

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИИ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н. ГОЛИКОВА  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

*На правах рукописи*

КОЗЛОВ  
АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

КОРРЕКЦИЯ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ И АПОПТОЗА С ПОМОЩЬЮ МИНОЛЕКСИНА  
НА МОДЕЛИ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЭПИЛЕПСИИ У КРЫС ЛИНИИ  
КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук  
Бажанова Елена Давыдовна

Санкт-Петербург – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1 ЭПИЛЕПСИЯ, НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ, АПОПТОЗ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	11
1.1 Эпилепсия.....	11
1.2 Нейровоспаление .....	13
1.3 Апоптоз: внешнерецепторный и внутренний пути.....	16
1.4 Маркеры нейровоспаления и апоптоза .....	19
1.4.1 Фактор транскрипции p53.....	19
1.4.2 Регулятор апоптоза Bcl-2 .....	20
1.4.3 Каспаза-8 и каспаза-3 .....	22
1.4.4 Астроцитарный глиоз. Глиальный фибриллярный кислый белок .....	25
1.4.5 Мембранный рецептор FAS.....	27
1.4.6 FAS-ассоциированный белок с доменом смерти FADD – посредник между FAS и апоптозом .....	31
1.4.7 Фактор некроза опухолей альфа .....	32
1.4.8 Белок-адаптер TRADD .....	35
1.4.9 Ядерный фактор-каппа В .....	36
1.5 Перепрофилирование лекарственных препаратов.....	40
1.6 Тетрациклины в неврологии.....	40
1.7 Крысы линии Крушинского-Молодкиной .....	45
1.8 Киндлинг .....	48
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	50
2.1 Дизайн исследования .....	50
2.2 Метод оценки уровня апоптоза.....	57
2.3 Иммуногистохимический метод.....	58

2.4 Вестерн-блоттинг .....	59
2.5 Статистические методы .....	61
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	62
3.1 Измерение длительности латентного периода .....	62
3.2 Определение уровня апоптоза.....	65
3.3 Анализ изменения экспрессии фактора p53 .....	74
3.4 Анализ экспрессии Bcl-2.....	82
3.5 Оценка изменений экспрессии каспаз.....	90
3.6 Определение экспрессии глиального фибриллярного кислого белка.....	94
3.7 Анализ экспрессии FAS .....	103
3.8 Анализ экспрессии белка-посредника FADD .....	106
3.9 Результаты оценки экспрессии фактора некроза опухолей альфа .....	109
3.10 Результаты анализа экспрессии TRADD.....	113
3.11 Оценка уровня экспрессии ядерного фактора каппа В.....	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	120
ВЫВОДЫ.....	130
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	132
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	133

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** По статистике, судорожные припадки так или иначе затронули до 10% населения мира. Для подавляющего большинства людей это был сопутствующий эпизодический синдром какого-либо заболевания, но в 1-2% случаев они обозначили собой начало эпилепсии. Это хроническое неврологическое заболевание, для которого характерны повторяющиеся спонтанные припадки, от них страдает более 51 миллионов человек, или до 1% населения мира, и ежегодно регистрируется более 4.9 миллионов новых случаев. Эпилепсия представляет собой одно из наиболее распространённых и серьёзных заболеваний головного мозга, приводящее к ухудшению качества жизни, инвалидности и смерти (Boulenouar M. et al., 2023). Каждый год 1 из 1000 пациентов с эпилепсией становится жертвой внезапной смерти. У 30 до 40% детей с эпилепсией наблюдается нарушения когнитивных функций и интеллекта. Наличие эпилепсии само по себе может привести к психосоциальным проблемам, таким как депрессия и тревожность. Сопутствующие психиатрические заболевания в 10 раз чаще поражают людей с эпилепсией, чем популяцию в целом. Кроме того, зачастую больные подвергаются стигматизации в обществе (Janson M. et al., 2021).

Распространённость эпилепсии, вероятно, будет расти, поскольку всё больше людей выживают после серьёзных черепно-мозговых травм, инсультов, энцефалитов и менингитов, при тяжёлых наследственных заболеваниях, а также есть определённый прогресс в лечении опухолей головного мозга. В отсутствии таких достижений современной медицины как новые антибиотики, противопаразитарные и противовирусные препараты, лучевая и химиотерапия, многие пациенты не прожили бы достаточно долго, чтобы у них развилась эпилепсия (Falco-Walter J., 2020).

**Степень разработанности темы.** За последние 40 лет разработано более 20 противосудорожных препаратов для лечения эпилептических припадков, но эффективность фармакотерапии практически не изменилась, в каждом третьем случае не удаётся точно установить причину развития эпилепсии и подобрать адекватное лечение. И с каждым новым назначенным препаратом вероятность избавиться от приступов для пациента падает.

Тем не менее, надежды на преодоление резистентности по-прежнему связаны с фармакологической терапией. Например, ценобамат, препарат с двойным механизмом модуляции токов натриевых каналов и рецепторов ГАМК-А, уменьшает частоту приступов лучше многих противоэпилептических препаратов, а фенфлурамин, препарат, действующий на серотонин, резко снижает частоту судорожных приступов при синдроме Драве, в случае которого эпилепсия считается резистентной (Klein P. et al., 2024).

Но это не меняет главного – большинство доступных или разрабатываемых лекарств направлены на подавление возбудимости в ЦНС и купирование судорог, при этом они не воздействуют на вызывающие её механизмы эпилепсии (Wang G. et al., 2021).

Нейровоспаление и эпилепсия – разные патологии, но они настолько тесно связаны, что активация одного приводит к развитию другого. Различные противовоспалительные препараты могут быть перепрофилированы для лечения эпилепсии и в доклинических исследованиях уже показали положительный эффект у модельных животных (Sanz P. et al., 2024).

Рассмотренный в данной работе препарат миноциклин показал многообещающие результаты в экспериментальной неврологии, что было связано с его высокой липофильностью, став безопасным и эффективным дополнением к антипсихотическим препаратам (Singh S. et al., 2021). Он оказывает положительный эффект при ишемическом инсульте и травмах (Zhao K. et al., 2023), рассеянном (Chauhan P. et al., 2021) и боковом амиотрофическом склерозе (Gordon P.H. et al., 2007), болезнях Паркинсона (Cankaya S. et al., 2019) и Хантингтона (Thomas M. et al., 2004), а также других. Его применение в этой области обусловлено главным образом двумя неантибиотическими эффектами: противовоспалительным и антиапоптотическим.

Всё это говорит о необходимости разработки противоэпилептических препаратов с новыми механизмами действия, воздействующих на ключевые точки патогенеза, в том числе нейровоспалительные и проапоптотические каскады. Но для этого необходимо знать, на какие воспалительные пути, молекулярные мишени и механизмы, задействованные в патогенезе эпилепсии, он оказывает действие.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы – экспериментальное обоснование коррекции минолексинем нейровоспаления и апоптоза при фармакорезистентной эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Оценить уровни апоптоза и экспрессию апоптоз-ассоциированных белков: p53, Bcl-2, каспазы-3 и -8 в височной области и гиппокампе крыс Крушинского-Молодкиной при аудиогенном киндлинге и введении минолексина.
2. Оценить уровень глиоза при аудиогенном киндлинге и введении минолексина.
3. Изучить развитие нейровоспаления при киндлинге и введении минолексина (экспрессия маркеров нейровоспаления FAS, FADD, TNF- $\alpha$ , TRADD, Nf-kB).
4. Провести комплексный анализ воздействия минолексина на развитие нейровоспаления и апоптоза при экспериментальной эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной.

**Научная новизна.** Впервые исследовано изменение уровня апоптоза при длительном аудиогенном киндлинге в височной области и гиппокампе крыс Крушинского-Молодкиной, выявлено повышение гибели клеток во всех изученных областях мозга крыс. Выявлен основной путь активации апоптоза при экспериментальной эпилепсии – p53-опосредуемый каскад. Показана ведущая роль p53 в патогенезе эпилепсии у исследуемых животных. Показано, что антиапоптотический белок Bcl-2 не играет значимой роли в эпилептогенезе при киндлинге у крыс данной линии. Впервые исследовано влияние миноциклина на клеточную гибель и нейровоспаление в височной области и гиппокампе крыс при экспериментальной эпилепсии (длительный аудиогенный киндлинг). Выявлено позитивное действие миноциклина при киндлинге (снижение экспрессии проапоптотического белка p53 в височной области и гиппокампе в группе крыс, подвергшихся киндлингу и получавших миноциклин). Показано отсутствие ведущей роли каспазы-3 и -8 в патогенезе эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной и преобладание каспазозависимых путей апоптоза. Впервые исследовано развитие нейровоспаления, глиоза и активации астроцитов при длительном аудиогенном киндлинге в височной области и гиппокампе крыс Крушинского-Молодкиной, и возможность коррекции этих изменений с помощью миноциклина.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в ходе исследования данные расширяют представление о роли нейровоспаления и аберрантной гибели клеток путём апоптоза как о фундаментальных механизмах, лежащих в основе эпилептогенеза и субстрата для формирования лекарственной устойчивости. Все имеющиеся на сегодняшний день гипотезы о природе фармакорезистентности не полны, но сходятся на процессах апоптоза и нейровоспаления. Выявление таких фундаментальных молекулярных механизмов может помочь разработать эффективные методы лечения эпилепсии, в том числе считающейся фармакорезистентной в настоящее время. Для модуляции путей воспаления и апоптоза необходимы другие лекарственные препараты. Вместо разработки новых для этой цели могут быть использованы старые, уже проверенные, выпускающиеся и используемые в клинической практике, либо вытесненные более современными препараты, изначально созданные для лечения совсем других заболеваний, такие, как соединения тетрациклинового ряда, включая миноциклин. Результаты данного исследования позволят установить влияние миноциклина на нейровоспаление и сопутствующий апоптоз нейронов и глии при эпилепсии, выяснить механизмы его действия и предложить исследуемые вещества как базу для создания новых препаратов, эффективных для терапии эпилепсии, в том числе считающейся фармакорезистентной.

**Методология и методы исследования.** Методология включала: поиск и анализ научной информации для постановки задачи и целей; выбор экспериментальной модели; методик исследования; планирование и постановка экспериментов; описание, статистическую обработку и анализ полученных результатов.

Методологические подходы: экспериментальное моделирование фармакорезистентной эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной, проведение патоморфологических и биохимических исследований, оценка влияния аудиогенного киндлинга и введения миноциклина на уровень апоптоза в головном мозге крыс и экспрессию маркеров нейровоспаления (TUNEL, иммуногистохимия, вестерн-блоттинг). Экспериментальные исследования проведены в соответствии с нормативной документацией: ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики (OECD Guide 1:1998 Principles of good laboratory practice (Принципы надлежащей лабораторной практики))», ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений

и организации процедур, рекомендациями № 33 от 14.11.2023 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических исследований», Постановление главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4 об утверждении санитарных правил и норм СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

**Положения, выносимые на защиту:**

1. При аудиогенном киндлинге уровни апоптоза в височной доле и гиппокампе крыс Крушинского-Молодкиной повышаются. Миноциклин демонстрирует выраженный антиапоптотический эффект. Выявлены изменения экспрессии апоптоз-ассоциированных белков при киндлинге. Антиапоптотический нейропротективный эффект миноциклина обусловлен в основном супрессией проапоптотического белка p53. Выявлено тканеспецифичное действие миноциклина на экспрессию каспазы-3 и каспазы-8.

2. Не обнаружено влияния киндлинга и миноциклина на экспрессию GFAP в височной области и гиппокампе.

3. Выявлены тканеспецифические изменения экспрессии маркеров нейровоспаления при киндлинге (FAS, FADD). При введении миноциклина показано уменьшение экспрессии TNF- $\alpha$  и NF- $\kappa$ B, возросшей при киндлинге, в изученных отделах мозга.

4. Комплексный анализ воздействия миноциклина на нейровоспаление и апоптоз на модели крыс Крушинского-Молодкиной подтвердил его антиапоптотические и противовоспалительные эффекты, обусловленные в основном подавлением экспрессии белка p53, TNF- $\alpha$  и фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, во всех исследуемых отделах головного мозга.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность исследования подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, полученных при морфологическом и биохимическом исследовании пяти отделов головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной (самцов и самок), использованием современного оборудования и адекватных методов исследования, включая статистическую обработку полученных результатов.

Диссертационное исследование выполнено в рамках выполнения плановой научно-исследовательской работы (НИР) Федерального государственного бюджетного



учреждения науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России), ныне Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ НКЦ им. С.Н. Голикова ФМБА России) по теме: «Участие нейровоспаления в патогенезе эпилепсии и исследование возможности его фармакологической коррекции» шифр «Нейровоспаление» (2022-2025 гг.).

Результаты исследования представлены в виде устных и стендовых докладов на XXII Всероссийской научно-практической конференции «Поленовские чтения» (Санкт-Петербург, 2023); XXIV съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийском конгрессе «Неотложные состояния в неврологии: современные методы диагностики и лечения», посвящ. 100-летию со дня рожд. Г.А. Акимова (Санкт-Петербург, 2023); II Всероссийской научно-практической конференции студентов, магистрантов, аспирантов «Современные достижения молодых ученых в биологии, медицине и ветеринарии» (Онлайн-конференция, Астрахань 2023); Всероссийской научно-практической конференции «Развитие науки и технологий в современной России» (Москва, 2024); VII Всероссийской научно-практической конференции (Пенза, 2024); два доклада на Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 100-летию со дня рождения акад. Берёзова Т.Т. «Биохимия человека 2024» (Москва, 2024); Всероссийском конгрессе «Нейронауки: интеграция теории и практики» (Санкт-Петербург, 2024); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные исследования висцеральных систем в биологии и медицине» (Астрахань, 2024), XV Международной научно-практической конференции (Пенза, 2025).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, остальные – тезисы докладов и другие печатные материалы.

**Личный вклад соискателя.** Все экспериментальные результаты, приведенные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку полученных данных, осуществлял их анализ и обобщение, принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 155 страницах и состоит из введения, главы 1 – эпилепсия, нейровоспаление, апоптоз (обзор литературы), главы 2 – материалы и методы исследования, главы 3 – результаты исследования и их обсуждение, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка использованной литературы, который включает 249 источников. Работа проиллюстрирована 38 рисунками и 11 таблицами.

## **ГЛАВА 1. ЭПИЛЕПСИЯ, НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ, АПОПТОЗ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

### **1.1 Эпилепсия**

Согласно определению международной противоэпилептической лиги (ILAE) от 2014 года, при эпилепсии у человека наблюдается два или более неспровоцированных или рефлекторных припадков с интервалом более 24 часов, или один неспровоцированный или рефлекторный припадок, когда риск повторного припадков в течение следующих 10 лет составляет 60%. Приступы возникают при аномальной синхронной нейронной активности в конкретном участке мозга или во всём его объёме, когда нейронные сети были неправильно сформированы или повреждены различными агентами. Различия в этиологии эпилепсии среди разных возрастных групп приводят к бимодальной распространённости заболевания – с генетическими/терапевтическими причинами, достигающими пика в детстве, и накопленными повреждениями мозга (травмы, опухоли, нейродегенеративные заболевания), достигающими пика в пожилом возрасте. При этом этиология припадков неизвестна примерно в 50% случаев. Часто считается, что эпилепсия является симптомом основного неврологического заболевания.

При всём многообразии причин эпилепсии они могут быть сведены в четыре категории: идиопатическая (носит наследственный или предположительно наследственный характер, отсутствуют грубые аномалии), симптоматическая (приобретённая, в том числе генетически обусловленная, связанная с грубыми анатомическими или патологическими аномалиями), спровоцированная (нет грубых нейроанатомических или нейропатологических изменений, причиной приступов считается определённый системный или средовой фактор, может иметь генетическую природу) и криптогенная (предположительно симптоматической природы, причина не установлена, составляет более 40% случаев эпилепсии у взрослых). Эпилепсия в подавляющем большинстве случаев является многофакторной, сочетая генетическую предрасположенность, приобретённые причины и провоцирующие факторы, но чаще

всего можно выделить основную причину эпилепсии (Shorvon S.D., 2011).

Примерно у 70–80% больных удаётся достичь ремиссии (Méndez-Armenta M. et al., 2014), однако у примерно трети эпилепсия не поддаётся терапии имеющимися препаратами или их комбинациями, и такая форма эпилепсии признаётся лекарственно-устойчивой (Juvale I.A. et al., 2021). Также имеют место проблемы в дифференциальной диагностике, особенно в детском и пожилом возрасте, которые могут приводить к псевдорезистентности (Bartolini E. et al., 2022).

Согласно определению, данному в 2017 году Международной противэпилептической лигой (ILAE), для фармакорезистентной эпилепсии характерно наличие приступов в течение 6 месяцев после начала лечения даже при соблюдении надлежащих терапевтических режимов одним или несколькими препаратами (Avakyan G.N. et al., 2017). Существует несколько гипотез о природе лекарственной устойчивости эпилепсии, в числе которых фармакокинетическая, транспортная, генетическая и эпигенетическая, нейронной сети, внутренней тяжести, мишени и нейровоспаления. Ни одна из них по отдельности не объясняет нейробиологическую основу возникновения эпилепсии и изменения резистентности во времени у отдельно взятого пациента, однако все гипотезы объединяют общие механизмы, связанные с нейровоспалением, нарушениями апоптоза и нейродегенеративными изменениями (Bazhanova E.D. et al., 2021).

Вне зависимости от причины эпилепсии, известной или скрытой, а также от того, в какой степени она поддаётся лечению, в основе её патогенеза лежат механизмы, связанные с нейровоспалением, нарушениями апоптоза и нейродегенеративными изменениями. Нейровоспаление и эпилепсия взаимосвязаны. Эпилептические судороги и воспалительные медиаторы образуют порочный цикл положительной обратной связи, усиливая друг друга (Sanz P. et al., 2020).

Помимо нейронов в патогенез эпилепсии широко вовлечён и глиальный компонент, вырабатывающий медиаторы воспаления. Недавние исследования указывают на значительный вклад глии, особенно активированных астроцитов и микроглии, в патофизиологию эпилепсии (Devinsky O. et al., 2013). Данные исследований образцов, полученных от пациентов и экспериментальных животных, выявили большую роль астроцитов в распространении припадков (Dossi E. et al., 2018).

Кроме воспаления, во время эпилептического припадка и какое-то время после

него в мозге пациентов и экспериментальных животных наблюдается массовая гибель клеток, как нейронов, так и глии. Исследования биомаркеров выявили индукцию молекулярных механизмов апоптоза и экспрессию проапоптотических белков (Bazhanova E.D. et al., 2021).

Патологические процессы, обусловленные и связанные с эпилептогенезом и инициирующие генерацию и рецидивирование эпилептических припадков, являются предметом интенсивных исследований. Эпилепсия может быть как первичной патологией, так и следствием других патологических состояний. Нейровоспаление может быть как одной из причин эпилепсии, но не исключено и его развития в ходе прогрессирования заболевания (Prasucci E. et al., 2021).

## **1.2 Нейровоспаление**

Нейровоспаление – это реакция ЦНС на различные повреждения, такие как повреждение тканей, инфекции, аутоиммунные состояния, стресс и судороги. Оно включает биосинтез и высвобождение молекул с провоспалительными свойствами, таких как цитокины, хемокины и белки системы комплемента, которые производятся активированной микроглией, астроцитами, нейронами, эндотелиальными клетками сосудистой сети головного мозга и инфильтрировавшимися клетками иммунной системы. В целом нейровоспаление считается нормальной реакцией, которая помогает поддерживать гомеостаз. Но если оно затягивается или переходит определённые пределы, реакция может стать дезадаптивной, что приводит к клеточной дисфункции, наблюдаемой при боли, стрессе, острой и хронической нейродегенерации и при эпилепсии. Такой воспалительный ответ в нервной системе вызывается повышенной активностью нейронов в отсутствии явных патологических состояний, и называется нейрогенным воспалением (Rana A., Musto A.E., 2018). Развитие эпилепсии, также называемое эпилептогенезом, в основном обусловлено состояниями «стерильного воспаления», свободными от патогенов, при которых рецепторное распознавание эндогенных сигналов опасности, известных как молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), приводит к повышенной продукции провоспалительных цитокинов, вовлеченных в синаптическую реорганизацию. Это вызывает долгосрочную гипервозбудимость нейронной сети и увеличивают

проницаемость ГЭБ (Hollis A., Lukens J.R., 2025). Провоспалительные молекулы, такие как цитокины, хемокины и простагландины, играют «нейромодуляторную» роль, опосредованную прямой активацией их рецепторов в нейронах или, косвенно, стимуляцией аутокринных рецепторов глии, что приводит к изменениям в физиологии этих клеток, нарушению ГЭБ и развитию эпилепсии. На рисунке 1 представлена схема нейровоспаления с основными молекулами и путями в эпилептогенезе.

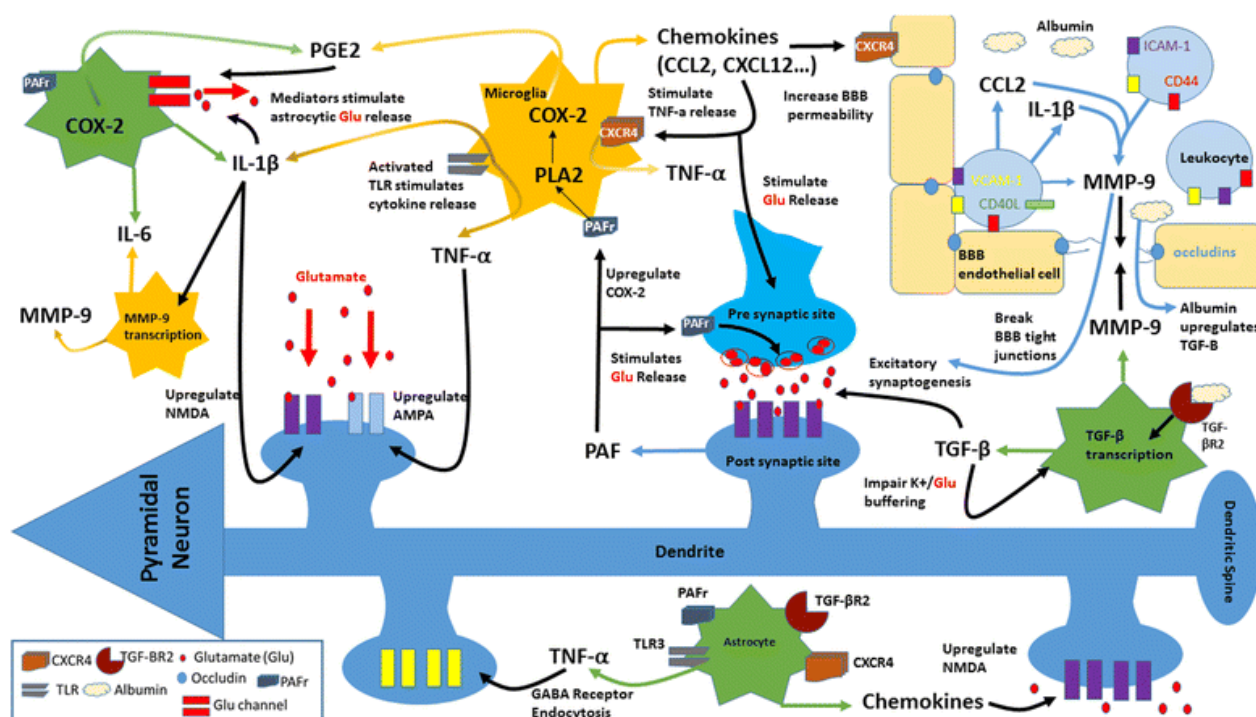


Рисунок 1 – Нейровоспаление в эпилептогенезе. По (Vezzani A. et al., 2015).

Нейровоспаление обычно активируется в эпилептогенных областях мозга у людей и явно участвует в моделях эпилепсии у животных. Иммуногистологические и биохимические исследования эпилептических очагов от пациентов, в том числе с лекарственно-устойчивыми формами эпилепсии, продемонстрировали активацию нескольких воспалительных путей. Паттерны экспрессии таких молекул, как IL-1 $\beta$ , IL-6, CD55, хемокины, фактор некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ), рецепторов TLR2, TLR4 и других в нейронах и глии сходны с таковыми в моделях эпилептического статуса и эпилептогенеза у грызунов. Имеющиеся данные подтверждают концепцию о том, что нейровоспаление является не только следствием судорог, но участвует в их возникновении. Структурные и патогенетические общности включают активацию

микроглии, реактивный астроглиоз, нарушение гематоэнцефалического барьера, воспалительную клеточную инфильтрацию, потерю нейронов, нейропластичность и реорганизацию цепей (Chen Y. et al., 2023).

Цитокины в основном продуцируются микроглией и астроцитами в ЦНС, играя роль как в её развитии и нормальном функционировании, так и участвуя в различных патологических процессах, связанных с воспалением. На фоне растущего объёма данных, подтверждающих фундаментальную роль нейровоспаления в развитии эпилепсии, определение роли провоспалительных цитокинов в эпилептогенезе может помочь в преодолении фармакорезистентности.

Провоспалительные цитокины вносят решающий вклад в воспалительные реакции в головном мозге. Доказано, что эпилептические припадки связаны с их повышенным уровнем, особенно интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 и фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Khaboushan A.S. et al., 2022). TNF- $\alpha$  может играть роль как про-, так и противовоспалительного цитокина, в зависимости от задействованных путей и мишеней, соответственно, как провоцируя, так и подавляя судороги (Sharma R. et al., 2019).

Хемокины – это суперсемейство небольших секретируемых белков, которые направляют миграцию иммунных клеток, действуя на рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR) на их поверхности. Многие из хемокинов участвует в регуляции воспаления, привлекая иммунные клетки (Chen Y. et al., 2023). Хемокины также продуцируются астроцитами и микроглией, активируя микроглию и привлекая моноциты с периферии (Mukherjee S. et al., 2020). В мозге хемокины в основном секретируются глиальными клетками и вместе со своими рецепторами могут быть вовлечены в эпилепсию. Повышенная экспрессия CCL2, CCL5, CCL19, CCL22, CXCL8 наблюдается в гиппокампе животных с эпилепсией или после черепно-мозговых травм (Sharma R. et al., 2019).

Система комплемента включает более 30 белков в плазме и клеточных мембранах и, запуская воспалительные реакции, способствует вторичному повреждению тканей и эпилептогенезу после повреждения ЦНС (Chen M. et al., 2020). При эпилепсии наблюдаются нарушения классических (C1inh, C4), альтернативных (FH, пропердин, C3) и терминальных (TCC) путей (Kopczynska M. et al., 2018). Воздействие на пути комплемента может оказаться полезным для лечения эпилепсии. Так, инактивация пути

СЗ у мышей с моделью эпилептического статуса, вызванного интрацеребровентрикулярной инъекцией каиновой кислоты, уменьшала признаки нейродегенерации (Wei Y. et al., 2021). Недавние исследования выявили множество механизмов, включая взаимозависимость окислительного стресса и нейровоспаления. Установлено, что нейровоспаление может регулироваться факторами транскрипции (NF- $\kappa$ B и *nrf2*), активируемыми активными формами кислорода. Нейровоспаление, в свою очередь, может индуцировать экспрессию и активность НАДФН-оксидазы (NOX), способствуя формированию окислительного стресса (Jiang J. et al., 2022).

### **1.3 Апоптоз: внешнерецепторный и внутренний пути**

Аномальный всплеск активности нейронов, происходящий во время припадка, может привести к различным изменениям на клеточном уровне, и некоторые из них станут для клетки последними. Различают не менее 12 типов гибели нейронов: внутренний и внешнерецепторный пути апоптоза, онкоз, некроптоз, партанатоз, аутофагия, аутолиз, фагоптоз и другие. Так или иначе, важным патологическим признаком эпилепсии, в том числе фармакорезистентной, является гибель нейронов. Как и нейровоспаление, апоптоз является физиологическим процессом и удаление избыточных нейронов в развивающейся нервной системе необходимо для её правильного формирования. Эксперименты на животных и изучение нейронов людей с эпилепсией демонстрируют, что индуцированная приступом апоптотическая гибель нейронов и глиальных клеток способствует повреждению головного мозга, нарушая соотношение возбуждающих и тормозных нейротрансмиттеров. В случае эпилепсии имеет место как внешнерецепторный, так и внутренний, митохондриальный пути апоптоза, которые сходятся на эффекторных каспадах.

Апоптоз вызывает увеличение повреждения головного мозга с каждым припадком, что особенно проявляется в гиппокампе, приводя, в том числе, к развитию лекарственной устойчивости (Бажанова Е.Д., Козлов А.А., 2022; Sokolova T.V. et al., 2022). На рисунке 2 представлены основные биохимические пути и молекулы, участвующие в апоптозе.

Апоптоз представляет собой физиологический процесс запрограммированной гибели клеток, необходимый для развития и функционирования многоклеточных



организмов. Удаление избыточного количества нейронов необходимо для нормального функционирования и формирования нервной системы, однако aberrантная гибель нейронов и глиального компонента является одной из основных причин острых и хронических нейродегенеративных заболеваний (Fricker M. et al., 2018).

