

Функциональное состояние nigrostriatalной системы крыс линии Крушинского – Молодкиной в ходе аудиогенных судорог

Н.А. Дорофеева, Л.С. Никитина, Д.В. Зосен, М.В. Глазова, Е.В. Черниговская

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Нейрохимические механизмы запуска и реализации судорожного припадка при эпилепсии в настоящее время остаются мало изученными и практически нет работ, оценивающих состояние нейромедиаторных систем на ранних этапах судорожных припадков на генетических моделях животных с повышенной судорожной готовностью. Было проведено исследование роли ERK1/2 киназы (extracellular signal-regulated kinase) в регуляции активности глутамат-, ГАМК- и дофаминергических нейронов nigrostriatalной системы крыс линии Крушинского – Молодкиной на клонико-тонической стадии и на стадии атаксии аудиогенного судорожного припадка. Показано, что при предъявлении крысам линии Крушинского – Молодкиной специфического звукового раздражителя происходит увеличение активности ERK1/2 киназы в стриатуме и в черной субстанции по сравнению с интактными крысами Крушинского – Молодкиной, что сопровождается усилением активности Synapsin 1. В результате активации экзоцитоза усиливается выброс глутамата в стриатуме, что приводит к инициации судорог. Однако на стадии клонико-тонических стадий в стриатуме мы выявили ряд изменений, приводящих к остановке судорожного припадка. Повышение фосфорилирования тирозин-гидроксилазы в компактной части черной субстанции за счет усиления активности ERK1/2 киназы приводит к интенсивному выбросу дофамина в стриатуме. При этом происходит увеличение содержания D2- и снижение D1-рецепторов, что указывает на ослабление D1 (проэпилептического) и активации D2 (антиэпилептического) зависимых путей регуляции ГАМК-ергических нейронов черной субстанции. Мы показали увеличение содержания ферментов синтеза ГАМК в ретикулярной части черной субстанции, что, возможно, приводит к ингибированию глутаматергических нейронов таламуса и является одним из механизмов торможения судорожной активности на стадии атаксии.

Ключевые слова: крысы Крушинского – Молодкиной; иммуногистохимия; Вестерн блоттинг; nigrostriatalная система; дофаминергические нейроны; D2- и D1-рецепторы дофамина; ERK1/2; глутамат; ГАМК; Synapsin 1.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Дорофеева Н.А., Никитина Л.С., Зосен Д.В., Глазова М.В., Черниговская Е.В. Функциональное состояние nigrostriatalной системы крыс линии Крушинского – Молодкиной в ходе аудиогенных судорог. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):204-211. DOI 10.18699/VJ16.146

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dorofeeva N.A., Nikitina L.S., Zosen D.V., Glazova M.V., Chernigovskaya E.V. Functional state of the nigrostriatal system of Krushinsky – Molodkina rats during audiogenic seizure expression. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):204-211. DOI 10.18699/VJ16.146

ORIGINAL ARTICLE

Received 25.09.2015 г.

Accepted for publication 20.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

Functional state of the nigrostriatal system of Krushinsky – Molodkina rats during audiogenic seizure expression

N.A. Dorofeeva, L.S. Nikitina, D.V. Zosen, M.V. Glazova, E.V. Chernigovskaya

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Neurochemical mechanisms of initiation and expression of epileptic seizures are poorly explored, and there are no published data that could demonstrate the functional state of the neuromediator systems at the initial state of seizure in the animals genetically prone to seizure. In the current work, we studied the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) in the regulation of the nigrostriatal glutamate, GABA and dopamine neurons of Krushinsky – Molodkina rats at clonus-tonus and ataxia stages of audiogenic seizure. We demonstrated upregulation of ERK1/2 activity upon audio stimulation which was accompanied by increased activation of Synapsin I in the striatum and substantia nigra in comparison to intact Krushinsky – Molodkina rats. The observed exocytosis activation led to secretion of glutamate in the striatum and, as a result, to stimulation of seizures. However, at clonus-tonus stage in the striatum we revealed the changes that could participate in further inhibition of seizure activity, such as increased phosphorylation of tyrosine hydroxylase upon increased ERK1/2 activity followed by activation of dopamine release in the pars compacta of the substantia nigra. At the same time, enhanced D2 and increased D1 dopamine receptor contents were observed. These data revealed attenuation of direct (pro-seizure) and indirect (anti-seizure) pathways of the regulation of the substantia nigra GABA neurons. We demonstrated activation of GABA in the substantia nigra pars reticulata, which probably results in the inhibition of glutamate neurons of the thalamus and could be one of the mechanisms inhibiting seizure activity during ataxia.

Key words: Krushinsky–Molodkina rats; immunohistochemistry; Western blot; nigrostriatal bundle; dopamine neurons; D1 and D2 dopamine receptors; ERK1/2; glutamate; GABA; Synapsin 1.

Эпилепсия – одно из распространенных неврологических заболеваний, которым страдают 0,5–1 % мирового населения (Hauser, 1994). В настоящее время для изучения механизмов формирования эпилептиформной активности широко используются экспериментальные модели аудиогенной эпилепсии на животных, имеющих генетическую предрасположенность к судорожным припадкам. Одной из таких экспериментальных моделей являются крысы инбредной линии Крушинского–Молодкиной (Крушинский, 1960). Животные этой линии, характеризующиеся двухволновым клонико-тоническим припадком, который возникает у них в ответ на звук высокой мощности, были получены на основе аутбредной популяции крыс Вистар.

Значительную роль в регуляции двигательной активности, в том числе судорожных припадков, играет комплекс структур базальных ганглиев (Deransart, Deraulis, 2002). Центральным звеном системы базальных ганглиев можно считать стриатум, в котором происходит сбор и анализ информации, приходящей из других отделов мозга (Graybiel, 1990; Gurney et al., 2004).

