



Иммунорфологическая оценка изменений функциональных белков астроглии на индуцированной каинатом модели склероза гиппокампа

Д.Н. Воронков¹, А.В. Егорова^{1,2}, Е.Н. Федорова^{1,2}, А.В. Ставровская¹, И.А. Потапов¹, А.К. Павлова¹, В.С. Сухоруков^{1,2}

¹Научный центр неврологии, Москва, Россия;

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Участие астроцитов в медиаторном обмене, нейропластичности, энергетической поддержке нейронов и нейровоспалении определяет их патогенетическую роль при эпилепсии.

Цель исследования – оценка регионально-специфических изменений распределения функциональных белков астроглии в реактивных астроцитах при каинат-индуцированной модели мезиальной эпилепсии височной доли.

Материалы и методы. Иммунофлуоресцентным методом оценивали локализацию и экспрессию функциональных белков астроглии: аквапорина-4, коннексина-43, EAAT1/2 и глутаминсинтетазы в поле СА3 гиппокампа, зубчатой извилине, слое *stratum lucidum* у животных через 28 сут после интрагиппокампального введения каиновой кислоты.

Результаты. Выявленные изменения носили неоднородный характер в исследованных субрегионах гиппокампа. Астроциты *stratum lucidum*, ассоциированные с мишистообразными волокнами, демонстрировали наибольшую уязвимость и снижение содержания и/или нарушение локализации каналов и транспортёров, формирующих мембранные комплексы в отростках. Нарушение гомеостатических функций астроцитовотягощает патологический процесс как на стороне введения токсина, так и в противоположном гиппокампе.

Ключевые слова: склероз гиппокампа; каиновая кислота; астроциты

Этическое утверждение. Эксперимент проводили с соблюдением биоэтических норм по работе с лабораторными животными. Исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 5-3/22 от 01.06.2022).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Адрес для корреспонденции: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. Научный центр неврологии.
E-mail: voronkov@neurology.ru. Воронков Д.Н.

Для цитирования: Воронков Д.Н., Егорова А.В., Федорова Е.Н., Ставровская А.В., Потапов И.А., Павлова А.К., Сухоруков В.С. Иммунорфологическая оценка изменений функциональных белков астроглии на индуцированной каинатом модели склероза гиппокампа. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2024;18(2):34–44.

DOI: <https://doi.org/10.17816/ACEN.1102>

Поступила 07.03.2024 / Принята в печать 03.05.2024 / Опубликовано 25.06.2024

Immunomorphologic Assessment of Changes in Functional Astroglial Proteins in a Kainate-Induced Hippocampal Sclerosis Model

Dmitry N. Voronkov¹, Anna V. Egorova^{1, 2}, Evgenia N. Fedorova^{1, 2}, Alla V. Stavrovskaya¹,
Ivan A. Potapov¹, Anastasiya K. Pavlova¹, Vladimir S. Sukhorukov^{1, 2}

¹Research Center of Neurology, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Astrocytes are involved in mediator metabolism, neuroplasticity, energy support of neurons and neuroinflammation, and this determines their pathogenetic role in epilepsy.

Aim. This study aimed at evaluating region-specific changes in the distribution of functional astroglial proteins in reactive astrocytes in a kainate-induced model of mesial temporal lobe epilepsy.

Materials and methods. The localization and expression of functional astroglial proteins (i.e. aquaporin-4, connexin-43, EAAT1/2, and glutamine synthetase) in the hippocampus CA3 region, dentate gyrus, and stratum lucidum layer were evaluated by immunofluorescence 28 days after intra-hippocampal administration of kainic acid to animals.

Results. Changes were heterogeneous in different hippocampus subregions. Astrocytes of the stratum lucidum associated with mossy fibers showed the highest vulnerability and decreased content and/or disturbed localization of the channels and transporters that form membrane complexes in the processes. Disturbances in homeostatic functions of astrocytes aggravated the adverse processes both on the side where the toxin was injected and in the contralateral hippocampus.

Key words: hippocampal sclerosis; kainic acid; astrocytes

Ethics approval. The experiment was carried out in compliance with bioethics standards for experiments with laboratory animals. The study was approved by the Ethics Committee of Research Center of Neurology (Protocol 5-3/22 dated 06.01.2022).

Source of funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 80 Volokolamskoye shosse, Moscow, 125367, Russia. Research Center of Neurology.
E-mail: voronkov@neurology.ru. Voronkov D.N.

For citation: Voronkov D.N., Egorova A.V., Fedorova E.N., Stavrovskaya A.V., Potapov I.A., Pavlova A.K., Sukhorukov V.S. Immunomorphologic assessment of changes in functional astroglial proteins in a kainate-induced hippocampal sclerosis model. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2024;18(2):34–44.

DOI: <https://doi.org/10.17816/ACEN.1102>

Received 07.03.2024 / Accepted 03.05.2024 / Published 25.06.2024

Введение

Около трети случаев заболевания эпилепсией являются фармакорезистентными [1], поэтому исследование механизмов эпилептогенеза и поиск новых терапевтических мишеней являются важнейшими задачами трансляционных нейронаук. На молекулярном и морфологическом уровнях эпилепсия характеризуется нейродегенерацией, аномальными формами нейропластичности, нарушениями нейрогенеза, изменением топологии межнейронных связей, нейромедиаторным дисбалансом, нарушением функциональной способности ряда рецепторных комплексов и модификацией молекулярной структуры ионных каналов [2].

Самым частым гистологическим диагнозом у взрослых пациентов, оперированных по поводу фокальной структурной фармакорезистентной эпилепсии, является склероз гиппокампа (СГ) [3, 4], характеризующийся гибелью нейронов отдельных полей гиппокампа. Ведущей причиной гибели нейронов при СГ признают глутаматергическую эксайтотоксичность, вызываемую избыточным выбросом глутамата при эпилептической активности [5]. Поскольку астроглия выполняет гомеостатические функции, в том числе контролирует уровень внеклеточного глутамата, она непосредственно участвует в эксайтотоксических каскадах реакций. Кроме того, астроциты, модулируя синаптическую передачу, обеспечивают энергетическую поддержку нейронов, участвуют в нейрово-

спалении и синаптической пластичности [6]. Нарушение астроцитарных функций – одна из важных причин эпилептизации мозга [7].

При СГ выделяют несколько паттернов повреждения, сопровождающихся разной выраженностью астроглиоза (пролиферации и гипертрофии астроцитов). Наиболее часто (60–80% случаев) встречается тип 1 по классификации Международной противоэпилептической лиги с наиболее выраженным повреждением полей CA1 и CA3 и затрагивающий CA2 и зубчатую извилину (*dentate gyrus*, DG) [4]. При СГ типа 2 преимущественно поражается поле CA1, а тип 3 характеризуется наибольшим повреждением нейронов хилуса (иначе обозначаемого как поле CA4). Выраженность астроглиоза, в особенности в поле CA3, показывает прямую корреляцию с частотой и тяжестью эпилептических приступов как до, так и после резекции гиппокампа [8].

До 20% случаев височной эпилепсии характеризуются отсутствием выраженной гибели нейронов при реактивных изменениях астроглии, что, согласно A. Grote и соавт., не предшествует СГ 1–3 типов, а является отдельным состоянием [9]. Вопросы причинно-следственной связи реактивных изменений астроглии и повреждения нейронов гиппокампа остаются нерешёнными.

Эпилептогенез при височной эпилепсии связан с аномальным прорастанием мшистых волокон (аксонов гранулярных клеток DG) в молекулярный слой DG и формированием новых возбуждающих синапсов. Реорганизация нейронной сети гиппокампа ведёт к гиперсинхронизации и генерации эпилептических разрядов [10], в чём важную роль играет дисфункция глиальных клеток.

