого исследуемого белка отбирали каждый 15-й срез. Всего для каждого животного было проанализировано пять срезов исследуемой зоны для каждого иммуноокрашивания.

Экспрессию $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК-А рецепторов (GABAAR(α)), KCC2 и NKCC1 в центральном ядре НБЧ оценивали как оптическую плотность иммунопозитивного вещества на 8-битных изображениях с использованием программы ImageJ (версия 6.0). Оптическую плотность фона оценивали на том же срезе в неиммунореактивной ткани мозга.

Вестерн-блот анализ

Образцы НБЧ гомогенизировали в лизирующем буфере (20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА), содержащем ингибиторы протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и cocktail ингибиторов фосфатаз (Roche, #04 906 837 001), используя механический гомогенизатор при 4°C. Нерастворимые материалы 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× буфером для нанесения проб (0.2 M Трис-HCl pH 6.7, 6% додецилсульфат натрия, 15% глицерин, 0.003% бромфеноловый синий и 10% β -меркаптоэтанол) и инкубировали 10 мин при 96°C. Равные количества образцов (10 мкг белка на лунку геля) загружали для электрофореза, белки разделяли на 10%-ном полиакриламидном геле, а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3718). Мембраны инкубировали в

5%-ном обезжиренном молоке или 3%-ном БСА в Трис-буфере с добавлением детергента Tween (TBST) (0.1% Tween 20, 20-мМ Трис, 137-мМ NaCl; pH 7.4) в течение 1 ч, а затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами (табл. 1). После этого мембраны промывали в буфере TBST и инкубировали с конъюгированными с пероксидазой вторичными антителами против кролика или мыши (табл. 1) в течение 1 ч при комнатной температуре. Специфические белковые полосы 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 Laboratories Inc., Hercules, CA, США).

Денситометрический анализ содержания белка проводили с помощью программы ImageJ (версия 6.0). Экспрессию везикулярного транспортера ГАМК (VGAT) в НБЧ оценивали путем нормализации к актину. Детекцию белков, используемых для нормализации, проводили с использованием тех же мембран, что и детекцию белков интереса.

Статистический анализ

Все данные, полученные с помощью Вестерн-блоттинга, ПЦР в реальном времени и иммуногистохимического анализа, обрабатывались статистически с помощью *U*-критерия Манна–Уитни с использованием программного обеспечения GraphPad 7. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В наших экспериментах мы использовали наивных крыс КМ, не подвергавшихся ранее звуковому воздействию и не испытывавших аудиогенных припадков. В качестве контроля использовали крыс Вистар. Исследовались животные трех возрастных групп: 1) 15 дней (P15), когда происходит активный морфогенез НБЧ; 2) 2 мес. (P60), когда развитие НБЧ завершено, но крысы КМ не демонстрируют стабильных аудиогенных припадков; 3) 4 мес. (P120), когда способность крыс КМ к АГП полностью сформирована.

Анализ ГАМК-ергической системы в нижних буграх четверохолмия (НБЧ)

Во-первых, мы проанализировали экспрессию везикулярного транспортера ГАМК VGAT, который отвечает за загрузку ГАМК из цитоплазмы ГАМК-ергических нейронов в синаптические везикулы [22]. Наши данные, полученные методом Вестерн-блот не выявили различий в экспрессии VGAT в НБЧ между крысами КМ и Вистар на P15 и P120, однако в НБЧ 2-месячных крыс КМ (P60) экспрессия VGAT была значительно повышена по сравнению с характерной для крыс линии Вистар этого возраста (рис. 1).

Для оценки постсинаптических эффектов мы провели анализ экспрессии белков, отвечающих за эффекты ГАМК в клетках-мишенях нижних бугров четверохолмия. В первую очередь оценили уровень экспрессии $\alpha 1$ -субъединицы постсинаптического ГАМК-А рецептора (GABAAR(α)), которая является обязательным компонентом рецептора, участвующим в связывании ГАМК [23]. Иммуногистохимический анализ выявил повышенную экспрессию GABAAR(α) у крыс КМ на 15-й день жизни, тогда как в других возрастных группах (P60, P120) она не отличалась от соответствующего контроля Вистар (рис. 2a, 2b).