В работе рассмотрена дорсолатеральная часть стриатума, которая, помимо глутаматергических проекций из сенсомоторной и ассоциативной областей коры, иннервируется дофаминергическими нейронами черной субстанции, в свою очередь, получающими проекции от ГАМК-ергических нейронов стриатума (Lynd-Balta, Haber, 1994; Durieux et al., 2012). В настоящее время принято различать две субпопуляции длинноаксонных умеренно-шипиловых ГАМК-ергических нейронов, различающихся по направлению эфферентных проекций и составу экспрессируемых белков. Первая субпопуляция нейронов иннервирует ретикулярную часть черной субстанции, характеризуется экспрессией рецептора дофамина D1 и дает начало просудорожному прямому пути базальных ганглиев. Вторая субпопуляция направляет отростки к бледному шару, экспрессирует рецептор дофамина D2 и дает начало непрямому антисудорожному пути базальных ганглиев (Gerfen et al., 1990; Le Moine, Bloch, 1995).

Эпилептиформные состояния обусловлены нарушением механизмов, которые обеспечивают баланс между возбуждающими и тормозными системами мозга – дофамин-, глутамат- и ГАМК-ергическими, в том числе в базальных ганглиях. Нарушение взаимодействия этих систем может происходить на уровне нарушения синтеза нейромедиаторов, рецепторного связывания и на этапе их выведения за счет изменения в процессах экзоцитоза (Bradford, Peterson, 1987; Scharfman, 2007). Одним из координирующих механизмов влияния дофамина и глутамата на активность ГАМК-ергических нейронов стриатума является ERK1/2 сигнальный каскад (Valjent et al., 2000; Guerrero et al., 2002; Chen et al., 2004; Nateri et al., 2007). Связывание D1-рецептора с медиатором вызывает активацию ERK1/2, что, в свою очередь, повышает активность NR2B субъединицы NMDA-рецептора (Greengard, 2001; Lee et al., 2002). Стимуляция кортикостриатальных проекций вызывает активацию фосфорилирования ERK1/2 киназ в D2-позитивных нейронах стриатума (Sgambato et al., 1998; Gerfen et al., 2002; Kotecha et al., 2002; Bertran-Gonzalez et al., 2008).

На различных моделях было показано, что ERK1/2 киназы играют важную роль в формировании различных форм эпилепсии у человека и животных (Nateri et al., 2007; O'Sullivan et al., 2008; Lindgren et al., 2009; Osterweil et al., 2010; Glazova et al., 2015). Некоторые авторы рассматривают возможность использования функций ERK1/2 и их блокаторов в фармакологии (Nateri et al., 2007; Sebolt-Leopold, Herrera, 2004). Все это позволяет предположить участие ERK1/2 киназ в регуляции активности нейронов nigростриатной системы в ходе аудиогенных судорожных припадков.

ERK1/2 киназы оказывают влияние на процессы биосинтеза нейромедиаторов. Например, они являются одним из факторов активации тирозингидроксилазы, фосфорилируя ее по серину-31 (Hauck et al., 1992). ERK1/2 киназы могут не только регулировать интенсивность фосфорилирования ТГ, но и влиять на экспрессию гена тирозингидроксилазы, что приводит к усилению биосинтеза дофамина (DeCastro et al., 2005; Shah et al., 2006; Björklund, Dunnett, 2007). ERK1/2 киназы могут принимать участие в регуляции нейрональной активности также на этапе выведения нейротрансмиттеров, за счет активации синтеза и/или активности белков экзоцитоза, фосфорилируя Synapsin 1 (Murray et al., 1998; Longuet et al., 2005; Vara et al., 2009; Benagiano et al., 2011). При этом показано, что белки экзоцитоза вносят существенный вклад в процесс эпилептогенеза. Многие авторы рассматривают Synapsin 1 как один из важнейших элементов этого процесса (Yamagata et al., 1995; Garcia et al., 2004; Etholm, Heggelund, 2009; Vara et al., 2009; Fassio et al., 2011; Ketzef et al., 2011).

ERK1/2 являются также важным компонентом, вызывающим индукцию глутаматергической синаптической активности, обусловленной усилением экспрессии VGLUT2 (vesicular glutamate transporter 2) (Doyle et al., 2010), являющегося одним из маркеров интенсивности выведения глутамата. Кроме того, известна связь между нарушением экспрессии VGLUT2 и повышенной судорожной активностью (Schallier et al., 2009). Ранее нами было показано, что инактивация ERK1/2 привела к отмене или снижению тяжести судорожных припадков у крыс линии Крушинского–Молодкиной, что сопровождалось торможением выведения глутамата, вызванного снижением уровня фосфорилированного Synapsin 1 в гиппокампе. Это позволило предположить важную роль ERK1/2 в инициации судорожной активности (Glazova et al., 2015).

Целью нашего исследования являются изучение особенностей ответа nigростриатной системы крыс линии Крушинского–Молодкиной, имеющих генетическую предрасположенность к аудиогенным эпилептиформным припадкам, и исследование роли ERK1/2 киназ в эпилептогенезе. В работе показано, что в момент возникновения судорожной активности происходит значительная активация ERK1/2 киназ как в стриатуме, так и в черной субстанции, что, очевидно, приводит к изменению в состоянии дофамин-, глутамат- и ГАМК-ергических систем nigростриатного комплекса.