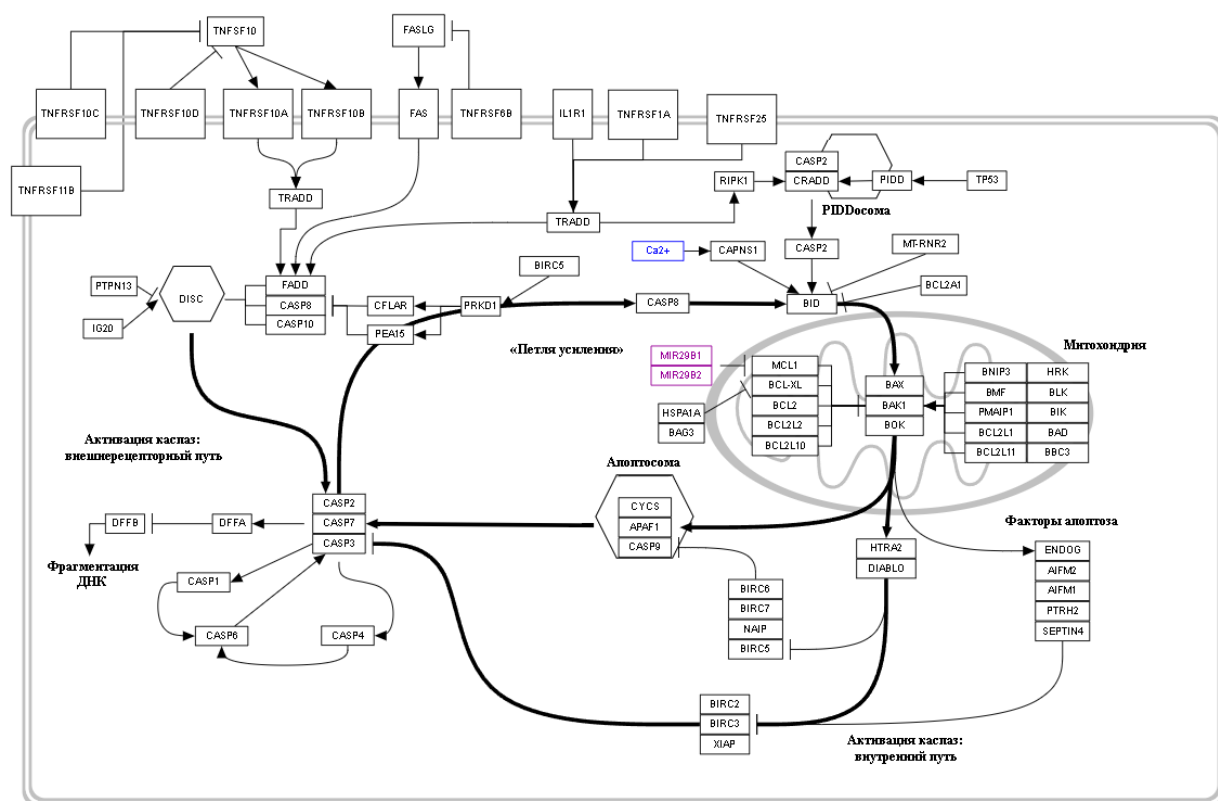


Рисунок 2 – Внешнерецепторный и митохондриальный пути апоптоза.

Адаптировано по: <https://pathway-viewer.toolforge.org/embed/WP1772>

Внешний путь апоптоза начинается с лигирования рецепторов смерти семейства фактора некроза опухоли (TNF) на поверхности клетки. Оно может привести к привлечению белка домена смерти, связанного с FAS (FADD), который, в свою очередь, связывает молекулы прокаспазы-8, инициируя аутопротеолитическую обработку и активацию каспазы-8, запускающей эффекторные каспазы. TNF- $\alpha$  и лиганд FAS могут вызывать апоптоз некоторых нейронов во время воспаления, а для двигательных нейронов был описан FAS-зависимый апоптотический путь, включающий p38, оксид азота (NO), в этом случае развивается классический апоптоз, зависящий от каспаз. При гибели нейронов во время инсульта и судорог отмечается повышенная активность

каспазы-8, а ингибирование внешнего пути апоптоза любым способом защищает нейроны от гибели. Внутренний путь апоптоза сосредоточен на регуляции проницаемости мембран митохондрий белками семейства Bcl-2. В нейронах этот процесс полностью зависит от экспрессии и активации Вах, удаление и ингибирование которого предотвращает их аберрантную гибель в ряде моделей нейродегенерации. Вах контролируется посредством ингибирующих взаимодействий с антиапоптотическими членами семейства Bcl-2, но его ингибиторами могут выступать и некоторые другие белки. Исследования *in vitro* на первичных нейрональных культурах выявили важность белков Puma и Bim, содержащих только ВНЗ, в индукции апоптоза в ответ на множество токсических стимулов, включая повреждение ДНК, активные формы кислорода, амилоид- $\beta$  и эксайтотоксический стресс (Fricker M. et al., 2018). В патогенезе эпилепсии задействованы внешний и внутренний пути апоптоза. При этом активация внешнего пути предшествует активации внутреннего. На завершающей стадии обоих путей активируются каспазы-3 и -7. Повышение их уровня в головном мозге после судорог и в эпилептических очагах не оставляет сомнений в вовлечённости апоптоза в эпилептогенез (Bazhanova E.D., Kozlov A.A., 2022; Henshall D.C., Simon R.P., 2005).

Повреждение и гибель нейронов были обнаружены ещё в 1990-х годах вместе со свойственными апоптозу фрагментами ДНК в образцах тканей мозга крыс после продолжительных судорог. С другой стороны, запрограммированная гибель клеток была выявлена у пациентов с повреждениями головного мозга, риск развития эпилепсии у которых велик.

Проводятся экспериментальные работы по лечению рефрактерной эпилепсии за счёт воздействия на механизмы апоптоза. В частности, показано, что аллостерический модулятор рецептора  $\gamma$ -аминомасляной кислоты GABAB (BHF177) ингибирует апоптоз нейронов, таким образом защищая их от развития рефрактерной эпилепсии по пути IRS-1/PI3K/Akt, что может быть использовано при разработке новых методов лечения (Wang P. et al., 2022).

Таким образом, экспериментальное моделирование на животных и клиническая нейровизуализация пациентов показали, что эпилептические припадки вызывают гибель нейронов, усугубляя течение болезни. Такое повреждение головного мозга может способствовать эпилептогенезу, нарушениям когнитивной функции и фенотипу эпилепсии.

## 1.4 Маркеры нейровоспаления и апоптоза

### 1.4.1 Фактор транскрипции p53

Фактор транскрипции и супрессор опухолей p53 – тетрамерный фосфопротеин, который управляет рядом основных клеточных функций, включая транскрипцию генов, синтез и репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, старение и гибель клеток. Этот белок является одним из ключевых модуляторов реакции клеток на стресс, активация которого запускает апоптоз в различных типах клеток, в число которых входят и нейроны. P53 в нервной системе работает как в норме, при формировании и развитии ЦНС, так и при неврологических расстройствах, таких как инсульт, болезни Альцгеймера и Паркинсона, синдром Ангельмана, черепно-мозговые травмы, боковой амиотрофический склероз, аутизм, спиноцеребеллярная атаксия и эпилепсия (Li H. et al., 2023).

Экспрессия p53 повышена в повреждённых нейронах мозга на моделях острых повреждений, таких как ишемия и эпилепсия, а также в образцах ткани головного мозга, полученных на животных моделях и у пациентов с хроническими нейродегенеративными заболеваниями.

Главенствующая роль p53 в инициации апоптоза нейронов показана на примере действия его ингибиторов, предотвращающих гибель клеток, антисмысловых олигонуклеотидов или нокаута гена (Morrison R.S., Kinoshita Y., 2000; Morrison R.S. et al., 2003).

Исследования удалённого участка гиппокампа у пациентов с трудноизлечимой височной эпилепсией методом вестерн-блоттинга выявили активацию биохимических путей, связанных с p53-зависимым апоптозом, а иммуногистохимические методы показали локализацию p53 в ядрах нейронов и глии (Engel T. et al., 2007). Выявлена повышенная экспрессия p53 в ядрах нейронов области CA3 гиппокампа крыс, которым вводили пентилентетразол внутривенно, по сравнению с контрольной группой, при этом в зубчатой извилине таких различий не было (Ding D-X. et al., 2014). В образцах мозга пациентов с фокальной лекарственно-устойчивой эпилепсией экспрессия

проапоптотического белка p53 в коре головного мозга и белом веществе эпилептического очага и перифокальной зоны была повышена по сравнению с людьми без эпилепсии (Sokolova T.V. et al., 2022). Подавление p53 прямыми или косвенными способами, например микро-РНК, может уменьшить апоптоз, вызванный эпилептическими припадками (B. Martinez, P.V. Replow, 2023).

Но было бы ошибкой считать ингибирование p53 универсальным методом борьбы с эпилепсией, в ряде случаев может наступить ухудшение. Это показал эксперимент с эпилептическим статусом у мышей дикого типа и животных с недостатком p53. Анализ электроэнцефалограммы (ЭЭГ) во время эпилептического статуса, индуцированного введением каиновой кислоты в область миндалевидного тела, показал, что у мышей с дефицитом p53 судороги длились значительно дольше по сравнению с животными дикого типа. При этом повреждение гиппокампа у них было сопоставимым (Engel T. et al., 2010).

#### 1.4.2 Регулятор апоптоза Bcl-2

В 1988 году было обнаружено, что белок Bcl-2 (B Cell Lymphoma/Leukaemia 2) массой 26 кДа способствует развитию злокачественных опухолей, не давая их клеткам погибнуть, но при этом не усиливая пролиферацию. Единственным белком, с которым Bcl-2 гомологичен, оказался белок вируса Эпштейна-Барр (EBV), известный как BHRF1. Ген bcl-2 был идентифицирован в результате исследования хромосомной транслокации t(14;18), которая обнаруживается почти во всех фолликулярных лимфомах (Tsujimoto Y. et al., 1984).

Впоследствии было показано, что экспрессия Bcl-2 может защищать клетки от стресса, вызванного различными факторами. Затем были открыты и другие белки со сходным строением.

Белки семейства Bcl-2 эволюционно консервативны и имеют общие домены гомологии Bcl-2 (BH) (Suraweera C.D. et al., 2022). Функционально их можно разделить на антиапоптотические, проапоптотические и дивергентные (BH3). Проапоптотические Вах-подобные белки создают поры во внешней мембране митохондрий, что приводит к высвобождению цитохрома c в цитоплазму и активации каспаз, и, далее, к гибели клеток. Антиапоптотические белки, как Bcl-2, связывают и ингибируют множество

доменов ВНЗ, непосредственно вызывая олигомеризацию Вах или ВАК. Группа ВНЗ объединяет белки со слабовыраженной гомологией последовательностей по сравнению с Bcl-2 (Choudhury S., 2019).

Влияние Bcl-2 на регуляцию клеточного цикла было обнаружено путём мониторинга его экспрессии. Протеомный анализ клеток, сверхэкспрессирующих Bcl-2, выявил 169 белков с повышенным уровнем экспрессии и 120 белков со снижением в 1,5 раза. В основном они связаны с работой рибосом и окислительным фосфорилированием, что объясняет большую часть эффектов Bcl-2. Однако детальные механизмы не прямой регуляции клеточного цикла Bcl-2 неясны (Du X. et al., 2021).

Многие из этих белков широко экспрессируются в нервной системе развивающихся и взрослых организмов. Показана физиологическая роль Bcl-2 и Bcl-x в выживании нейронов, так, они защищают нейроны от широкого спектра токсических воздействий (Merry D.E., Korsmeyer S.J., 1997). Bcl-2 экспрессируется в развивающемся и зрелом мозге, где участвует в регуляции путей окислительного стресса (Hollville E. et al., 2019). Несмотря на высокие уровни экспрессии мРНК и белка Bcl-2 как в клетках-предшественницах нейронов, так и в постмитотических нейронах эмбрионального мозга, дефицит Bcl-2 не вызывает каких-либо необратимых изменений и развитие идёт нормально, без значительного усиления запрограммированной гибели нейронов.

Экспрессия Bcl-2 изменяется при многих состояниях, для которых характерна быстрая или отсроченная гибель нейронов, а также нейродегенерация. Во многих случаях описано снижение уровней антиапоптотических белков Bcl-2 с увеличением уровней проапоптотических белков или без него в поражённых областях мозга. Но в других случаях при тех же патологических состояниях описывается повышенная экспрессия антиапоптотических генов и их белков, что может просто отражать реакцию выжившей популяции клеток (Shacka J.J., Roth K.A., 2005).

Экспрессия Bcl-2 снижена при различных нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, а уровни проапоптотических членов этого семейства, таких как Вах, напротив, высоки как в посмертных образцах от пациентов, так и в моделях трансгенных животных (Erekat N.S., 2022).

В материале, полученном от пациентов с височной эпилепсией, детей и взрослых, наблюдается повышение уровней Bcl-2. Анализ методом вестерн-блотинга ткани

височной коры головного мозга показал значительное увеличение уровней белка Bcl-2 у людей с лекарственно-устойчивыми формами. Также Bcl-2 положительно связан с продолжительностью, частотой и тяжестью эпилептических припадков (Vega-García A. et al., 2021).

По данным исследования сыворотки крови 65 пациентов с эпилепсией, высокие уровни Bcl-2 связаны с когнитивной дисфункцией, отмечавшейся у 18 пациентов. Время и частота эпилептических припадков у пациентов с когнитивной дисфункцией были достоверно выше, чем у пациентов без таковой (Zhang Y. et al., 2020).

Уровни Bcl-2 положительно коррелируют с продолжительностью эпилепсии, тяжестью приступов и их частотой, притом у пациентов с неконтролируемыми приступами они выше. Помимо антиапоптотического белка Bcl-2, эта же закономерность наблюдается у проапоптотического белка FAS (El-Hodhod M.A. et al., 2006, Skardoutsou A. et al., 2022).

Анализ экспрессии Bcl-2 при склерозе гиппокампа вследствие височной эпилепсии показал, что увеличение соотношения Bcl-2/Bax не предотвращает экспрессию активной каспазы-3 глией и гранулярными нейронами, но в полях СА активная каспаза-3 не обнаруживалась (Toscano E.C de B. et al., 2019).

Таким образом, насколько эффективно Bcl-2 выполняет свою функцию при эпилепсии, неясно, как и то, насколько он полезен при данном заболевании: защищает ли нейроны от избыточной гибели или наоборот, способствует выживанию дефектных нейронов и прогрессии заболевания с развитием лекарственной устойчивости.

#### 1.4.3 Каспаза-8 и каспаза-3

Каспазы представляют собой эволюционно консервативные аспартат-специфические цистеиновые протеазы, присутствующие в клетках в качестве зимогенов, которые образуют активный фермент после протеолитического расщепления. При активации апоптоза запускается каскад каспаз, который завершается активацией эффекторных каспаз (каспаза-3). Эффекторные каспазы расщепляют ключевые внутриклеточные структурные белки и белки выживания и активируют фермент, ответственный за характерную фрагментацию ДНК.

В настоящее время идентифицировано 18 каспаз млекопитающих (Eskandari E., Eaves C.J., 2022), которые делятся на каспазы воспаления/процессирования цитокинов, включающие 1, 5 и 11 каспазы, и каспазы, регулирующие апоптоз, включающие 2, 3, 6, 7, 8, 9 каспазы.

Апоптозные каспазы функционально подразделяются на инициаторные (-8, -9 и -10) и эффекторные (-3, -6 и -7). В случае внешнерецепторного пути апоптоза сигнальный комплекс, индуцирующий смерть, поддерживает димеризацию каспаз как критический и достаточный этап для активации инициаторных каспаз -8 и -10 (Eskandari E., Eaves C.J., 2022). Далее будут подробно рассмотрены каспаза-8 и каспаза-3.

Каспаза-8 была идентифицирована по ее способности опосредовать гибель клеток в ответ на внешние сигналы. Значительную часть функций каспазы-8 можно описать термином «паноптоз», который в основном включает в себя три режима запрограммированной гибели клеток, а именно пироптоз, апоптоз и некроптоз (Fritsch M. et al., 2019).

Каспаза-8 играет немаловажную роль при эпилепсии. Эпилептические припадки запускают запрограммированную клеточную смерть, или апоптоз как по внутреннему так и по внешнему пути. В культуре нейронов гиппокампа, полученной из 1-2-дневных крысят Sprague-Dawley, которую инкубировали в среде Neurobasal-A/B27 без кинуриновой кислоты или магния в течение 40 минут, наблюдалась подобная судорогам активность и все признаки апоптоза. Изучение их лизатов показало расщепление каспаз -3, -8, -9 и -12 после судорог, но не каспаз -1, -2, -6, -7 и -10. Гибель клеток удалось предотвратить, заблокировав каспазу-8, но не -9. Таким образом, активация внешнего пути гибели клеток происходит до активации внутреннего (Meller R. et al., 2006). У самцов крыс Вистар, подвергшихся электрическому киндлингу миндаины 15 и 45 раз, вестерн-блот также показал увеличение уровня каспаз-8 и -9 в мозжечке. В данном случае наблюдалась активация как внешнего, так и внутреннего пути апоптоза (Rubio R. et al., 2019).

Эти же закономерности наблюдаются в человеческом мозге. Анализ образцов эпилептических очагов височной доли 4 мужчин и 4 женщин с лекарственно-устойчивой эпилепсией в возрасте 12-56 лет, удалённых во время операций, выполненных в Российском научно-исследовательском институте им. А.Л. Поленова, и контрольных образцов фрагментов коры и белого вещества 5 мужчин и 3 женщин,

удалённых из-за черепно-мозговых травм, выявил повышение экспрессии каспазы-8 в эпилептическом очаге и в перифокальной зоне височной коры (Sazhina T.A. et al., 2020).

Во время апоптоза активированная каспаза-3 расщепляет широкий спектр субстратов, что приводит к характерным морфологическим изменениям в клетках (фрагментации ДНК). Расщепление иных мишеней каспазы-3 приводит к другим морфологическим изменениям, включая сжатие клеток.

Экспрессия каспазы-3 не всегда приводит к гибели клетки. Было показано, что сублетальная её активация регулирует пролиферацию клеток путём протеолитического расщепления различных субстратов. Она играет ключевую роль в регуляции роста и поддержании гомеостатического состояния как нормальных, так и злокачественных клеток и тканей в многоклеточных организмах. Каспаза-3 также действует как регуляторная молекула в нейрогенезе и синаптической активности (Eskandari E., Eaves C.J., 2022). Знание биохимических путей неапоптотической активации и модуляции каспазы-3 имеет потенциальное значение для понимания синаптической недостаточности в патофизиологии неврологических расстройств.

Каспаза-3 является одним из наиболее изученных регуляторов апоптоза при гибели нейронов, вызванной судорогами, её активность прослеживается как в гиппокампе, так и в других эпилептогенных очагах. Однако в некоторых исследованиях не сообщалось о наличии активной каспазы-3 после судорог.

Выявлена также положительная корреляция между экспрессией каспазы-3 в коре и продолжительностью заболевания, тогда как в белом веществе наблюдалась отрицательная корреляция. Кроме того, уровень экспрессии каспазы-3 был идентифицирован как маркер тяжести заболевания у людей с эпилепсией (Sitovskaya D. et al., 2023).

Повышенная экспрессия каспазы-3, связанная со временем начала, продолжительностью и средним количеством эпилептических припадков в неделю, а также количеством предыдущих противоэпилептических препаратов отмечена у пациентов с мезиальной височной эпилепсией, возникшей после черепно-мозговой травмы. При этом лекарственная резистентность развивается в одном из трёх случаев (Vega-García A. et al., 2021). На модели эпилептического статуса у 15 самцов крыс линии Sprague-Dawley, вызванного внутрибрюшинным введением хлорида лития, в эпилептических очагах также было выявлено повышение экспрессии каспазы-3 по



сравнению с контролем. Уровень экспрессии FAS и каспазы-3 в тканях гиппокампа крыс отрицательно коррелировал с содержанием митохондриальной ДНК, то есть митохондриальная дисфункция была тесно связана с активацией этого сигнального пути (Feng J. et al., 2018). Уровни воспалительных и апоптотических, включая каспазу-3, маркеров выше у пациентов с генерализованными судорогами, чем с парциальными (Kegler A. et al., 2021). В более чем 30% случаев височной эпилепсии у людей не наблюдается повреждения нейронов гиппокампа или прорастания мшистых волокон, несмотря на хронические припадки. Такую же картину можно наблюдать у некоторых широко используемых линий мышей, в частности C57BL/6 и BALB/c, после введения каиновой кислоты. Возможно, в основе защитного механизма лежит аутофагия (Rami A., Benz A., 2018).

Таким образом, каспазы объединяют оба пути апоптоза, которые имеют место при эпилепсии, но их роль в нервной системе не сводится только к нему. Также следует учитывать существование других, независимых от каспаз путей апоптоза.

#### 1.4.4 Астроцитарный глиоз. Глиальный фибриллярный кислый белок

Термин «глиальные клетки» охватывает несколько типов клеток, которые состоят из многих подтипов. Макроглия включает в себя клетки-предшественницы, астроциты и олигодендроглиocyты, а микроглия – резидентные макрофаги нервной системы. Глия составляет примерно половину клеток ЦНС.

Астроциты – звёздчатые клетки с тысячами отростков, которые взаимодействуют со всеми типами клеток ЦНС, участвуют в регуляции развития нервной системы и её функционирования. Астроциты регулируют образование, выведение и функции синапсов, имеют конечные ножки, которые покрывают сосудистую сеть ЦНС, способствуя метаболической поддержке и гомеостатической функции (Jessen R.K. et al., 2004).

Астроциты составляют значительную часть клеток эпилептических очагов при височной эпилепсии и не являются однородной популяцией. На основе морфологических особенностей были выделены три типа астроцитов: радиальные, фиброзные и протоплазматические. При склерозе гиппокампа астроциты, помимо необычно высокой численности (плотность глии возрастает примерно на 80%)

демонстрируют необычные свойства (de Lanerolle N.C. et al., 2010). Результаты исследований, полученные как на животных моделях, так и на ткани мозга пациентов с эпилепсией, указывают на то, что дисфункция астроцитов может участвовать в распространении припадков (Dossi E. et al., 2018).

Процесс активации астроцитов приводит к «реактивному глиозу», реакции со специфическими структурными и функциональными характеристиками. Она связана с изменениями в экспрессии многих генов и характерными морфологическими признаками, имеет важные функциональные последствия при эпилепсии и других нейродегенеративных заболеваниях (Pekny M. et al., 2014). Общий результат этих функциональных реакций в итоге полезен для нервной ткани, поскольку экспериментальное удаление реактивных астроцитов увеличивает степень повреждения и гибели нейронов (Robel S. et al., 2011). Однако реактивный глиоз может и усиливать повреждение ЦНС при хронических нейродегенеративных состояниях.

После повреждения астроциты мигрируют к его очагу и размножаются, что приводит к образованию глиального рубца. В процессе они приобретают фибробластоподобную амёбоидную морфологию и увеличивают экспрессию различных белков, таких как глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), виментин, нестин и фермент – индуцируемая синтаза оксида азота (iNOS). Эти важные отличительные признаки предполагают, что существует временная последовательность в прогрессии от наивных к реактивным, а затем от реактивных к рубцобразующим астроцитам (Lagos-Cabré R. et al., 2020).

Реактивный глиоз может быть локальным или диффузным, умеренным или тяжёлым (Sofroniew M.V., 2014).

GFAP принят в качестве маркера астроцитов в ЦНС, его повышенная экспрессия была признана индикатором глиоза, связанного с повреждением мозга или его заболеваниями.

На сегодняшний день известно уже 12 различных изоформ GFAP у человека и 7 у мышевидных грызунов:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta/\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\zeta$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\Delta 135$ ,  $\Delta 164$ ,  $\Delta \text{exon}6$ ,  $\Delta \text{exon}7$  (Gogishvili D. et al., 2025; van Bodegraven E.J. et al., 2021; Leipp F. et al., 2024).

Одной из причин височной эпилепсии может выступать фокальная кортикальная дисплазия. Исследования демонстрируют увеличение экспрессии белков цитоскелета (GFAP, виментин), защитного белка S100 и проапоптотических белков каспазы-3 в

мозговой ткани зоны эпилептического фокуса таких пациентов. Изучение биоптатов височной доли 60 таких пациентов, 30 взрослых пациентов и 30 детей, показало значительное увеличение экспрессии GFAP в коре и белом веществе независимо от пола и возраста. В белом веществе была обнаружена статистически значимая отрицательная корреляция между экспрессией GFAP и длительностью заболевания, а также положительная корреляция между GFAP и виментином, S100 и каспазой-3. В коре аналогичных корреляций не обнаружено (Sitovskaya D. et al., 2023).

Подобное повышение экспрессии GFAP наблюдалось у мышей при судорогах, вызванных пентилентетразолом (Díaz F. et al., 2023). Повышенная экспрессия GFAP отмечалась в модели височной эпилепсии у крыс, вызванной пилокарпином, как в случае наличия фебрильных судорог, так и без них (Alese O.O., Mabandla M.V., 2019).

GFAP ценен не только как диагностический маркер, но и как терапевтическая мишень. Изучение тканей височной коры от 18 пациентов с лекарственно-устойчивой височной эпилепсией, модельных крыс линии BALB/c Wistar, которым вводили пилокарпин и культуры клеток нейронов крысиного гиппокампа продемонстрировали, что нацеленная на GFAP в нейронах гиппокампа микро-РНК miR-15a ингибирует апоптоз клеток и снижает воспаление. Также отмечено, что уровни экспрессии miR-15a были снижены при эпилепсии (Fan Y. et al., 2020).

Таким образом, глия играет значительную роль в функции здорового мозга, а также вовлечена в различные патологические процессы, играя в них не меньшую роль, чем сами нейроны. К патологическим процессам при эпилепсии, в том числе фармакорезистентной, относятся активация глии и глиоз, ярко проявляющиеся в гиппокампе.

#### 1.4.5 Мембранный рецептор FAS

FAS/APO-1 (CD95, TNFRSF6) – это гликозилированный трансмембранный рецептор типа I массой 45 кДа. FAS может экспрессироваться в различных как лимфоидных, так и нелимфоидных клетках, включая Т, В и NK-клетки, моноциты/макрофаги, миелоидные клетки и фибробласты (Tummers B. et al., 2020). Хотя многие типы клеток могут экспрессировать FAS, не все из них восприимчивы к апоптозу по этому пути. С рецептором FAS связывается FAS-лиганд (FASL).

FASL – это гликозилированный трансмембранный белок типа I массой 40 кДа. Он был клонирован из клеток гибридомы CD8<sup>+</sup> Т-клеток (PC60-dl05) после повторного обогащения для вариантов, экспрессирующих высокие уровни FASL. FASL по своему строению входит в суперсемейство TNF.

Экспрессия FASL гораздо более ограничена, чем экспрессия FAS.

Человеческий FASL может экспрессироваться на Т-клетках, NK-клетках и макрофагах.

В упрощённом виде FAS-опосредованный путь апоптоза представлен на рисунке 3, где FAS-специфические регуляторы индукции апоптоза обозначены чёрными прямоугольниками. Регулятор индукции апоптоза FLIP общий для различных рецепторов смерти, обозначен серым прямоугольником. Регуляторы механизма апоптоза показаны белыми рамками.

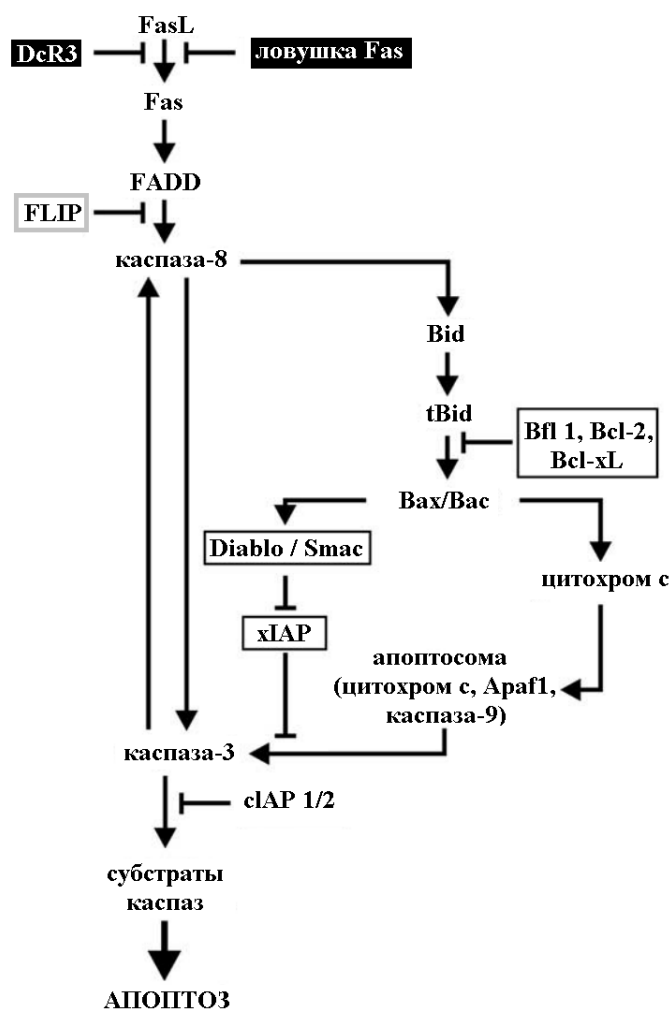


Рисунок 3 – Классический и неклассический FAS-индуцированные пути, ведущие к апоптозу.

Вместе эти молекулы контролируют многочисленные аспекты иммунного ответа. Важность взаимодействий FAS/FASL подчеркивается глубокими изменениями, наблюдаемыми у пациентов и в животных моделях, в которых эти молекулы генетически изменены.

Понимание сигналов, контролирующих экспрессию FASL, и сигналов, генерируемых лигированием FAS, может определить потенциальные подходы для терапевтического воздействия на процессы заболеваний, зависящие от FAS/FASL (Eischen C.M., Leibson P.J., 1997).

Хотя апоптотические особенности системы FASL/FAS и задействованные сигнальные каскады сравнительно хорошо изучены, через этот рецептор реализуются и неапоптотические сигнальные пути (Wajant H., 2003).

Система FAS/FASL играет центральную роль в физиологической регуляции апоптоза и вовлечена в патогенез ряда новообразований и заболеваний, таких как остеоартрит, диабет, заболевания глаз, ишемические процессы, анемия и нейродегенеративные заболевания (Lagunas-Rangel F.A., 2023).

Но даже в нервной системе роль FAS не сводится к одному апоптозу. FAS также стимулирует рост аксонов мотонейронов (Benlefkı S. et al., 2023).

На животных моделях судорожной активности продемонстрировано, что нейровоспаление и нейродегенерация являются преобладающими характеристиками эпилепсии. Оба этих процесса вовлечены в формирование склероза гиппокампа – основной аномалии, которую можно обнаружить у пациентов с височной эпилепсией. Он характеризуется астроглиозом: нерегулярной пролиферацией астроцитов в сочетании с апоптозом нейронов. Несмотря на множество исследований на животных, участие системы FAS в целом остаётся слабо изученным.

Исследования показали повышение регуляции как FAS (в 1,65 раза), так и FASL (в 5,46 раза) в материалах от 14 пациентов с фармакорезистентной височной эпилепсией, по поводу чего было проведено хирургическое вмешательство.