Кроме того, мы проанализировали экспрессию активных транспортеров Cl^- , KCC2 и NKCC1, которые поддерживают баланс Cl^- в клетках-мишенях путем на-

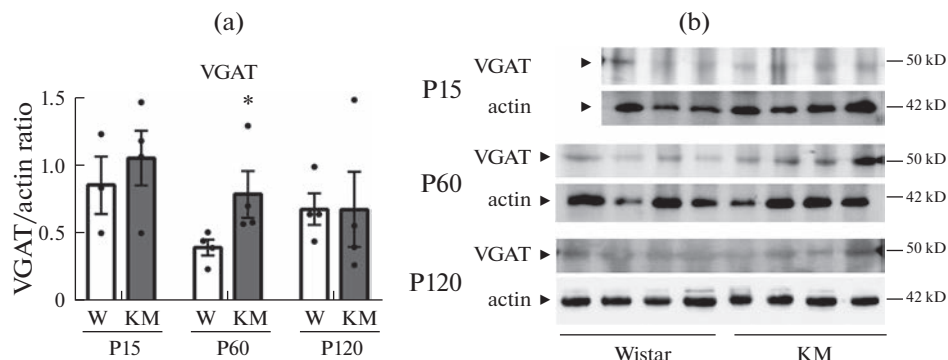


Рис. 1. Экспрессия везикулярного транспортера ГАМК VGAT в нижних буграх четверохолмия (НБЧ) крыс Крушинского—Молодкиной (KM) и Вистар в постнатальном онтогенезе. (а) Вестерн-блот анализ везикулярного транспортера ГАМК (VGAT) в НБЧ не выявил различий между крысами Вистар (W) и KM на 15-й (P15) и 120-й (P120) дни постнатального развития, однако на 60-й день (P60) экспрессия VGAT была повышена в НБЧ крыс KM. Данные Вестерн-блот анализа представлены как среднее $\pm$ SEM. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем. (б) Репрезентативные изображения иммуноблота VGAT и актина в НБЧ крыс KM и Вистар на соответствующих стадиях онтогенеза.

копления или вывода Cl^- соответственно [6]. Наши данные показали, что при P15 экспрессия KCC2 в НБЧ крыс KM не отличалась от характерной для крыс Вистар (рис. 2с, 2d), в то время как экспрессия NKCC1 была выше, чем у крыс Вистар, что, вероятно, указывает на увеличение притока Cl^- (рис. 2е, 2f). В возрасте P60 экспрессия обоих транспортеров не отличалась между крысами KM и Вистар (рис. 2с–f). Однако у 4-месячных крыс KM наблюдалась аномально низкая экспрессия KCC2 наряду с неизменным NKCC1 (рис. 2с–f). Наблюдаемые изменения могут указывать на изменение внутриклеточного баланса Cl^- с повышением его эффлюкса у взрослых животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы проанализировали зависящие от возраста изменения экспрессии ключевых белков, ответственных за синтез, синаптическую передачу и постсинаптические эффекты ГАМК в НБЧ крыс KM в трех онтогенетических точках — P15, P60 и P120.

15-й постнатальный день (P15)

Согласно данным литературы, конец второй постнатальной недели — это период, когда нормальный морфогенез НБЧ обычно завершается, хотя некоторые процессы развития продолжают до конца первого месяца [16, 24]. Наши предыдущие данные показали, что двухнедельные крысы KM все еще демонстрировали повышенную пролиферацию и апоптоз в НБЧ, что указывает на задержку созревания этой структуры по сравнению с нормальными крысами (Вистар) [20]. Более того, наши предыдущие исследования показали, что в НБЧ крыс KM в этот период времени экспрессия основного фермента синтеза ГАМК GAD67 была такой же, как в контроле, что указывает на отсутствие изменений в синтезе ГАМК. PV — кальций-связывающий белок, являющийся маркером активных ГАМК-ергических нейронов. Количество PV-позитивных клеток у 15-дневных крыс KM было ниже, чем у