Материалы и методы

В качестве модели исследования судорожной готовности выбраны крысы инбредной линии Крушинского – Молодкиной с наследственной аудиогенной эпилепсией. Крысы Крушинского – Молодкиной отвечают на звуковой стимул полным и стабильным клонико-тоническим судорожным припадком в 99 % случаев. Повышенная судорожная готовность полностью формируется у них к концу третьего месяца жизни, и по достижении этого возраста они отвечают стабильным судорожным припадком на звуковой сигнал (Семиохина и др., 2006). В наших экспериментах крыс содержали в индивидуальных клетках вивария при естественном освещении и свободном доступе к пище и воде. Все процедуры проводили согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. В работе использовали крыс весом 250–300 г старше трех мес. Судорожная активность у крыс линии Крушинского – Молодкиной вызывалась звуковым стимулом (интенсивностью 50 дБ, частотой 10 кГц), подаваемым с генератора. Судорожное поведение крыс тестировалось по следующим характеристикам: наличие и длительность латентного периода аудиогенного припадка, «дикого бега», клонических и тонических судорог и атаксии. Все крысы были подвергнуты звуковой стимуляции за две недели до начала эксперимента для проверки их готовности к судорожным припадкам и первая, контрольная, группа крыс была выведена из эксперимента без предъявления звукового стимула. Крыс этого же возраста второй группы подвергали звуковой стимуляции и декапитировали на стадии клонико-тонических судорог после предъявления звукового сигнала. Крысы третьей группы были декапитированы на стадии атаксии. Все три группы животных были выведены из эксперимента в один день. Мозг разделяли на две половины в сагиттальной плоскости. Далее из одной половины иссекали стриатум и черную субстанцию для приготовления проб для последующего биохимического (Вестерн-блот) анализа. Вторую половину мозга фиксировали в 4 %-м параформальдегиде, разведенном на фосфатном буфере и охлажденном до 4 °С для последующего иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимический метод. После стандартной предварительной обработки срезы инкубировали с первичными антителами к GAD67 (1:750, Millipore); GAD65 (1:750, Abcam); VGLUT2 (1:200, Abcam); фосфо-Synapsin 1 (1:500, ProSci Incorporated); фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (1:250, Cell Signaling Technology), фосфо-тирозингидроксилазе (Ser31) (1:1000, Millipore), тирозингидроксилазе (1:1000, Sigma-Aldrich), D1а- и D2-рецепторам (1:1000, Millipore) в течение 12 ч при комнатной температуре. После промывки в PBS срезы обрабатывали биотинилированными вторичными антителами (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 в стандартных условиях. Для оценки специфичности иммунного окрашивания в каждом случае делали отрица-

тельный контроль (выполнение иммуногистохимической реакции без первичных антител), результатом чего было отсутствие иммунного окрашивания. Анализ производили с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Imager A1.

Вестерн-блоттинг. Для приготовления проб из мозга иссекали стриатум и черную субстанцию. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE). Далее белковые фракции переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences, Freiburg, Германия). Использовали те же первичные антитела, что и при иммуногистохимическом анализе. 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, выявляемому для определения уровня общего количества белка в пробах. Уровень фосфорилирования ERK1/2 киназ и тирозингидроксилазы был скорректирован по уровню общего количества этих белков в пробах.

Морфофункциональный анализ материала. Количественная оценка содержания исследуемых веществ в стриатуме и черной субстанции проводилась на основании измерения оптической плотности иммунореактивного вещества в телах нейронов или волокнах на микрофотографиях с помощью программного обеспечения ВидеоТест, а также на пленках Вестерн-блот анализа с помощью программного обеспечения ImageJ. Данные были выражены в условных единицах оптической плотности. Кроме оценки содержания в нейронах иммунореактивного вещества, в некоторых случаях проводился подсчет количества нейронов, давших интенсивную иммуногистохимическую реакцию на выявляемые белки.

Статистический анализ результатов. Все полученные данные обрабатывали статистически по *t*-критерию Стьюдента, а также по критерию Манна–Уитни, при оценке достоверности отличий между группами *n* = количеству животных в группе. В каждой экспериментальной группе было исследовано по пять крыс. Данные представлены в виде среднего значения по каждой группе животных ± стандартное отклонение для среднего значения. Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Изменение активности глутаматергических нейронов в стриатуме крыс Крушинского – Молодкиной при предъявлении звукового сигнала. В стриатуме на стадии клонико-тонических судорог наблюдалось значительное снижение уровня VGLUT2 (рис. 1, а–г). Эти данные подтверждает увеличение фосфорилирования Synapsin 1 (рис. 1, д, е), вызванное повышенной активностью ERK1/2 киназ (рис. 1, ж). На стадии атаксии, несмотря на высокое содержание фосфо-ERK1/2 киназ, количество активных форм Synapsin 1 снижается, хоть и остается несколько выше контрольного уровня (рис. 1, з). Видимо, это приводит к снижению интенсивности выброса глутамата на стадии атаксии и накоплению его в терминальных отделах, что выражается в повышении содержания VGLUT2 (рис. 1, а).