Гистологический анализ биоптатов мозга подтвердил у всех наличие астроглиоза. В другом исследовании также показана повышенная экспрессия FAS при эпилепсии. В ткани склерозированного гиппокампа пациентов с височной эпилепсией на биопсийном

и секционном материале, с помощью специфической матрицы апоптоза, опосредованного рецепторами смерти, был выявлен 31 ген с повышенной регуляцией. В данном случае экспрессия рецептора и лиганда FAS была повышена, а FADD оставалась в пределах нормы.

В моделях животных эпилептические припадки вызывали значительное увеличение экспрессии FAS в ипсилатеральном гиппокампе, и его уровни возвращались в норму в интервале от 4 до 24 часов. У крыс с судорогами, вызванными каиновой кислотой, в интервале от 4 часов до 5 суток наблюдалась повышенная экспрессия как мРНК FAS, так и самого белка, показан повышенный синтез p53 в нейронах (Ananias Teocchi M.A., D'Souza-Li L., 2016).

При изучении склеротизированных образцов гиппокампа от 24 пациентов с лекарственно-устойчивой мезиальной височной эпилепсией была выявлена высокая экспрессия генов, связанных с апоптозом, включая bcl-2, p53, bax, fas и каспазу-3. Корреляционный анализ показал, что экспрессия FAS, p53 и каспазы-3 положительно коррелировала с частотой и тяжестью приступов, а соответственно и с потерей нейронов (Xu S. et al., 2007).

Исследование сыворотки крови 30 детей и подростков (средний возраст  $8,03 \pm 4,49$  года) с идиопатической эпилепсией и 15 лиц из контрольной группы показало значительное повышение уровня растворимого FAS (s.FAS), выявленное с помощью иммуноферментного анализа.

Уровни sFAS положительно коррелировали с тяжестью припадков и отрицательно с продолжительностью с момента последнего приступа, но при этом были сопоставимы у пациентов с различными типами приступов, хотя в случае неконтролируемых были самыми высокими (El-Hodhod M.A. et al., 2006).

Оценка нейронального и глиального апоптоза и его связи с нейровоспалением в эпилептических очагах и крови пациентов с фокальной лекарственно-резистентной эпилепсией выявила повышенные уровни провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , FAS, NF- $\kappa$ B). Достоверное повышение экспрессии FAS в перифокальной зоне эпилептического очага было отмечено в коре, а тенденция к повышению – в белом веществе. Это, в сочетании с данными гистологии, указывает на активацию внешнего пути апоптоза (Sokolova T.V. et al., 2022).

#### 1.4.6 FAS-ассоциированный белок с доменом смерти FADD – посредник между FAS и апоптозом

FAS-ассоциированный белок с доменом смерти (FADD), также известный как MORT-1, является эволюционно консервативным цитоплазматическим адаптерным белком, ключевым адаптерным белком, передающим апоптотические сигналы, опосредованные основными рецепторами смерти (DR). FADD взаимодействует с несколькими белками суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), активируя каспазу-8 и впоследствии вызывая гибель клеток (Park Y.-H. et al., 2022).

Кроме того, FADD участвует в пролиферации, воспалении, управлении клеточным циклом, врожденном иммунитете, аутофагии и канцерогенезе, он нужен для эмбрионального развития. FADD может инициировать и другие типы гибели клеток, например, некроз. Многие из этих функций зависят не от рецепторов смерти, а от фосфорилирования данного белка и его локализации (Liu Y. et al., 2022).

В результате этих взаимодействий формируется комплекс сигнализации, индуцирующий смерть (DISC), в который входят FAS, FADD и прокаспаза-8 с соотношением 3:3:3. DISC образуется через несколько секунд после стимуляции FAS.

FADD участвует в воспалении, положительно или отрицательно регулируя сигнальный путь NF-κB. Способность FADD активировать либо подавлять активацию NF-κB зависит от стимулированного рецептора выше по биохимическим путям и, вероятно, от типа клеток (Tourneur L., Chiocchia G., 2010).

Сигнальный путь FAS/FASL/FADD задействован в апоптозе нейронов глии, в том числе при нейродегенерации, что показано в моделях воздействия мышьяка на нервную систему *in vivo* с шестинедельными самцами крыс линии Sprague-Dawley и *in vitro* (Sun H. et al., 2022).

В доступной литературе имеется мало сведений о роли FADD в эпилептогенезе. Так, в образцах мозга пациентов с височной эпилепсией отмечено повышенное связывание FADD с DAP (Death Associated Proteins)-киназой, зависимой от кальция/кальмодулина, чего не наблюдалось в контрольных образцах. Это содержащая

домен смерти серин/треониновая киназа, которая участвует в контроле апоптоза, в том числе вызванного эпилептическими припадками (Henshall D.C. et al., 2004).

Состояния, связанные с FADD и дефектами его гена, нарушают апоптоз, опосредованный FAS, и могут вызывать клиническую картину с судорожными припадками, что косвенно свидетельствует о его роли в патогенезе эпилепсии (Giovannini G. et al., 2024).

#### 1.4.7 Фактор некроза опухолей альфа

TNF- $\alpha$  (Фактор некроза опухолей альфа) – это провоспалительный цитокин, вырабатываемый макрофагами и моноцитами во время острого воспаления, который отвечает за множество событий внутри клетки, исход которых – некроз или апоптоз. По структуре он представляет собой тример в форме «груши» или «конуса». В таком виде TNF- $\alpha$  связывается либо с рецептором клеточной мембраны массой 55 кДа, называемым TNFR-1, который содержит домен смерти (DD-), либо с рецептором клеточной мембраны массой 75 кДа, называемым TNFR-2, который взаимодействует с TRAF.

TNFR-1 и TNFR-2 относятся к так называемому суперсемейству рецепторов TNF. TNF- $\alpha$  действует, активируя ряд вторичных белков, которые вызывают различные реакции внутри клетки, такие как активация транскрипции генов, выработка активных форм кислорода или азота. Каспазы привлекаются к активированному рецептору адаптерными белками, такими как TRADD и FADD (Idriss H.T. et al., 2000).

В организме TNF- $\alpha$  присутствует в двух формах: активной растворимой и в виде трансмембранного предшественника. После обработки ферментом, превращающим TNF- $\alpha$  (TACE), растворимая форма TNF- $\alpha$  отщепляется и связывается со своими рецепторами, а его цитоплазматический домен отправляется в ядро (Horiuchi T. et al., 2010). TNF- $\alpha$  играет двойную и противоположную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. В то время как TNFR1 преимущественно связан с воспалением и нейродегенерацией, TNFR2 участвует в регенерации тканей и нейропротекции. Наряду с другими провоспалительными молекулами он высвобождается активированной микроглией и астроцитами, способствуя повреждению тканей.



Экспрессия TNF- $\alpha$  возрастает при различных заболеваниях, в том числе болезнях ЦНС. Многочисленные исследования показывают, что у пациентов с расстройствами настроения, эпилепсией, большим депрессивным и биполярным расстройством повышен уровень растворимого плазменного фактора некроза опухоли- $\alpha$  (Druzhkova T.A. et al., 2022).

На рисунке 4 представлено взаимодействие TNF- $\alpha$  с двумя описанными выше рецепторами.

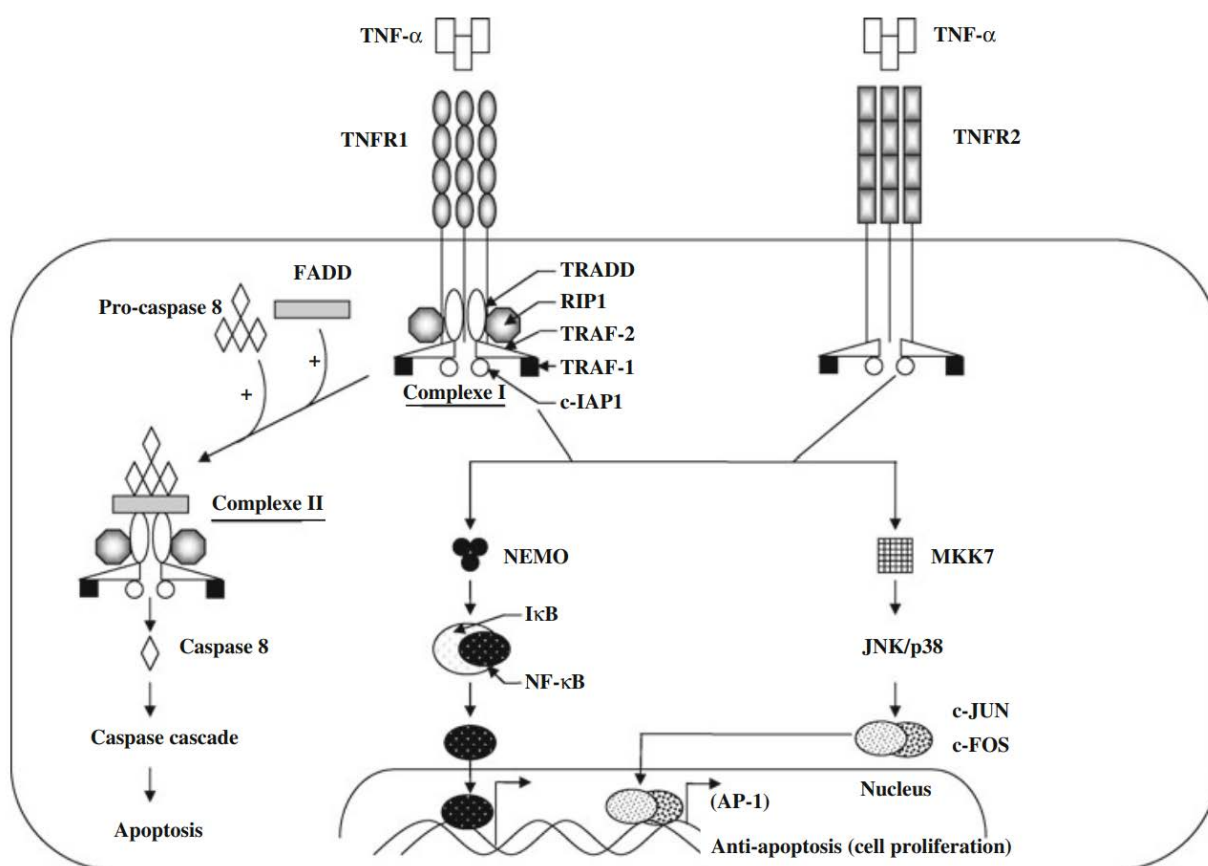


Рисунок 4 – Взаимодействие TNF- $\alpha$  с двумя рецепторами. По (Zidi I. et al., 2010).

Роль TNF- $\alpha$  при эпилепсии до конца не раскрыта. Этот цитокин может влиять на нейроны напрямую или опосредованно через экспрессию рецепторов нейротрансмиттеров на глиальных клетках, а также вызывает изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Но даже в случае экспрессии глией он вызывает разный эффект: воспалительный и дегенеративный эффект при секреции астроцитами, и направленный на восстановление тканей и ремиелинизацию при секреции микроглией.

Анализ материала гиппокампа пациентов с лекарственно-устойчивой височной эпилепсией показал, что общие уровни белка проксимального сигнального адаптера TNFR1, белка, ассоциированного с доменом смерти (TRADD), расщепленной иницирующей каспазы-8 и киназы 1, регулирующей сигнал апоптоза (ASK1), выше, чем в контроле.

Методом иммунопреципитации обнаружено связывание TRADD-FADD, а флуоресцентная микроскопия выявила колокализацию TRADD с FADD в гиппокампе. Эти данные свидетельствуют о том, что сигнализация TNFR1 задействована в патогенезе эпилепсии и, возможно, в формировании лекарственной резистентности (Yamamoto A. et al., 2006).

При измерении сывороточного уровня цитокинов у детей в возрасте от 4 до 17 лет, в числе которых у 28 была тяжёлая эпилепсия с приёмом трёх и более противосудорожных препаратов, у 29 – лёгкая с приёмом одного препарата и 27 здоровых, уровни TNF- $\alpha$  были выше при тяжёлой форме по сравнению с лёгкой и выше у детей с эпилепсией, чем в контроле. Для подтверждения использовались данные MPT и истории болезни (Kamaşak T. et al., 2020).

При анализе уровней цитокинов степени повреждения нейронов гиппокампа при медиальной височной эпилепсии у 71 пациента больницы Медицинского университета Сюйчжоу со склерозом гиппокампа и без него, а также 20 лиц без эпилепсии из контрольной группы TNF- $\alpha$  в периферической крови определялся с помощью иммунофлуоресцентного анализа потока мультимикросфер.

При склерозе гиппокампа он был максимальным, без него – ниже, и ещё ниже у контрольной группы. Таким образом, высокая экспрессия TNF- $\alpha$  может иметь важное значение при оценке пациентов со склерозом гиппокампа (Wang B. et al., 2024).

TNF- $\alpha$ , наряду с другими, может быть использован в качестве прогностического маркера тяжести течения височной эпилепсии и риска развития лекарственной резистентности, который в её случае может достигать 30-50%.

Здесь имеет значение не только повышение, но и снижение уровня TNF- $\alpha$ , которое может быть связано с длительным хроническим нейровоспалением, а также

патофизиологическими механизмами с преимущественным участием Т-звена иммунитета (Panina Y.S. et al., 2023).

#### 1.4.8 Белок-адаптер TRADD

TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein) участвует в различных рецепторных сигнальных путях и играет важную роль в жизнедеятельности клетки, в том числе в реализации клеточной смерти. TRADD имеет в своём составе два различных функциональных домена, NTD для связывания TRAF на N-конце и CTD, домен смерти (DD) на C-конце. Человеческий TRADD – это белок массой 34 кДа с двумя функциональными доменами, соединёнными неструктурированным пептидом из ~37 аминокислотных остатков.

В клетках мышей с нокаутом гена *tradd* и отсутствием TRADD соответственно, не работают нормально как апоптоз, опосредованный TNF- $\alpha$ , так и активация NF- $\kappa$ B, JNK и ERK, стимулированная TNF- $\alpha$ . С другой стороны, сверхэкспрессия TRADD в клетках линии 293T активирует апоптотические и антиапоптотические сигнальные пути (Chen N-J. et al., 2008). TRADD может перемещаться между ядром и цитоплазмой, активируя апоптоз двумя различными способами (Morgan M. et al., 2002).

Для многих патологий ЦНС, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона, депрессию и эпилепсию, характерны дегенеративные процессы в гиппокампе, сопровождающиеся активацией апоптотических каскадов с повышением экспрессии TRADD (Liu W. et al., 2021). Однако в модели фокальных лимбических припадков у крыс, вызванных микроинъекцией каиновой кислоты в миндалевидное тело, экспрессия TRADD после приступов оставалась неизменной (Henshall D.C. et al., 2001).

В качестве адаптера TRADD-CTD ассоциируется с внутриклеточным доменом рецептора смерти через взаимодействия DD-DD. Он выступает посредником в различных передачах сигналов DR, ведущих, как к выживанию клеток, так и апоптозу. В качестве адаптера TRADD-CTD ассоциируется с внутриклеточным доменом рецептора смерти через взаимодействия DD-DD. В передаче сигналов TNFR1 и DR3 связывание TRADD-NTD с доменом TRAF TRAF2 приводит к привлечению TRAF2 и связанных с ним молекул, включая cIAP, к рецептору для убиквитинирования RIP1 и активации NF- $\kappa$ B. Деубиквитинированный RIP1 может взаимодействовать с TRADD и FADD, запуская

каспазозависимый апоптоз. TRADD также участвует в передаче сигналов Toll-подобных рецепторов (TLR), образуя комплекс с TRIF и RIP1 для активации NF- $\kappa$ B (рисунок 5).

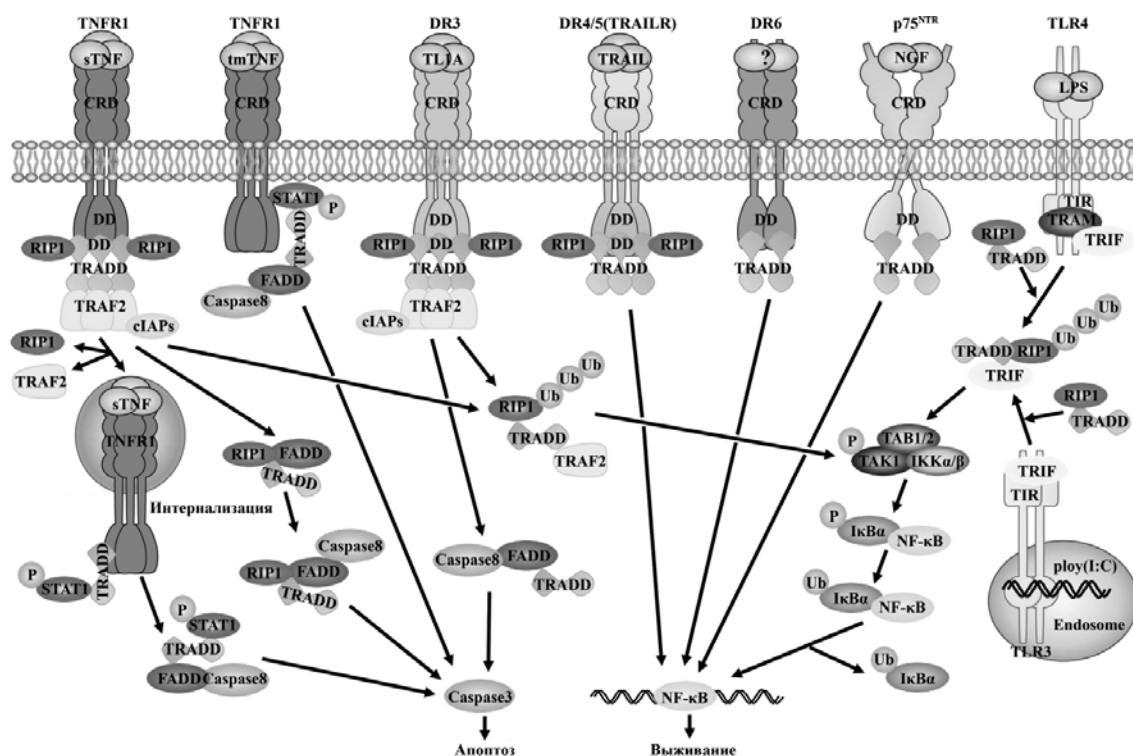


Рисунок 5 – Пути, в которых задействован белок-адаптер TRADD. По (Li Z. et al., 2020).

#### 1.4.9 Ядерный фактор-каппа В

Ядерный фактор-каппа В (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B) – это семейство из пяти факторов транскрипции: NF- $\kappa$ B1 (p105/p50), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB и c-Rel. Теоретически, существует 15 возможных комбинаций димеров, пока найдено только 13. Они участвуют в различных клеточных процессах, но наиболее широко известна их роль в развитии воспаления. Активация NF- $\kappa$ B, которая может идти по двум путям – классическому и неклассическому, и способствует транскрипции множества провоспалительных генов, в нервной системе ещё и связанных с активацией глии, окислительным стрессом, пролиферацией и апоптозом.

Неактивные формы NF- $\kappa$ B находятся в цитоплазме, связанные с ингибиторами семейства I $\kappa$ B, которых в настоящее время описано семь (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , Bcl-3,

p100 и p105). Когда они деградируют, происходит активация NF- $\kappa$ B. Канонический путь активации связан с развитием и функционированием нервной системы. Неканоничный путь активации важен уже для иммунной системы (Medeiros M. et al., 2021).

Активация по каноническому пути индуцируется связыванием провоспалительных цитокинов (например, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) с соответствующими рецепторами на поверхности клетки. Это запускает активацию TAK1 (трансформирующий фактор роста  $\beta$ -активируемая киназа 1), которая активирует комплекс IKK, состоящий из регуляторного NEMO и каталитических субъединиц IKK $\alpha$  и IKK $\beta$ . Активированный комплекс IKK фосфорилирует белок I $\kappa$ B, запуская убиквитинирование I $\kappa$ B и протеасомную деградацию. Классические димеры NF- $\kappa$ B высвобождаются и перемещаются в ядро для регуляции экспрессии генов. Неканоничный путь активируется через рецепторы суперсемейства TNFR, что приводит к стабилизации и накоплению NIK-киназы, которая фосфорилирует IKK $\alpha$ , который фосфорилирует белок p100, что приводит к частичной деградации и превращению в активную субъединицу p52. Субъединица p52 образует гетеродимер с RelB, который транслируется в ядро и активирует транскрипцию генов. Оба пути активации отражены на рисунке 6.

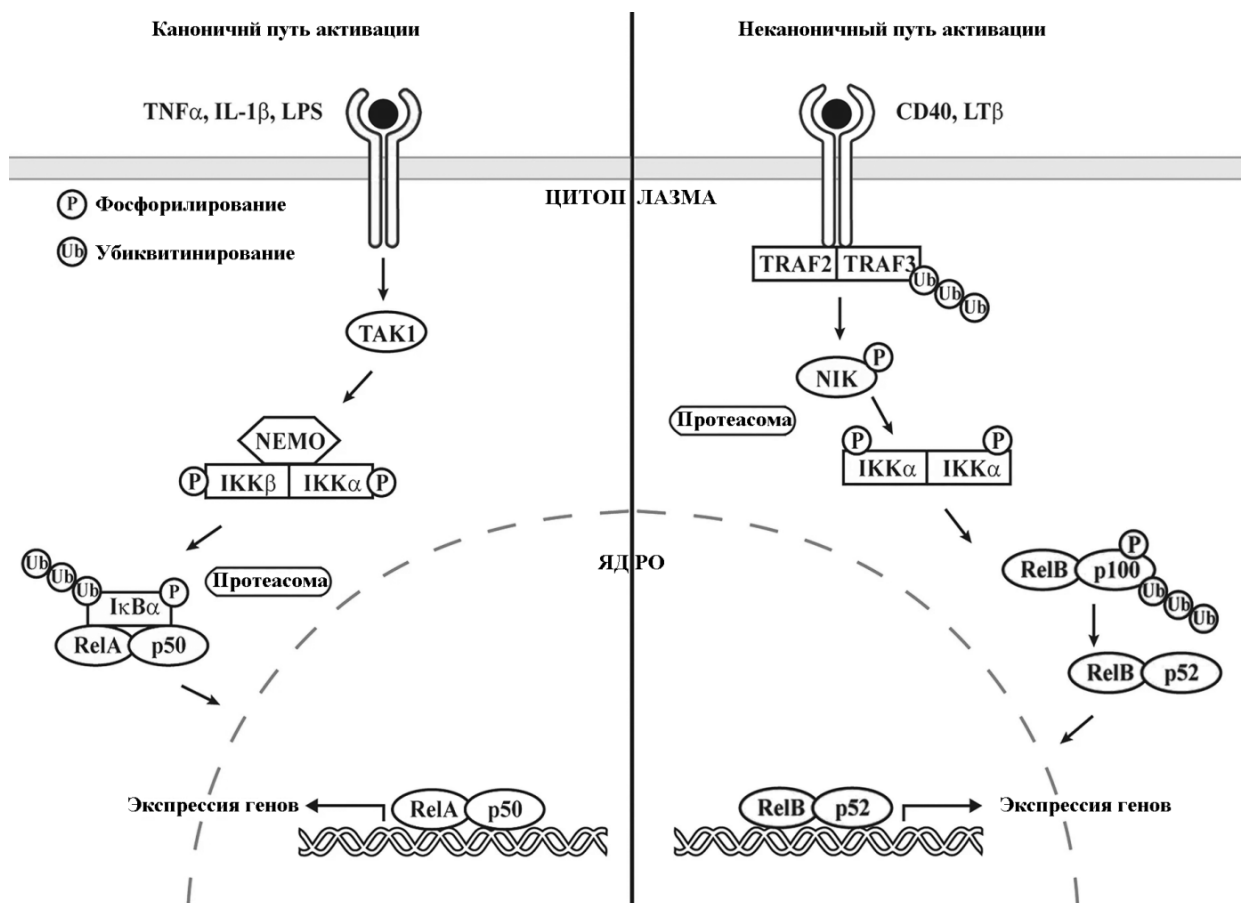


Рисунок 6 – Пути активации NF-κB. По (Dixit V., Mak T.W., 2002).

NF-κB экспрессируется и в норме, играя важную роль в синаптической пластичности, регуляции поведения, обучения и памяти. В физиологических условиях активация NF-κB может поддерживать ГЭБ (Wang C. et al., 2022).

Роль NF-κB в патогенезе неврологических заболеваний была предложена ещё в 1993 году так как роль сигнальных молекул в его сборке могут выполнять активные формы кислорода в низких концентрациях. Было высказано предположение, что NF-κB играет роль окислительно-восстановительно-контролируемого транскрипционного активатора не только в лимфоцитах, но и в клетках нервной системы (Kaltschmidt B. et al., 1993).

В различных условиях, в зависимости от типа клеток и/или комбинации субъединиц NF-κB, он может активировать как апоптотические, так и антиапоптотические пути.

Проапоптотическая роль NF-κB заключается в активации транскрипции генов p53, c-myc, cyclin d1, bcl-xs, bax, fas и nos.

Антиапоптотическая роль реализуется через активацию TNF-α, который связывается с рецептором TNFR, вызывая в нём конформационные изменения и вызывая высвобождение сайленсера доменов смерти (SODD). Здесь NF-κB также регулирует экспрессию генов супероксиддисмутазы и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, включая собственно Bcl-2 и Bcl-XL. Таким образом, в норме NF-κB действует как антиапоптотический фактор, но в патологических условиях его роль меняется на противоположную. Активация NF-κB связана со сверхэкспрессией генов, которые участвуют в патогенезе различных состояний, таких как ишемия и травмы головного мозга, окислительный стресс, нейродегенеративные (болезнь Хантингтона, Альцгеймера и Паркинсона) и нейровоспалительные заболевания (Singh S., Singh T.G., 2020, Sun E. et al., 2022; Sharma V.K. et al., 2021). Различные исследования демонстрировали повышенный уровень NF-κB и экспрессии его целевых генов при эпилепсии, что отражено на рисунке 7, где представлены: Bcl-2, CCL2 – фактор хемотаксиса моноцитов, COX-2 – циклооксигеназа 2, CX3CL1 – фракталкин, ГЛУ – глутамат, ГАМК – γ-аминомасляная кислота, IL – интерлейкины, IFN – интерфероны,

MnSOD – марганцевая супероксиддисмутаза, MRP – белок множественной лекарственной устойчивости и MDR – его рецептор, NF-κB, NOS – синтаза оксида азота, eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота, iNOS – индуцируемая синтаза оксида азота, nNOS – нейрональная синтаза оксида азота, PG – простагландин, P-gp – P-гликопротеин, TNF – TNFα.

Анализ тканей мозга пациентов с эпилепсией и лабораторных животных и животных моделей показал, что NF-κB выполняет множество функций, связанных с выживанием нейронов и повреждением (Abbadie C. et al., 1993). Пути, активируемые NF-κB, в основном включают синтез провоспалительных цитокинов IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, интерферонов, таких как IFN-γ, фактора некроза опухолей TNF-α, колониестимулирующих факторов и некоторых ферментов, которые могут вызывать гибель нейронов и воспаление. Провоспалительные цитокины могут усиливать нейрональную возбудимость и формировать токсичную микросреду, которая способствует прогрессированию эпилепсии и повысить восприимчивость к ней. Но провоспалительные факторы могут также повышать выживание нейронов (Cai M., Lin W., 2022).

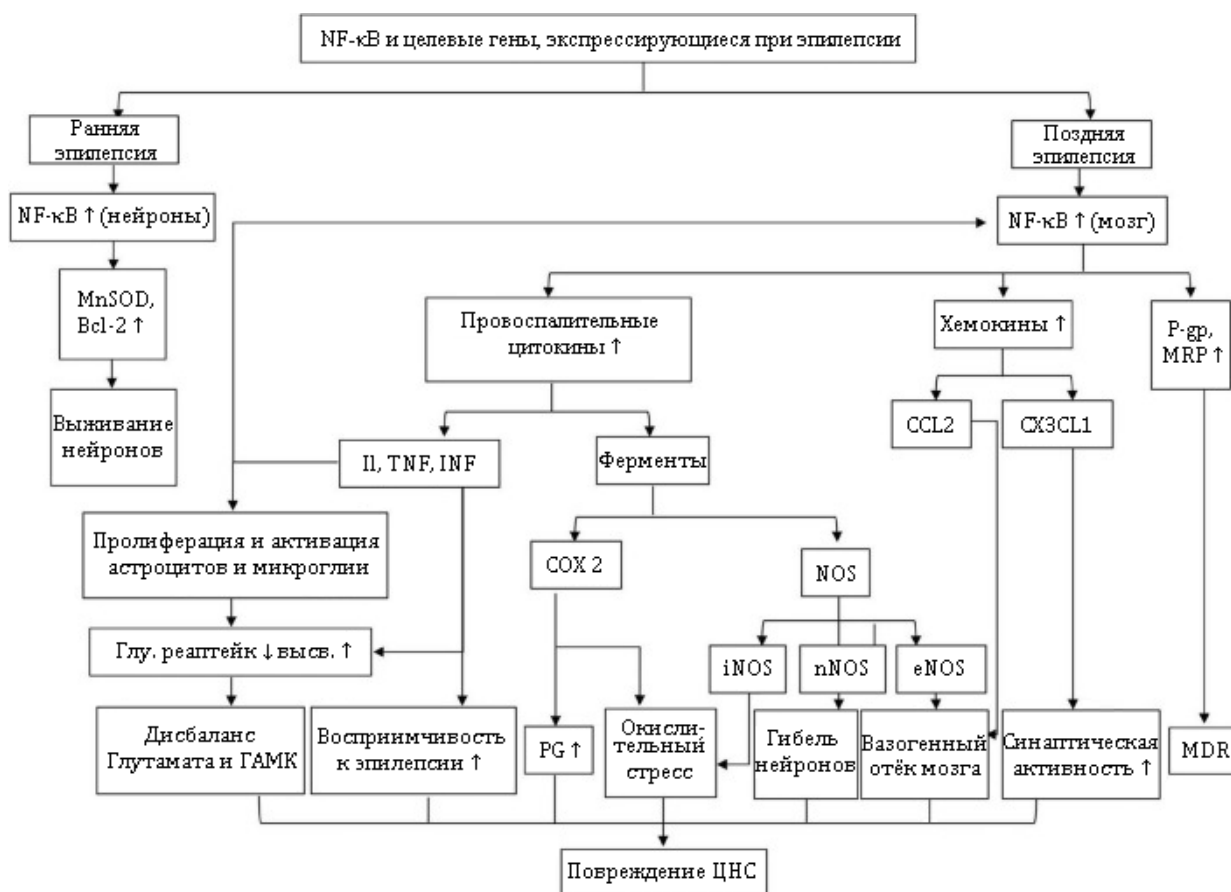


Рисунок 7 – NF-κB при эпилепсии. Перевод (Cai M., Lin W., 2022).