Распространённой хронической моделью височной эпилепсии, воспроизводящей патоморфологические признаки СГ, является введение каиновой кислоты (КК) – агониста каинатных рецепторов, подтипа ионотропных глутаматных рецепторов. Эффекты КК, в зависимости от действия на пре-, постсинаптические или глиальные каинатные рецепторы, включают, помимо увеличения возбудимости глутаматергических пирамидных нейронов поля CA3 и подавления высвобождения ГАМК, «реактивную» пластичность гранулярных нейронов DG, а также провоспалительные реакции глии и изменения высвобождения нейротрофных факторов и глиотрансмиттеров (сигнальных молекул, обеспечивающих коммуникацию между глиальными клетками и контролирующей возбудимость нейронов) [11].

Астроциты вовлечены в регуляцию глутаматергической нейротрансмиссии, они контролируют уровень внеклеточного глутамата с помощью транспортеров EAAT1 (GLAST) и EAAT2 (GLT-1) и участвуют в метаболизме и детоксикации глутамата с помощью глиоспецифичного фермента – глутаминсинтетазы (GS) [12]. Астроциты формируют так называемые «трёхчастные синапсы», окружая область синаптического контакта нейронов своими отростками, что позволяет им модулировать нейротрансмиссию. Астроциты также высвобождают глиотрансмиттеры, к которым относят пурины, D-серин и различные лиганды рецепторов глутамата, воздействующие

на возбудимость нейронов [6]. Регуляция групповой активности нейронов обеспечивается благодаря межастроцитарным сетям, сформированным с помощью белков щелевых контактов коннексинов (Cx30, Cx43), участвующих в транспорте малых молекул и организации глиальной сети, регуляции транспорта глутамата, диффузии энергетических метаболитов и глиотрансмиттеров [6, 13]. Одним из факторов, обуславливающих гипервозбудимость нейронов, является нарушение водного баланса нервной ткани, в регуляции которого ведущая роль принадлежит белку водных каналов – аквапорину-4 (AQP4) [12, 14]. Локализованный в дистальных отделах отростков астроцитов AQP4, как и Cx43, связан с перераспределением ионов и воды в межклеточном пространстве, влияет на концентрацию нейротрансмиттеров и участвует в регуляции объёма астроцитарных перисинаптических муфт. Кроме того, AQP4 и Cx43 участвуют в миграции астроцитов и регуляции подвижности их отростков [13], что подчёркивает их значение при глиозе и перестройке ткани.

Структурные и функциональные характеристики нейроглиоваскулярных взаимодействий в структурах мозга определяются региональными особенностями астроглии [12]. Глиоархитектоника гиппокампа, как и других структур мозга, тесно связана с его синаптической организацией. Астроциты разных отделов и слоёв гиппокампа отличаются морфологической, нейрохимической и функциональной гетерогенностью [15, 16]. Региональные особенности, по-видимому, связаны не только с функционированием структур в норме, но и определяют особенности ответа астроцитов на патологические процессы, а реактивная астроглия, в свою очередь, сохраняет региональный профиль экспрессии гомеостатических генов [17]. К числу генов, уровень экспрессии которых определяет региональную специфичность астроглии гиппокампа, относятся *slc1a2* (EAAT2), *slc1a3* (EAAT1), *Gja1* (Cx43), *Glul* (GS), *Aqp4* [16, 18]. Важно, что нарушения регуляции отдельных групп генов могут затрагивать определённые субпопуляции астроглии [19]. Взаимосвязь AQP4, Cx43, EAAT1/EAAT2 и формирование ими на мембране астроцитов макромолекулярных комплексов [20] требуют совместной оценки изменений этих функциональных белков при СГ.

Таким образом, данные современных экспериментальных исследований указывают на значительный вклад астроглии в эпилептогенез, однако роль астроглии в патогенезе СГ на сегодняшний день изучена недостаточно.

Цель настоящего исследования – оценка регионально-специфических изменений распределения функциональных белков астроглии в реактивных астроцитах при каинат-индуцированном СГ.

Материалы и методы

В исследование были взяты 10 крыс-самцов Вистар в возрасте 3,5–5,0 мес массой 300–350 г, полученные из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА «Столбовая». Животные содержались в условиях вивария при постоянном доступе к воде и корму. Эксперимент проводился с соблюдением биоэтических норм по работе с лабораторными животными в соответствии с требованиями European

Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS No. 170). Исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 5-3/22 от 01.06.2022).

Стереотаксические инъекции

Для анестезии применяли золетил-ксилазиновый наркоз после премедикации атропином (ОАО «Дальхимфарм») в дозе 0,04 мг/кг подкожно за 10–15 мин. Затем последовательно внутримышечно вводили смесь золазепам гидрохлорида и тилетамина гидрохлорида (0,3 мг/кг в составе Золетил-100, «Virbac») и ксилазина гидрохлорид (3 мг/кг, Ксила, «De Adelaar»).

Раствор КК («Sigma») в дозе 0,5 мкг в 3 мкл физиологического раствора вводили с помощью стереотаксического манипулятора «RWD», в поле CA1 рострального отдела гиппокампа справа ($n = 5$) в соответствии с координатами (AP = -3,0; ML = 2,0; DV = 2,8) по атласу мозга крысы¹. С левой стороны вводили физиологический раствор в том же объёме. Ложнооперированным (контрольным) крысам ($n = 5$) билатерально вводили по 3 мкл физиологического раствора.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Через 28 сут после введения КК животных декапитировали с помощью гильотины, мозг извлекали, рассекали во фронтальной плоскости и фиксировали 24 ч в 4% нейтральном формалине. После пропитывания 30% раствором сахарозы образцы помещали в среду О.С.Т. («TissueTek») и готовили серии замороженных фронтальных срезов (толщиной 12 мкм) на уровне фронтальной трети гиппокампа. Срезы нагревали в пароварке, в цитратном буфере pH 6,0 («Leica») в течение 15 мин. Окрашивание проводили в соответствии с рекомендациями производителей первичных антител. Использовали антитела к нейрональным белкам NeuN («Abcam», ab104224) и синаптофизину (SF, «Sigma», S5768) и антитела к белкам астроцитов: транспортёрам глутамата EAAT1 (GLAST, «Abcam», ab181036) и EAAT2 (GLT1, «Abcam», ab203130), GS («Sigma», G2781), Cx43 («Abcam», ab11370), AQP4 («Sigma», HPA014734), виментину (Vim, «Abcam», ab92547) и глиофибрилярный белок (GFAP, «Abcam», ab207165). Для выявления микроглии использовали антитела к IBA1 («GeneTex», GTX635399). Первичные антитела инкубировали со срезами во влажной камере 18 ч при комнатной температуре. После этого для выявления связывания использовали соответствующие антитела («Invitrogen») к иммуноглобулинам мыши или кролика, меченные флуорохромами «Alexa Fluor 488» или «Alexa Fluor 555». Срезы заключали в среду «Fluoroshield» («Abcam»), содержащую 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) для окрашивания ядер клеток.

Морфометрия

От каждого животного на уровне ростральной трети гиппокампа исследовали 6–12 срезов, взятых с равными

¹ Paxinos G., Watson Ch. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Amsterdam; Boston, 2005.

интервалами по rostrocaudальной оси. Срезы документировали, используя микроскоп «Nikon Eclipse Ni-U», и на изображениях, полученных при увеличении объектива $\times 20$, оценивали с помощью программы «ImageJ» среднюю интенсивность флуоресценции ткани (с коррекцией фонового окрашивания) в градациях яркости 8-битного изображения.