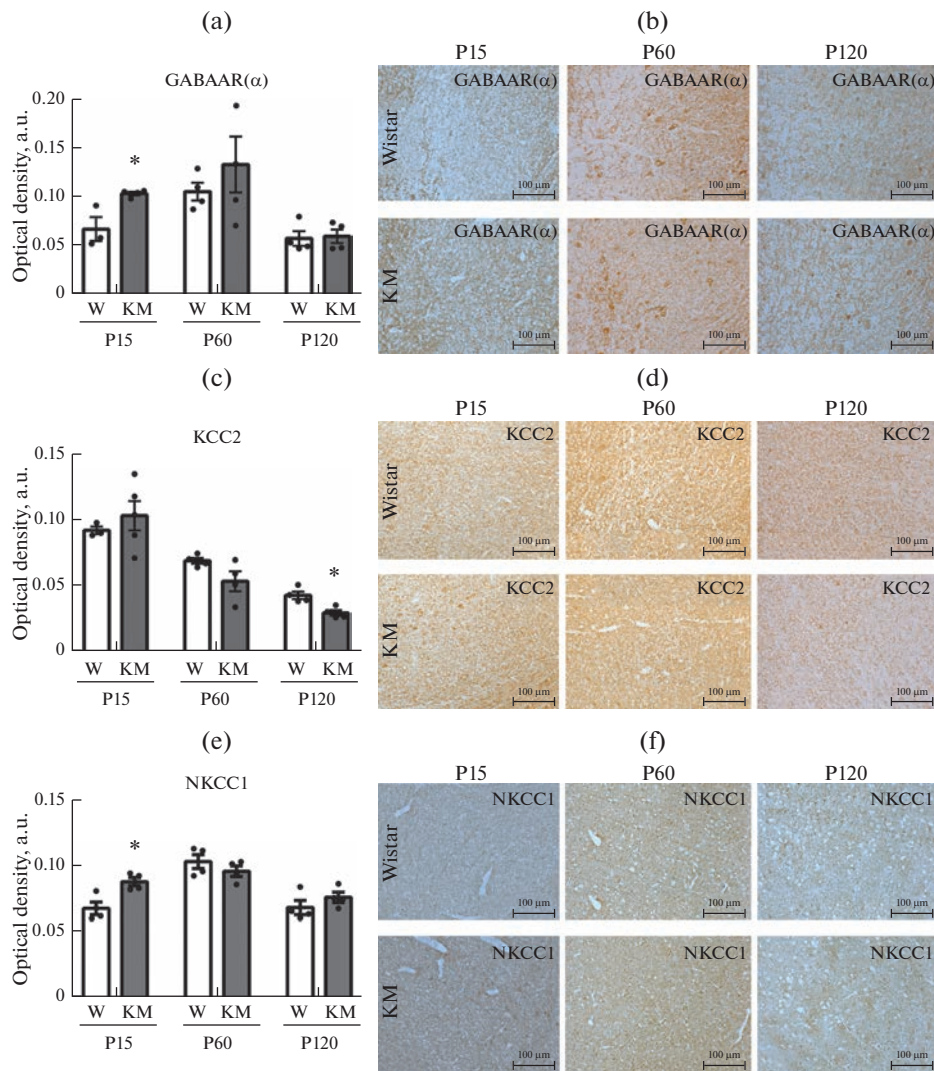


Рис. 2. Экспрессия белков, отвечающих за эффекты γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в клетках-мишенях нижних бугров четверохолмия (НБЧ) крыс Крушинского–Молодкиной (КМ) и Вистар в постнатальном онтогенезе. (а) – Иммуногистохимический анализ показал повышенную экспрессию $\alpha 1$ -субъединицы рецепторов ГАМК-А (GABAAR ($\alpha 1$)) в НБЧ крыс КМ в возрасте P15, в то время как в другие возрастные сроки она не отличалась от таковой у крыс Вистар. (б) – Репрезентативные микрофотографии ИГХ GABAAR(α) в центральном ядре НБЧ крыс Вистар и КМ в P15, P60 и P120. (с) – Экспрессия K^+/Cl^- котранспортера (KCC2) в НБЧ крыс КМ не отличалась от контроля Вистар в возрасте P15 и P60, но была значительно снижена в P120. (д) – Репрезентативные микрофотографии ИГХ KCC2 в центральном ядре НБЧ крыс Вистар и КМ в P15, P60 и P120. (е) – Экспрессия $Na^+/K^+/Cl^-$ котранспортера 1 (NKCC1) в НБЧ крыс КМ, напротив, была повышена в P15, но не в других временных точках. (е) – Репрезентативные микрофотографии ИГХ NKCC1 в центральном ядре НБЧ крыс Вистар и КМ в P15, P60 и P120. Графики (а), (с), (е) показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества в относительных единицах (а.е.). Иммуногистохимические данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Масштабные линейки: 100 мкм.