### **1.5 Перепрофилирование лекарственных препаратов**

Из-за длительного цикла разработки новых противоэпилептических средств, высокой стоимости и низкого шанса довести цикл до конца, альтернативой может стать выявление противоэпилептических эффектов у препаратов, которые давно применяются для лечения других заболеваний и их перепрофилирование противоэпилептические (Khachigian I.M., 2020; Kumbhar P. et al., 2022).

Поиск таких препаратов среди уже имеющихся стал важным направлением исследований в области эпилепсии, и в этом достигнут большой прогресс. Помимо основного противоэпилептического действия, многие из них выполняют функцию нейропротекторов (Du C. et al., 2016).

Также этот подход объединяет в себе эпилепсию и нейровоспаление. Различные препараты, обладающие противовоспалительными свойствами, как было показано, оказывают благоприятный эффект в моделях эпилепсии. Они должны быть нацелены не только на само нейровоспаление, вызванное реактивными астроцитами и микроглией, но и на взаимодействие этих клеток с инфильтрировавшимися в мозг периферическими иммунными клетками. Несколько соединений, в том числе антибиотики тетрациклинового ряда, нацеленных на различные воспалительные сигнальные пути, продемонстрировали свою эффективность при эпилепсии (Sanz P. et al., 2024).

### **1.6 Тетрациклины в неврологии**

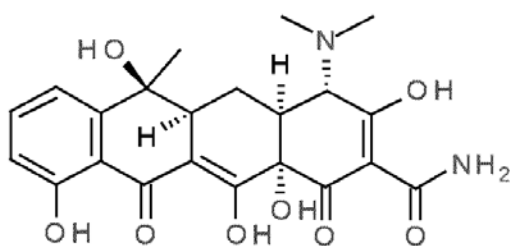
Тетрациклины — группа антибиотиков широкого спектра действия, которые имеют общую химическую структуру, основанную на четырёх линейно слитых углеводородных кольцах (рисунок 8).

Как и большинство других препаратов, используемых в клинической практике, тетрациклины проявляют различные нецелевые эффекты, которые могут объяснять нежелательные побочные эффекты и не только их (Jesus K. et al., 2022). Собственно

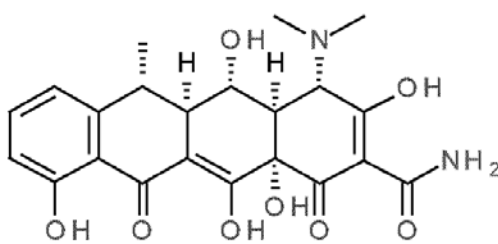


тетрациклин, а также миноциклин и доксициклин продемонстрировали противосудорожные эффекты у лабораторных животных в различных моделях эпилепсии в терапевтических дозах. В высоких дозах они оказывали токсическое действие, от двигательных нарушений до дыхательной недостаточности и гибели.

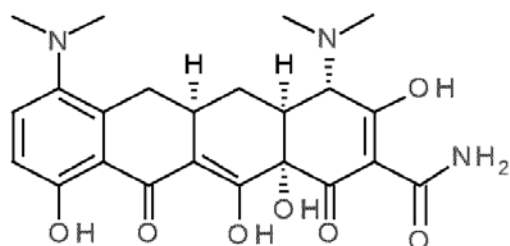
Миноциклин и доксициклин – тетрациклины второго поколения с похожей химической структурой и сопоставимым антибактериальным спектром, а также множеством неантибиотических свойств, в числе которых противогрибковые и противовирусные, противовоспалительные, антиоксидантные, антиапоптотические, нейропротекторные, иммуномодулирующие и ряд других (Singh S. et al., 2021).



Тетрациклин



Доксициклин



Миноциклин

Рисунок 8 – Химические формулы тетрациклинов: тетрациклина, доксициклина и миноциклина.

Доксициклин, структурный изомер тетрациклина, используется в медицине с 1966 года. Молекула, полученная полусинтетическим путём из окситетрациклина или

метациклина, является высоколипофильной, что обеспечивает отличное проникновение в ткани. В отличие от других тетрациклинов, доксициклин не накапливается при почечной недостаточности из-за компенсаторной желудочно-кишечной секреции. Системная токсичность отмечалась редко. Уже на раннем этапе использования доксициклином иногда лечили некоторые неинфекционные заболевания (Bonnetblanc J. M. 2002), и исследования продолжаются. Он находит применение в экспериментальной неврологии.

Способность доксициклина ингибировать металлопротеазы делает его потенциально пригодным для лечения эпилепсии. Матриксные металлопротеиназы (ММП) активируются в мозге при эпилептических припадках и могут стать терапевтической мишенью для лечения, например, височной эпилепсии. Но применение доксициклина при различных бактериальных инфекциях может обострять существующую эпилепсию или способствовать развитию эпилептических припадков (Kovács Z. et al., 2011).

Помимо этого у доксициклина имеется один недостаток, ставящий под сомнение его перспективы как противоэпилептического препарата. Этот недостаток выяснился при оценке периода выведения тетрациклина, доксициклина, метациклина, окситетрациклина, деметилхлортетрациклина и хлортетрациклина у здоровых лиц и пациентов, находящихся на длительной терапии противоэпилептическими препаратами. Оказалось, что период полувыведения доксициклина был значительно короче у пациентов, чем в контрольной группе. Периоды полувыведения других производных тетрациклина и их выведение с мочой существенно не различались. Соответственно, для поддержания адекватного уровня доксициклина в сыворотке следует повышать его дозу для достижения эффекта, что сопряжено с рисками. Классические производные тетрациклина могут назначаться в соответствии с общепринятыми принципами (Neuvonen P.J. et al., 1975).

Лучшим кандидатом на роль нового противоэпилептического препарата оказался миноциклин (минолексин), наиболее жирорастворимый из соединений класса тетрациклинов и менее токсичный, чем доксициклин. Миноциклин подавляет апоптоз посредством ослабления экспрессии TNF-альфа и снижения регуляции провоспалительных цитокинов через каспазозависимые и каспазозависимые пути, а также оказывает противовоспалительное действие, ингибируя активацию микроглии и

миграцию Т-лимфоцитов (Wang D.D. et al., 2012).

Миноциклин (4S,4aS,5aR,12aR)-4,7-бис(диметиламино)-1,10,11,12a-тетрагидрокси-3,12-диоксо-4a,5,5a,6-тетрагидро-4H-тетрацен-2-карбоксамид,  $C_{23}H_{27}N_3O_7$ ) – полусинтетический антибиотик второго поколения тетрациклинового ряда, разработанный в 1967 году с замещением диметиламиногруппы в седьмом положении (Jonas M. Cunha B.A., 1982). При лечении различных нейротропных инфекций различной этиологии были обнаружены нейропротективные, противовоспалительные и антиапоптотические свойства миноциклина.

Миноциклин проявляет широкий спектр противовоспалительного действия, ингибируя такие молекулы, как COX-2, iNOS, NADPH-оксидазу и P38 MAPK. Основной нейропротективный механизм миноциклин заключается в ингибировании p38 MAPK-зависимой нейротоксичности, вызванной активированной микроглией, и непосредственном предотвращении p38 MAPK-зависимую гибель нейронов. Воздействуя на синтазу оксида азота, он снижает выработку свободных радикалов, защищая мембраны клеток от перекисного окисления липидов. Миноциклин снижает пролиферацию и активацию клеток микроглии, которые вырабатывают провоспалительные цитокины, такие как TNF- $\alpha$ , IL-1 и IL-6, а также ингибирует транмиграцию Т-лимфоцитов и продукцию ММП-9 у мышей. За счёт ингибирования ММП он предотвращает разрушение базальной мембраны лейкоцитами, не давая им мигрировать из сосудов в паренхиму ЦНС.

В исследованиях некоторых авторов описаны антиапоптотические эффекты миноциклина. Острые и хронические нейродегенеративные заболевания часто сопровождаются или вызваны избыточным апоптозом нейронов и глии. Миноциклин снижает гибель нейронов путём апоптоза, наблюдаемую в различных экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний, таких как ишемия и болезнь Альцгеймера. Он воздействует как на каспазозависимые, так и каспазозависимые механизмы (ингибирование каспазы-1 и каспазы-3) клеточной смерти. Основным механизмом антиапоптотического действия миноциклина является прямая стабилизация мембран митохондрий и ингибирование высвобождения цитохрома c в цитозоль, что связано с активацией каспазы-3 и каспазы-9. В культуре клеток миноциклин активирует антиапоптотический фактор Bcl-2, который затем накапливается в митохондриях, чтобы противодействовать проапоптотическим членам

семейства Bcl-2 Bax, Bak и Bid. Известны и другие нейропротективные механизмы действия миноциклина, ни один из которых не связан с его антибактериальными свойствами. Препарат представляет собой хелатор  $\text{Ca}^{2+}$  и может связывать его избыток после различных повреждений и травм. Снижение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  предотвращает активацию кальпаинов, сохраняя аксоны целыми.

Кроме того, миноциклин может ингибировать активацию митоген-активируемого протеина (MAP) киназы p3841, влияя на множество процессов, которые в противном случае могут привести к гибели клеток (Kim H-S., Suh Y-H., 2009; Yong V. W. et al., 2004). Препарат ингибировал апоптоз в нейронах головного мозга человека, на что указывало ингибирование активации каспазы-3 и поли-АДФ-рибозополимеразы (Nagarakanti S., Bishburg E., 2016). Показав эффективность при ряде нейродегенеративных, психических заболеваний, а также как антидепрессант (Romero-Miguel R. et al., 2021), миноциклин может найти применение для лечения случаев эпилепсии, ранее не поддававшихся терапии существующими и перспективными противозепилептическими препаратами.

Тем не менее, миноциклин нельзя считать универсальным противозепилептическим препаратом. При его введении крысам с электрически индуцированным эпилептическим статусом не было отмечено влияния на развитие спонтанных судорог, хотя даже в этом случае его введение устраняло дефицит пространственной памяти и нормализовало двигательную активность.

Миноциклин ослаблял поведенческие долгосрочные последствия эпилептического статуса, уменьшая гиперактивность и гиперлокомоцию. В гиппокампе и грушевидной коре головного мозга наблюдалась типичная индуцированная эпилептическим статусом потеря нейронов. Использование миноциклина приводило лишь к селективному нейропротекторному эффекту (Russmann V. et al., 2016).

Таким образом, препараты тетрациклинового ряда, в частности исследуемый нами миноциклин, демонстрируют положительный эффект при эпилепсии у людей и в моделях на животных, но их мишени в биохимических каскадах нейровоспаления и апоптоза, а также механизм или механизмы действия остаются невыясненными как и природа лекарственной устойчивости эпилепсии.

Её преодоление – сложная и комплексная задача, которую мы старались решить в своих исследованиях.

### 1.7 Крысы линии Крушинского-Молодкиной

Слух играет важную роль в жизни грызунов (Rodentia), и именно высокая чувствительность к громким звукам лежит в основе аудиогенной эпилепсии, описанной у нескольких видов: крыс, мышей, хомячков, песчанок и морских свинок. Аудиогенные судороги с точки зрения поведенческих и нейрохимических аспектов аналогичны другим типам генерализованных припадков, однако механизмы данной формы эпилепсии остаются до сих пор неясными (Nuñez-Lumbreras M. de L.A. et al., 2024).

Аудиогенные припадки грызунов сходны с эпилептическими приступами у людей и являются хорошей моделью для поиска и изучения новых методов терапии эпилепсии и противоэпилептических препаратов. Исследования биохимических особенностей животных с генетически обусловленной аудиогенной эпилепсией демонстрируют многочисленные отклонения в нейротрансмиттерных системах, нарушения митохондриальных функций, нейровоспалительные процессы и повышенный уровень активности сигнального каскада MAPK (Garbuz D.G. et al., 2022, Сурина Н.М. и др., 2017).

Генетическая склонность к аудиогенной эпилепсии у крыс была выявлена ещё в 1906 году, когда в Вистаровском институте (США) выводили существующую до сих пор аутбредную линию крыс Вистар (Wistar). Среди них были животные, реагирующие на громкий звук эпилептиморфными припадками (Ross K.S., Coleman J.R., 2000). С тех пор на их основе в разных странах было создано несколько линий крыс с аудиогенной эпилепсией.

Именно на крысах линии Вистар, которые реагировали на звонок судорогами, в 1947-1948 годах Л.В. Крушинский, Л.Н. Молодкина и Д.А. Флесс на биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова в 1947 году они начали выведение собственной линии крыс, у которых развивались эпилептиформные приступы в ответ на действие сильного звука (Полетаева И.И., 2017). Дальнейший отбор привёл к тому, что свыше 99 % крыс этой линии стали отвечать на звуковой стимул характерным судорожным припадком (Горбачёва Е.Л. и др., 2019, Poletaeva I.I. et al., 2017).

Полученные в результате селекции животные, помимо аномальной реакции на звук, отличаются от крыс Вистар рядом других патологий и поведенческих нарушений, таких как высокая тревожность, сниженная подвижность, каталепсия, миоклонический гиперкинез, острые нарушения мозгового кровообращения, вплоть до кровоизлияний в мозг, склонность к параличам и парезам, а также социальный дефицит. Некоторые особенности их поведения напоминают расстройства аутистического спектра, но без признаков синдрома дефицита внимания и гиперактивности (Rebik A.A. et al., 2022, Витаев С.И., 2019).

У этих крыс наиболее подробно изучены не только поведение, физиологические и морфологические особенности головного мозга, но также генетические особенности (Fedotova I.B. et al., 2005). Изменения в экспрессии генов частично пересекаются с таковыми у больных эпилепсией людей и ещё более – с другими видами и линиями грызунов с фенотипами аудиогенной эпилепсии (Chuvakova L.N. et al., 2021).

Нейровоспаление играет важную роль в эпилептогенезе, и крысы линии Крушинского-Молодкиной не являются исключением. После приступов у крыс выявлен рост экспрессии провоспалительных цитокинов (Surina N.M. et al., 2023).

Также у них присутствуют нарушения апоптоза и пролиферации клеток. Гиппокамп и аномалии его развития играют важную роль в прогрессировании эпилепсии. Даже у не подвергавшихся воздействию громкого звука и не испытывавших судорог крыс Крушинского-Молодкиной в раннем постнатальном периоде для гиппокампа характерны меньшая клеточная популяция и увеличенное количество пролиферирующих клеток по сравнению с крысами Вистар.

Аберрантный нейрогенез у этих крыс может быть генетически детерминирован (Kulikov A.A. et al., 2020, Kulikov A.A. et al., 2021). Вместе с этим аудиогенные приступы вызывают нейродегенеративные процессы в гиппокампе. В гранулярном слое зубчатой извилины после судорог наблюдается гибель клеток, связанная с активацией проапоптотического белка p53 и митохондриального пути апоптоза (Kulikov A.A. et al., 2022).

Эпилепсия у крыс линии Крушинского-Молодкиной является фармакорезистентной, как и многие случаи человеческой фокальной височной эпилепсии.

Данная линия крыс была устойчива к лечению рядом противоэпилептических препаратов изначально и по мере селекции устойчивость нарастает. Это доказывают эксперименты с двумя классическими противоэпилептическими препаратами с разными механизмами действия – вальпроатом натрия и леветирацетамом. В промежутке времени между 1996 и 2007 годами оба купировали эпилептиморфные припадки у крыс, то уже в 2022 году вальпроат натрия не вызвал достоверных изменений показателей аудиогенного припадка у крыс линии 4 с максимальной выраженностью судорог.

Также не показало эффективности введение вальпроевой кислоты в дозе 100, 200 и даже 340 мг/кг обычным крысам линии Крушинского-Молодкиной. Добавление в схему лечения антиоксидантов мексидола или карнозина не изменило ситуацию.

Сходная динамика наблюдалась и в случае с леветирацетамом. Если ранее, в 2007 году, он увеличивал латентный период и предотвращал тоническую фазу припадка, то в 2022 доза в 40 мг/кг не оказала значимого эффекта на крыс линии 4 (Сурина Н.М. и др., 2023).

Также эпилепсия у данных крыс плохо поддавалась лечению противосудорожным препаратом этосуксемидом – производным янтарной кислоты. По механизму действия он является блокатором Т-типа кальциевых каналов. Его введение как взрослым, так и новорождённым крысам снизило проявление аудиогенных миоклонических судорог, но на показатели самих судорог влияло слабо. У взрослых крыс наблюдалось незначительное снижение предрасположенности к возникновению припадков в ответ на звуковую стимуляцию (Федотова И.Б. и др., 2019).

Таким образом, в динамике наблюдается снижение эффектов различных противоэпилептических препаратов и рост фармакорезистентности у данной линии крыс, что позволяет рассматривать их как модель фармакорезистентной эпилепсии.

Соответственно, крысы линии Крушинского-Молодкиной идеально подходят для экспериментального моделирования аудиогенной эпилепсии.

Многочисленные исследования доказали, что клинически работающие для людей противоэпилептические препараты эффективно снижают интенсивность приступов у грызунов, склонных к аудиогенной эпилепсией. Кроме того, эти грызуны подходят для тестирования новых противоэпилептических препаратов. (Garbuz D.G. et al., 2022).

## 1.8 Киндлинг

Киндлинг – это явление, при котором повторяющиеся субконвульсивные стимулы (химические или электрические) или судорожные стимулы (акустические) приводят к прогрессивному увеличению электрографического и поведенческого выражения приступа и распространению эпилептиформной активности по всему мозгу, распространенная модель для изучения эпилептогенеза (Harbachova E.L. et al., 2020). В классической модели киндлинга, вызванного прямой электрической стимуляцией миндалевидного тела, стимул низкой интенсивности порождает слабую, короткую, локализованную эпилептоморфную активность с минимальными поведенческими изменениями. После повторной стимуляции воздействие того же фактора индуцирует уже длительный, интенсивный припадок, распространяющийся на другие области мозга и прогрессирующие поведенческие изменения.

Первое описание аудиогенного киндлинга явления датируется 1960 годом, когда у крыс линии Крушинского-Молодкиной было зарегистрировано развитие миоклонических судорог с вовлечением переднего мозга после многократных аудиогенных судорог. Название оно получило в 1987 году по аналогии с классическим процессом киндлинга, вызванным внутримозговой электрической стимуляцией, когда было вновь описано у крыс линии Вистар в Страсбурге (Vinogradova L.V., 2017).

В лаборатории нейрохимии Национального центра научных исследований Франции были выведены крысы Вистар, реагирующие на звук. Изменения поведения и ЭЭГ, происходящие при повторении аудиогенных припадков, не оставляли сомнений, что развился киндлинг, а припадок распространился от ствола в структуры переднего мозга (Vergnes M., 1987).

Механизмы, распространения эпилептических очагов и усиления тяжести приступов при аудиогенном киндлинге в значительной степени неизвестны (de Deus J.L. et al., 2020). Крысы, подвергнутые аудиогенному киндлингу, демонстрируют положительный перенос на последующий обычный электрический киндлинг миндалевидного тела. Таким образом, механизмы, связанные с кортиколимбическими сетями и основные пути эпилептогенеза при обоих видах киндлинга сходны (Vinogradova L.V., 2017).



Киндлинг, независимо от того, какой стимул использовался, служит моделью развития височной эпилепсии, которая связан в основном с нарушением регуляции глутаматергической передачи в гиппокампе (Aleksandrova E.A., 2024).

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Дизайн исследования

В качестве экспериментальной модели эпилепсии нами были использованы самцы и самки крыс инбредной линии Крушинского-Молодкиной с наследственной аудиогенной эпилепсией в возрасте 11 месяцев и массой тела 250 грамм. Животные содержались в виварии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук» (ИЭФБ РАН). В 2010 году они были получены из вивария биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, с тех пор в ИЭФБ РАН поддерживается стабильная популяция. Инбредность линии обеспечивается братско-сестринским скрещиванием (сибкросс).

В связи с тем, что линия крыс Крушинского-Молодкиной характеризуется повышенной тревожностью, низкой социальностью и склонностью к острым нарушениям мозгового кровообращения, плохо адаптируются к перемещению и изменению условий содержания, работа с животными проводилась на базе ИЭФБ РАН (договор о научно-практическом сотрудничестве между ИЭФБ РАН и ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России № 2/25 от 03.02.2025). Весь спектр морфологических и биохимических исследований головного мозга крыс проводился на базе лаборатории морфологии и биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства».

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с правилами, утверждёнными санитарным врачом РФ от 29.08.2014 г. № 51, в поликарбонатных клетках, покрытых металлической сеткой по одной группе одного пола с круглосуточным доступом к воде, соответствующей ГОСТ Р 51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества» и корму, который соответствовал ГОСТ 3456-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» от 01.10.2020. Содержание животных осуществлялось

в контролируемых условиях окружающей среды ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$  и относительной влажности воздуха 30-70%), с 12-часовым циклом освещения в соответствии с ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016. Животные были разделены по группам в соответствии с полом методом стратификации по массе тела. Животным был присвоен индивидуальный номер в виде металлической бирки в ухе и групповая отметка на хвосте. Адаптация животных не проводилась, так как они не были перемещены.

Все процедуры с использованием животных проводились согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (№ 123 01/01/1991), используемых для экспериментальных и других научных целей. Работа одобрена на заседании комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН от 24.11.2023 (протокол № 1-11/2023).

Для эксперимента были отобраны крысы, которые стабильно реагировали на стимуляцию звуком с частотой 9-10 kHz и мощностью 50 dB развёрнутым тонико-клоническим припадком, который включает в себя следующие фазы: двигательное возбуждение (клонический бег); генерализованные клонические судороги, захватывающие конечности, ушные раковины и вибриссы; тонические судороги шеи, туловища и передних конечностей; тонические судороги, частично захватывающие задние конечности; судороги с полной экстензией задних конечностей. Все они представлены на рисунке 9.

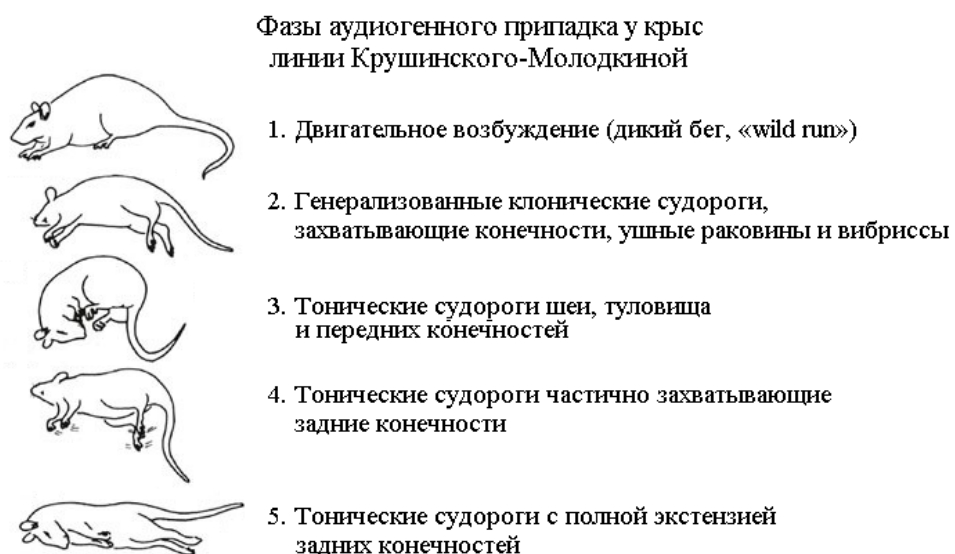


Рисунок 9 – Фазы аудиогенного припадка у крыс линии Крушинского-Молодкиной.

Данные параметры киндлинга от частоты и громкости звука, до времени адаптации, продолжительности воздействия и исключения животного через 1 минуту в случае отсутствия реакции, стандартны и отработаны для крыс линии Крушинского-Молодкиной. Считается, что эпилепсия у них развивается уже после 7 последовательных припадков. Продолжение киндлинга после 14 дней чревато тяжёлыми лимбическими припадками, а после 21 дня – гибелью животных (Александрова Е.П. и др., 2023; Дорофеева Н.А. и др., 2016).

В соответствии с целями и задачами эксперимента животные были разделены на 6 групп (рисунок 10).



Рисунок 10 – Схема эксперимента.

У крыс линии Крушинского-Молодкиной наблюдаются половые различия в поведении. Самцы отличаются высоким уровнем тревожности, они хуже реагируют на незнакомую обстановку, чем самки. Различия фиксируются также в характере эпилептиформных припадков, вызываемых аудиогенной стимуляцией: у самок быстрее возникают дикий бег, тонико-клонические и клонические судороги, а у самцов быстрее возобновляется дыхание. По последовательности фаз эпилептиформного припадков и вызванных им изменений в головном мозге самцы и самки крыс линии КМ не отличаются друг от друга. Тем не менее, половые различия требуют проведения экспериментов, как с самцами, так и с самками, с последующим сведением, чтобы

избежать неправильной интерпретации результатов (Криволапов С.А., Ершов Б.Г., 2015).

В нашем эксперименте исследуемым веществом выступал миноциклин, выпускаемый под торговой маркой Минолексин® АО «АВВА РУС», (ул. Крылатские Холмы, 30, корп.9, Москва, 121614), капсулы 50 мг – полусинтетическое соединение второго поколения тетрациклинового ряда, которое в настоящее время широко тестируется на животных, а также в клинических исследованиях. Препарат продемонстрировал защитное действие при множестве неврологических расстройств, включая повреждение спинного мозга, инсульт, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона и болезнь Паркинсона.

Миноциклин обладает противовоспалительным и антиапоптотическим эффектом, хорошей липофильностью (Singh S. et al., 2021) и высокой пероральной абсорбцией (Singh T. et al., 2022). На основе имеющихся литературных данных было принято решение использовать миноциклин в данном эксперименте, а также подобрана доза 45 мг/кг, в которой он оказывает целевой эффект, а характерные для тетрациклинов побочные действия сведены к минимуму. Данная доза считается терапевтической и была выбрана нами на основании анализа материалов множества экспериментов на животных. Так, миноциклин в дозе 45 мг/кг вводили крысам в модели ишемического инсульта с окклюзией средней мозговой артерии для изучения его влияния на микроглию (Wang L. et al., 2024). Миноциклин оказался эффективен в такой же дозе для модуляции триптофан-кинуренинового пути и уменьшения воспаления у стрессированных мышей, улучшив их когнитивные способности, тогда как в более низких дозах его эффект проявлялся слабее (Cheng D. et al., 2023). Миноциклин в дозе 45 мг/кг внутрибрюшинно вводился крысам линии Sprague-Dawley с моделью для изучения функции ГЭБ (Yang G. et al., 2022). Также было показано, что миноциклин работает в соответствующей дозе при литий-пилокарпин-индуцированном эпилептическом статусе у крыс, оптимально подавляя активацию астроцитов и микроглии. Миноциклин назначали животным в дозе 45 мг/кг в течение 2 недель после эпилептического статуса, а затем через шесть недель после его отмены наблюдали спонтанные рецидивирующие судороги в течение двух недель. Он снижал частоту, тяжесть и продолжительность судорог (Pawlik M.J. et al., 2021).

Дозы, превышающие 45-50 мг/кг, например, 90 мг/кг считаются высокими. Согласно данным метаанализа статей применение миноциклина в умеренной дозе (45 мг/кг/сут) у крыс в моделях нейродегенеративных заболеваний оказалось наиболее эффективным в целях нейропротекции (Li C. et al., 2013). В соответствии с целями и задачами нашего эксперимента такая доза выглядела оптимальной. В более низкой миноциклин мог не оказать выраженного эффекта, а в более высоких проявились бы характерные для тетрациклинов побочные эффекты. К побочным эффектам, которые чаще наблюдаются в случаях передозировки миноциклина, относятся головокружение, тошнота и рвота. Применение миноциклина несёт более высокий риск развития системной красной волчанки, чем другие тетрациклины, также он может вызывать аутоиммунный гепатит. Для миноциклина нет специального антидота (Nazarian S., Akhondi H., 2025).

Инъекции физраствора или Минолексина в дозе 45 мг/кг, растворённого в физрастворе, проводились внутрибрюшинно по окончании каждой звуковой стимуляции (9 kHz, 50 dB) в течение 14 дней.

Для генерации и воспроизведения звукового сигнала использовались ноутбук Samsung R540 с установленной программой NCH Tone Generation (© NCH Software) и колонки 2.0 SVEN 315. Звуковая стимуляция проводилась в аквариуме объёмом 50 литров и длилась до начала фазы «дикого бега», либо 1 минуту, а затем прекращалась, если у крысы не наблюдался судорожный припадок. Во время эксперимента проводилась видеофиксация. У животных, подвергнутых киндлингу, фиксировался латентный период – время начала приступа от момента подачи звукового сигнала (в пределах 60 секунд), а также особенности припадка, производилась видеофиксация. Судороги оценивали по модифицированной шкале Racine, их тяжесть у всех животных всех групп составляла 6 баллов. Животные контрольной группы и группы, проходившей киндлинг без введения миноциклина, получали внутрибрюшинные инъекции 1 мл физраствора. Далее был сделан перерыв продолжительностью 7 дней и проведена эвтаназия с использованием препарата «Золетил» в дозировке 300 мг/кг, некропсия, перфузия физраствором с помощью перистальтического насоса 7554-90, Cole Parmer Masterflex, декапитация на ручной гильотине AE1601, Open science и извлечение головного мозга.

Мозг разделяли на две половины в сагиттальной плоскости. Правую половину мозга фиксировали в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере для последующей заморозки и иммуногистохимического и TUNEL анализа. Из левой половины иссекали дорсальный гиппокамп, кору и белое вещество височной области для вестерн-блотта (Western blotting).