Окрашивание на нейрональные и глиальные белки позволило, помимо полей (секторов) гиппокампа (CA1, CA2, CA3, DG), дифференцировать слои поля CA3: молекулярный лакунозный слой (*stratum lacunosum-moleculare*), лучистый (*str. radiatum*), прозрачный (*str. lucidum*), пирамидный (*str. pyramidale*), краевой (*str. oriens*). В DG выявляли слой гранулярных клеток (*str. granulare*) и полиморфный слой (хилус, *stratum polymorphe*) [21].

Измерения выполняли в секторе CA3 в целом и в *stratum lucidum* в отдельности, а также в полиморфном слое DG правого (ипсилатерального повреждению) и левого (контралатерального) гиппокампов животных, получавших КК, и справа (на стороне введения 0,9% NaCl) – для контрольных животных. Области интереса сегментировали на изображениях вручную. Для оценки площади AQP4⁺-сосудов с помощью локальной пороговой сегментации в «ImageJ» выделяли площадь сосудов по отношению к площади поля зрения. Для оценки распределения Cx43 в ткани использовали анализ текстуры изображения GLCM (Gray level co-occurrence matrix). Показатель GLCM contrast обратен изменению гомогенности распределения выявляемого маркера. Применение метода GLCM для гистологических изображений описано ранее [22].

Статистическая обработка

Полученные для каждого животного значения усредняли. Статистическую обработку проводили в программе «GraphPad Prism 7.0». Для выявления различий между группами использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее, SD – среднеквадратичное отклонение. При отклонении от нормального распределения по результатам теста Шапиро–Уилка (данные для SF) использовали тест Вилкоксона для сравнения полушарий. Данные для SF представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах [Q_1 ; Q_3]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Повреждение нейронов поля CA3 обнаруживали у всех животных, получавших КК (рис. 1, А). Оценка интенсивности окрашивания на маркер нейронов NeuN показала значимое ($p < 0,001$) снижение до $60,63 \pm 22,11\%$ в пирамидном слое поля CA3 на стороне введения токсина по сравнению с контрольной группой, но не на противоположной стороне ($89,8 \pm 16,8\%$ от контроля). Повреждение нейронов выявили и в поле CA1, однако в связи с близостью трека иглы и активацией глии, обусловленной механическим повреждением, эта область гиппокампа была в нашем исследовании исключена

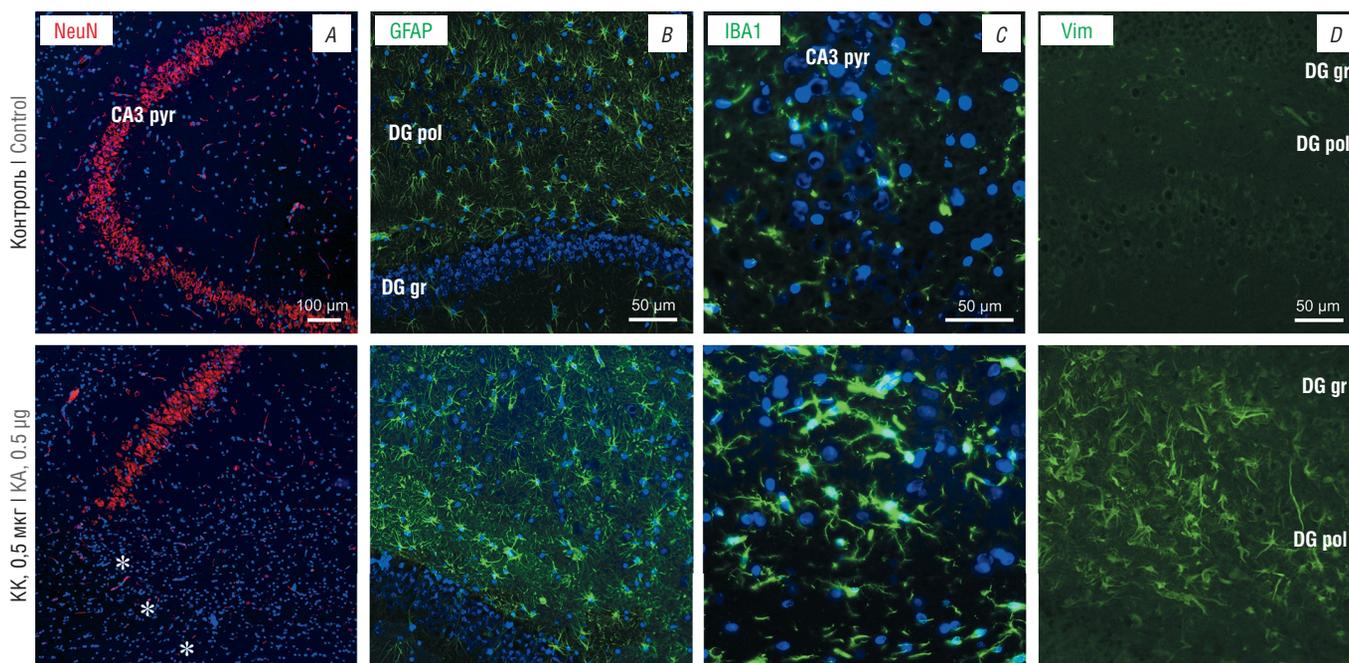


Рис. 1. Интрагиппокампальное введение КК вызывает повреждение нейронов поля CA3 и активацию глии в DG.

A – выявление нейронального маркера NeuN (окрашено красным), поле CA3, $\times 10$;

B – активация астроцитов, GFAP (окрашено зелёным), DG, $\times 20$;

C – гипертрофия микроглии, IBA1 (окрашено зелёным), поле CA3, $\times 40$;

D – экспрессия виментина (окрашено зелёным), реактивными астроцитами полиморфного слоя гиппокампа, $\times 20$.

CA3 pyr – пирамидный слой поля CA3; DG pol – полиморфный слой, DG gr – гранулярный слой, * область повреждения. Ядра окрашены DAPI (синим).

Fig. 1. Administration of KA into the hippocampus resulted in neuronal damage in the CA3 region and glia activation in the DG.

A, detection of NeuN neuronal marker (stained with red), CA3, $\times 10$;

B, astrocyte activation, GFAP (stained with green), DG, $\times 20$;

C, microglia hypertrophy, IBA1 (stained with green), CA3, $\times 40$;

D, expression of vimentin (stained with green) by reactive astrocytes of the polymorphic layer of the hippocampus, $\times 20$.

CA3 pyr, pyramidal layer of CA3; DG pol, polymorphic layer, DG gr, granular layer, * damage area. Nuclei stained with DAPI (blue).

из анализа. В DG значимого снижения окрашивания на NeuN не выявили. Интенсивность окрашивания на SF в *stratum lucidum* на стороне введения токсина ($Me = 73,44 [67,76; 87,15]$) была значимо ($p < 0,05$, тест Вилкоксона) выше по сравнению с противоположным гиппокампом ($Me = 68,12 [56,67; 77,81]$).

Как в поле CA3, так и в DG гиппокампа отмечали выраженный глиоз, усиление окрашивания на GFAP, гипертрофию и деформацию отростков астроцитов (рис. 1, B), а также активацию микроглии (рис. 1, C). Часть астроцитов как в CA3, так и в DG экспрессировала Vim, что характерно для незрелых и реактивных астроцитов, при этом наибольшую интенсивность окрашивания на Vim отмечали в DG. Обращает на себя внимание, что тела Vim⁺-астроцитов были наиболее изменены (рис. 1, D).

Следовательно, введение КК вызывало активацию астроцитов как непосредственно в области максимального повреждения нейронов (в поле CA3), так и в полиморфном слое DG, без потери нейронов в последнем.

Границы *stratum lucidum*, формируемого преимущественно аксонами зернистых нейронов DG, выявлялись

как с помощью окрашивания на SF, так и при выявлении глиальных маркеров (рис. 2), за исключением относительно однородного окрашивания на AQP4. Наибольшие отличия в окрашивании между слоями поля CA3 визуальными отмечали для EAAT1 и Sx43, причём *stratum lucidum* отличался наиболее низким их содержанием.