Вистар, что указывает на снижение активности ГАМК-ергических клеток [25]. Эти изменения сопровождались снижением активности синапсина 1, что указывает на снижение синаптической передачи, и в частности на ослабление высвобождения ГАМК [25]. Вероятно, эти данные указывают на задержку формирования ГАМК-ергической системы в НБЧ крыс КМ на ранних этапах постнатального развития.

В настоящей работе получены новые данные, дополняющие картину дисрегуляции ГАМК в НБЧ крыс КМ в первые месяцы постнатального развития. Так, анализ VGAT, ответственного за загрузку ГАМК в синаптические везикулы, не выявил изменений у 15-дневных крыс КМ, но повышенная экспрессия постсинаптических рецепторов GABAAR(α 1) указывала на снижение связывания ГАМК и интернализации рецептора [26, 27], что связано с описанной ранее дисрегуляцией ГАМК-ергической передачи.

Постсинаптические эффекты ГАМК тесно связаны с балансом Cl^- в клетках-мишенях, который, в свою очередь, зависит от экспрессии и активности транспортеров ионов хлора KCC2 и NKCC1 [6]. Более того, предполагается, что изменения в соотношении экспрессии KCC2 и NKCC1 являются ключевым механизмом, который регулирует переключение эффекта ГАМК с возбуждения на торможение во время постнатального развития всего мозга [28, 29]. В первые постнатальные дни преобладает экспрессия NKCC1, а экспрессия KCC2 низкая, что поддерживает относительно высокую внутриклеточную концентрацию Cl^- и деполяризующее действие ГАМК [30, 31]. Затем, в течение первых двух недель, активный синаптогенез сопровождается увеличением экспрессии KCC2, что приводит к усиленному выведению Cl^- из клеток и установлению гиперполяризующего эффекта ГАМК [17, 18]. Наше исследование не выявило изменений по сравнению с крысами Вистар в экспрессии KCC2 в НБЧ 15-дневных крыс КМ, однако наблюдалась аномально повышенная экспрессия NKCC1. Эти данные недостаточны для предположения о задержке переключения возбуждающей функции ГАМК на тормозную в НБЧ. Тем не менее, повышение экспрессии NKCC1 может быть связано с увеличением притока Cl^- в клетки-мишени ГАМК, что приводит к ухудшению тормозного действия ГАМК, в дополнение к снижению высвобождения ГАМК.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что к концу второй постнатальной недели активность ГАМК-ергических нейронов и ГАМК-ергическая нейротрансмиссия были аномально снижены в НБЧ крыс КМ. Поскольку этот период связан с активным созреванием ГАМК-ергической системы в этой структуре мозга, наши результаты свидетельствуют о генетически обусловленной задержке становления тормозных ГАМК-ергических проекций в НБЧ крыс КМ.

60-й постнатальный день (P60)

Согласно нашим предыдущим исследованиям, к концу второго месяца развитие НБЧ у крыс КМ завершается, поскольку количество клеток, пролиферация и апоптоз больше не отличаются от контроля Вистар [20]. Однако повышенное число GAD67- и PV-позитивных клеток и повышенная активность синапсина 1 в НБЧ двухмесячных крыс КМ указывали на повышенную активность ГАМК-ергической системы в этом слуховом центре. Наши данные показали также увеличение экспрессии VGAT в НБЧ, что дополнительно указывает на повышенную активность высвобождения ГАМК. Экспрессия GABAAR(α 1) рецепторов и транспортеров Cl^- в НБЧ достигла контрольного уровня. Таким образом, поскольку НБЧ является критической структурой, ответственной за запуск АГП, наблюдаемое усиление тормозной передачи может быть одним из основных факторов, препятствующих стабильной экспрессии АГП у крыс КМ данного возраста.