Согласно атласу крысиного мозга (Paxinos G., Watson C., 1998), для исследования взята амигдало-пириформная трансляционная область (Interneural 5.70 mm, Bregma -3.30 mm), указанная на рисунке 11. Данная область мозга, а именно височная кора, подлежащее белое вещество, гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа, поле СА4 гиппокампа и хилус были выбраны как места наиболее частого формирования первичных эпилептических очагов, в том числе связанных с фармакорезистентной эпилепсией. Их аномалии лежат в патогенезе аудиогенных судорог у крыс линии Крушинского-Молодкиной.

Височные доли – область мозга, в которой чаще всего возникают эпилептические припадки, что было выяснено ещё в 1880-х годах (Abarrategui B. et al., 2021). Височная кора в наибольшей степени подвержена гипоксии, травмам, злокачественным новообразованиям, энцефалитам различной этиологии, страдает от пороков развития и генетических аномалий (Henning O. et al., 2023). Нарушения в височной коре сопряжены с нарушениями в подлежащем белом веществе, которое участвует в латерализации приступов и их распространении вовне при мезиальной височной эпилепсии. При мезиальной височной эпилепсии зоны коры, участвующие в распространении приступов, демонстрируют повышенную функциональную связь с глубокими сетями белого вещества. Связи между островком, височной долей и супрамаргинальной извилиной положительно коррелируют с частотой приступов (Cui W. et al., 2021).

Другой областью мозга, где чаще всего возникает эпилептический очаг, является гиппокамп. У пациентов с эпилепсией и другими заболеваниями наблюдается его склерозирование. Гиппокамп представляет собой структуру, состоящую из двух переплетающихся пластинок аллокортекса: зубчатой извилины и аммониевого рога. Он состоит из трех отдельных зон: зубчатой извилины, собственно гиппокампа и субикулюма. Аммонов рог (Cornu Ammonis, CA) разделяют на четыре поля в соответствии с морфологией нейронов: CA1, CA2, CA3 и CA4. Отдельные подполя человеческого гиппокампа имеют специализированные и уникальные функции и

уязвимости (Williams E.M. et al., 2023). Автоматизированная волюметрия подполей пациентов со склерозом гиппокампа и гистологическое исследование образцов показали сильную атрофию поля СА4 (Mizutani M. et al., 2021).

Зубчатая извилина играет решающую роль в индукции и распространения эпилептической активности. Её гранулярный слой представляет собой одну из наиболее сильно ингибируемых областей мозга. В случае её нарушения начинается сильное и неконтролируемое возбуждение её нейронов, формирование аномальных цепей, прорастание мшистых волокон, изменения рецепторов и мембран, абберантный нейрогенез и реактивный астроцитарный глиоз (Dengler C., Coulter D. 2016).

Хилус играет важную роль в модуляции возбудимости зубчатой извилины. В нём располагаются пролиферативные клетки (нейральные предшественники типа 1, предшественники олигодендроцитов, нейральные предшественники (NPC) и пролиферативные зрелые астроциты), скорость деления которых изменяется во время патологических событий. Совокупность клеток хилуса модулирует множественные физиологические процессы, регулируемые гиппокампом (García-Martinez Y. et al., 2020).

Стандартные срезы замороженных препаратов головного мозга толщиной 10 мкм были изготовлены на полуавтоматическом криотоме Leica CM 1520 и помещены на предметные стёкла (ThermoFisher Scientific Superfrost Plus) для последующей окраски.

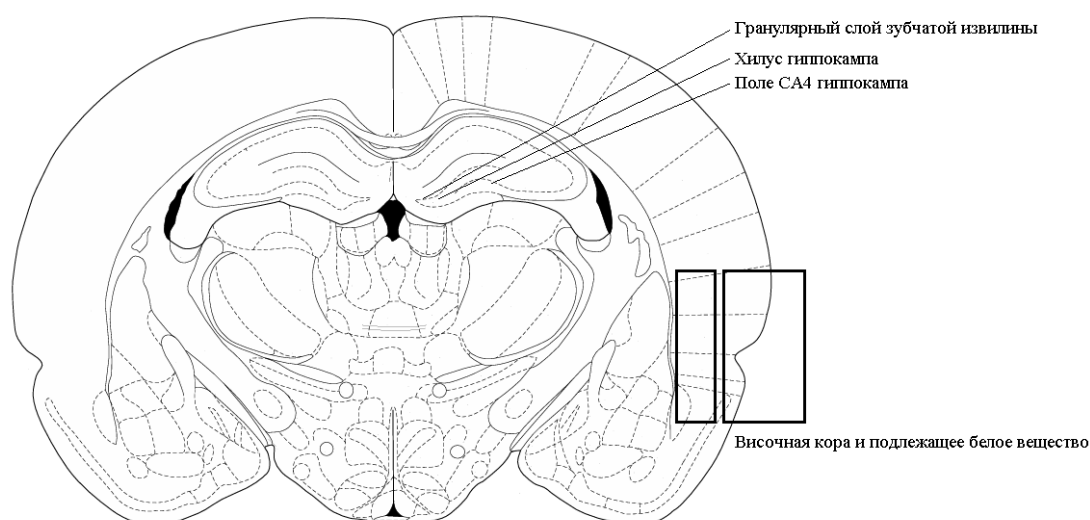


Рисунок 11 – Расположение исследуемых структур головного мозга крысы.



## 2.2 Метод оценки уровня апоптоза

Для детекции уровня апоптоза использовался метод TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Этот метод обнаружения апоптотической фрагментации ДНК широко используется для идентификации и количественной оценки уровня апоптотических и неапоптотических повреждений ДНК. Он основан на использовании терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы (TdT), фермента, который катализирует прикрепление дезоксиинуклеотидов, меченных биотином, флуоресцеином или другим маркером, к 3'-гидроксильным концам разрывов ДНК (Kurylkova K. et al., 2012). Это прямой тест, который выявляет как одно-, так и двухцепочечные разрывы (Sharma R. et al., 2021).

В рамках данного эксперимента был использован набор производства Elabscience® E-CK-A320 «Набор для изучения апоптоза TUNEL In Situ (Green, FITC)». Срезы промывали 5 минут в дистиллированной воде и проводили тепловое демаскирование, инкубируя стёкла в 0.01 М цитратном буфере (pH 6.0), разогретом до +90°C в течение 15 минут, охлаждали буфер ещё 15 минут, после чего помещали в PBS на 3–5 минут. После промывки стёкол их инкубировали в растворе протеинкиназы K (Proteinase K) (1 мкл Prot K+99 мкл PBS) в течение 15 минут и перемещали на 5 минут в дистиллированную воду и затем в PBS на 3–5 минут.

Помещали TdT EQUILIBRATION BUFFER, инкубируя 10 минут в термостате при +37°C. Стряхнув лишнюю жидкость, сразу наносили на стекло TdT EQUILIBRATION BUFFER 1750 мкл – 70 % и Labeling solution 500 мкл – 20%, TdT Enzyme 250 – 10% и инкубировали 1 ч во влажной камере при +37°C без света в термостате. После этого срезы промывали специальным промывочным буфером (Washbuffer) и инкубировали в нем 10 минут при комнатной температуре. Затем срезы в течение часа инкубировали с антителами против дигоксигенина, конъюгированными с флуоресцеином. В качестве ядерного красителя использовали DAPI (4 мкл DAPI + 96 мкл PBS). Срезы промывали PBS, заключали в мовиол, накрывали покровным стеклом (BioVitrum) и после высыхания хранили при -20°C в тёмной упаковке.

Изображения срезов головного мозга были получены с помощью микроскопа PFM (WPI) с цветной камерой Leica DFC300 FX при увеличении x100 для анализа и x200 для фотоматериалов в разрешении 1280×960 пикселей. Для последующей работы с

изображениями использовалась программа VideoTest Software. Подсчёт апоптотических TUNEL+-клеток проводился на 4-5 срезах исследуемой области головного мозга (височная кора и подлежащее белое вещество, гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа, поле CA4 и хилус) каждого животного и далее рассчитывали среднее количество на группу.

Таковыми считались клетки, демонстрирующие характерное зелёное свечение, локализованное в области ядра. Для их выявления и дифференциации от различных артефактов (неспецифическое окрашивание, посторонние включения, дефекты сенсора камеры) и кровеносных сосудов использовалось визуальное сравнение с дополнительной негативной контрастирующей окраской DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол). Это ДНК-специфичный зонд, образующий флуоресцентный комплекс, присоединяясь к малой бороздке АТ-богатых последовательностей ДНК. Если при совмещении изображений одного поля зрения специфическое свечение совпадало с ядром клетки, это учитывалось как апоптоз. Число подвергшихся апоптозу клеток подсчитывалось в абсолютных единицах в поле зрения. Расчёт в % от общего числа клеток в поле зрения не представлялся целесообразным из-за невозможности или крайней затруднённости подсчёта всех клеток (высокая клеточная плотность, слияние контуров и малый размер ядер, неравномерное свечение) (Козлов А.А. и др., 2023).

### **2.3 Иммуногистохимический метод**

Для оценки экспрессии p53 были использованы следующие реактивы: первичные антитела к p53 (C-19)-R: sc-1311-R SANTA CRUZ Rabbit polyclonal to p53, вторичные антитела Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Ready to use) ab64256 Abcam 125 ml и Streptavidin-Peroxidase Polymer, Ultrasensitive Product Number S 2438 Sigma. Для оценки экспрессии Bcl-2 были использованы первичные антитела к Bcl-2 (C 21): sc-783 Rabbit polyclonal, SANTA CRUZ, а GFAP – первичные антитела A14673 (ABclonal) Rabbit поликлональные. Остальные реактивы те же, что для определения p53. Визуализацию производили с помощью 3,3'-диаминобензидина (DAB).

Для выявления антигена (p53, Bcl-2, GFAP) с помощью антител, конъюгированных с биотином, использовался следующий протокол. Срезы промывали в дистиллированной воде и PBS, проводили тепловое демаскирование антигенов

инкубированием срезов в горячем (+90°C) 0.01 М цитратном буфере (pH 6.0) в течение 8-9 минут, после чего раствор охлаждали в течение 15 минут. Далее срезы промывали в PBS 5 минут, помещали в 0.3% раствор перекиси водорода в метаноле на 30 минут для блокирования эндогенной пероксидазы. Промывали в PBS+Tween 0.05% 5 минут 3 раза. Далее помещали стекла в блокирующий раствор – альбумин бычий сывороточный (BSA) без Tween на 1 час (2% BSA на PBS). Затем при комнатной температуре проводили инкубацию с соответствующими первичными антителами в течение ночи на 16-18 часов.

На следующий день стёкла промывали в PBS+Tween 0.05% 3 раза по 5 минут и инкубировали с вторичными антителами Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Ready to use) ab64256 Abcam 125 ml, конъюгированными с биотином, 1 час при комнатной температуре. Снова промывали в PBS 3 раза по 5 минут. Инкубировали со Streptavidin-Peroxidase Polymer, Ultrasensitive Product Number S 2438 Sigma 1:400 на PBS – 1 час и промывали в PBS. Далее срезы проявляли с помощью диаминобензидина – 2 мл замороженного DAB (1x50)+100 мл PBS + 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 мкл 30%) 20 минут. Промывали в дистиллированной воде 6-7 раз и проводили заключение под покровные стёкла с монтирующей средой Витрогель (Биовитрум).

Изображения срезов головного мозга были получены с помощью микроскопа PFM (WPI) с цветной камерой Leica DFC300 FX для анализа в разрешении 1280×960 пикселей, а также на сканирующем микроскопе для лабораторных исследований Pannoramic MIDI (3DHISTECH Ltd.) при увеличении x200. Подсчёт оптической плотности проводился с использованием программы PhotoM версии 1.31 (А. Черниговский, [http://t\\_lambda.chat.ru](http://t_lambda.chat.ru)) на 4-5 срезах исследуемой области головного мозга (височная кора и подлежащее белое вещество, гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа, поле CA4 и хилус) каждого животного и далее рассчитывали среднюю оптическую плотность.

## 2.4 Вестерн-блоттинг

Для оценки уровней экспрессии каспазы-3, каспазы-8 и белков нейровоспаления биоптаты височной коры, подлежащего белого вещества и гиппокампа гомогенизировали в лизирующем буфере (20 mM Tris, pH 7.5; 1 mM EDTA; 1 mM

EGTA; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100) с ингибиторами протеаз и фосфатаз. Общее количество белка оценивали по Лоури, используя бычий сывороточный альбумин (BSA) в качестве стандарта. Полученный супернатант смешивали в соотношении 2:1 с 3х загрузочным буфером (0.2 M Tris-HCl pH 6.7, 6% sodium dodecyl sulfate, 15% glycerol, 0.003% bromophenol blue, and 10% b-mercaptoethanol) инкубировали в течение 10 минут при 96°C. Равные количества образцов (4 мкл на образец) загружали для электрофореза и белки разделяли в 12% полиакриламидном геле. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3718). Мембраны инкубировали в 3% BSA-TBST буфере (0.1% Tween 20, 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.4) в течение 1 часа, а затем инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами. Были использованы следующие первичные антитела: к каспазе-3 (1:1000; Abclonal, поликлональные антитела rabbit A16793), к каспазе-8 (1:1000; Cloud-Clone Corp, моноклональные антитела mouse MAA853Ra23), к FAS (1:1000; Cloud-Clone Corp, pAb FAS, RPA030Ra01 поликлональные), к FADD (1:1000; Abcam, Rb pAb to FADD ab24533, поликлональные), к TRADD (1:1000; Abcam, Rb mAb to TRADD, ab110644 моноклональные), к NF-kB (1:1000; Cloud-Clone Corp, pAb NFkB (Rat), PA030Ra01, поликлональные), к TNF- $\alpha$  (1:1000; Abcam Rb pAb to TNF alpha, ab9739, PAB824Ra01, поликлональные), к  $\beta$ -тубулину (1:1000; Cloud-Clone Corp, моноклональные антитела mouse CAB870Mi22). Мембраны промывали буфером TBST и затем инкубировали с вторичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. Вторичные антитела представляли собой либо конъюгированные с пероксидазой антитела против антител кролика или мыши (1:10000), либо конъюгированные с биотином антитела против антител кролика или мыши (1:5000). В последнем случае мембраны после промывки в буфере TBST дополнительно инкубировали в растворе стрептавидин-пероксидазы (1:10000) в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки мембраны инкубировали в субстрате SuperSignal<sup>TM</sup> West Dura Extended Duration (ThermoFisher Scientific, #34075) в течение 5 минут. Анализ полученных блотов проводился методом денситометрии с учетом нормализации относительно окрашивания на весь белок с помощью Ponso с использованием гель-документирующей системы (ChemiDoc, BioRad, США). Также определяли экспрессию белка хаус-кипинг гена тубулина. Относительную плотность каждой белковой полосы определяли количественно с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 6.0).

## 2.5 Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1, которая использовалась также для построения графиков наряду с Microsoft Excel 2008. Обработка включала в себя определение размеров выборки, типа данных, проверку нормальности распределения. В соответствии с этим определялся метод анализа и представления данных. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk test) для малых выборок. В случае нормального распределения сравнение нескольких независимых выборок, представленных массивами количественных данных, проводилось параметрическим методом – дисперсионным анализом ANOVA, в остальных случаях сравнение производилось непараметрическим методом – критерием Красела-Уоллиса (Kruskal-Wallis test или one-way ANOVA on ranks). Для апостериорных сравнений – дополнительного выявления значимых различий между группами (post-hoc тесты) был использован критерий Тьюки (Tukey's range test) в случае нормального распределения и Данна (Dunn test) в случае ненормального, соответственно. Для поиска корреляций между числом припадков и длительностью латентного периода использовался коэффициент корреляции Спирмена. Значимыми считали отличия при  $p < 0,05$  и ниже.

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Измерение длительности латентного периода

При мезиальной височной эпилепсии наблюдается так называемый латентный период, латентность или время латентности между спровоцировавшим заболевание фактором, таким как травма, инсульт или энцефалит, и началом припадков. В это время в поражённом мозге идут скрытые процессы, которые приводят к реорганизации нейронных сетей, формируя эпилептический очаг в гиппокампе, миндалевидном теле или коре. Подобное явление подтверждено с помощью ЭЭГ и анализа биомаркеров у экспериментальных животных, особенно грызунов, у которых продолжительность латентного периода короче, чем у людей (Lévesque M. et al., 2021).

Для крыс линии Крушинского-Молодкиной латентный период определяется как время начала приступа от момента подачи звукового сигнала, один из поведенческих маркеров, указывающих на формирование височной эпилепсии и аберрантные изменения в головном мозге, включая пролиферацию и миграцию аномальных нейронов с последующим формированием связей и реорганизацию нейрональной сети (Vinogradova L.V., 2017; Botterill J.J. et al., 2019).

Динамика изменения времени латентного периода у крыс, получавших внутрибрюшинно инъекции физраствора и раствора минолексина в течение 14 дней, представлена на рисунке 12.

Было выявлено статистически значимое ( $p = 0,0110$ ) уменьшение латентного периода у крыс ( $p < 0,05$ ) у крыс, получавших препарат (рисунок 12Б), по сравнению с группой, получавшей только физраствор (рисунок 12А). У всех животных, подвергавшихся киндлингу, длительность латентного периода возрастала со временем. В среднем рост составил 38.33%: ДИ (доверительный интервал) 11,35 (4,65-19,17) секунд для крыс, получавших физраствор, и ДИ 4,35 (3,75-5,80) секунд для группы, получавшей раствор минолексина.

При введении минолексина, несмотря на замедление увеличения латентного

периода, животные продолжали проявлять типичную для их линии реакцию на звуковой стимул. Следовательно, длительная терапия минолексинном не способна предотвратить возникновение эпилептических припадков или снизить их частоту.

Подобный результат наблюдался в модели эпилептического статуса у крыс с внутрибрюшинными инъекциями пентилентетразола, животные получали лечение капсаицином и противоэпилептическим препаратом фенитоином отдельно или совместно. Среди оцениваемых показателей были в том числе латентный период и доза пентилентетразола, необходимая для индукции эпилептического статуса. Фенитоин увеличил латентность и пороговую дозу, а капсаицин предотвратил вызванное фенитоином увеличение времени латентности и пороговой дозы. Оба препарата снижали повреждение нейронов, но вместе смогли его предотвратить почти полностью (Abdel-Salam O.M.E. et al., 2020).

С другой стороны, длительный латентный период может считаться благоприятным признаком. Анализ ретроспективной базы данных пациентов, перенёсших хирургическое лечение эпилепсии в больнице Университета Томаса Джефферсона, показал, что по мере увеличения латентного периода между оперативным вмешательством и возможным рецидивом увеличивалось время между первым и вторым приступами (Klodowski D.A. et al., 2022). Согласно другому анализу данных 159 пациентов, у которых через какое-то время после инсульта развилась эпилепсия, короткий латентный период увеличивает риск развития лекарственной устойчивости. Наиболее неблагоприятны в этом отношении первые месяцы после инсульта, а затем риск снижается в течение года и продолжает медленно падать. Длительность латентного периода может быть связана с некоторыми гипотезами о природе фармакорезистентности, такими как гипотезы внутренней тяжести и нейронной сети (Lattanzi S. et al., 2022). У концепции латентного периода есть множество спорных и не решённых моментов. Например, неясно, является ли его длительность точным отражением продолжительности эпилептогенного процесса. Кроме того, его длительность может различаться в очень широких пределах. Латентные периоды могут быть очень короткими или очень длинными, и сложно представить молекулярные или структурные изменения в мозге, которые занимают десятилетия между причиной развития эпилепсии и первыми приступами.

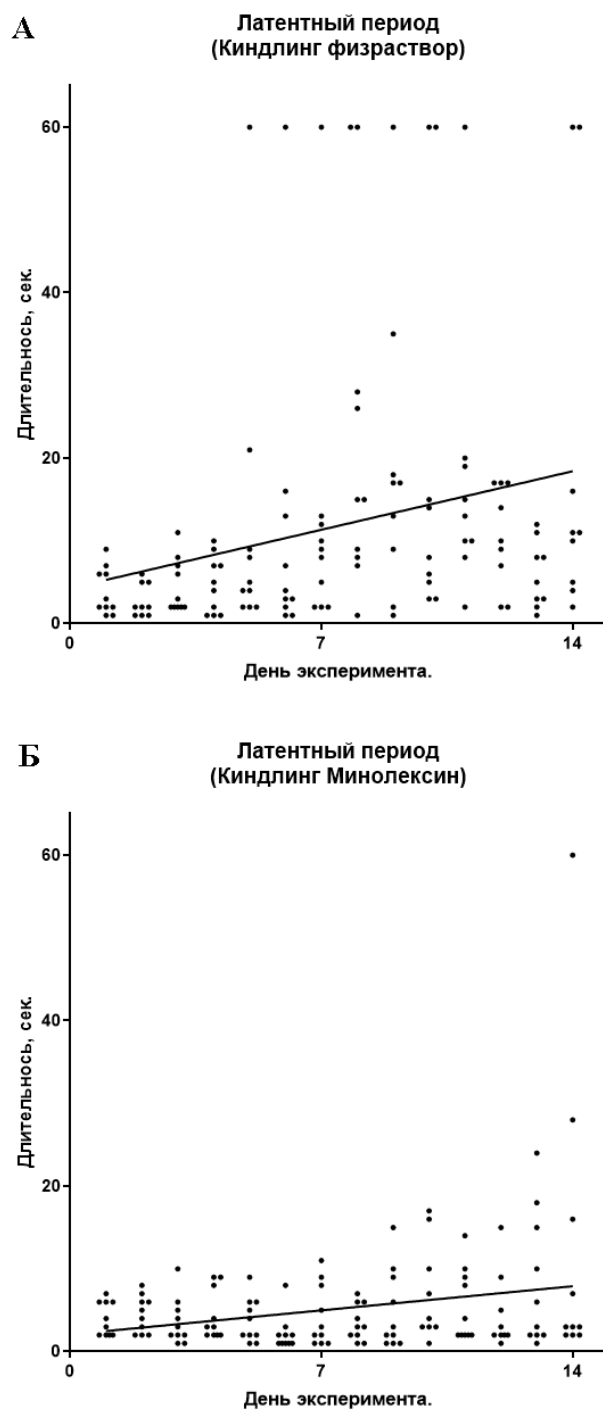


Рисунок 12 – Анализ изменения длительности латентного периода в группе животных, получавших физраствор и минолексин в течение 14 дней.

А – продолжительность латентного периода у группы животных, получавших инъекции физраствора; Б – продолжительность латентного периода у группы животных, получавших инъекции раствора минолексина. Данные были проанализированы с помощью ANOVA и проверены на линейную регрессию.



Каждая линия представляет собой линейную регрессию.

С другой стороны, в крысиных моделях эпилепсии, вызванной инъекциями пилокарпина, латентный период составляет всего несколько дней, а при киндлинге ещё меньше, что мало для развития отсроченных вторичных изменений (Sloviter R.S., 2008).

Также была выявлена корреляция между числом припадков (дней эксперимента) и длительностью латентного периода Spearman  $r = 0,6440$ , 95% confidence interval (0,1552 to 0,8794) для животных, получавших инъекции физраствора, и Spearman  $r = 0,6073$ , 95% confidence interval (0,09585 to 0,8650) для крыс, получавших раствор минолексина.

Так или иначе, миноциклин не является антиконвульсантом и на параметры припадка влияния не оказывает. Так субхроническое введение миноциклина, сразу после электроиндуцированного эпилептического статуса у крыс не повлияло на развитие спонтанных судорог. Однако он ослаблял долгосрочные поведенческие последствия эпилептического статуса (Russmann V. et al., 2016).

### 3.2 Определение уровня апоптоза

В таблице 1 представлено среднее число TUNEL-позитивных клеток в поле зрения для исследуемых областей головного мозга в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

Таблица 1 – Среднее число TUNEL-позитивных клеток в поле зрения исследуемых отделов головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	8,0 (5,3-9,6)*	20,0 (12,0-22,4)#	12,63 (11,29-18,8)*#
Белое вещество	3,6 (2,3-4,7)*	8,5 (5,4-10,6)#	6,45 (6,25-6,9)*#
Гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа	5,2 (4,15-5,85)*	9,8 (9,0-11,2)#	7,5 (5,95-8,3)* #
Поле СА4 гиппокампа	7,9 (6,85-8,9)*	9,8 (8,0-12,0)#	7,3 (6,083-8,6)*
Хилус гиппокампа	10,2 (8,95-12,2)*	17,6 (15,8-19,6)#	12,63 (7,625-14,75)*

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

На рисунках 13-17 представлено изменение числа TUNEL-позитивных клеток в исследуемые отделах головного мозга при аудиогенном киндлинге с введением физраствора и минолексина, а также у контрольной группы крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам.

Уровень апоптоза невысок у крыс контрольной группы, получавших растворитель физраствор без воздействия киндлинга, в височной доле и в гиппокампе. У животных, подвергавшихся многократному киндлингу и получавших только инъекции физраствора, наблюдалось усиление апоптотической гибели нейронов и глиальных клеток во всех исследуемых областях мозга по сравнению с контрольной группой (рис. 13-17).

Повторяющиеся эпилептические припадки вызывают гибель клеток головного мозга, последствия которой необратимы из-за ограниченной способности нейронов к пролиферации.

В данной работе был исследован только процесс апоптоза, но при эпилепсии нейроны могут погибнуть и другими способами. Некроптоз – вид регулируемой клеточной смерти, также связан с эпилепсией. В этом случае происходит ингибирование каспазы-8, димеризация рецептор-взаимодействующих протеинкиназ 1 (RIP1) и RIP3, активация белка, подобного домену киназы смешанной линии (MLKL), перемещение MLKL к плазматической мембране и разрыв клетки. К этому приводит окислительный стресс, активация астроцитов и микроглии, дисбаланс ионов кальция, истощение аденозинтрифосфата, повышение уровня внеклеточного глутамата и калия (Mohseni-Moghaddam P. et al., 2024).

Ферроптоз и пироптоз – недавно открытые механизмы программируемой клеточной смерти. Они связаны с окислительным стрессом и нейровоспалением, которые вносят значительный вклад в патогенез эпилепсии, и все больше данных свидетельствует об их связи с эпилепсией (Feng F et al., 2024).

Исследования показывают, что ингибирование этих путей, в частности ферроптоза, может оказаться эффективным терапевтическим подходом при эпилепсии. Но в целом механизмы, лежащие в основе гибели нейронов при эпилепсии, остаются невыясненными (Cai Y., Yang Z., 2021).

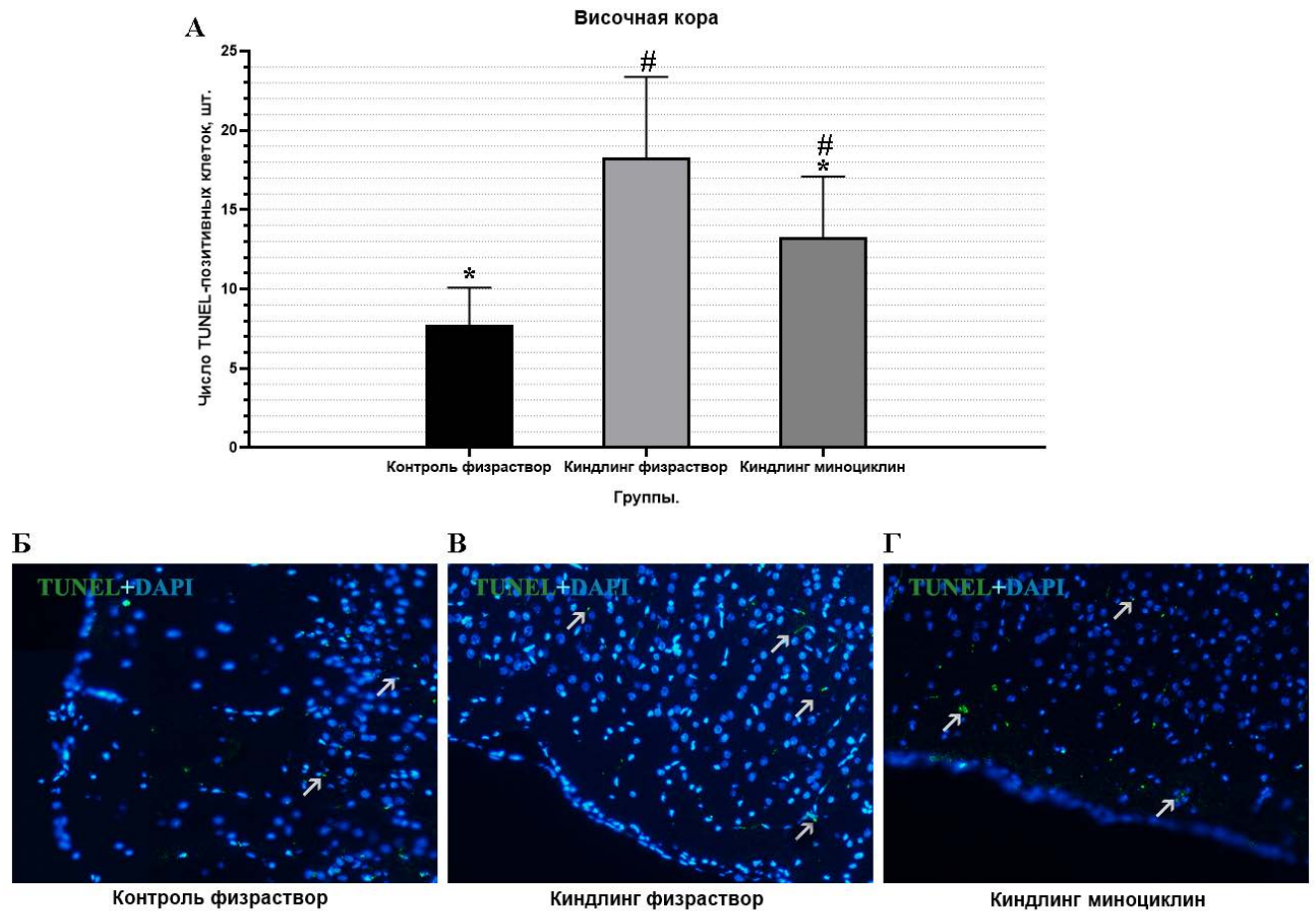


Рисунок 13 – Изменения числа TUNEL-позитивных клеток в височной коре.