Помимо резкого роста интенсивности иммунофлуоресценции для GFAP ($p < 0,001$) в поле CA3 (без учёта слоёв, по сравнению с ложнопериоперированным контролем), на стороне введения КК увеличивалось содержание Sx43 ($p < 0,001$) и GS ($p < 0,001$), а окрашивание на AQP4 значимо ($p < 0,001$) снижалось (рис. 2, 3).

На фоне снижения интенсивности иммунофлуоресценции для AQP4 в поле CA3 более отчётливо выявлялись тела глиальных клеток и отмечалось снижение интенсивности окрашивания сосудов, что свидетельствует о перераспределении AQP4 в клетках и снижении его содержания в концевых ножках астроглии. Это подтверждается измерениями доли площади окрашенных сосудов в поле зрения: в поле CA3 она была значимо ($p = 0,022$) снижена с $0,99 \pm 0,48\%$ у контрольной группы до $0,55 \pm 0,15\%$ на стороне введения КК. В DG выявили сходные изменения.

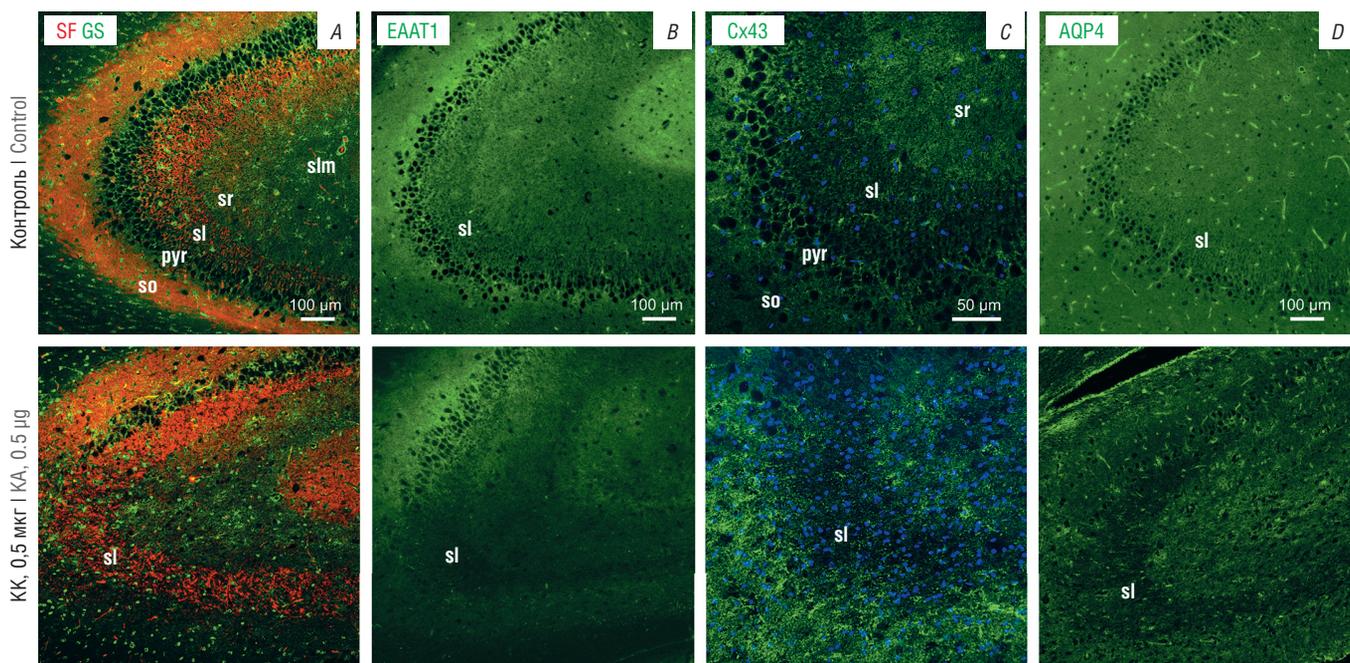


Рис. 2. Изменения экспрессии и локализации функциональных белков астроцитов в слоях поля СА3 гиппокампа под действием КК. А – выявление локализации GS (окрашено зелёным) и SF (окрашено красным) в слоях гиппокампа, $\times 10$; В – выявление EAAT1, $\times 10$; С – выявление Cx43 (окрашено зелёным), ядра докрашены DAPI (окрашено синим), $\times 20$; D – выявление AQP4, $\times 10$. so – stratum oriens; pyr – stratum pyramidalis; sl – stratum lucidum; sr – stratum radiatum; slm – stratum lacunosum molecularis.

Fig. 2. Changes in expression and localization of astrocyte functional proteins in hippocampal CA3 layers after administration of KA. A, identification of GS localization (stained with green) and SF (stained with red) in hippocampus layers, $\times 10$; B, EAAT1 detected, $\times 10$; C, Cx43 detected (stained with green), nuclei further stained with DAPI (stained with blue), $\times 20$; D, AQP4 detected, $\times 10$. so, stratum oriens; pyr, stratum pyramidalis; sl, stratum lucidum; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum molecularis.

Рост общей интенсивности флюоресценции (рис. 3) в поле СА3 для Cx43 преимущественно происходил за счёт глиальных клеток в *stratum oriens* и *stratum lacunosum molecularis*. Изменение распределения Cx43 в ткани подтвердила оценка «контраста» изображения – показателя обратного гомогенности распределения выявляемого маркера в образце. В поле СА3 этот показатель значимо ($p = 0,021$) возрастал втрое ($214,49 \pm 116,51$) по сравнению с контролем ($70,97 \pm 2,41$) на стороне введения КК. Выявленное снижение однородности распределения Cx43, по-видимому, отражает перераспределение Cx43 в отростках астроцитов. Интересно, что у животных, получавших КК, отмечали крупные Cx43⁺-кластеры окрашивания вокруг сосудов, что может быть связано с увеличением экспрессии Cx43 эндотелиоцитами или нарушением его распределения в концевых ножках астроглии.

Распределение GS также менялось в слоях гиппокампа по-разному. На стороне введения КК в поле СА3 выявляли большое количество редких у контрольных животных овоидных GS⁺-глиальных клеток с интенсивным окрашиванием цитоплазмы, вероятно, относящихся к олигодендроглии. В *stratum lucidum* наблюдали снижение окрашивания на GS в отростках астроцитов (рис. 3, 4). При этом в *stratum oriens*, *stratum radiatum* и *stratum lacunosum*

molecularis выявляли GS⁺-реактивные астроциты с гипертрофированными отростками и интенсивно окрашенной цитоплазмой.

Для транспортера глутамата EAAT1 среднее значение интенсивности в поле СА3 без учёта слоев значимо увеличилось ($p = 0,0149$) под действием КК на стороне повреждения, а визуально отмечали наличие зон как с повышенной, так и с пониженной экспрессией EAAT1, что может быть связано с разной степенью повреждения нейронов в поле СА3.

При оценке иммунофлюоресценции в *stratum lucidum* на стороне введения КК (рис. 3) выявили значимое по сравнению с ложнооперированным контролем снижение содержания функциональных белков астроцитов: EAAT1, EAAT2, GS и AQP4, за исключением Cx43 (для которого выявляли тенденцию к увеличению окрашивания; $p = 0,053$). В *stratum lucidum* гиппокампа противоположного полушария также отмечали снижение иммунофлюоресценции, наибольшее для GS и AQP4.