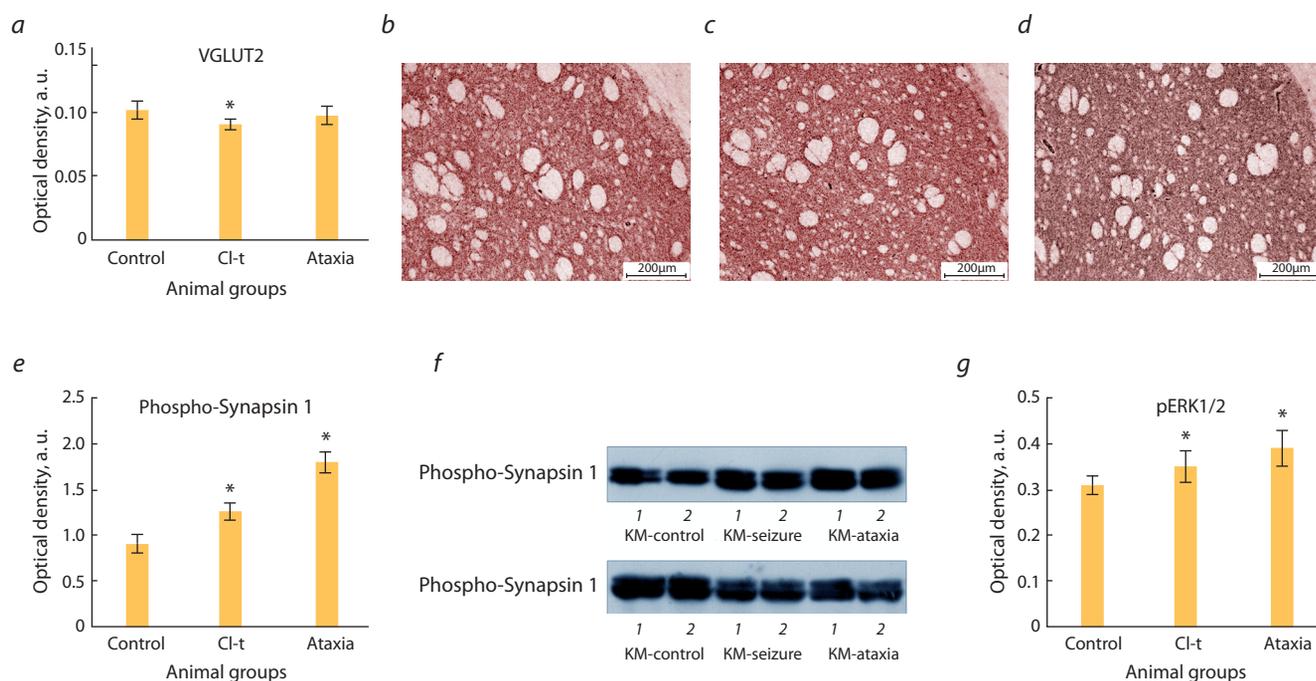


Fig. 1. Contents of (a) VGLUT2, (e) phospho-Synapsin 1, and (g) phospho-ERK1/2 in the striatum of Krushinsky–Molodkina rats of the control group at tonic-clonic seizure and ataxia.

The contents of (a) VGLUT2 and (g) phospho-ERK1/2 were assessed from their immunoreactivities on histological slices. (f) The expression level of phospho-Synapsin 1 was evaluated by Western blot analysis. Optical density is expressed in arbitrary units as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ vs. tonic-clonic seizure. Immunohistochemical detection of VGLUT2 in the striatum of KM rats: (b) in the control, (c) at tonic-clonic seizure, and (d) ataxia.

Изменение активности ГАМК-ергических нейронов в стриатуме и черной субстанции крыс Крушинского–Молодкиной при предъявлении звукового сигнала. Содержание GAD67 увеличивается уже на этапе возникновения судорожной активности и остается повышенным до конца стадии атаксии (рис. 2, a, б).

В волокнах ретикулярной части черной субстанции крыс Крушинского–Молодкиной на всех этапах судорог наблюдается повышение содержания белка GAD67 (рис. 3, a, б), что говорит об усилении уровня синтеза ГАМК. Содержание GAD65 на клонико-тонической стадии снижается (рис. 3, в), это свидетельствует об интенсивном выбросе ГАМК в данной структуре и может приводить к торможению ГАМК-ергических нейронов черной субстанции.

Изменение активности дофаминергических нейронов в стриатуме и черной субстанции крыс Крушинского–Молодкиной при предъявлении звукового сигнала. Вызванный специфическим звуковым стимулом судорожный припадок у крыс Крушинского–Молодкиной характеризуется повышением активности дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции, о чем свидетельствует увеличение содержания фосфотирозингидроксилазы на фоне снижения общего количества белка тирозингидроксилазы (рис. 4, a–z), что коррелирует с повышением активности ERK1/2 киназ. В стриатуме также отмечено повышение уровня фосфотирозингидроксилазы при увеличении содержания общей тирозингидроксилазы (рис. 4, d, e).

Повышенная активность дофаминергических нейронов черной субстанции приводит к повышению уровня D2-рецепторов стриатума на стадии клонико-тонических судорог (рис. 5, a, б), в то время как содержание D1 снижено (рис. 5, в–e). Однако уже на стадии атаксии содержание D2-рецепторов дофамина возвращается к контрольному уровню (рис. 5, a, б).