А – график, отражающий число подвергшихся апоптозу клеток,

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммунофлуоресцентное выявление TUNEL+ клеток в группе Контроль,

В – в группе Киндлинг физраствор,

Г – в группе Киндлинг миноциклин.

Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на TUNEL+ клетки.

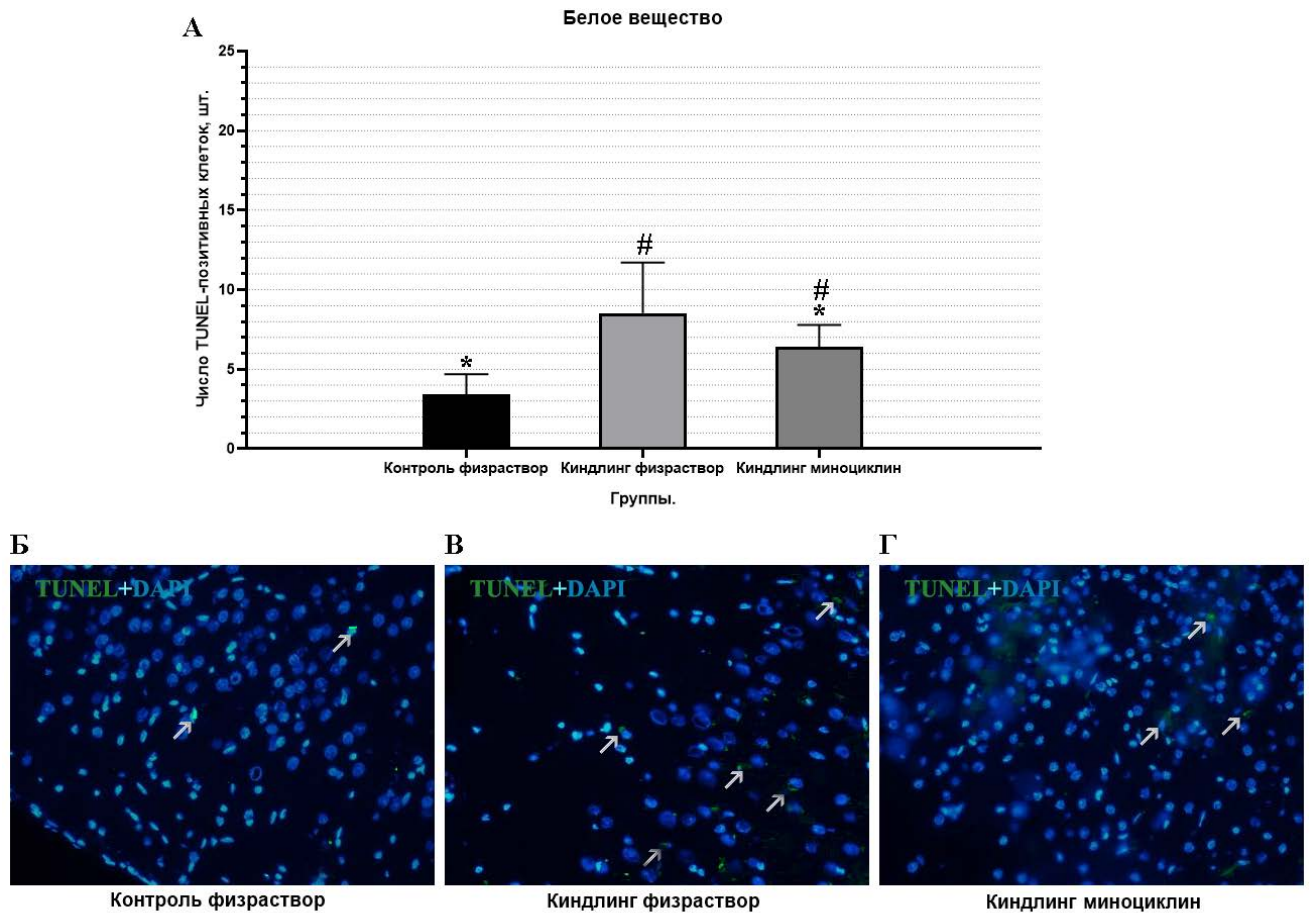


Рисунок 14 – Изменения числа TUNEL-позитивных клеток в подлежащем белом веществе.

А – график, отражающий число подвергшихся апоптозу клеток,

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммунофлуоресцентное выявление TUNEL+ клеток в группе Контроль,

В – в группе Киндлинг физраствор,

Г – в группе Киндлинг миноциклин.

Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на TUNEL+ клетки.

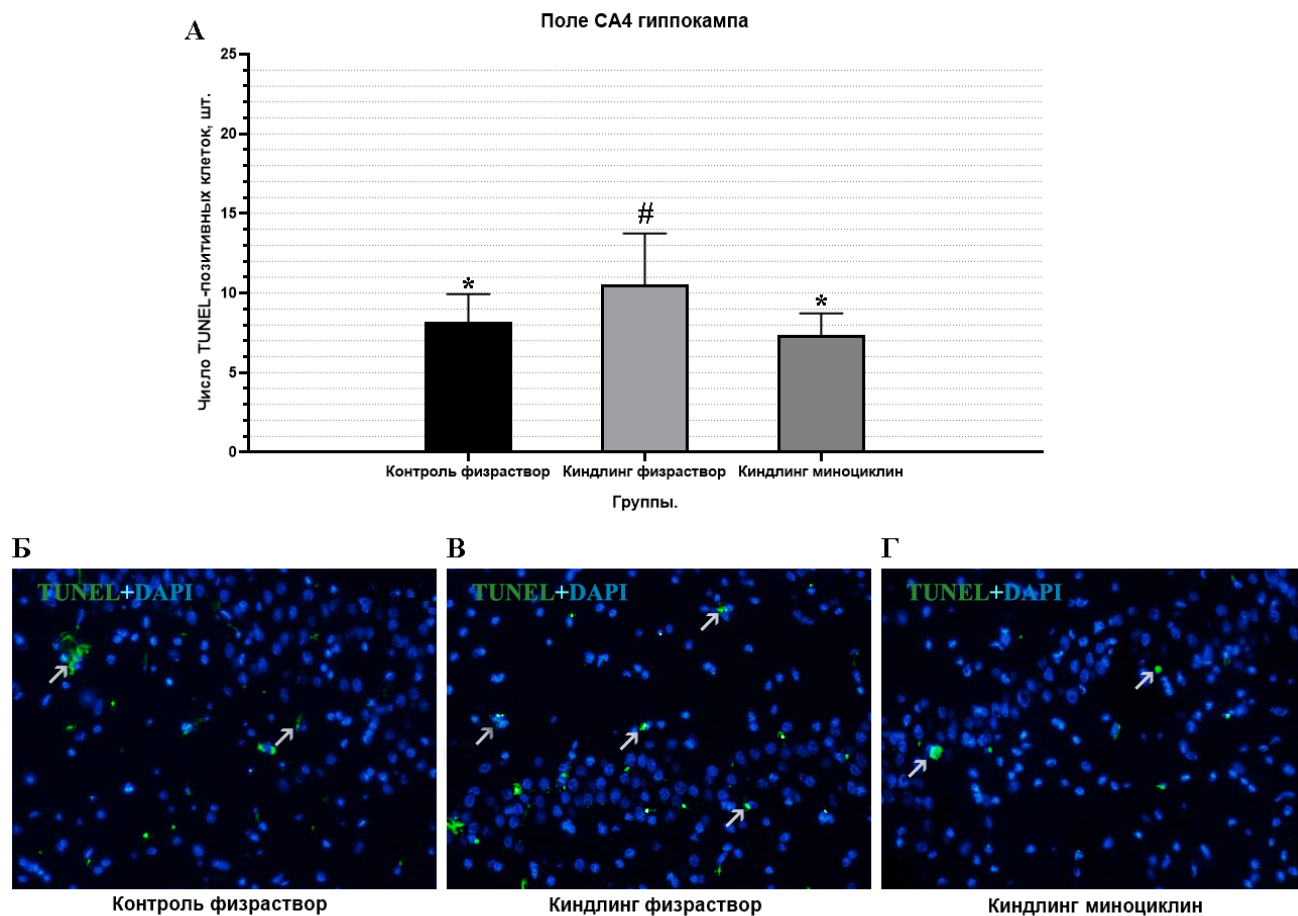


Рисунок 15 – Изменения числа TUNEL-позитивных клеток в поле СА4 гиппокампа.

А – график, отражающий число подвергшихся апоптозу клеток,

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммунофлуоресцентное выявление TUNEL+ клеток в группе Контроль,

В – в группе Киндлинг физраствор,

Г – в группе Киндлинг миноциклин.

Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на TUNEL+ клетки.

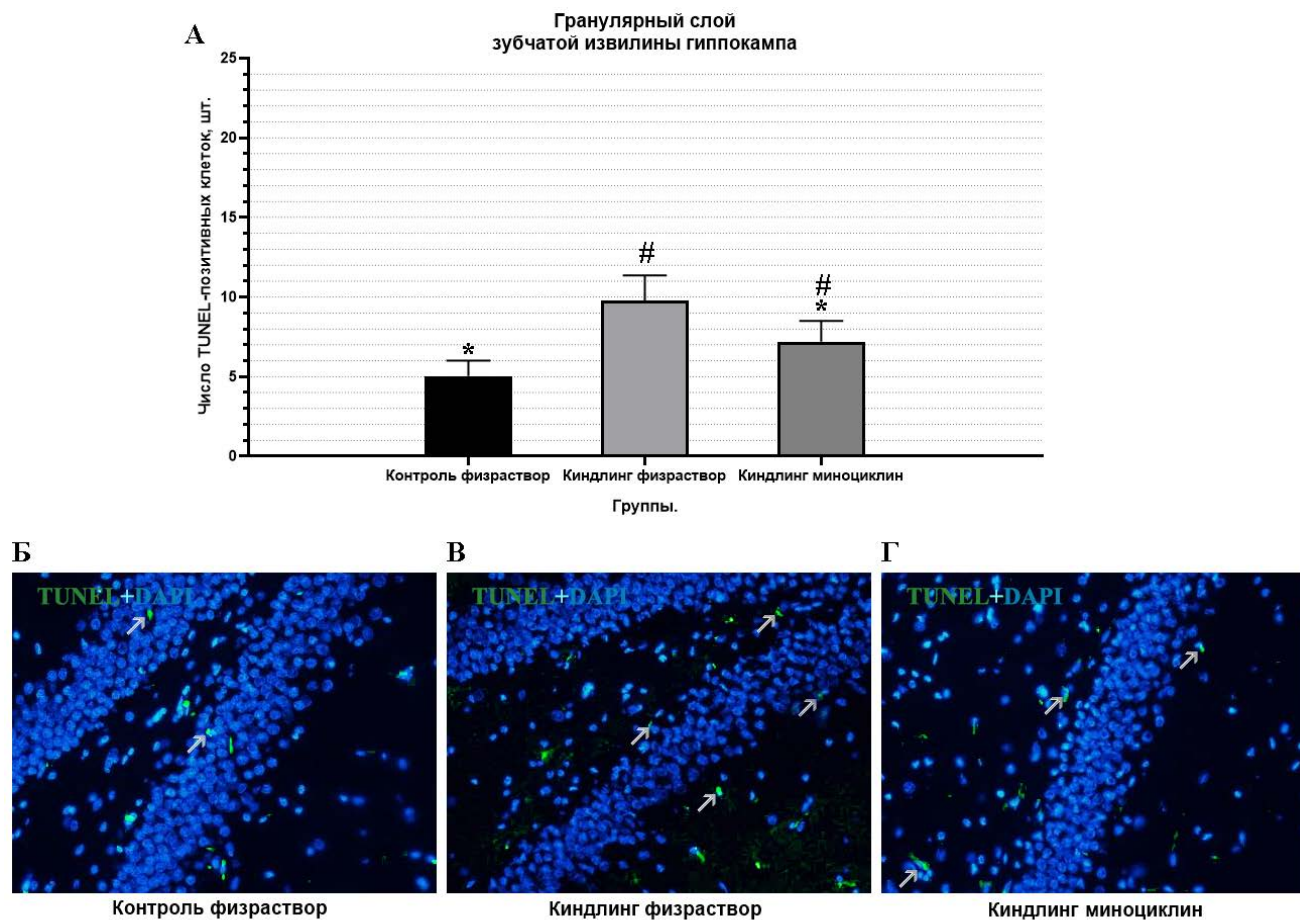


Рисунок 16 – Изменения числа TUNEL-позитивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа.

А – график, отражающий число подвергшихся апоптозу клеток,

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммунофлуоресцентное выявление TUNEL+ клеток в группе Контроль,

В – в группе Киндлинг физраствор,

Г – в группе Киндлинг миноциклин.

Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на TUNEL+ клетки.



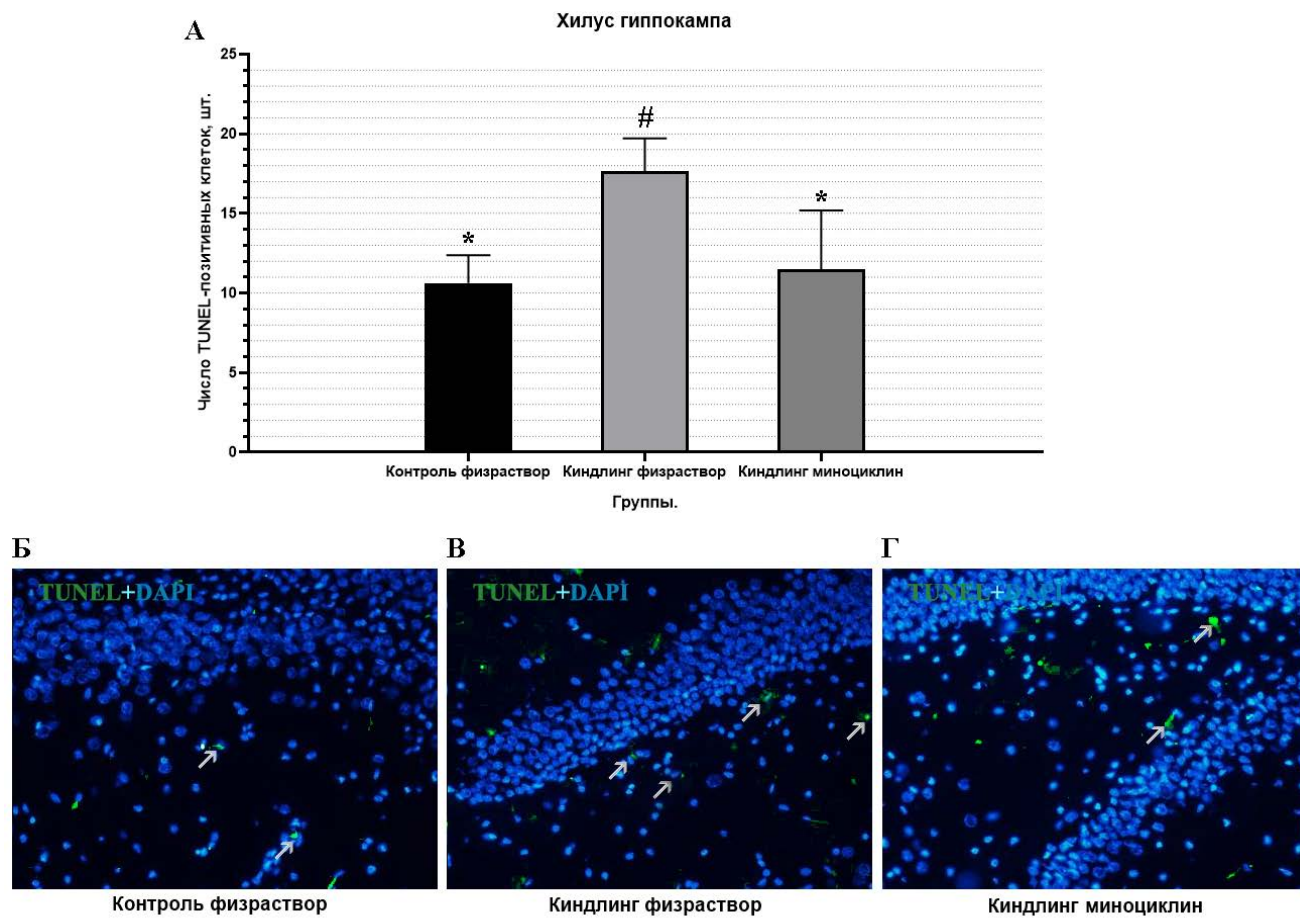


Рисунок 17 – Изменения числа TUNEL-позитивных клеток в хилусе гиппокампа.

А – график, отражающий число подвергшихся апоптозу клеток,

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммунофлуоресцентное выявление TUNEL+ клеток в группе Контроль,

В – в группе Киндлинг физраствор,

Г – в группе Киндлинг миноциклин.

Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на TUNEL+ клетки.

Нейродегенеративные процессы способствуют усилению эпилептогенеза, появлению новых эпилептогенных очагов, генерализации, нарушениям когнитивных функций, памяти, развитию сопутствующих заболеваний и в итоге, к смерти. При введении минолексина во всех исследуемых областях головного мозга крыс отмечено статистически значимое снижение числа TUNEL-позитивных клеток по сравнению с животными, не получавшими минолексин: височная кора ( $p = <0,0001$ ,  $F = 15,39$ ), подлежащее белое вещество ( $p = 0,0002$ ,  $F = 12,86$ ), поле СА4 гиппокампа ( $p = 0,0306$ ,  $F = 4,171$ ), гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа ( $p < 0,0001$ ,  $F = 24,1$ ), хилус ( $p = 0,0001$ ,  $F = 14,86$ ).

Апостериорные сравнения подтвердили значимые различия между всеми группами:

Для височной коры: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p < 0,0001$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0182$ , Киндлинг физраствор Киндлинг миноциклин  $p = 0,0456$ .

Для подлежащего белого вещества:  $p = 0,0002$ ,  $p = 0,0166$  и  $p = 0,1329$  соответственно.

Для гранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа:  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0097$ ,  $p = 0,0034$ .

Для поля СА4 гиппокампа: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,1181$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,7424$  - различий нет, минолексин снизил уровень апоптоза до значений контроля, Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0284$ .

Для хилуса гиппокампа: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0002$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,8050$  минолексин также снизил число TUNEL-позитивных клеток до контрольных значений, Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0007$ .

В основном показатели остались выше по сравнению с животными контрольной группы, не подвергавшейся киндлингу, близко подходя к норме в хилусе и снизившись в поле СА4 гиппокампа, где они были изначально несколько выше. Следовательно, введение минолексина снижает апоптотическую гибель клеток, оказывая благоприятный эффект при эпилепсии.



Другими авторами показано, что в нервной системе минолексин противодействует апоптозу на крысиных моделях повреждения головного мозга (He J. et al., 2021) и внутримозгового кровоизлияния, где после его инъекций количество TUNEL-позитивных клеток значительно уменьшилось на 1, 3 и 7 дни, при этом экспрессия Beclin-1, LC3BII/I и каспазы-3, -8 также снижались (Wu Z. et al., 2016). Минолексин показал нейропротекторное действие на культуре клеток нейробластомы мышей-2а (N2a) при токсическом действии антибиотика колистина, снизив активацию каспаз и количество активных форм кислорода (Dai C. et al., 2018). Также, по данным других исследователей, введение минолексина предотвращает апоптоз в различных типах клеток ЦНС человека, инфицированных вирусом лихорадки Западного Нила (Michaelis M. et al., 2007). Антиапоптотическое действие минолексина проявилось в модели болезни Альцгеймера у дрозофилы (Khatoon R. et al., 2022), где минолексин также снижает апоптоз нейронов, и при семейной болезни Альцгеймера, где он уменьшает накопление внутриклеточного бета амилоида на -69%, блокирует аномальное фосфорилирование тау-белка и фосфорилирование проапоптотического фактора транскрипции c-JUN, снижает активность p53 и каспазы-3, предотвращая апоптоз нейронов (Blecharz-Lang K.G. et al., 2022).

Миноциклин предотвращает апоптоз нейронов, вызванный радиацией у крыс в гиппокампе – одной из немногих радиочувствительных зон в целом устойчивого к ионизирующему излучению мозга, что может оказаться полезным для пациентов с опухолями головного мозга, проходящих лучевую терапию. В нашем случае минолексин также снизил апоптоз в гиппокампе подвергшихся аудиогенному киндлингу крыс. На immortalized линии нейронов гиппокампа мыши HT22 выяснено, что данный нейропротективный эффект не связан с репарацией ДНК. Миноциклин усиливал индуцированную радиацией аутофагию, при этом снижая апоптоз через сигнализацию AMPK $\alpha$ 1. Также в основе эффекта могут лежать его антиоксидантные свойства, поскольку любые эпилептиморфные припадки сопровождаются окислительным стрессом. В подверженных ишемии тканях мозга тетрациклины, наоборот, подавляют аутофагию (Zhang L. et al., 2017). Предварительная обработка минолексином снизила продукцию активных форм кислорода и уровень апоптотических маркеров в клетках линии PC12 феохромоцитомы крысы, похожих на первичные нейроны, подвергшихся воздействию известного своей нейротоксичностью кадмия (Shayan M. et al., 2023) и

мышьяка (Shayan M. et al., 2023). Эксперимент с введением 3% севофлурана старым мышам показал, что предварительное лечение минолексинном уменьшает симптомы послеоперационной когнитивной дисфункции, подавляя апоптоз и нейровоспаление посредством ингибирования сигнализации Notch. Результаты были подтверждены *in vitro* (Liang J. et al., 2023). Введение минолексина мышам при субарахноидальном кровоизлиянии оказало положительный эффект, который выражался в снижении фагоцитарной активности микроглии, ослаблении экспрессии провоспалительных цитокинов и апоптоза, что было подтверждено методом TUNEL и ПЦР в реальном времени (Blecharz-Lang K.G. et al., 2022).

Таким образом, мы показали антиапоптотические свойства минолексина при экспериментальной эпилепсии на модели крыс линии Крушинского-Молодкиной. Препарат значительно снизил уровни апоптоза во всех исследуемых отделах мозга крыс.

### **3.3 Анализ изменения экспрессии фактора p53**

Фактор транскрипции и супрессор опухолей p53 управляет рядом основных клеточных функций, включая транскрипцию генов, синтез и репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, старение и гибель клеток. В нервной системе он активен в норме и при патологии. Он является одним из ключевых модуляторов реакции клеток на стресс, активация которого запускает апоптоз в различных типах клеток, в число которых входят и нейроны. Его экспрессия повышается при различных повреждениях и заболеваниях ЦНС (Agostini M. et al., 2018).

В таблице 2 представлена средняя оптическая плотность p53-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

На рисунках 18-22 представлено изменение оптической плотности P53 иммунореактивного материала в клетках исследуемых отделов головного мозга при аудиогенном киндлинге с введением физраствора и минолексина, а также у контрольной группы крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам.

Таблица 2 – Средняя оптическая плотность p53-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,023 (0,014-0,028)*	0,032 (0,031-0,038)#	0,020 (0,018-0,025)*
Белое вещество	0,015 (0,013-0,017)*	0,023 (0,022-0,025)#	0,017 (0,014-0,019)*
Гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа	0,021 (0,017-0,023)	0,030 (0,024-0,034)#	0,029 (0,020-0,037)#
Поле СА4 гиппокампа	0,019 (0,016-0,023)	0,023 (0,017-0,026)	0,021 (0,018-0,025)
Хилус гиппокампа	0,020 (0,019-0,029)*	0,039 (0,030-0,041)#	0,030 (0,024-0,034)*

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

В височной коре животных (рисунок 18 А, В), подвергшихся киндлингу и получавших физраствор, наблюдается статистически значимый рост ( $p = 0,0003$ ,  $F = 11,65$ ) экспрессии p53 по сравнению с контролем (рисунок 18 А, Б), соотносящийся с повышением уровня апоптоза в данной области. При введении минолексина (рисунок 18 А, Г), уровни p53 возвращаются к контрольным значениям, достоверно отличаясь от уровня p53 в группе Киндлинг физраствор так же, как и уровень апоптоза, что свидетельствует о терапевтическом эффекте исследуемого вещества. Это подтверждается апостериорными сравнениями: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0013$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,9995$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0007$ .

Аналогичные изменения синтеза проапоптотического белка p53 наблюдаются в подлежащем белом веществе, так же, как и уровня апоптоза клеток (рисунок 19 А, Б, В, Г). Так, после киндлинга также можно отметить значимое ( $p = 0,0001$ ,  $F = 13,38$ ) усиление экспрессии p53, и снижение синтеза данного белка в получавшей миноциклин группе крыс до уровня контрольной группы, что видно по результатам апостериорных сравнений: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0002$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,6533$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0010$ .

В поле СА4 гиппокампа (рисунок 20 А, Б, В, Г) статистически значимых различий содержания p53 у всех групп выявлено не было ( $p = 0,5865$ ,  $F = 0,5462$ ).

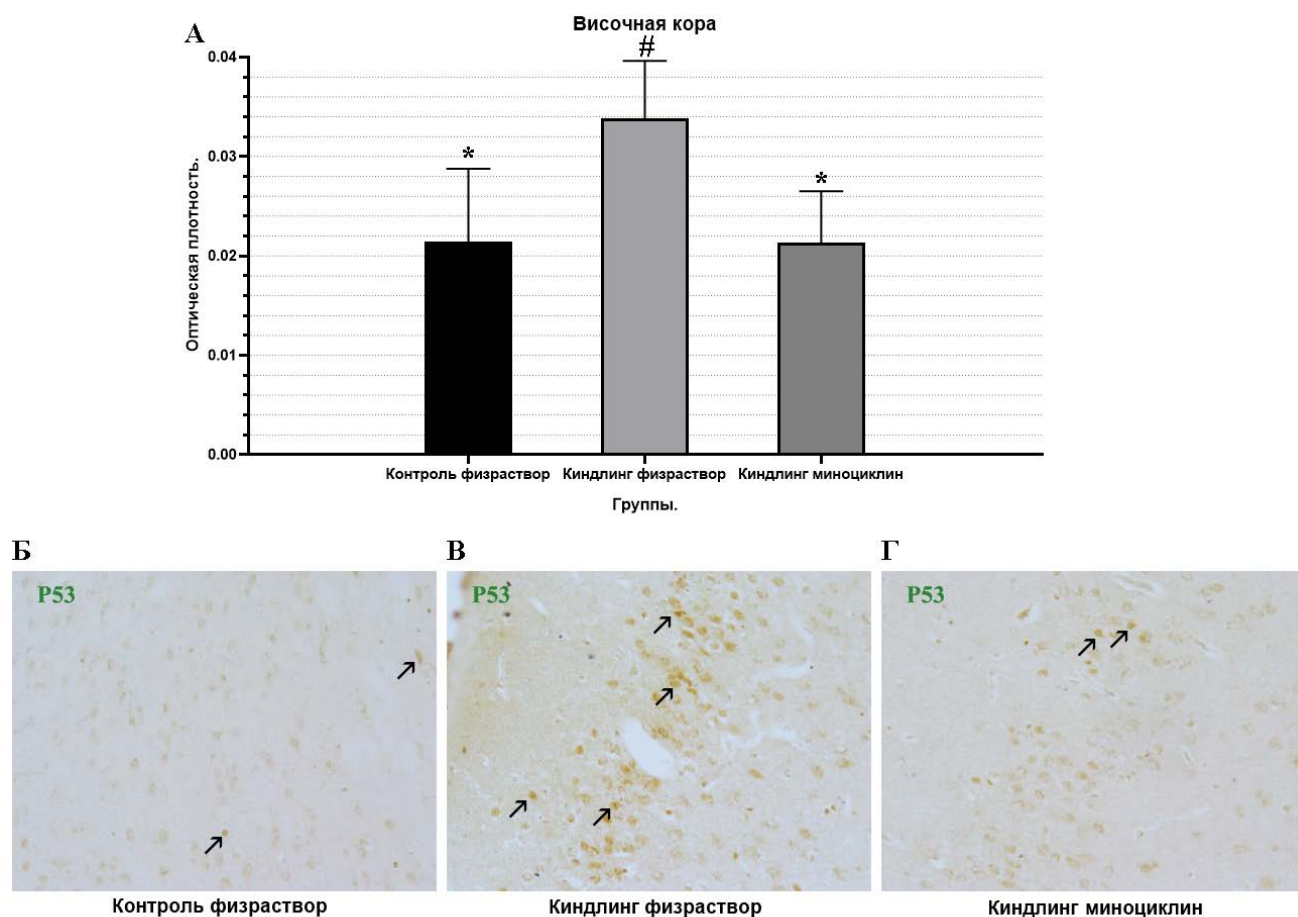


Рисунок 18 – Изменения оптической плотности p53-иммунореактивного материала в клетках височной коры.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.