120-й постнатальный день (P120)

Анализ взрослых крыс КМ с полностью сформированной способностью к АСП также продемонстрировал значительные отличия в состоянии ГАМК-ергической системе НБЧ по сравнению с крысами родительской линии Вистар. Ранее мы обнаружили аномально низкую экспрессию GAD67 и PV в центральных ядрах НБЧ взрослых крыс КМ, что указывает на снижение функциональной активности ГАМК-ергических нейронов [21]. Ранее у крыс КМ не было показано нарушений в числе ГАМК-ергических нейронов в НБЧ относительно контрольной линии крыс КМ "0", не проявляющих аудиогенной эпилепсии [32]. При этом уровень экспрессии мРНК GAD67 оказался у крыс КМ выше в пять раз. Однако в данном случае крыс, подверженных аудиогенной эпилепсии, не сравнивали с крысами родительской линии Вистар, что, возможно, объясняет расхождение в полученных результатах. Наши данные также показали значительное снижение экспрессии KCC2, что позволило нам предположить снижение эффлюкса Cl^- в клетках, получающих ГАМК-ергическую иннервацию и экспрессирующих ГАМК-А рецепторы, и, следовательно, ухудшение гиперполяризующего действия ГАМК в НБЧ. Таким образом, резкое ослабление ГАМК-ергической передачи, наряду с нарушением баланса Cl^- в клетках-мишенях, может вносить значительный вклад в повышенную возбудимость НБЧ у взрослых крыс КМ и опосредовать наступление полностью сформированной судорожной готовности.

Интересно, что исследования других грызунов с предрасположенностью к аудиогенным судорогам показали противоположные изменения в ГАМК-ергической системе НБЧ. Так, в центральном ядре НБЧ крыс GEPR-9 наблюдалось повышенное количество GAD67-позитивных нейронов, что указывает на усиление выработки ГАМК [10]. Кроме того, хомяки, генетически предрасположенные к аудиогенным судорогам (GASH:Sal) продемонстрировали неизменную экспрессию KCC2 в НБЧ [15]. Хотя проявление рефлекторных припадков у разных видов животных сходны, вероятно, наблюдаемые расхождения можно объяснить различными генетическими аномалиями, которые в ходе постнатального развития приводят к возникновению разных нейрхимических нарушений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования, наряду с предыдущими результатами [21], позволили нам сравнить постнатальное развитие ГАМК-ергической системы в НБЧ крыс КМ, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам, и предположить возможный вклад генетически обусловленных изменений в восприимчивость к АГП. В ранние сроки постнатального развития (конец второй постнатальной недели) у крыс КМ наблюдалось снижение активности ключевых маркеров ГАМК-ергической системы в НБЧ по сравнению с крысами Вистар. Кроме того, измененная экспрессия транспортеров Cl^- KCC2 и NKCC1 в этой структуре мозга указывала на дисбаланс Cl^- в нейронах-мишенях и, следовательно, на нарушение ГАМК-опосредованного торможения. Эти результаты подтверждают замедленное созревание ГАМК-ергической системы в НБЧ, что может лежать в основе патологических изменений в дальнейшем, у взрослых крыс КМ.

К концу второго постнатального месяца (P60) у крыс КМ наблюдалась стабилизация и даже повышение уровня ГАМК-передачи в НБЧ. Однако у взрослых животных с полностью сформировавшейся судорожной готовностью (P120) функциональная активность ГАМК-ергических клеток была значительно снижена, а аномально низкий уровень KCC2 вновь позволил предположить нарушение ГАМК-опосредованной гиперполяризации в нейронах НБЧ. С другой стороны,