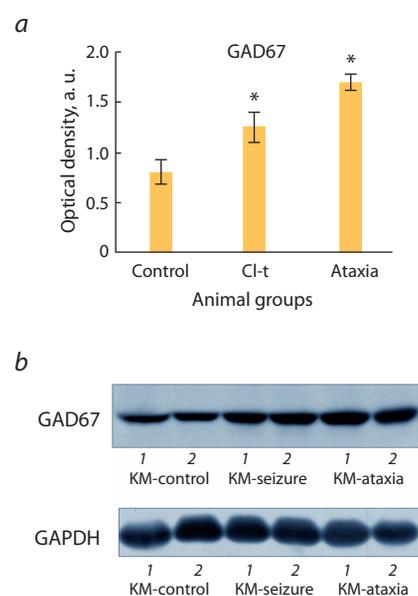
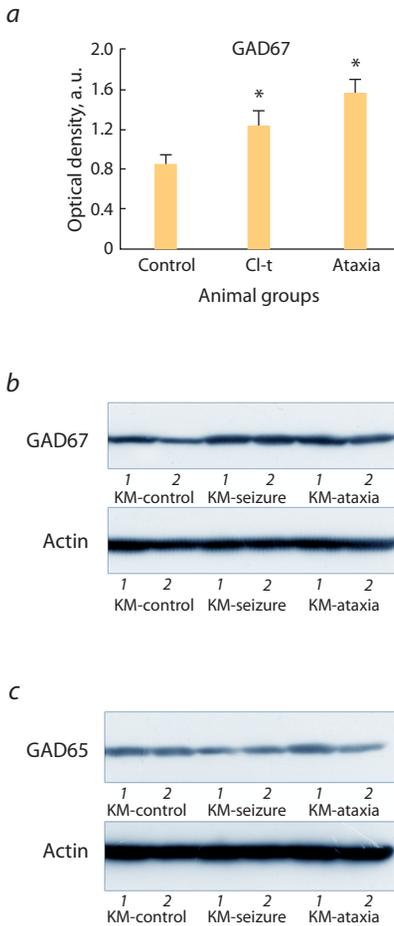
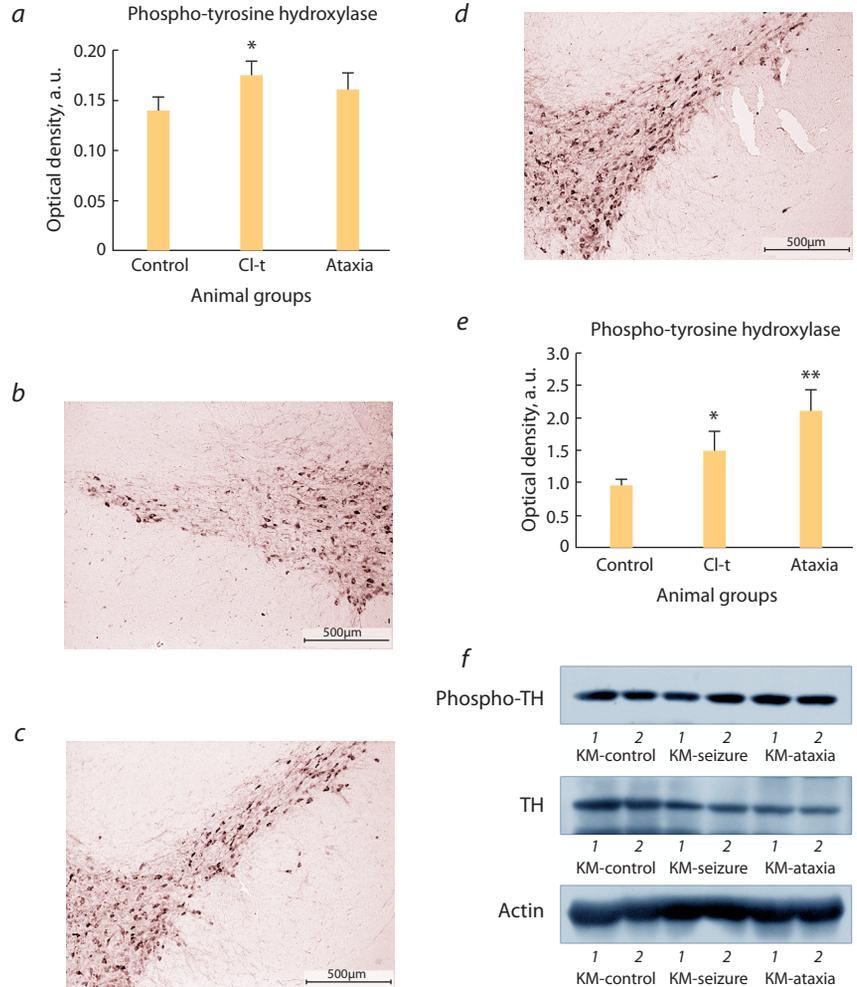


Fig. 2. Contents of GAD67 (a, б) in the striatum of Krushinsky–Molodkina rats in the control at tonic-clonic seizure and ataxia measured by Western blot analysis.

Optical density is presented in arbitrary units. Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. control.



Optical density is presented in arbitrary units. Data are shown as mean \pm SE. * p < 0.05 vs. control.



Optical density is presented in arbitrary units. Data are shown as mean \pm SE. * p < 0.05 vs. control.

Обсуждение

Нейрохимические механизмы запуска и реализации судорожного припадка при эпилепсии в настоящее время остаются малоизученными. Нами было проведено сопоставление состояния основных нейромедиаторных систем nigrostriатного комплекса крыс Крушинского – Молодкиной на клонико-тонической стадии и стадии атаксии. При этом необходимо отметить, что интерпретировать характер изменений при взятии мозга на стадии клонико-тонического припадка сложно. С одной стороны, это могут быть механизмы, направленные на запуск судорожной активности, с другой – выявленные

изменения могут являться результатом истощения активно работающих нейромедиаторных систем, что приводит к прекращению припадка и переходу крыс в стадию атаксии.

Судорожный припадок у крыс линии Крушинского – Молодкиной развивается в течение нескольких секунд после предъявления звукового сигнала, что заставляет предположить, что на нейрохимическом уровне изменения активности возбуждающих и тормозных нейротрансмиттеров должны быть связаны с быстрыми процессами, в том числе с выбросом нейротрансмиттеров в синапсах. Действительно, зависимость эпилептиформной активности от уровня экспрессии белков, отвечающих за выведение нейротрансмиттеров, была показана в экспериментах на нокаутных животных (Kataoka et al., 2011; Matveeva et al., 2012; Corradini et al., 2014). Кроме того, вероятен вклад изменения баланса фосфорилирования – дефосфорилирования белков в реализацию судорожного припадка. Нами ранее было показано, что крысы Крушинского – Молодкиной в интактном состоянии характеризуются повышенным содержанием VGLUT2 в стриатуме, являющегося маркером глутаматергических нейронов (Dorofeeva et al., 2015). Мы предположили, что это свидетельствует о накоплении нейромедиатора в терминальных отделах из-за нарушения его