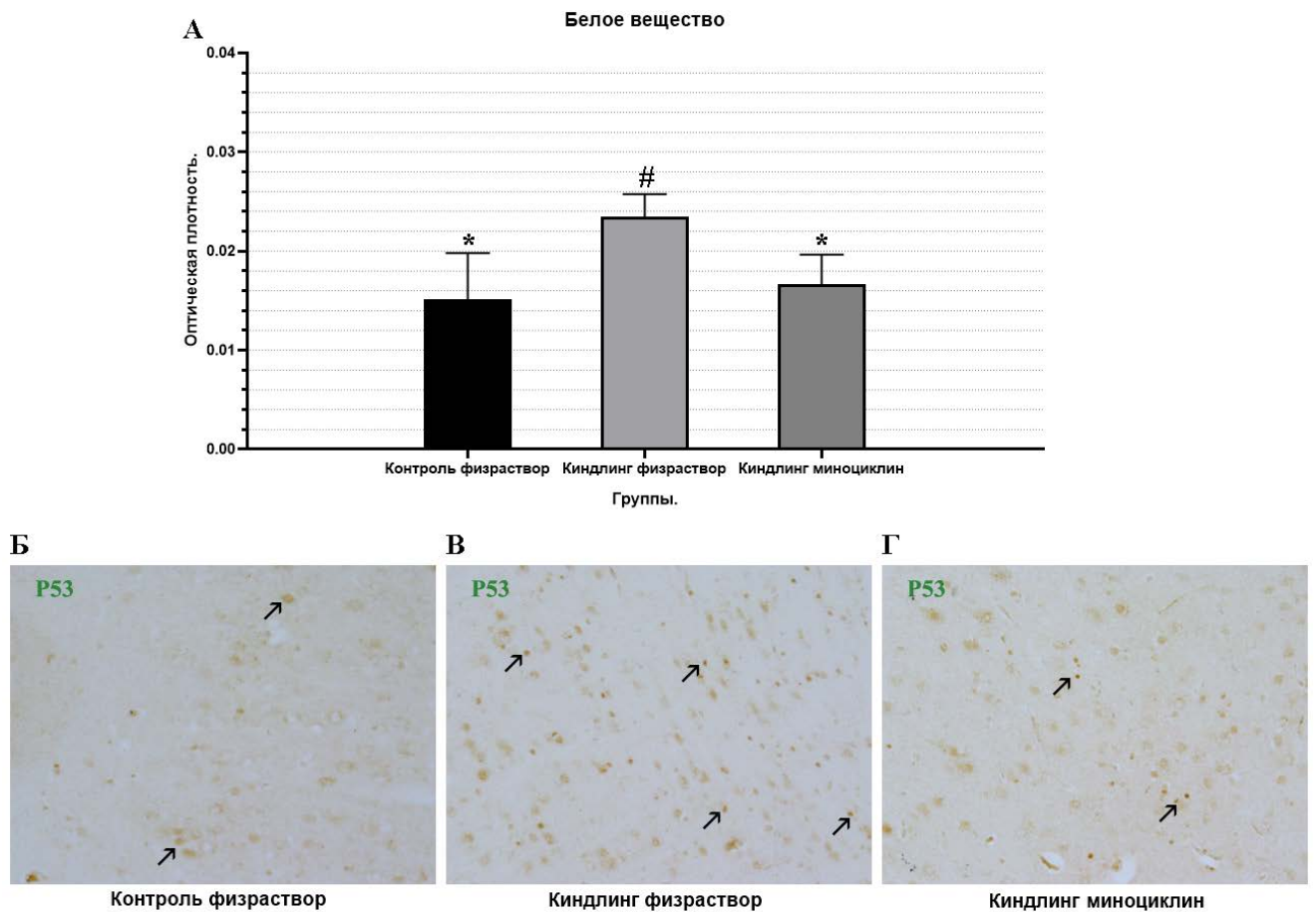


Рисунок 19 – Изменения оптической плотности p53-иммунореактивного материала в клетках подлежащего белого вещества.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.

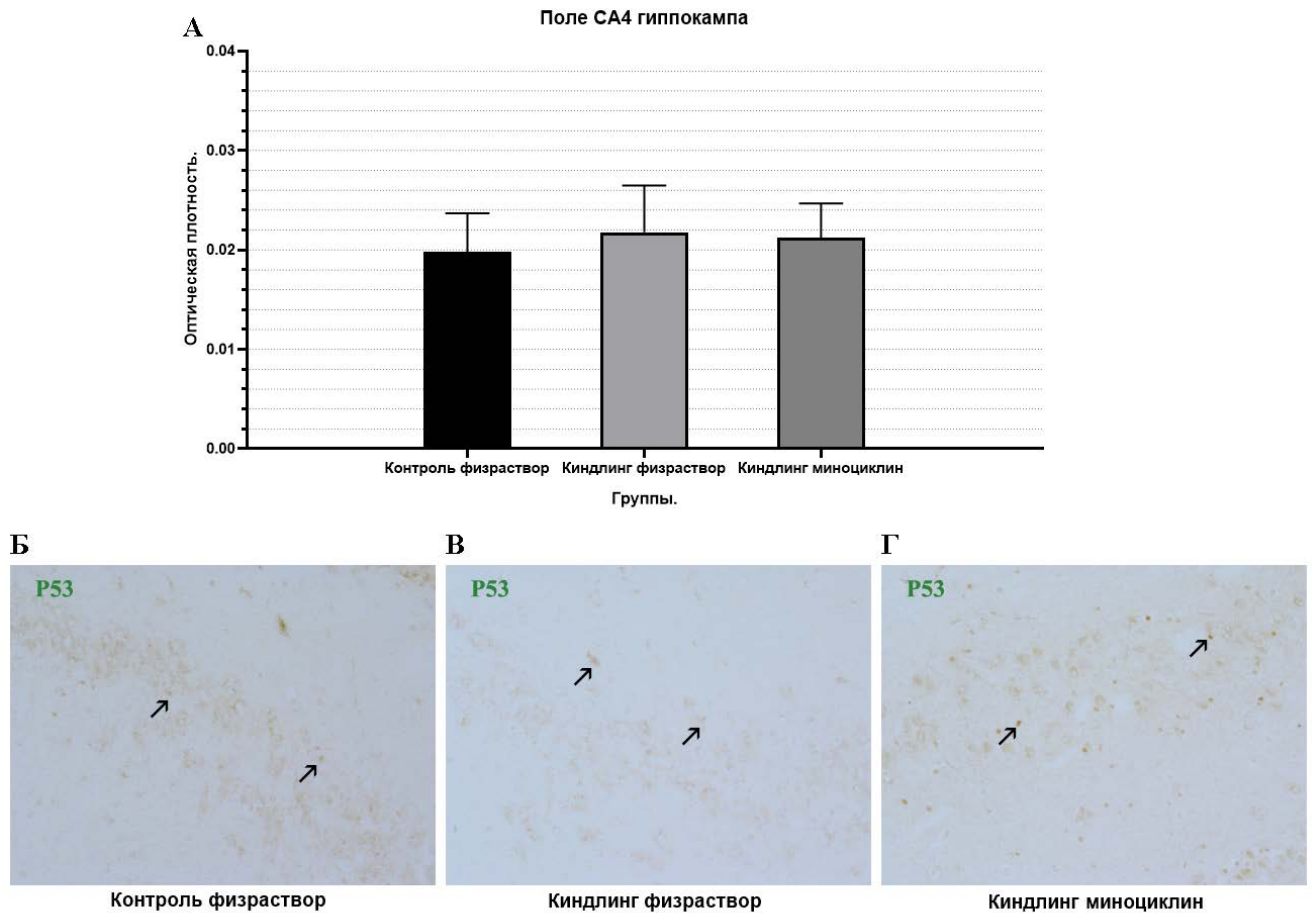


Рисунок 20 – Изменения оптической плотности p53-иммунореактивного материала в клетках поля СА4 гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.

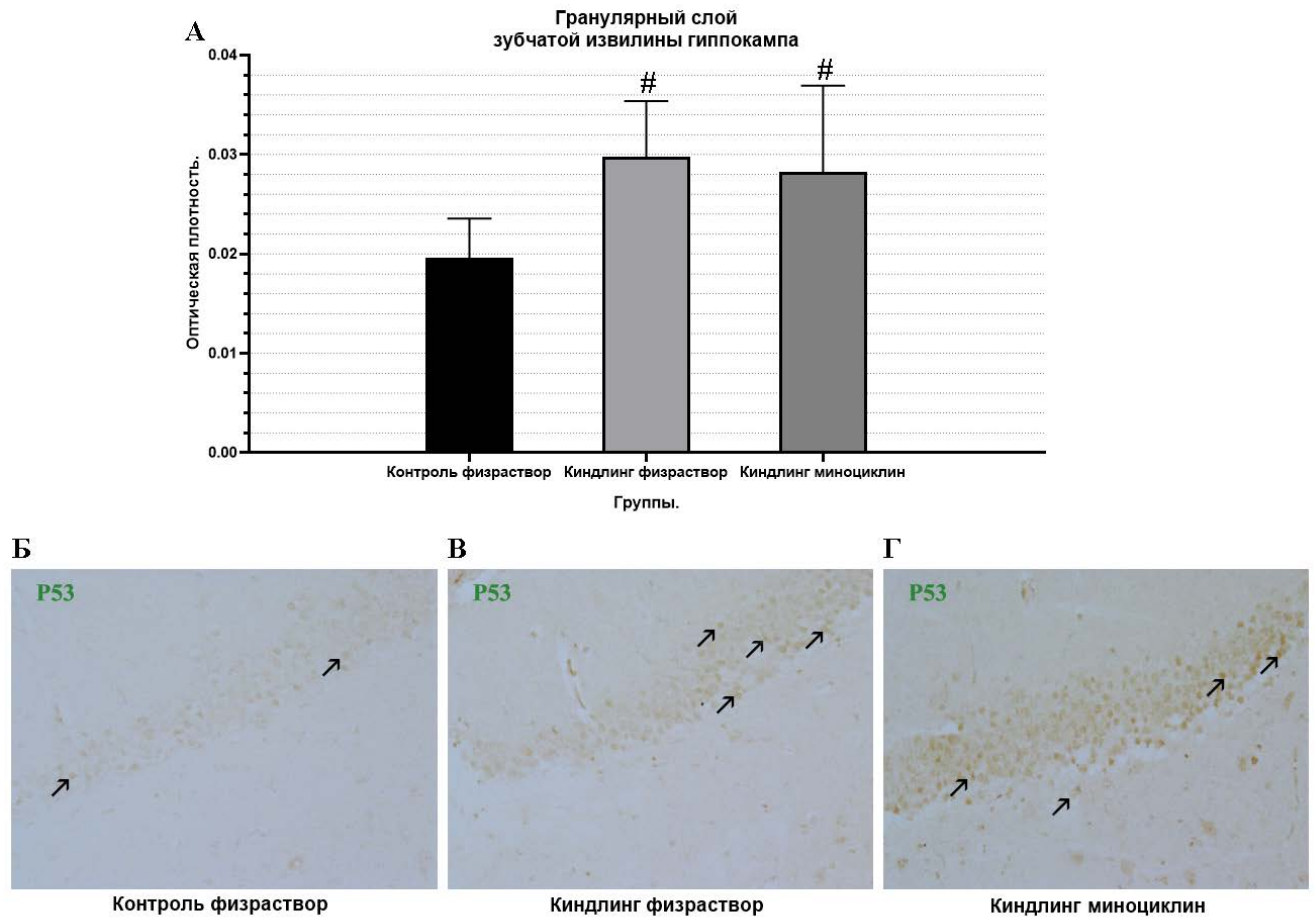


Рисунок 21 – Изменения оптической плотности p53-иммунореактивного материала в клетках гранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.



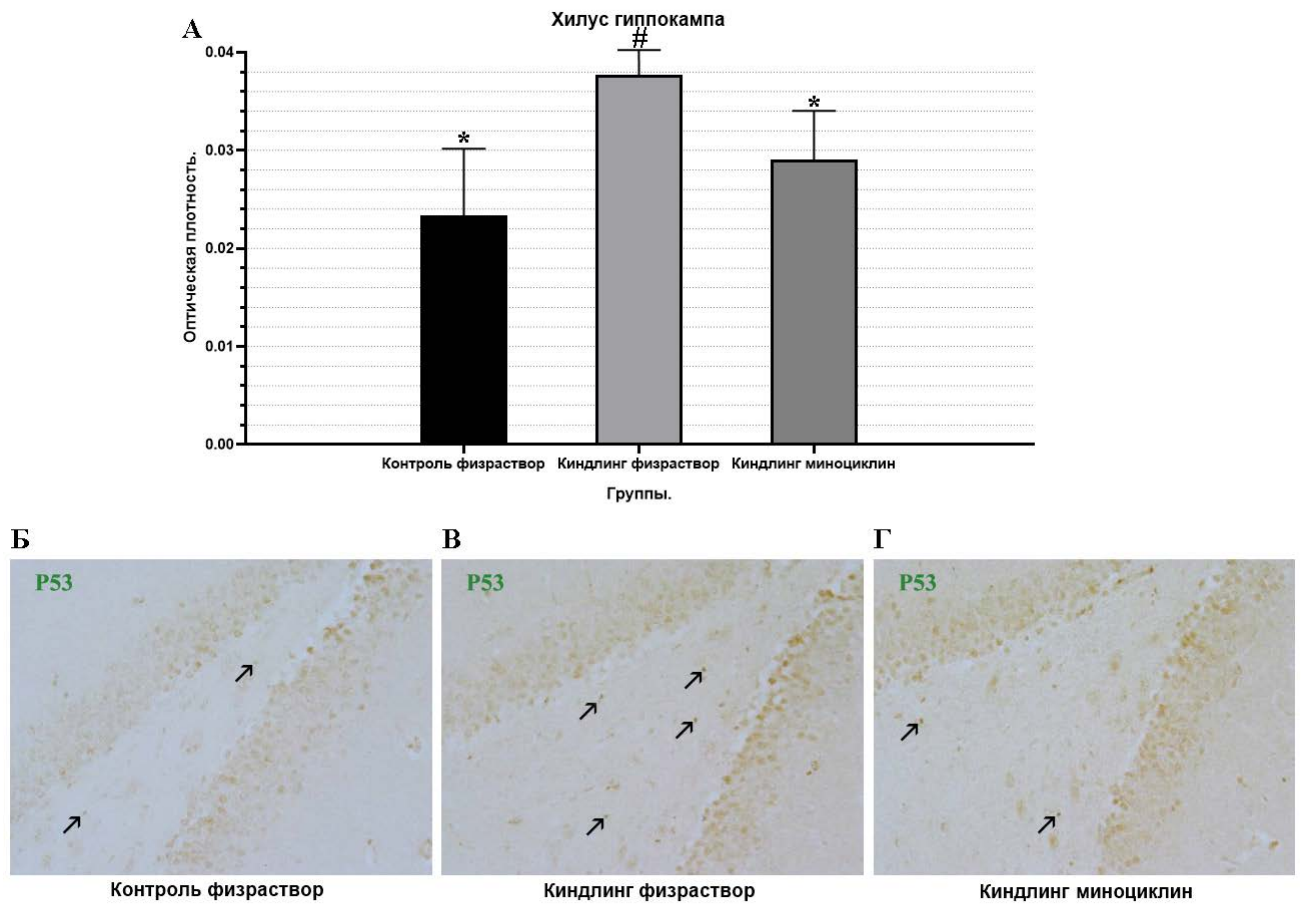


Рисунок 22 – Изменения оптической плотности p53-иммунореактивного материала в клетках хилуса гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление p53+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.



В гранулярном слое зубчатой извилины (рисунок 21 А, Б, В, Г) экспрессия p53 в экспериментальных группах статистически достоверно отличается от контроля в сторону повышения ( $p = 0,0271$ ,  $F = 4,307$ ), при этом положительного эффекта от введения минолексина не прослеживается: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0307$ . Однако уровень апоптоза в поле СА4 и в гранулярном слое зубчатой извилины, как и в других изученных областях мозга, значительно повышается при киндлинге и снижается в группе крыс, подвергшихся киндлингу и получавших минолексин.

В хилусе гиппокампа у животных из группы Киндлинг физраствор (рисунок 22 А, В) наблюдается усиление экспрессии p53, свидетельствующее об активации данного апоптотического пути.

При введении минолексина (рисунок 22 А, Г) наблюдается снижение синтеза данного проапоптотического белка. У животных, получавших минолексин, уровни p53 и апоптоза соответственно, достоверно ниже, по сравнению с группой крыс Киндлинг физраствор ( $p = 0,0009$ ,  $F = 9,881$ ): Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0006$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,1951$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0305$ .

Противовоспалительное и антиапоптотическое действие миноциклина (минолексина) на головной мозг показано в ряде экспериментов других авторов, в их числе с черепно-мозговой травмой и субарахноидальным кровоизлиянием у самцов крыс линии Sprague-Dawley.

Введение миноциклина внутривентриально через 1 час после травмы ослабляло отёк головного мозга и защищало его от воспаления, индуцированного NLRP3-инфламмасомой, которая контролирует созревание и высвобождение провоспалительных цитокинов, особенно интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), и p53-ассоциированного апоптоза. Нужно отметить, что лечение миноциклином в данном случае подавляло экспрессию белка p53 (Li J. et al., 2016).

Лечение миноциклином уменьшило нейровоспаление у мышей и снизило уровень ацетил-p53 в тканях их мозга через активацию белка сиртуина 1 (SIRT1) из семейства гистондеацетилаз класса III (HDAC), который является одним из регуляторов энергетического и метаболического гомеостаза, в том числе модуляции p53 и

подавлении активации микроглии. Дефицит SIRT1 наблюдается при ряде неврологических заболеваний, особенно нейродегенеративных и возрастных (Wu L-H. et al., 2020). Миноциклин также снизил экспрессию p53 при моделировании болезни Паркинсона на линии клеток PC12 обработкой нейротоксином 6-гидроксидофамином, который поражает дофаминергические нейроны. Здесь он проявил себя как мощный антиоксидант (Jiang B-P. et al., 2014). Миноциклин также частично устранил неврологические расстройства у рыбок данио-рерио, вызванные билирубином при моделировании неонатальной желтухи, в том числе за счёт снижения активности p53 (Xiong G. et al., 2024).

Таким образом, фактор транскрипции p53 и опосредованный им путь апоптоза имеют важное значение у крыс линии Крушинского-Молодкиной после аудиогенных судорог во всех исследуемых отделах головного мозга, кроме поля СА4 гиппокампа. Миноциклин эффективно подавляет апоптоз, идущий по этому механизму.

### **3.4 Анализ экспрессии Bcl-2**

Антиапоптотический белок Bcl-2 защищает нейроны от гибели, вызванной окислительным стрессом и другими факторами, экспрессируется в нервной системе в норме и при патологии.

Так, его экспрессия снижается при заболеваниях, связанных с потерей нейронов, и повышается при таких, в патогенез которых вовлечена пролиферация и выживание aberrantных нейронов, в частности эпилепсии и злокачественных новообразованиях.

В таблице 3 представлена средняя оптическая плотность bcl-2-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

На рисунках 23-27 представлено изменение оптической плотности Bcl-2 иммунореактивного материала в клетках исследуемых отделов головного мозга при аудиогенном киндлинге с введением физраствора и минолексина, а также у контрольной группы крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам.

Таблица 3 – Средняя оптическая плотность Bcl-2-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,016 (0,015-0,021)	0,013 (0,010-0,017)	0,017 (0,016-0,018)
Белое вещество	0,014 (0,013-0,015)	0,011 (0,008-0,016)	0,013 (0,012-0,014)
Гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа	0,022 (0,020-0,024)	0,020 (0,014-0,023)	0,018 (0,016-0,019)#
Поле СА4 гиппокампа	0,017 (0,014-0,019)	0,016 (0,010-0,016)	0,014 (0,012-0,015)#
Хилус гиппокампа	0,019 (0,016-0,021)	0,019 (0,018-0,020)	0,016 (0,014-0,018)#

Примечания:

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

В коре височной доли (рисунок 23 А, Б, В, Г) не наблюдается статистически достоверных различий в экспрессии Bcl-2 при киндлинге по сравнению с контрольной группой и при лечении минолексинном по сравнению с группой Киндлинг физраствор ( $p = 0,0698$ ,  $KW = 5,324$ ). В белом веществе (рисунок 24 А, Б, В, Г) статистически достоверных изменений между всеми тремя группами тоже не обнаружено ( $p = 0,1799$ ,  $F = 1,856$ ). В исследованных областях гиппокампа (рисунки 25-27) наблюдается значимое снижение экспрессии Bcl-2 в группе Киндлинг миноциклин по сравнению с контрольной группой. Для поля СА4 ( $p = 0,0399$ ,  $KW = 6,444$ ), тест Данна (Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,4105$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0354$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p > 0,9999$ ). Для гранулярного слоя зубчатой извилины ( $p = 0,0364$ ,  $F = 3,895$ ) (Тест Тьюки: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,3237$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0283$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,4702$ ). И для хилуса соответственно: ( $p = 0,0392$ ,  $F = 3,743$ ).

В нашем эксперименте Bcl-2 не играет существенной роли в снижении уровня апоптоза при введении минолексина в подлежащем белом веществе височной доли и в гиппокампе.

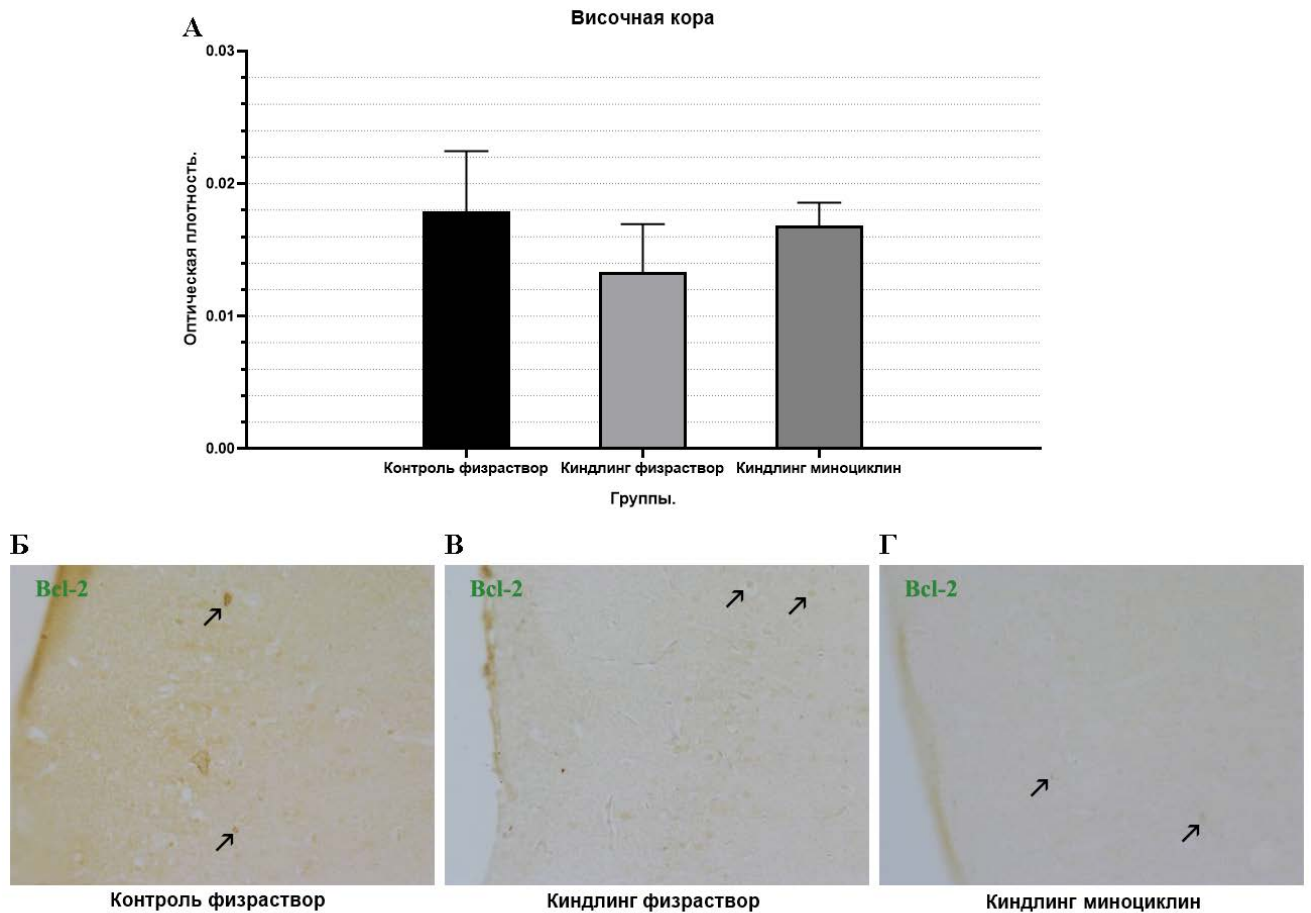


Рисунок 23 – Изменения оптической плотности Bcl-2-иммунореактивного материала в клетках височной коры.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.

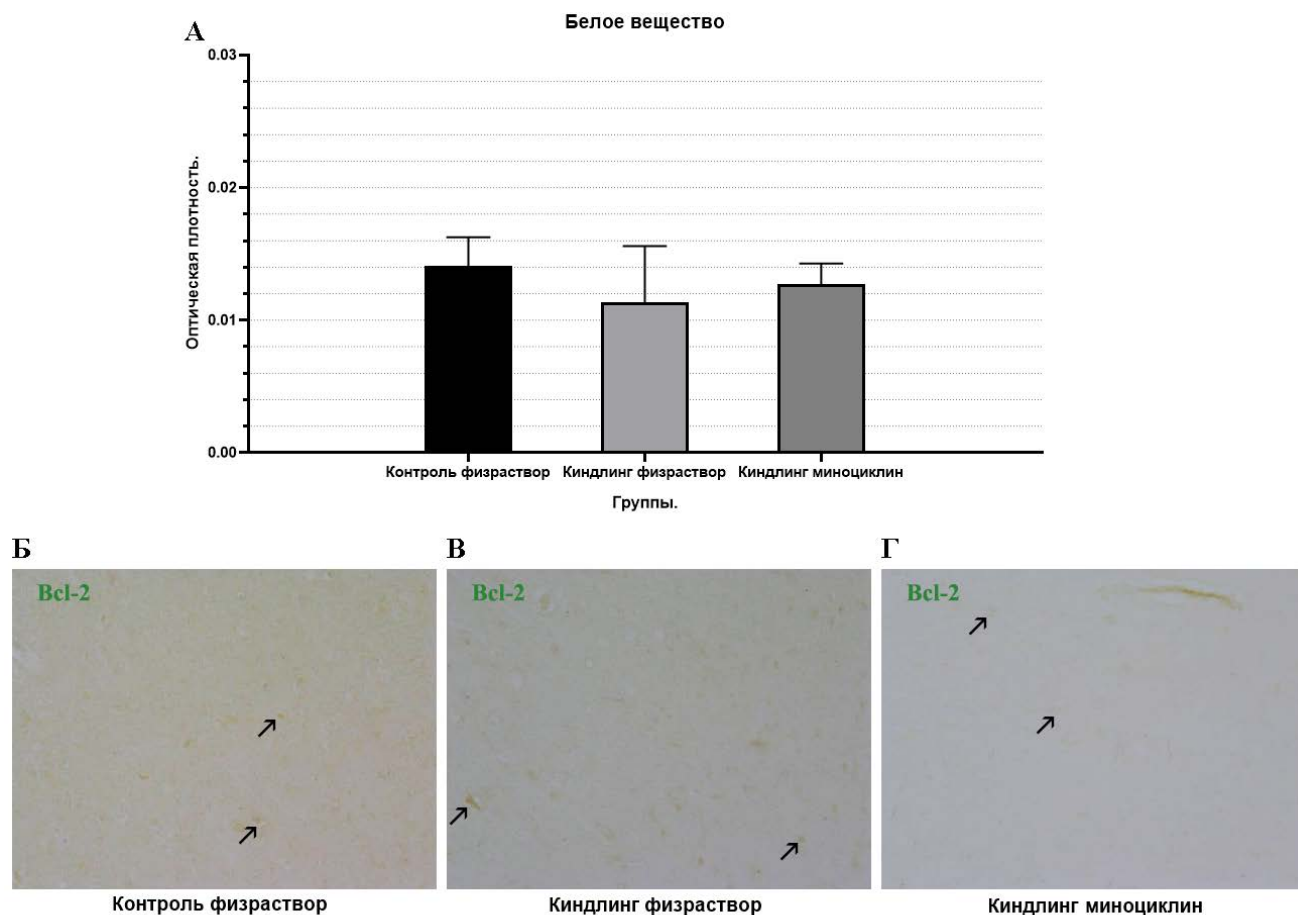


Рисунок 24 – Изменения оптической плотности Bcl-2-иммунореактивного материала в клетках подлежащего белого вещества.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.

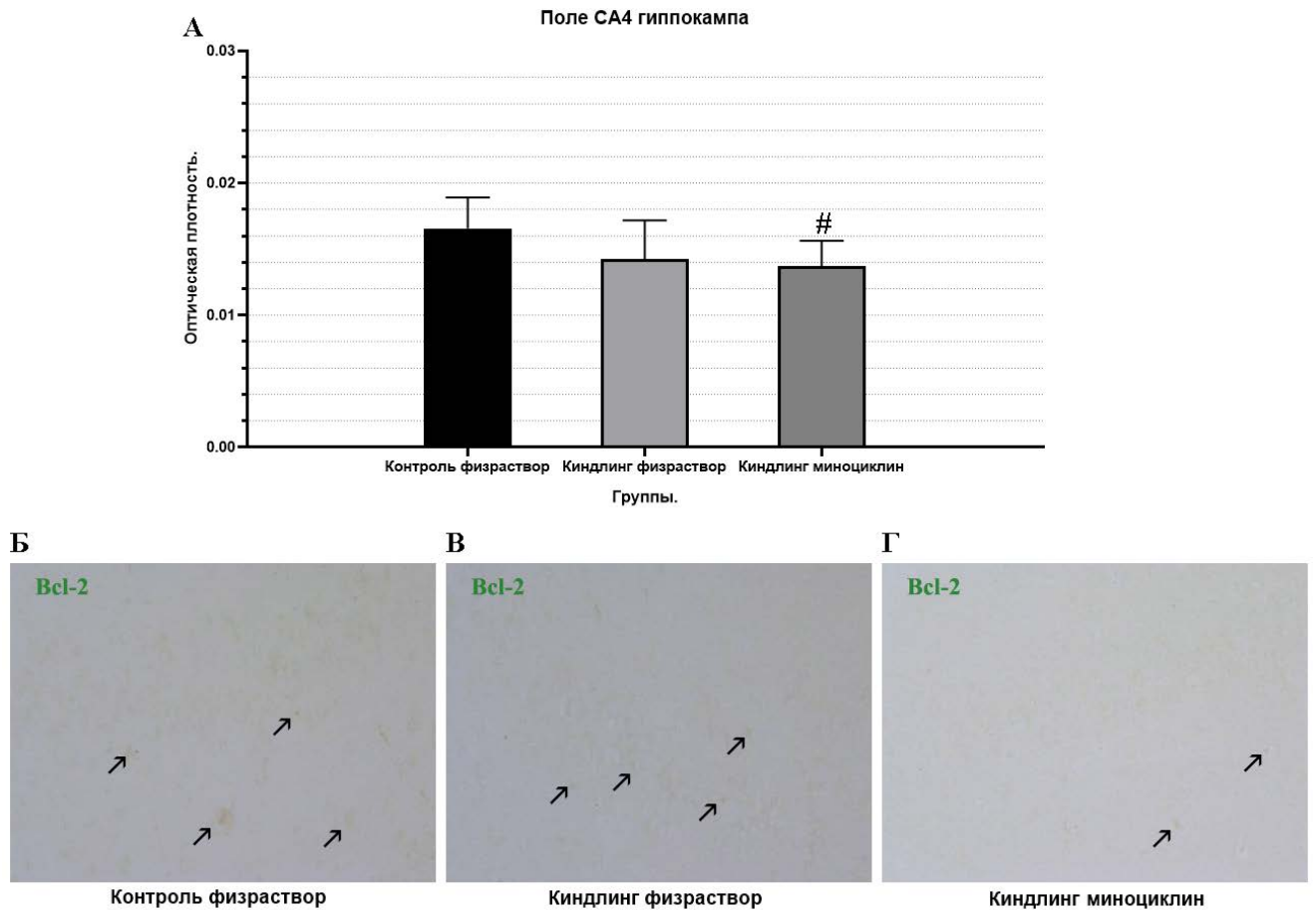


Рисунок 25 – Изменения оптической плотности Bcl-2-иммунореактивного материала в клетках поля СА4 гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.