Сходное с изменениями в *stratum lucidum*, однако менее резко выраженное снижение содержания исследованных белков (EAAT1, GS, AQP4) установлено и в полиморфном

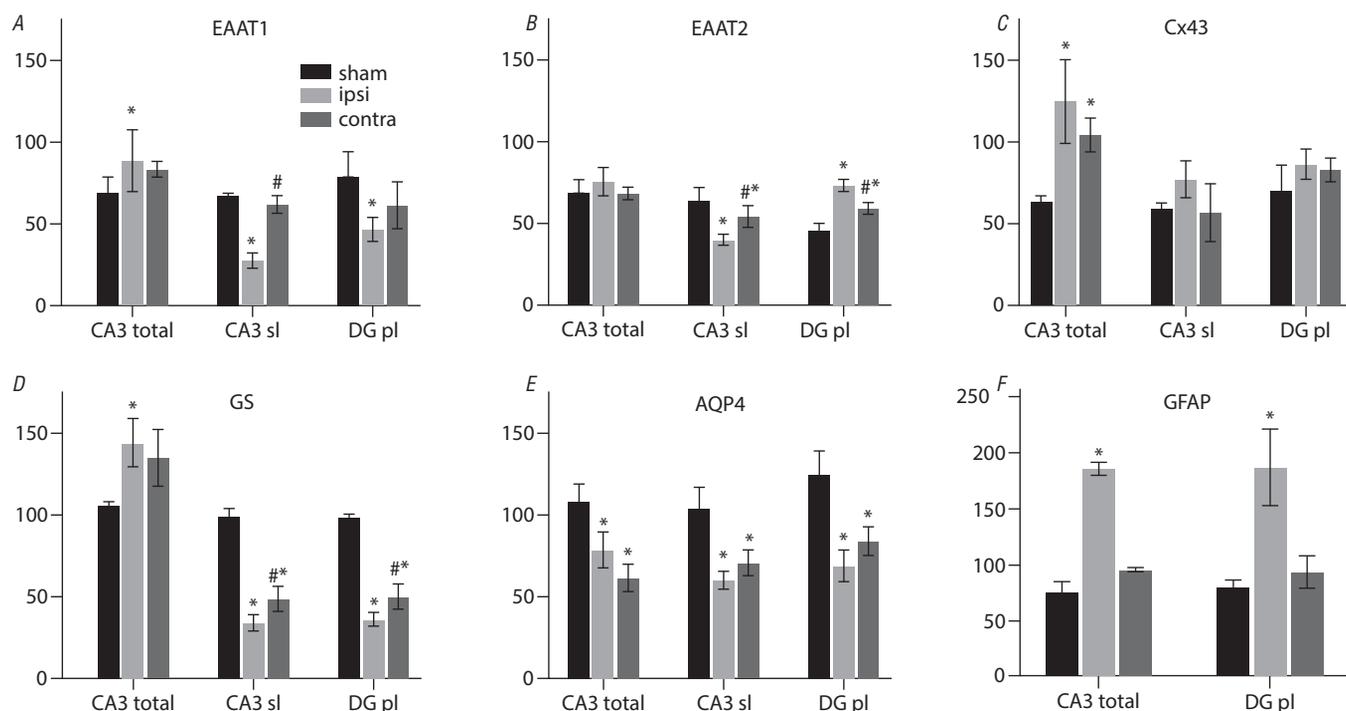


Рис. 3. Изменения интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на функциональные белки астроцитов в поле CA3 гиппокампа (CA3 total), *stratum lucidum* (CA3 sl) и полиморфном слое DG (DG pl) под действием КК.

A – транспортёр глутамата EAAT1 (GLAST); B – транспортёр глутамата EAAT2 (GLT-1); C – Cx43; D – GS; E – AQP4; F – GFAP. sham – ложнооперированные животные; ipsi – на стороне повреждения; contra – контралатерально повреждению; * $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированными животными; # $p < 0,05$ по сравнению со стороной повреждения (ANOVA, апостериорный тест Тьюки).

Fig. 3. Changes in immunofluorescent staining intensity for functional astrocyte proteins in CA3 of the hippocampus (CA3 total), *stratum lucidum* (CA3 sl), and the polymorphic layer of DG (DG pl) after administration of KA.

A, EAAT1 glutamate transporter (GLAST); B, EAAT2 glutamate transporter (GLT-1); C, Cx43; D, GS; E, AQP4; F, GFAP. sham, sham-operated animals; ipsi, on damage side; contra, contralateral to damage side; * $p < 0.05$ compared with sham-operated animals; # $p < 0.05$ compared with damage side (ANOVA, Tukey's post-hoc test).

слое DG гиппокампа (рис. 3), что, вероятно, связано с общей направленностью изменений астроглии в областях синаптических контактов мшистых волокон с нейронами. Обращает на себя внимание, что только для EAAT2 были выявлены противоположные изменения (увеличение иммуноокрашивания) в DG по сравнению с *stratum lucidum*. Увеличение интенсивности окрашивания на EAAT2, по видимому, было зарегистрировано за счёт интенсивного окрашивания сомы реактивных астроцитов (рис. 4).

Таким образом, введение КК приводило к одностороннему повреждению пирамидных нейронов поля CA3 гиппокампа и глиозу, причём реактивные изменения астроглии сопровождалось снижением экспрессии её функциональных гомеостатических белков в *stratum lucidum* – слое мшистых волокон как на стороне введения токсина, так и в противоположном полушарии. В поле CA3 при индуцированном КК повреждении наблюдали увеличение экспрессии GFAP, Vim, GS и Cx43, перераспределение AQP4 с умеренным снижением интенсивности иммуноокрашивания. В то же время реактивные изменения астроглии в *stratum lucidum* отличались от поля CA3 в целом и сопровождалось значимым снижением белков обмена глутамата (GS, EAAT1/2) и AQP4, а содержание Cx43 значимо не менялось, хотя и имело тенденцию к повышению. Помимо изменений содержания Cx43, AQP4, GS и EAAT2,

выявили и изменения их клеточной локализации и распределения в ткани, в том числе связанные с нарушением глиоваскулярных контактов.

Обсуждение

Интрагиппокампажное введение КК вызывало глиоз в областях CA3 и DG и выраженные в различной степени изменения региональной экспрессии функциональных белков астроцитов в поле CA3 в целом и в слое *stratum lucidum*. На стороне введения токсина выявляли повреждение нейронов в полях CA1 и CA3, соответствующее картине СГ типа 1 [4]. Обнаруженные изменения астроглии были характерны и для противоположного полушария, где статистически значимого повреждения нейронов не зарегистрировали.

Stratum lucidum поля CA3 гиппокампа представлен мшистыми волокнами – аксонами гранулярных клеток DG, формирующими множество глутаматергических «детонаторных» синапсов на пирамидных нейронах поля CA3. Их функциональное значение в эпилептогенезе и наблюдаемые при эпилепсии перестройки мшистых волокон определяют интерес к изменениям глиальных клеток в этой области [10]. Полученные нами данные о росте иммуноокрашивания на SF в *stratum lucidum* согласу-

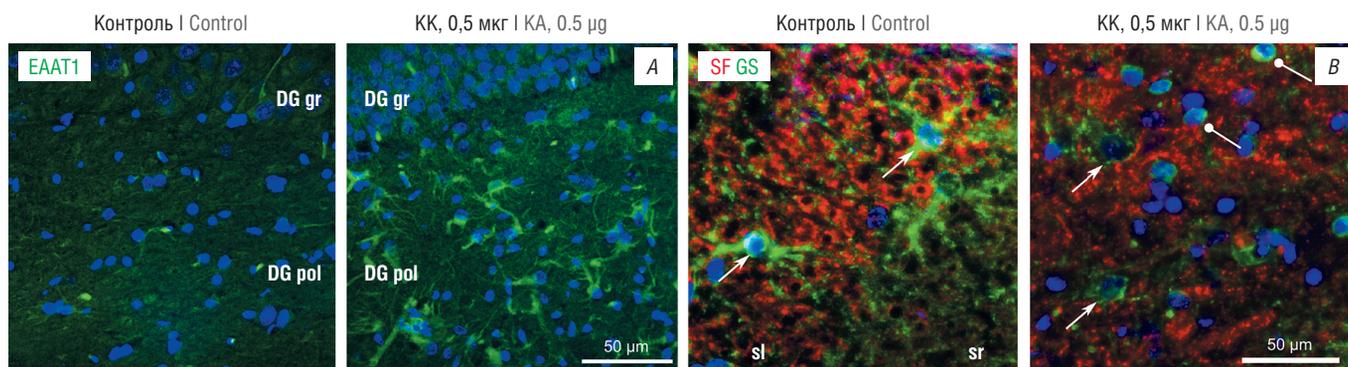


Рис. 4. Изменения внутриклеточной локализации EAAT2 и GS в астроцитах под действием КК.