предыдущий анализ возбуждающей (глутаматергической) системы не выявил никаких нарушений в НБЧ взрослых крыс КМ [21]. Таким образом, генетически обусловленная дисфункция тормозной передачи может быть одним из основных факторов повышенной возбудимости НБЧ у крыс КМ, способствуя функционированию НБЧ как триггерной структуры аудиогенного судорожного припадка.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, 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 им. И.М. Сеченова (код протокола 6-3/2022, 23 июня 2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данное исследование было поддержано программой Правительства РФ № 075-967-23-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть анализа была проведена в Научно-исследовательском ресурсном центре № 441590 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blauwblomme T, Dossi E, Pellegrino C, Goubert E, Iglesias BG, Sainte-Rose C, Rouach N, Nabhout R, Huberfeld G* (2019) Gamma-aminobutyric acidergic transmission underlies interictal epileptogenicity in pediatric focal cortical dysplasia. *Ann Neurol* 85: 204–217. <https://doi.org/10.1002/ana.25403>
2. *Wang Y, Wang Y, Chen Z* (2018) Double-edged GABAergic synaptic transmission in seizures: The importance of chloride plasticity. *Brain Res* 1701: 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.09.008>
3. *Houser CR* (2014) Do structural changes in GABA neurons give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol* 813: 151–160. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8914-1_12
4. *Goodkin HP, Yeh JL, Kapur J* (2005) Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. *J Neurosci* 25: 5511–5520. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0900-05.2005>
5. *Scharfman HE, Brooks-Kayal AR* (2014) Is plasticity of GABAergic mechanisms relevant to epileptogenesis? *Adv Exp Med Biol* 813: 133–150. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8914-1_11
6. *Liu R, Wang J, Liang S, Zhang G, Yang X* (2019) Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. *Front Neurol* 10: 1407. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01407>

7. Palma E, Amici M, Sobrero F, Spinelli G, Di Angelantonio S, Ragozzino D, Mascia A, Scoppetta C, Esposito V, Miledi R, Eusebi F (2006) Anomalous levels of Cl⁻ transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8465–8468.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602979103>
8. Vinogradova LV (2017) Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. *Epilepsy Behav* 71: 142–153.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.06.014>
9. Faingold CL (1999) Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Adv Neurol* 79: 311–321.
10. Ribak CE (2017) An abnormal GABAergic system in the inferior colliculus provides a basis for audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Behav* 71: 160–164.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.02.024>
11. Ribak CE, Morin CL (1995) The role of the inferior colliculus in a genetic model of audiogenic seizures. *Anat Embryol (Berl)* 191: 279–295.
<https://doi.org/10.1007/BF00534681>
12. Lasley SM (1991) Roles of neurotransmitter amino acids in seizure severity and experience in the genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res* 560: 63–70.
13. Simler S, Ciesielski L, Clement J, Rastegar A, Mandel P (1992) Involvement of synaptosomal neurotransmitter amino acids in audiogenic seizure-susceptibility and -severity of Rb mice. *Neurochem Res* 17: 953–959.
<https://doi.org/10.1007/BF00993272>
14. Fuentes-Santamaria V, Alvarado JC, Herranz AS, Garcia-Atares N, Lopez DE (2008) Decreased levels of GABA in the inferior colliculus of the epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res* 79: 224–227.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.02.003>
15. Prieto-Martin AI, Aroca-Aguilar JD, Sanchez-Sanchez F, Munoz LJ, Lopez DE, Escribano J, de Cabo C (2017) Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: The GASH:Sal model. *Epilepsy Behav* 71: 218–225.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.025>
16. Lohmann C, Friauf E (1996) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J Comp Neurol* 367: 90–109.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960325\)367:1<90::AID-CNE7>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960325)367:1<90::AID-CNE7>3.0.CO;2-E)
17. Achilles K, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A, Luhmann HJ, Kilb W (2007) Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na⁺-dependent K⁺-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci* 27: 8616–8627.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5041-06.2007>
18. Valeeva G, Valiullina F, Khazipov R (2013) Excitatory actions of GABA in the intact neonatal rodent hippocampus in vitro. *Front Cell Neurosci* 7: 20.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00020>
19. Федотова ИБ, Семиохина АФ (2002) Аудиогенная эпилепсия и миоклонус в онтогенезе крыс КМ. *Журн высш нерв деят* 52(2): 261–265. [Fedotova IB, Semiokhina AF (2002) Developmental changes in audiogenic epilepsy and myoclonus in KM rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 52(2): 261–265. (In Russ)].
20. Chernigovskaya EV, Dorofeeva NA, Nasluzova EV, Kulikov AA, Ovsyannikova VV, Glazova MV (2018) Apoptosis and proliferation in the inferior colliculus during postnatal development and epileptogenesis in audiogenic Krushinsky-Molodkina rats. *Epilepsy Behav* 88: 227–234.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.09.023>
21. Chernigovskaya EV, Dorofeeva NA, Lebedenko OO, Nikolaeva SD, Naumova AA, Lavrova EA, Glazova MV (2019) Neurochemical Organization of the Inferior Colliculus in Audiogenic Krushinsky-Molodkina Rats During Development of Seizure Susceptibility. *Russ J Physiol* 105: 724–741.
<https://doi.org/10.1134/S0869813919060013>
22. Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18: 9733–9750.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09733.1998>
23. Olsen RW, Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56: 141–148.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.045>
24. Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H (1993) Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 69: 236–242.
[https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90113-f](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90113-f)
25. Chernigovskaya EV, Korotkov AA, Dorofeeva NA, Gorbacheva EL, Kulikov AA, Glazova MV (2019) Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with over-activation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling. *Epilepsy Behav* 99: 106494.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106494>