выведения в результате пониженной интенсивности фосфорилирования Synapsin 1 (Dorofeeva et al., 2015). На клонико-тонической стадии судорожного припадка наблюдается повышение содержания фосфо-Synapsin 1 на фоне усиливающейся активности ERK1/2 киназ. Все это сопровождается заметным снижением количества VGLUT2 в стриатуме, что, вероятно, свидетельствует об активном выбросе медиатора в синаптическое пространство и связывании глутамата с рецепторами экспрессируемыми ГАМК-ергическими нейронами. Ранее было показано, что снижение уровня фосфорилирования Synapsin 1 при инактивации ERK1/2 киназ в ходе аудиогенного припадка сопровождается накоплением VGLUT2 в стриатуме, а также в гиппокампе (Glazova et al., 2015). Совокупность этих данных указывает на зависимость выброса глутамата от активности ERK1/2 киназ. Таким образом, интенсивная нейротрансмиссия глутамата в стриатуме является одной из возможных причин возникновения судорожного припадка.

Быстрое увеличение содержания выявляемых белков на стадии клонико-тонических судорог вызывает удивление, однако различия, описанные нами, являются статистически достоверными. Мы показали повышение GAD67 в стриатуме на клонико-тонической стадии (приблизительно через 20–30 с после подачи звука), что можно рассматривать как начальный этап восстановления запасов ГАМК, израсходованного в предыдущие этапы судорожного припадка, так как известно, что GAD67, являющийся конститутивным белком, в основном отвечает за синтез ГАМК (Asada et al., 1997). Дальнейшее увеличение его содержания на стадии атаксии может являться одной из причин остановки судорожного припадка. Интенсивность синтеза ГАМК в стриатуме в большой степени зависит от активности дофаминергической системы черной субстанции. На стадии клонико-тонических судорог мы отметили повышение уровня фосфорилирования тирозингидроксилазы по Ser31 в компактной части черной субстанции. Активация тирозингидроксилазы может быть следствием

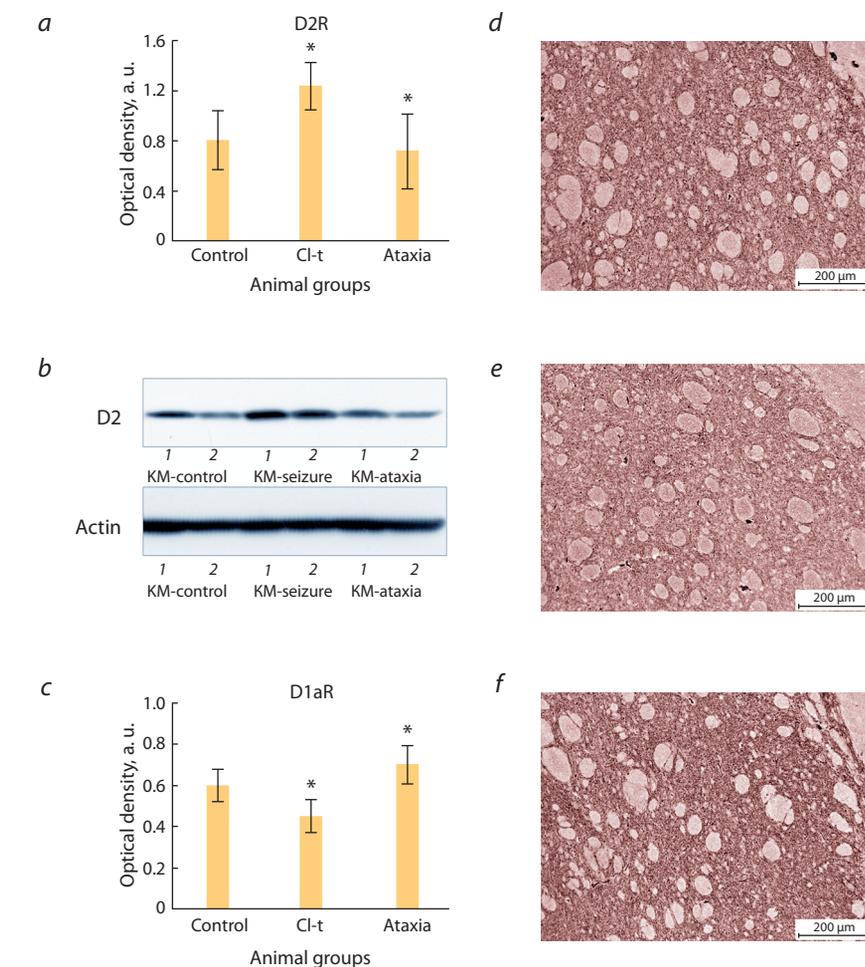


Fig. 5. Contents of (a, b) dopamine D2 receptors detected by Western blotting and (c) D1 receptors in Krushinsky–Molodkina rats revealed by immunohistochemistry: (d) in control, (e) at tonic-clonic seizure, and (f) at ataxia.

Optical density is presented in arbitrary units. Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. control.