A – интенсивное окрашивание на транспортёр глутамата EAAT2 (окрашено зелёным) в телах реактивных астроцитов полиморфного слоя, $\times 40$; *B* – выявление GS (окрашено зелёным) и SF (окрашено красным) в отростках и телах реактивных астроцитов (стрелки) в *stratum lucidum* и клетках без выявляемых отростков (отрезки с точкой на конце), $\times 40$.

DG gr – гранулярный слой; DG pol – полиморфный слой; sl – *stratum lucidum*; sr – *stratum radiatum*.

Fig. 4. Changes in intracellular EAAT2 and GS location in astrocytes after KA administration.

A, intense staining for EAAT2 glutamate transporter (green) in reactive astrocyte bodies of the polymorphic layer, $\times 40$;

B, GS detected (stained with green) and SF (stained with red) in the processes and bodies of reactive astrocytes (arrows) in *stratum lucidum* and cells without processes identified (line segments with a dot at the end), $\times 40$.

DG gr, granular layer; DG pol, polymorphic layer; sl, *stratum lucidum*; sr, *stratum radiatum*.

ются с данными литературы [23] о повышении его содержания через 30 дней после введения КК и могут свидетельствовать о «реактивной» пластичности.

Астроциты разных регионов гиппокампа различаются своими характеристиками, зависящими в том числе от «обслуживаемых» ими синапсов [15]. Хилус и *stratum lucidum* гиппокампа характеризуются относительно высокой плотностью астроглии [24]. Астроциты *stratum lucidum* отвечают изменениями внутриклеточного Ca^{2+} только на пачечную активность нейронов и значительный рост концентрации глутамата, в отличие от астроцитов DG, которые обеспечивают тонкую регуляцию синаптической передачи [25]. Контакты астроцитов с синаптическими бутонами на мшистых волокнах, по сравнению с синапсами других областей гиппокампа, менее тесные [25]. Интересной особенностью *stratum lucidum* является и крайне высокое содержание мозгового нейротрофического фактора [26], участвующего в регуляции морфогенеза астроглии и играющего роль в нейровоспалении [27, 28].

Охарактеризованные в нашем исследовании изменения содержания и локализации AQP4, глиальных транспортеров глутамата (EAAT1/EAAT2), GS и Sx43 ассоциированы с повышенной возбудимостью нейронов и связаны с инициацией и поддержанием эпилептической активности [7]. Отметим, что наблюдаемые в работах разных авторов противоречия в изменениях этих белков связаны с методами измерения, анализируемыми областями и сроками введения КК. Например, через 1 сут после вызванного введением КК эпилептического статуса содержание AQP4 в гиппокампе крыс было снижено, однако возрастало по прошествии месяца [29]. С другой стороны, у пациентов с височной эпилепсией и СГ увеличивалось общее содержание AQP4, однако уменьшалось его иммуноокрашивание в периваскулярном пространстве [30]. В настоящем исследовании выявили согласующееся

с другими авторами перераспределение AQP4 в астроцитах и снижение площади AQP4⁺-периваскулярного окрашивания, наряду с общим снижением содержания AQP4. Ранее на каинатной модели в полях CA1 и CA3 показано снижение содержания AQP4 в периваскулярном компартменте как в латентном, так и в позднем периоде эпилептогенеза [31]. Субклеточное перераспределение AQP4 с преимущественной локализацией в нейропиле, но не в периваскулярных концевых ножках астроцитов выявили и на модели посттравматической эпилепсии [32].

Локализация AQP4 совместно с EAAT2 и Kir4 в виде макромолекулярного комплекса обуславливает его возможное участие в обмене K^{+} и глутамата [29, 33]. Предполагают, что нарушение ассоциации AQP4 и транспортёра глутамата EAAT2 в астроцитах приводит к нейрональной дисфункции [34, 35]. Оценка уровня AQP4 и EAAT2 на модели эпилепсии с КК показала снижение их экспрессии в раннем периоде эпилептогенеза [29], что согласуется с нашими результатами для *stratum lucidum*. Изменение распределения этих белков в отростках астроглии, показанное и в нашей работе, свидетельствует о нарушениях организации глиоваскулярных и глионейрональных контактов в концевых ножках астроцитов. Помимо этого, по данным литературы, глиальный транспортёр глутамата EAAT2 (но не EAAT1) напрямую ингибируется КК [36] и обнаруженный нами его рост в DG может отражать этап компенсаторного увеличения экспрессии. Разнонаправленные изменения EAAT2 в *stratum lucidum* и DG могут быть обусловлены гетерогенностью астроцитов данных зон гиппокампа или разной степенью выраженности их реакции.

В ряде работ отмечено повышение экспрессии и EAAT1 после введения КК, рассматриваемое авторами как компенсаторная реакция [36]. Нами выявлено повышение содержания EAAT1 в поле CA3, происходившее, однако, не за счёт астроглии *stratum lucidum*, где для обоих

транспортёров, наоборот, выявили снижение окрашивания. В целом дисфункция транспортёров EAAT1/2 в эпилептических очагах приводит к нарушению утилизации внеклеточного глутамата [37], но описываемые изменения экспрессии этих белков у пациентов с височной эпилепсией часто противоречивы и демонстрируют разную направленность изменений [38, 39].

В предупреждении накопления токсического глутамата важную роль играет и специфичный для астроглии фермент глутамин-глутаматного обмена – GS. У пациентов с мезиально-височной эпилепсией интенсивность окрашивания на GS снижалась в полях CA1, CA3 и DG гиппокампа, демонстрируя связь с характером приступов [40]. В нашей работе обнаружено снижение интенсивности окрашивания на GS в отростках астроцитов *stratum lucidum*, но не в других слоях, где GS⁺-реактивные астроциты имели гипертрофированные отростки. Ранее перераспределение GS в отростках астроцитов в CA1-0 и CA3-областях гиппокампа показано на моделях височной эпилепсии [40, 41].

Возбудимость и синхронизация нейронов во многом регулируются также скоординированной работой астроцитарной сети при участии коннексинов. Генетический нокаут у животных Sx43 приводит к судорогам и двигательным нарушениям [42]. Нарушение связей между астроцитами способствует эпилептогенезу за счёт снижения буферизации K⁺, Na⁺ с последующим торможением клиренса глутамата из синаптической щели. В эксперименте показано нарушение коммуникации между астроцитами посредством Sx43 уже на ранних стадиях эпилептогенеза [43]. С другой стороны, функционирование астроцитарной сети необходимо для доставки энергетических субстратов [44], следовательно, сниженная коммуникация астроцитов может подавлять судорожную активность и быть защитной на поздних стадиях эпилептогенеза [45].