26. *Leidenheimer NJ* (2008) Regulation of excitation by GABA(A) receptor internalization. *Results Probl Cell Differ* 44: 1–28.
https://doi.org/10.1007/400_2007_039
27. *Barnes EM Jr* (1996) Use-dependent regulation of GABAA receptors. *Int Rev Neurobiol* 39: 53–76.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7742\(08\)60663-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7742(08)60663-7)
28. *Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E, Nothwang HG* (2006) Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J Neurosci* 26: 10407–10419.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-06.2006>
29. *Lu J, Karadshah M, Delpire E* (1999) Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 39: 558–568.
30. *Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, Sato K* (2001) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104: 933–946.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00149-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00149-x)
31. *Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, Mori N, Fukuda A, Sato K* (2002) Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 59–66.
[https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00536-9](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00536-9)
32. *Solius GM, Revishchin AV, Pavlova GV, Poletaeva II* (2016) Audiogenic epilepsy and GABAergic system of the colliculus inferior in Krushinsky-Molodkina rats *Dokl Biochem Biophys* 466: 32–34.
<https://doi.org/10.1134/S1607672916010099>

Dysregulation of GABAergic System in the Inferior Colliculi of Rats during the Development of Audiogenic Epilepsy

S. D. Nikolaeva^a, A. P. Ivlev^a, A. A. Naumova^a, A. A. Kulikov^a,
M. V. Glazova^{a, *}, and E. V. Chernigovskaya^a

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

^{*}*e-mail: mglazova@iephb.ru*

Epilepsy is tightly associated with dysfunction of inhibitory GABA neurotransmission. In this study, Krushinsky–Molodkina (KM) rats genetically prone to audiogenic seizures (AGS) were used. KM rats are characterized by the development of audiogenic epilepsy during postnatal ontogenesis, with AGS onset at the age of 1.5–2 months and fully developed AGS expression by 3rd month. We analyzed GABAergic system of the inferior colliculi (IC) of KM rats at different stages of postnatal development. Wistar rats were used as a control. In the IC of young KM rats, Na⁺/K⁺/Cl[−] cotransporter 1 (NKCC1) expression was increased, while K⁺/Cl[−] cotransporter 2 (KCC2) was unchanged indicating impairment of postsynaptic GABA action at early stages of postnatal development. Moreover, we revealed also an increase in the expression of vesicular GABA transporter (VGAT) in the IC which additionally pointed on the higher activity of GABA release. In adult rats, in opposite, we revealed a decrease in the expression of KCC2 transporter indicating downregulation of GABA inhibition on the target cells. Thus, GABA dysregulation in the IC can mediate the seizure susceptibility in adult KM rats.

Keywords: Krushinsky–Molodkina rats, audiogenic seizures, inferior colliculi, postnatal ontogenesis