усиления фосфорилирования ERK1/2 киназ при предъявлении крысам звукового сигнала. Кроме того, при подаче звукового сигнала на фоне увеличения активности дофаминергических нейронов черной субстанции происходит изменение содержания рецепторов дофамина в стриатуме: повышение уровня D2 и снижение D1. В настоящее время показано, что оба типа этих рецепторов вовлечены в регуляцию активности ГАМК-ергических нейронов стриатума. Стимуляция D1 приводит к усилению, в то время как стимуляция D2 приводит к ослаблению выведения ГАМК в экспериментах *in vivo* и *in vitro* (Girault et al., 1986; Bernath, Zigmond, 1989; Floran et al., 1990). На основании полученных результатов и данных литературы можно сделать вывод о том, что в момент судорожного припадка у крыс Крушинского–Молодкиной происходит интенсивный выброс дофамина в стриатуме, вызывающий увеличение экспрессии D2-рецепторов дофамина и последующее торможение выброса ГАМК D2-экспрессирующими ГАМК-ергическими нейронами стриатума. Это приводит к инактивации непрямого (антисудорожного) пути регуляции ГАМК-ергических нейронов черной субстанции. Снижение содержания D1-рецепторов на клонико-тонической стадии приводит также к торможению выведения ГАМК. В результате происходит также инактивация прямого (просудорожного) пути регуляции ГАМК-ергических нейронов черной субстанции,

что приводит к активации этих нейронов, о чем свидетельствует повышение содержания GAD65 в ретикулярной части черной субстанции. Усиление тормозного влияния ГАМК-ергических нейронов ретикулярной части черной субстанции на глутаматергические нейроны таламуса, очевидно, приводит к снижению моторной активности на стадии атаксии.

Несмотря на сложность интерпретации и необходимость критической оценки полученных результатов, мы рискнули сделать следующее заключение. Одной из основных причин возникновения судорожного припадка можно считать активацию ERK1/2 киназ в стриатуме крыс Крушинского – Молодкиной, приводящую к интенсивному фосфорилированию Synapsin 1. Повышенная активность ERK1/2-зависимого белка Synapsin 1 в стриатуме сопровождается уменьшением содержания VGLUT2, что свидетельствует об усилении экзоцитоза глутамата. Однако на стадии клонико-тонических стадий мы выявили ряд изменений в стриатуме, приводящих к остановке судорожного припадка. Повышение фосфорилирования тирозингидроксилазы в компактной части черной субстанции за счет усиления активности ERK1/2 киназ вызывает интенсивный выброс дофамина в стриатуме. При этом мы наблюдаем увеличение содержания D2- и снижение D1-рецепторов, что указывает на ослабление D1 и D2 опосредованных путей регуляции стриатумом ГАМК-ергических нейронов черной субстанции, приводящее к усилению их активности и, как следствие, к ингибированию глутаматергических нейронов таламуса, что, возможно, является одним из механизмов торможения судорожной активности.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-04-01431.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Asada H., Kawamura Y., Maruyama K., Kume H., Ding R.-G., Kanbara N., Kuzume H., Sanbo M., Yagi T., Obata K. Cleft palate and decreased brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1997; 94(12):6496-6499.

Benagiano V., Lorusso L., Flace P., Girolamo F., Rizzi A., Bosco L., Cagiano R., Nico B., Ribatti D., Ambrosi G. VAMP-2, SNAP-25A/B and syntaxin-1 in glutamatergic and GABAergic synapses of the rat cerebellar cortex. *BMC Neurosci.* 2011;12(1):118.

Bernath S., Zigmond M.J. Dopamine may influence striatal GABA release via three separate mechanisms. *Brain Res.* 1989;476(2): 373-376.

Bertran-Gonzalez J., Bosch C., Maroteaux M., Matamalas M., Hervé D., Valjent E., Girault J.-A. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J. Neurosci.* 2008;28(22): 5671-5685.

Björklund A., Dunnett S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 2007;30(5)194-202.

Bradford H.F., Peterson D. Current views of the pathobiochemistry of epilepsy. *Mol. Aspects Med.* 1987;9(2):119-172.

Chen J., Rusnak M., Luedtke R.R., Sidhu A. D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J. Biol. Chem.* 2004;279(38):39317-39330.

Corradini I., Donzelli A., Antonucci F., Welzl H., Loos M., Martucci R., De Astis S., Pattini L., Inverardi F., Wolfert D., Caleo M., Bozzi Y., Verderio C., Frassoni C., Braida D., Clerici M., Lipp H.P., Sala M., Matteoli M. Epileptiform activity and cognitive deficits in SNAP-25(+/-) mice are normalized by antiepileptic drugs. *Cereb. Cortex.* 2014;24(2):364-376.

DeCastro M., Nankova B.B., Shah P., Patel P., Mally P.V., Mishra R., La Gamma E.F. Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. *Mol. Brain Res.* 2005;142(1):28-38.

Deransart C., Depaulis A. The control of seizures by the basal ganglia? A review of experimental data. *Epileptic Disord.* 2002;4(3):61-72.

Dorofeeva N.A., Glazova M.V., Khudik K.A., Nikitina L.S., Kirillova D., Chernigovskaya E.V. [Comparative Study of Nigrostriatal Systems in Wistar Rats and Rats Prone to Seizures]. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 2015;51(3):204-213.

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.* 2010;285(19):14366-14376.

Durieux P.F., Schifmann S.N., de Kerchove d'Exaerde A. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *EMBO J.* 2012;31(3):640-653.

Etholm L., Heggelund P. Seizure elements and seizure element transitions during tonic-clonic seizure activity in the synapsin I/II double knockout mouse: a neuroethological description. *Epilepsy Behav.* 2009;14(4):582-590.

Fassio A., Raimondi A., Lignani G., Benfenati F., Baldelli P. Synapsins: from synapse to network hyperexcitability and epilepsy. *Seminars in cell developmental biology.* Elsevier. 2011;22:408-415.

Florán B., Aceves J., Sierra A., Martínez-Fong D. Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci. Lett.* 1990;116(1):136-140.

García C., Blair H., Seager M., Coulthard A., Tennant S., Buddles M., Curtis A., Goodship J. Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J. Med. Genet.* 2004;41(3):183-186.

Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F., Sibley D.R. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 1990; 250(4986):1429-1432.