Анализ содержания Sx43 в образцах гиппокампа пациентов с СГ показал повышенную экспрессию Sx43, не образующего, однако, функционально состоятельных каналов [46], что связано с субклеточным перераспределением Sx43 в периваскулярных областях в сочетании с посттрансляционными модификациями белка,

нарушающими проницаемость каналов. Сходные изменения мы наблюдали в настоящем эксперименте: был выявлен рост содержания Sx43 в поле CA3 в целом, и, хотя изменения интенсивности окрашивания в *stratum lucidum* не были статистически значимыми, в этом слое отмечали перераспределение Sx43 и формирование его кластеров вокруг сосудов. Ранее было показано, что изменения экспрессии и локализации AQP4 и Sx43 приводят к нарушениям проницаемости ГЭБ [20] и негативным эффектам. Обращает на себя внимание, что AQP4 и Sx43 разнонаправленно изменяют свою локализацию, при этом вокруг сосудов накапливается Sx43 и снижается иммунореактивность AQP4. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении организации водных каналов и коннексинов в реактивных астроцитах, что, в свою очередь, может быть причиной нарушений ионного и водного гомеостаза [32] и вносить свой вклад в эпилептогенез.

Заключение

1. Реакция астроглии при каинат-индуцированном СГ неоднородна и характеризуется региональными особенностями, при этом наибольшую уязвимость демонстрируют астроциты *stratum lucidum*, ассоциированные с мшистыми волокнами.
2. Изменения экспрессии гомеостатических белков астроглии гиппокампа наблюдаются как в ипси-, так и в контралатеральном повреждению полушариях, что отягощает процесс эпилептизации в сохранном гиппокампе.
3. Изменения астроцитарных белков обмена глутамата при КК-индуцированном СГ усиливают нарушения нейротрансмиссии и могут провоцировать вторичное эксайтотоксическое повреждение нейронов при эпилептогенезе.
4. Нарушения локализации и экспрессии AQP4 и глиальных транспортёров глутамата носят однонаправленный характер, что указывает на общность их регуляторных механизмов и локальную дизрегуляцию астроцитами водного и ионного гомеостаза при СГ.
5. Нарушения периваскулярной локализации Sx43 и AQP4 отражают взаимозависимость двух классов мембранных белков и перестройку глиоваскулярных взаимодействий при СГ.

Список источников / References

1. Janmohamed M., Brodie M.J., Kwan P. Pharmacoresistance – epidemiology, mechanisms, and impact on epilepsy treatment. *Neuropharmacology*. 2020;168:107790. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107790

2. Sumadewi K.T., Harkitasari S., Tjandra D.C. Biomolecular mechanisms of epileptic seizures and epilepsy: a review. *Acta Epileptol*. 2023;5(28). DOI: 10.1186/s42494-023-00137-0

3. Копачев Д.Н., Шишкина Л.В., Быченко В.Г. и др. Склероз гиппокампа: патогенез, клиника, диагностика, лечение. Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. 2016;80(4):109–116. DOI: 10.17116/neiro2016804109-116

Копачев Д.Н., Шишкина Л.В., Быченко В.Г. et al. Hippocampal sclerosis: pathogenesis, clinical features, diagnosis, and treatment. *Burdenko's Journal of Neurosurgery*. 2016;80(4):109–116. DOI: 10.17116/neiro2016804109-116

4. Blümcke I., Thom M., Aronica E. et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013;54(7):1315–1329. DOI: 10.1111/epi.12220.

5. Tai X.Y., Bernhardt B., Thom M. et al. Review: neurodegenerative processes in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: clinical, pathological and neuroimaging evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2018;44(1):70–90. DOI: 10.1111/nan.12458

6. Verkhatsky A., Parpura V., Vardjan N., Zorec R. Physiology of astroglia. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2019;1175:45–91. DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_3

7. Binder D.K., Steinhäuser C. Astrocytes and epilepsy. *Neurochem. Res*. 2021;46(10):2687–2695. DOI: 10.1007/s11064-021-03236-x