Gerfen C.R., Miyachi S., Paletzki R., Brown P. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J. Neurosci.* 2002; 22(12):5042-5054.

Girault J.A., Barbeito L., Spampinato U., Gozlan H., Glowinski J., Beson M.J. In vivo release of endogenous amino acids from the rat striatum: further evidence for a role of glutamate and aspartate in corticostriatal neurotransmission. *J. Neurochem.* 1986;47(1):98-106.

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.* 2015;132(2):218-229.

Graybiel A.M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1990;3(7):244-254.

Greengard P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science.* 2001;294(5544):1024-1030.

Guerrero C., Pesce L., Lecuona E., Ridge K.M., Sznajder J.I. Dopamine activates ERKs in alveolar epithelial cells via Ras-PKC-dependent and Grb2/Sos-independent mechanisms. *Am. J. Physiol.-Lung Cell Mol. Physiol.* 2002;282(5):L1099-L1107.

Gurney K., Prescott T.J., Wickens J.R., Redgrave P. Computational models of the basal ganglia: from robots to membranes. *Trends Neurosci.* 2004;27(8):453-459.

- Hauser W.A. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*. 1994;35(s2):S1-S6.
- Haycock J.W., Ahn N.G., Cobb M.H., Krebs E.G. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1992;89(6):2365-2369.
- Kataoka M., Yamamori S., Suzuki E., Watanabe S., Sato T., Miyaoaka H., Azuma S., Ikegami S., Kuwahara R., Suzuki-Migishima R., Nakahara Y., Nihonmatsu I., Inokuchi K., Katoh-Fukui Y., Yokoyama M., Takahashi M. A single amino acid mutation in SNAP-25 induces anxiety-related behavior in mouse. *PLoS One*. 2011;6(9):e25158.
- Ketzel M., Kahn J., Weissberg I., Becker A., Friedman A., Gitler D. Compensatory network alterations upon onset of epilepsy in synapsin triple knock-out mice. *Neuroscience*. 2011;189:108-122.
- Kotecha S.A., Oak J.N., Jackson M.F., Perez Y., Orser B.A., Van Tol H.H., MacDonald J.F. A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron*. 2002;35(6):1111-1122.
- Krushinskij L.V. Formirovanie povedenija zhivotnyh v norme i patologii [Formation of Animal Behavior in Health and Disease]. Moscow, Moscow State University Publ., 1960.
- Le Moine C., Bloch B. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 1995;355(3):418-426.
- Lee F.J., Xue S., Pei L., Vukusic B., Chéry N., Wang Y., Wang Y.T., Niznik H.B., Yu X.M., Liu F. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*. 2002;111(2):219-230.
- Lindgren H.S., Ohlin K.E., Cenci M.A. Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in L-DOPA-induced angiogenic activity in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(12):2477-2488.
- Longuet C., Broca C., Costes S., Hani E.H., Bataille D., Dalle S.P. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 β -cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology*. 2005;146(2):643-654.
- Lynd-Balta E., Haber S. The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience*. 1994;59(3):625-640.
- Matveeva E.A., Price D.A., Whiteheart S.W., Vanaman T.C., Gerhard G.A., Slevin J.T. Reduction of vesicle-associated membrane protein 2 expression leads to a kindling-resistant phenotype in a murine model of epilepsy. *Neuroscience*. 2012;202:77-86.
- Murray B., Alessandrini A., Cole A.J., Yee A.G., Furshpan E.J. Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1998;95(20):11975-11980.
- Nateri A.S., Raivich G., Gebhardt C., Da Costa C., Naumann H., Vreugdenhil M., Makwana M., Brandner S., Adams R.H., Jefferys J.G. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J.* 2007;26(23):4891-4901.
- O'Sullivan G.J., Dunleavy M., Hakansson K., Clementi M., Kinsella A., Croke D.T., Drago J., Fienberg A.A., Greengard P., Sibley D.R. Dopamine D1 vs D5 receptor-dependent induction of seizures in relation to DARPP-32, ERK1/2 and GluR1-AMPA signaling. *Neuropharmacology*. 2008;54(7):1051-1061.
- Osterweil E.K., Krueger D.D., Reinhold K., Bear M.F. Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* 2010;30(46):15616-15627.
- Schallier A., Massie A., Loyens E., Moechars D., Drinkenburg W., Michotte Y., Smolders I. vGLUT2 heterozygous mice show more susceptibility to clonic seizures induced by pentylenetetrazol. *Neurochem. Int.* 2009;55(1):41-44.
- Scharfman H.E. The neurobiology of epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci.* 2007;7(4):348-354.
- Sebolt-Leopold J.S., Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;4(12):937-947.
- Semiöhina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva I.I. Krushinsky–Molodkina rats: study of audiogenic epilepsy, cardiovascular events, and behavior. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti im. I.P. Pavlova=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2006;56(3):298-316.
- Sgambato V., Pagès C., Rogard M., Besson M.-J., Caboche J. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. *J. Neurosci.* 1998;18(21):8814-8825.
- Shah P., Nankova B.B., Parab S., La Gamma E.F. Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein. *Brain Res.* 2006;1107(1):13-23.
- Valjent E., Corvol J.-C., Pagès C., Besson M.-J., Maldonado R., Caboche J. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* 2000;20(23):8701-8709.
- Vara H., Onofri F., Benfenati F., Sassoè-Pognetto M., Giustetto M. ERK activation in axonal varicosities modulates presynaptic plasticity in the CA3 region of the hippocampus through synapsin I. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2009;106(24):9872-9877.
- Yamagata Y., Obata K., Greengard P., Czernik A. Increase in synapsin I phosphorylation implicates a presynaptic component in septal kindling. *Neuroscience*. 1995;64(1):1-4.