8. Johnson A.M., Sugo E., Barreto D. et al. The severity of gliosis in hippocampal sclerosis correlates with pre-operative seizure burden and outcome after temporal lobectomy. *Mol. Neurobiol.* 2016;53(8):5446–5456. DOI: 10.1007/s12035-015-9465-y
9. Grote A., Heiland D.H., Taube J. et al. 'Hippocampal innate inflammatory gliosis only' in pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2023;146(2):549–560. DOI: 10.1093/brain/awac293
10. Twible C., Abdo R., Zhang Q. Astrocyte role in temporal lobe epilepsy and development of mossy fiber sprouting. *Front. Cell Neurosci.* 2021;15:725693. DOI: 10.3389/fncel.2021.725693
11. Falcón-Moya R., Sihra T.S., Rodríguez-Moreno A. Kainate receptors: role in epilepsy. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;11:217. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00217
12. Горина Я.В., Салмина А.Б., Ерофеев А.И. и др. Маркеры активации астроцитов. *Биохимия.* 2022;87(7):975–998. DOI: 10.31857/S0320972522070119
- Gorina Ya.V., Salmina A.B., Erofeev A.I. et al. Astrocyte activation markers. *Biochemistry (Mosc.)*. 2022;87(9):851–870. DOI: 10.1134/S0006297922090012
13. Huang X., Su Y., Wang N. et al. Astroglial connexins in neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 2021;14:657514. DOI: 10.3389/fnmol.2021.657514
14. Хаспеков Л.Г., Фрумкина Л.Е. Молекулярные механизмы, опосредующие участие глиальных клеток в пластических перестройках головного мозга при эпилепсии обзор. *Биохимия.* 2017;82(3):528–541.
- Khaspekov L.G., Frumkina L.E. Molecular mechanisms mediating involvement of glial cells in brain plastic remodeling in epilepsy. *Biochemistry (Mosc.)*. 2017;82(3):380–391. DOI: 10.1134/S0006297917030178
15. Viana J.F., Machado J.L., Abreu D.S. et al. Astrocyte structural heterogeneity in the mouse hippocampus. *Glia.* 2023;71(7):1667–1682. DOI: 10.1002/glia.24362
16. Prabhakar P., Pielot R., Landgraf P. et al. Monitoring regional astrocyte diversity by cell type-specific proteomic labeling in vivo. *Glia.* 2023;71(3):682–703. DOI: 10.1002/glia.24304
17. Makarava N., Mychko O., Molesworth K. et al. Region-specific homeostatic identity of astrocytes is essential for defining their response to pathological insults. *Cells.* 2023;12(17):2172. DOI: 10.3390/cells12172172
18. Batiuk M.Y., Martirosyan A., Wahis J. et al. Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat. Commun.* 2020;11(1):1220. DOI: 10.1038/s41467-019-14198-8
19. Su Y., Zhou Y., Bennett M.L. et al. A single-cell transcriptome atlas of glial diversity in the human hippocampus across the postnatal lifespan. *Cell Stem. Cell.* 2022;29(11):1594.e8–1610.e8. Erratum in: *Cell Stem. Cell.* 2023;30(1):113. DOI: 10.1016/j.stem.2022.09.010
20. Cibelli A., Stout R., Timmermann A. et al. Cx43 carboxyl terminal domain determines AQP4 and Cx30 endfoot organization and blood brain barrier permeability. *Sci. Rep.* 2021;11(1):24334. DOI: 10.1038/s41598-021-03694-x
21. Зиматкин С.М., Климутъ Т.В., Заерко А.В. Структурная организация формирования гиппокампа крысы. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(3):4–14. DOI: 10.18699/SSMJ20230301
- Zimatkin S.M., Klimuts T.V., Zaerko A.V. Structural organization of the rat hippocampal formation. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal.* 2023;43(3):4–14. DOI: 10.18699/SSMJ20230301
22. Воронков Д.Н., Ставровская А.В., Потапов И.А. и др. Глиальная реакция на нейровоспалительной модели болезни Паркинсона. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2022;174(11):658–664. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-11-658-664
- Voronkov D.N., Stavrovskaya A.V., Potapov I.A. et al. Glial reaction in a neuroinflammatory model of Parkinson's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2023;174(5):693–698. DOI: 10.1007/s10517-023-05772-8
23. Aguilar-Arredondo A., López-Hernández F., García-Velázquez L. et al. Behavior-associated neuronal activation after kainic acid-induced hippocampal neurotoxicity is modulated in time. *Anat. Rec. (Hoboken).* 2017;300(2):425–432. DOI: 10.1002/ar.23513
24. Bond A.M., Berg D.A., Lee S. et al. Differential timing and coordination of neurogenesis and astrogenesis in developing mouse hippocampal subregions. *Brain Sci.* 2020;10(12):909. DOI: 10.3390/brainsci10120909
25. Khakh B.S., Deneen B. The emerging nature of astrocyte diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* 2019;42:187–207. DOI: 10.1146/annurev-neuro-070918-050443
26. Dieni S., Matsumoto T., Dekkers M. et al. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.* 2012;196(6):775–788. DOI: 10.1083/jcb.201201038
27. Fernández-García S., Sancho-Balsells A., Longueville S. et al. Astrocytic BDNF and TrkB regulate severity and neuronal activity in mouse models of temporal lobe epilepsy. *Cell Death Dis.* 2020;11(6):411. DOI: 10.1038/s41419-020-2615-9
28. Albin M., Krawczun-Rygmaczewska A., Cesca F. Astrocytes and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Neurosci. Res.* 2023;197:42–51. DOI: 10.1016/j.neures.2023.02.001
29. Hubbard J.A., Szu J.I., Yonan J.M., Binder D.K. Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. *Exp. Neurol.* 2016;283(Pt A):85–96. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.05.003
30. Lee T.S., Eid T., Mane S. et al. Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol.* 2004;108(6):493–502. DOI: 10.1007/s00401-004-0910-7
31. Alvestad S., Hammer J., Hoddevik E.H. et al. Mislocalization of AQP4 precedes chronic seizures in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2013;105(1–2):30–41. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2013.01.006
32. Szu J.I., Chaturvedi S., Patel D.D., Binder D.K. Aquaporin-4 dysregulation in a controlled cortical impact injury model of posttraumatic epilepsy. *Neuroscience.* 2020;428:140–153. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.12.006
33. Wu N., Lu X.Q., Yan H.T. et al. Aquaporin 4 deficiency modulates morphine pharmacological actions. *Neurosci. Lett.* 2008;448(2):221–225. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.10.065
34. Lan Y.L., Zou S., Chen J.J. et al. The neuroprotective effect of the association of aquaporin-4/glutamate transporter-1 against Alzheimer's disease. *Neural. Plast.* 2016;2016:4626593. DOI: 10.1155/2016/4626593
35. Gebreyesus H.H., Gebremichael T.G. The potential role of astrocytes in Parkinson's disease (PD). *Med. Sci. (Basel).* 2020;8(1):7. DOI: 10.3390/medsci8010007
36. Parkin G.M., Udawela M., Gibbons A., Dean B. Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders. *World J. Psychiatry.* 2018;8(2):51–63. DOI: 10.5498/wjpv.8.i2.51
37. Todd A.C., Hardingham G.E. The regulation of astrocytic glutamate transporters in health and neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(24):9607. DOI: 10.3390/ijms21249607
38. Bjørnsen L.P., Eid T., Holmseth S. et al. Changes in glial glutamate transporters in human epileptogenic hippocampus: inadequate explanation for high extracellular glutamate during seizures. *Neurobiol. Dis.* 2007;25(2):319–330. DOI: 10.1016/j.nbd.2006.09.014
39. Sarac S., Afzal S., Broholm H. et al. Excitatory amino acid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy. *APMIS.* 2009;117(4):291–301. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02443.x
40. Eid T., Lee T.W., Patrylo P., Zaveri H.P. Astrocytes and glutamine synthetase in epileptogenesis. *J. Neurosci. Res.* 2019;97(11):1345–1362. DOI: 10.1002/jnr.24267
41. Papageorgiou I.E., Gabriel S., Fetani A.F. et al. Redistribution of astrocytic glutamine synthetase in the hippocampus of chronic epileptic rats. *Glia.* 2011;59(11):1706–1718. DOI: 10.1002/glia.21217
42. Hayatdavoudi P., Hosseini M., Hajali V. et al. The role of astrocytes in epileptic disorders. *Physiol. Rep.* 2022;10(6):e15239. DOI: 10.14814/phy2.15239
43. Bedner P., Steinhäuser C. Role of impaired astrocyte gap junction coupling in epileptogenesis. *Cells.* 2023;12(12):1669. DOI: 10.3390/cells12121669
44. Philippot C., Griemsmann S., Jabs R. et al. Astrocytes and oligodendrocytes in the thalamus jointly maintain synaptic activity by supplying metabolites. *Cell Rep.* 2021;34(3):108642. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108642
45. Henneberger C. Does rapid and physiological astrocyte-neuron signalling amplify epileptic activity? *J. Physiol.* 2017;595(6):1917–1927. DOI: 10.1113/JP271958
46. Deshpande T., Li T., Herde M.K. et al. Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Glia.* 2017;65(11):1809–1820. DOI: 10.1002/glia.23196

Информация об авторах

Воронков Дмитрий Николаевич – к.м.н., с.н.с. лаб. нейроморфологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Егорова Анна Валериевна – к.м.н., н.с. лаб. нейроморфологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия; доцент каф. гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7112-2556>

Федорова Евгения Николаевна – лаборант-исследователь лаб. нейроморфологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия; ассистент каф. гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2128-9056>

Ставровская Алла Вадимовна – к.б.н., зав. лаб. экспериментальной патологии нервной системы и нейрофармакологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Потапов Иван Александрович – м.н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы и нейрофармакологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7471-3738>

Павлова Анастасия Кирилловна – лаборант-исследователь лаб. экспериментальной патологии нервной системы и нейрофармакологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0006-5653-5524>

Сухоруков Владимир Сергеевич – д.м.н., зав. лаб. нейроморфологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия; профессор каф. гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0552-6939>

Вклад авторов: *Сухоруков В.С., Воронков Д.Н., Ставровская А.В.* – концепция исследования, разработка методологии; *Воронков Д.Н., Федорова Е.Н., Егорова А.В., Потапов И.А., Павлова А.К.* – проведение исследования, курирование и анализ данных; *Сухоруков В.С.* – руководство и координация работ.

Information about the authors

Dmitry N. Voronkov – Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of neuromorphology, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Anna V. Egorova – Cand. Sci. (Med.), researcher, Neuromorphology laboratory, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia; Associate Professor, Department of histology, embryology and cytology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7112-2556>

Evgenia N. Fedorova – research laboratory assistant, Neuromorphology laboratory, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia; assistant, Department of histology, embryology and cytology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2128-9056>

Alla V. Stavrovskaya – Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental pathology of the nervous system and neuropharmacology, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Ivan A. Potapov – junior researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system and neuropharmacology, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7471-3738>

Anastasiya K. Pavlova – research laboratory assistant, Laboratory of experimental pathology of the nervous system and neuropharmacology, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0006-5653-5524>

Vladimir S. Sukhorukov – D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of neuromorphology, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia; Professor, Department of histology, embryology and cytology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0552-6939>

Author contribution. *Sukhorukov V.S., Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N.* – study design, methodology development; *Voronkov D.N., Fedorova E.N., Egorova A.V., Potapov I.A., Pavlova A.K.* – conducting the study, curation and analysis of data; *Sukhorukov V.S.* – research management and coordination.