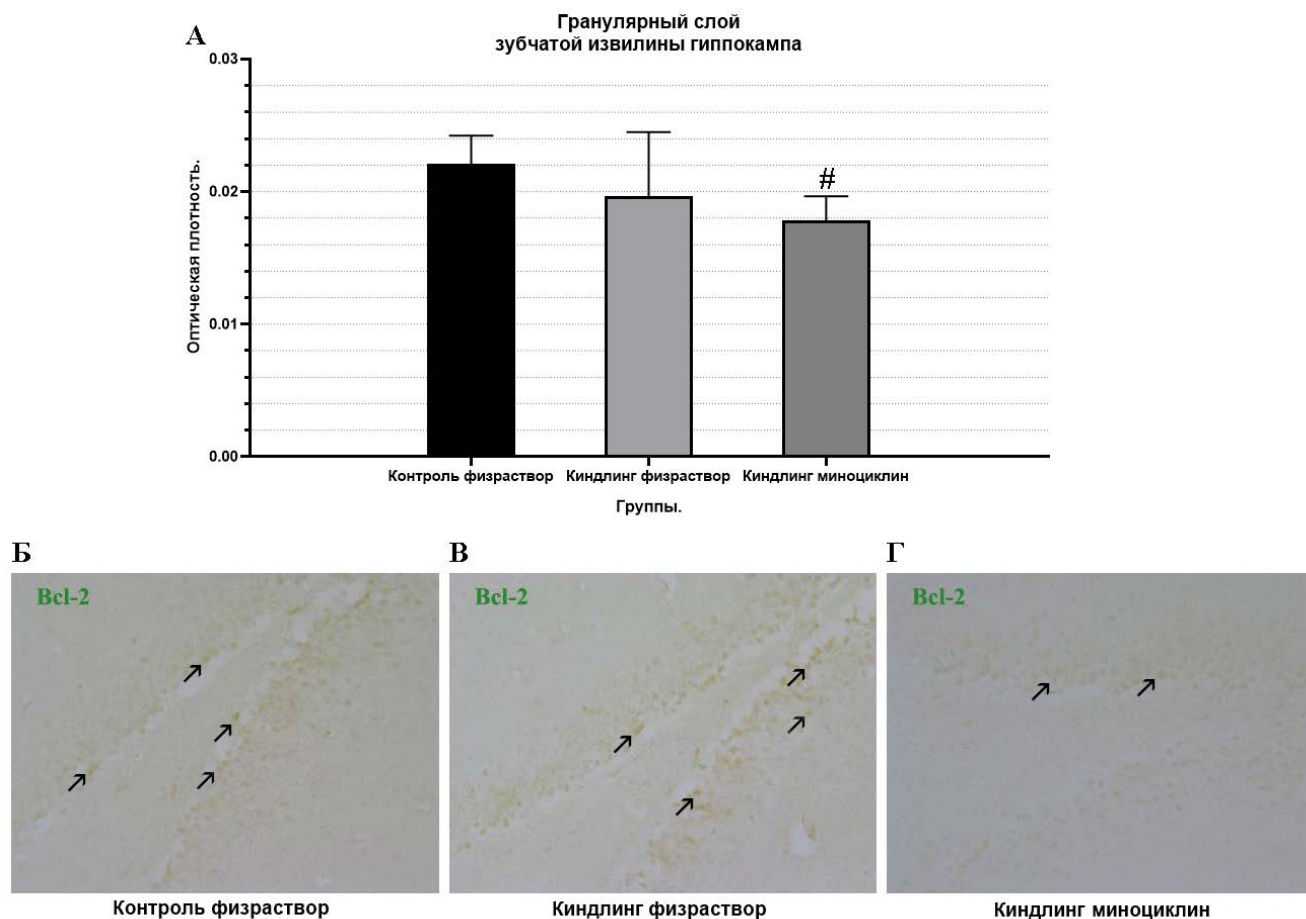


Рисунок 26 – Изменения оптической плотности Bcl-2-иммунореактивного материала в клетках гранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.

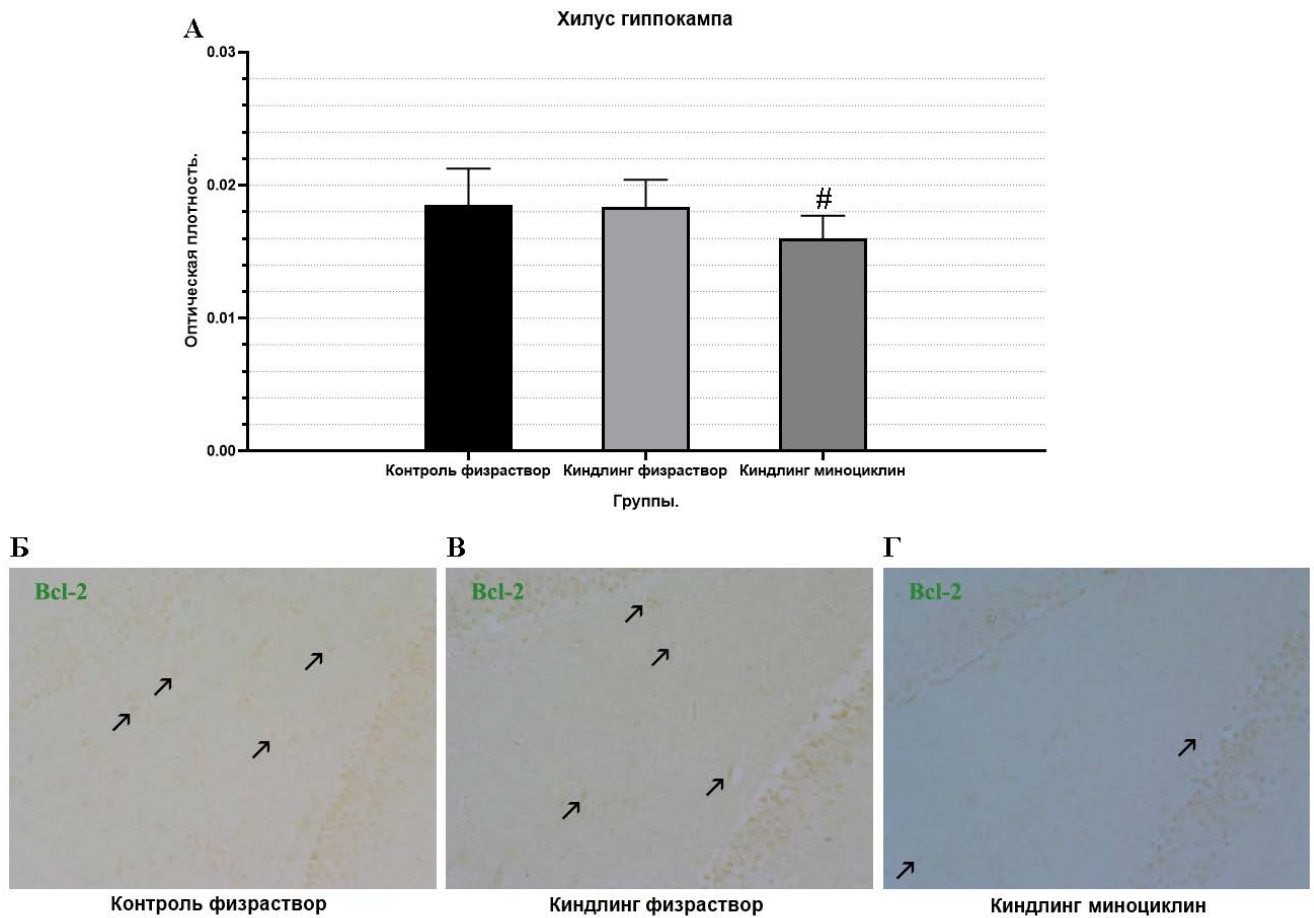


Рисунок 27 – Изменения оптической плотности Bcl-2-иммунореактивного материала в клетках хилуса гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на p53-иммунопозитивные клетки.



Однако в коре височной доли снижение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 может являться одной из причин активации клеточной гибели при длительном киндлинге, а повышение синтеза Bcl-2 при введении минолексина на фоне киндлинга может предохранять клетки от апоптоза. Влияние препаратов тетрациклинового ряда на экспрессию Bcl-2 изучено достаточно слабо не только в головном мозге, но и других органах. В имеющихся исследованиях миноциклин повышал уровни этого белка. При моделировании нейровоспаления у мышей с использованием липополисахарида миноциклин защитил нейроны гиппокампа и когнитивные способности животных, снизив экспрессию BAX и одновременно повысив Bcl-2. Здесь точкой его приложения выступил NOD-подобный рецепторный белок-3 (NLRP3), играющий важную роль при заболеваниях ЦНС (Zhan F. et al., 2024). Эксперимент с крысами линии Вистар с перекручиванием яичников, возникающей из-за этого ишемией и апоптозом показал, что у получавших лечение миноциклином животных повышался уровень экспрессии Bcl-2 (Roshanaee M.K. et al., 2022). В другом эксперименте с крысами Вистар с моделированием глаукомы и перерезки оптического нерва миноциклин также повышал экспрессию антиапоптотического гена bcl-2 и снижал экспрессию проапоптотического bax через 4 часа после трансекции, проявив себя как нейропротектор (Levkovitch-Verbin H. et al., 2014). Так, миноциклин вернул в норму соотношение BAX/Bcl-2 в клетках линии PC12, подвергшихся действию кадмия (Shayan M. et al., 2023) и мышьяка (Shayan M. et al., 2023). При нейродегенерации, вызванной метилфенидатом, известным под торговой маркой «Риталин», у самцов крыс и опосредованной сигнальными путями CREB/BDNF и Akt/GSK3, среди положительных эффектов миноциклина отмечалось повышение уровня Bcl-2. Он действовал на описанные выше сигнальные пути (Motaghinejad M., Motevalian M., 2022). Миноциклин также действует на путь белка, связывающего элемент ответа циклического АМФ (CREB) и нейротрофического фактора мозга (BDNF), проявляя нейропротективные свойства в модели алкогольной нейродегенерации (Motaghinejad M. et al., 2021) и действия никотина у самцов крыс (Motaghinejad M. et al., 2020).

В отличие от p53, антиапоптотический белок Bcl-2 значимой роли при аудиогенных судорогах у данных крыс не играет. Его уровни не меняются при киндлинге и несколько снижаются под действием минолексина в гиппокампе.

### 3.5 Оценка изменений экспрессии каспаз

Каспазы – семейство консервативных аспартат-специфических цистеиновых протеаз, изначально находящихся в клетке в форме неактивных зимогенов и активирующиеся при расщеплении. По функциям они делятся на воспалительные, инициирующие апоптоз, исполнительные и те, роль которых ещё не ясна.

Каспаза-8 относится к тем, что инициируют апоптоз, пироптоз и некроптоз в ответ на внешние сигналы, в том числе при эпилепсии.

На исполнительной каспазе-3 сходятся внешний и внутренний пути апоптоза. Активированная каспаза-3 расщепляет множество субстратов, вызывая характерные для апоптоза изменения, такие как фрагментация ДНК. Каспаза-3 является одним из наиболее изученных регуляторов апоптоза нейронов при эпилепсии.

В таблицах 4 и 5 представлена средняя оптическая плотность CASP-8 и CASP-3-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

Таблица 4 – Средняя оптическая плотность CASP-8-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,94 (0,72-1,3)	0,76 (0,67-0,89)	0,83 (0,47-1,3)
Белое вещество	1,0 (0,82-1,1)	1,0 (0,83-1,2)	0,67 (0,62-0,68)*#
Гиппокамп	1,1 (0,71-1,2)	0,96 (0,60-1,3)	1,1 (0,91-1,6)

Таблица 5 – Средняя оптическая плотность CASP-3-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,93 (0,15-1,9)	1,4 (1,2-1,5)	0,76 (0,45-1,9)
Белое вещество	1,0 (0,72-1,3)	0,64 (0,39-0,83)#	0,61 (0,42-0,70)#
Гиппокамп	1,0 (0,80-1,2)	0,93 (0,46-1,2)	0,74 (0,45-1,1)

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

На рисунке 28 представлено изменение экспрессии каспазы-3 и каспазы-8 в исследуемых отделах головного мозга при аудиогенном киндлинге с введением физраствора и минолексина, а также у контрольной группы крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам.

В височной коре ( $p = 0,4723$ ,  $F = 0,7776$ ), а также гиппокампе ( $p = 0,4858$ ,  $F = 0,7474$ ) изменений экспрессии каспазы-8 не выявлено.

В подлежащем белом веществе её экспрессия при введении минолексина достоверно снижалась, и здесь обнаружены различия как с контрольной группой, так и с животными, подвергавшимися многократному киндлингу и получавшими только физраствор ( $p = 0,0031$ ,  $KW = 11,56$ ): Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p > 0,9999$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0216$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0050$ .

Сходная картина была показана для каспазы-3. В височной коре головного мозга крыс статистически значимых изменений уровня экспрессии каспазы-3 не зафиксировано, хотя есть тенденция к его повышению при киндлинге и некоторому снижению при введении минолексина ( $p = 0,3266$ ,  $F = 0,7296$ ).

В подлежащем белом веществе зафиксировано статистически значимое снижение экспрессии каспазы-3 при киндлинге независимо от того, получали ли крысы минолексин, по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,0123$ ,  $F = 5,457$ ): Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0231$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0257$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,9987$ .

В гиппокампе значимых изменений уровня экспрессии каспазы-3 не выявлено ( $p = 0,479$ ,  $F = 0,7624$ ) вне зависимости от наличия или отсутствия многократных эпилептических припадков и введения минолексина.

Выявлено тканеспецифичное воздействие минолексина на экспрессию каспазы-8 и каспазы-3. В подлежащем белом веществе минолексин оказывает супрессирующее действие на экспрессию каспаз, а в височной коре и гиппокампе исследуемый препарат на их экспрессию не влияет. Исходя из этого, можно предположить, что в исследуемых отделах мозга апоптоз опосредуется различными механизмами, в том числе каспазозависимыми, либо экспрессия данных каспаз у крыс линии Крушинского-Молодкиной изначально повышена.

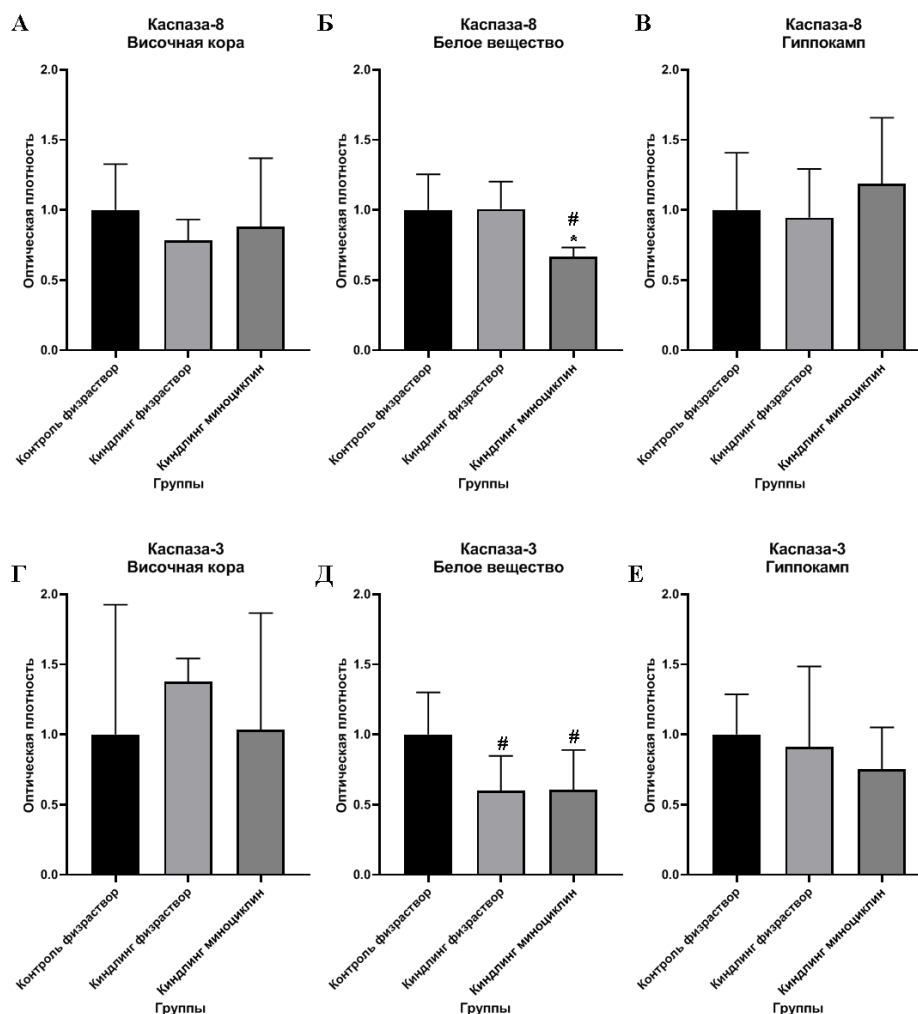


Рисунок 28 – Анализ экспрессии каспаз-8 и -3 в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

А – изменения экспрессии каспазы-8 в височной коре,

Б – изменения экспрессии каспазы-8 в подлежащем белом веществе,

В – изменения экспрессии каспазы-8 в гиппокампе,

Г – изменения экспрессии каспазы-3 в височной коре,

Д – изменения экспрессии каспазы-3 в подлежащем белом веществе,

Е – изменения экспрессии каспазы-3 в гиппокампе.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Таким образом, наши данные в целом совпадают с работами других авторов, согласно которым минолексин может снижать экспрессию каспазы-3, что было показано в ряде экспериментов, в том числе и в нашем, но только в подлежащем белом веществе височной доли, где имеет место каспазозависимый путь апоптоза. В случае височной коры и гиппокампа, где не обнаружено повышения экспрессии каспаз, минолексин не приводит, соответственно, к их снижению ниже базового уровня.

В другом эксперименте с повреждением сетчатки глаз крыс светом наблюдался каспазозависимый путь апоптоза, и активность каспазы-3 в повреждённой ткани увеличивалась, а при профилактическом введении миноциклина (30 и 45 мг/кг) и после лечения (45 мг/кг) исследуемые показатели были ниже, чем у непролеченных животных, меньше были и повреждения фоторецепторов (Chang C-J. et al., 2005). В случае с генетической моделью болезни Гентингтона у мышей после ишемии миноциклин ингибировал каспазу-1 и каспазу-3, задерживая прогрессирование симптомов (Chen M. et al., 2000). С помощью миноциклина удалось заблокировать активацию каспазы-3, защитив волосковые клетки внутреннего уха крыс линии Sprague-Dawley от токсического воздействия антибиотика гентамицина (Wei X. et al., 2005).

Миноциклин может ингибировать также каспазу-8, что выявлено нами в подлежащем белом веществе височной доли головного мозга крыс, и в эксперименте других авторов по оценке его воздействия на клетки линии P12, обработанные мышьяком. При воздействии мышьяка жизнеспособность клеток существенно снижалась, внутриклеточный окислительный баланс нарушался, а уровни каспазы-8 и каспазы-3 повышались. Миноциклин не только ослабил цитотоксичность, вызванную мышьяком, и уменьшил окислительный стресс, но также снизил экспрессию данных каспаз (Shayan M. et al., 2023). Гибель дофаминергических нейронов чёрной субстанции, связанная с массивным астроглиозом и активацией микроглии – характерная черта болезни Паркинсона, а сама глия играет роль и в случае других нейродегенеративных заболеваний. При болезни Паркинсона сообщалось об активации протеаз, таких как каспаза-3 и каспаза-8. Перспективным методом помощи таким больным может стать применение ингибиторов каспаз. В их число вошёл миноциклин, уменьшив активацию глии и защитив чёрную субстанцию подопытных животных (Hirsch E.C. et al., 2003).

Хотя миноциклин может снижать экспрессию каспаз, и в нашем эксперименте продемонстрировал это свойство в случае с каспазой-8 в белом веществе, другие

полученные результаты позволяют предположить, что в головном мозге крыс линии Крушинского-Молодкиной задействованы в основном каспазозависимые механизмы апоптоза.

### 3.6 Определение экспрессии глиального фибриллярного кислого белка

GFAP – специфический маркер астроцитов, белок промежуточных филаментов, присутствующий в зрелых глиальных клетках этого типа. Чрезмерное повышение его экспрессии является маркером реактивного глиоза (Brenner M., Messing A. 2021). На рисунке 17 представлено изменение оптической плотности GFAP иммунореактивного материала в клетках исследуемых отделов головного мозга при аудиогенном киндлинге с введением физраствора и минолексина, а также у контрольной группы крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам.

В таблице 6 представлена средняя оптическая плотность GFAP-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile). На рисунках 29-33 представлено изменение оптической плотности GFAP+ иммунореактивного материала в клетках исследуемых отделов головного мозга при аудиогенном киндлинге с введением физраствора и минолексина, а также у контрольной группы крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам.

Таблица 6 – Средняя оптическая плотность GFAP-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,20 (0,18-0,21)	0,25 (0,23-0,27)#	0,23 (0,22-0,26)#
Белое вещество	0,25 (0,23-0,27)	0,27 (0,26-0,30)#	0,28 (0,27-0,30)#
Гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа	0,20 (0,16-0,21)	0,22 (0,21-0,24)	0,23 (0,22-0,24)
Поле СА4 гиппокампа	0,28 (0,26-0,29)	0,27 (0,25-0,29)#	0,28 (0,26-0,29)#
Хилус гиппокампа	0,27 (0,24-0,28)	0,25 (0,23-0,30)	0,26 (0,26-0,29)

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

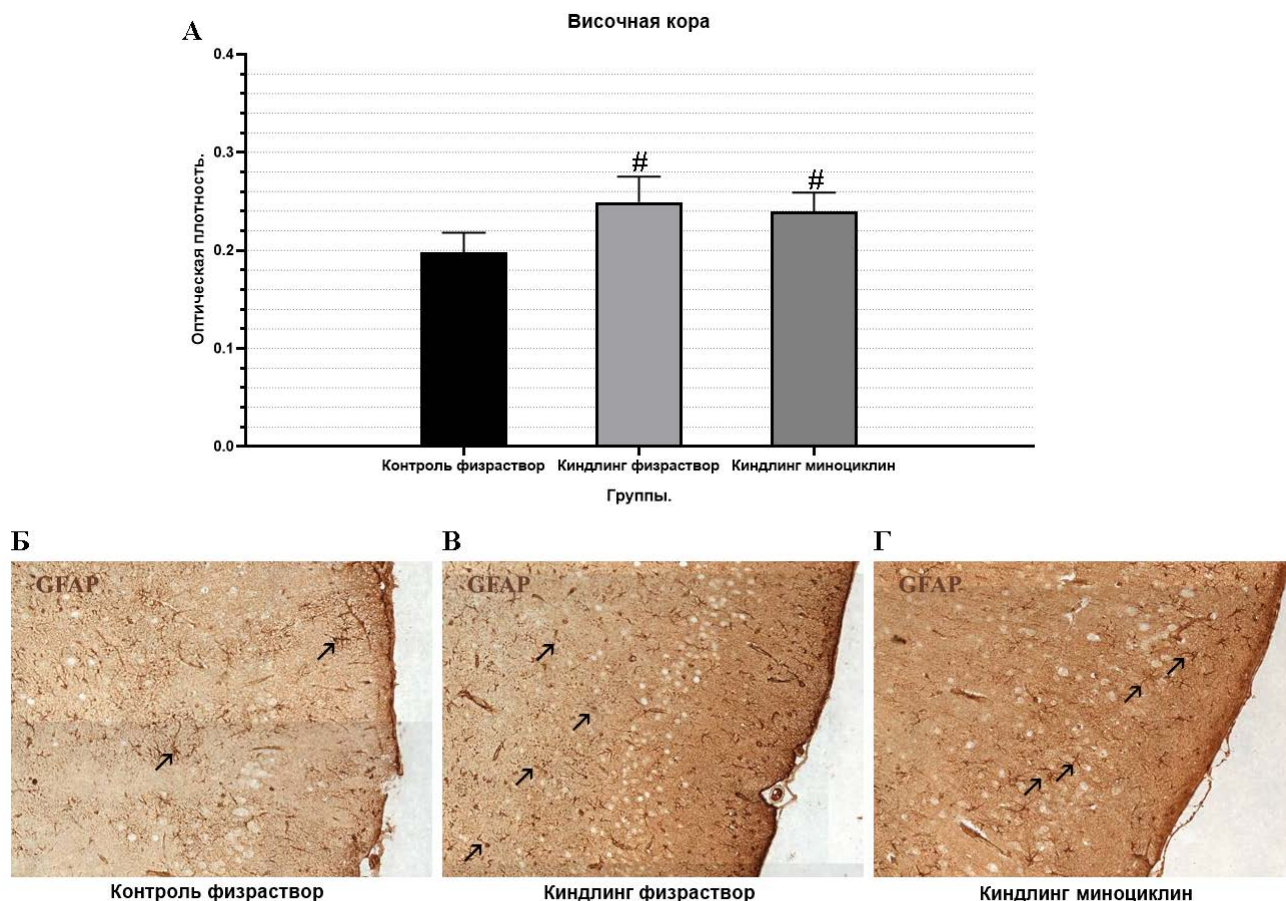


Рисунок 29 – Изменения оптической плотности GFAP-иммунореактивного материала в астроцитах височной коры.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление GFAP+ а в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на GFAP-иммунопозитивные астроциты.



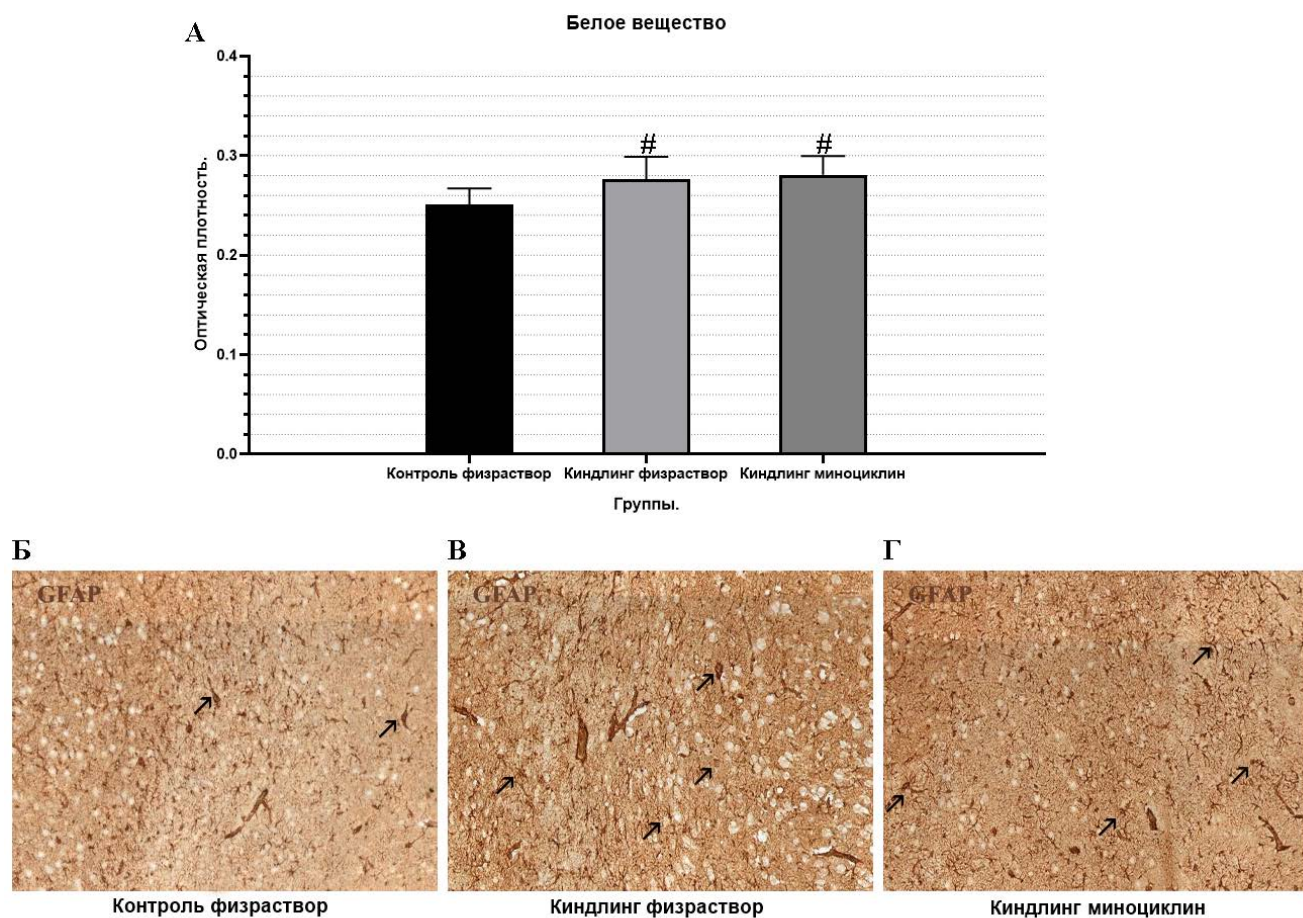


Рисунок 30 – Изменения оптической плотности GFAP-иммунореактивного материала в астроцитах белого вещества.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на GFAP-иммунопозитивные астроциты.



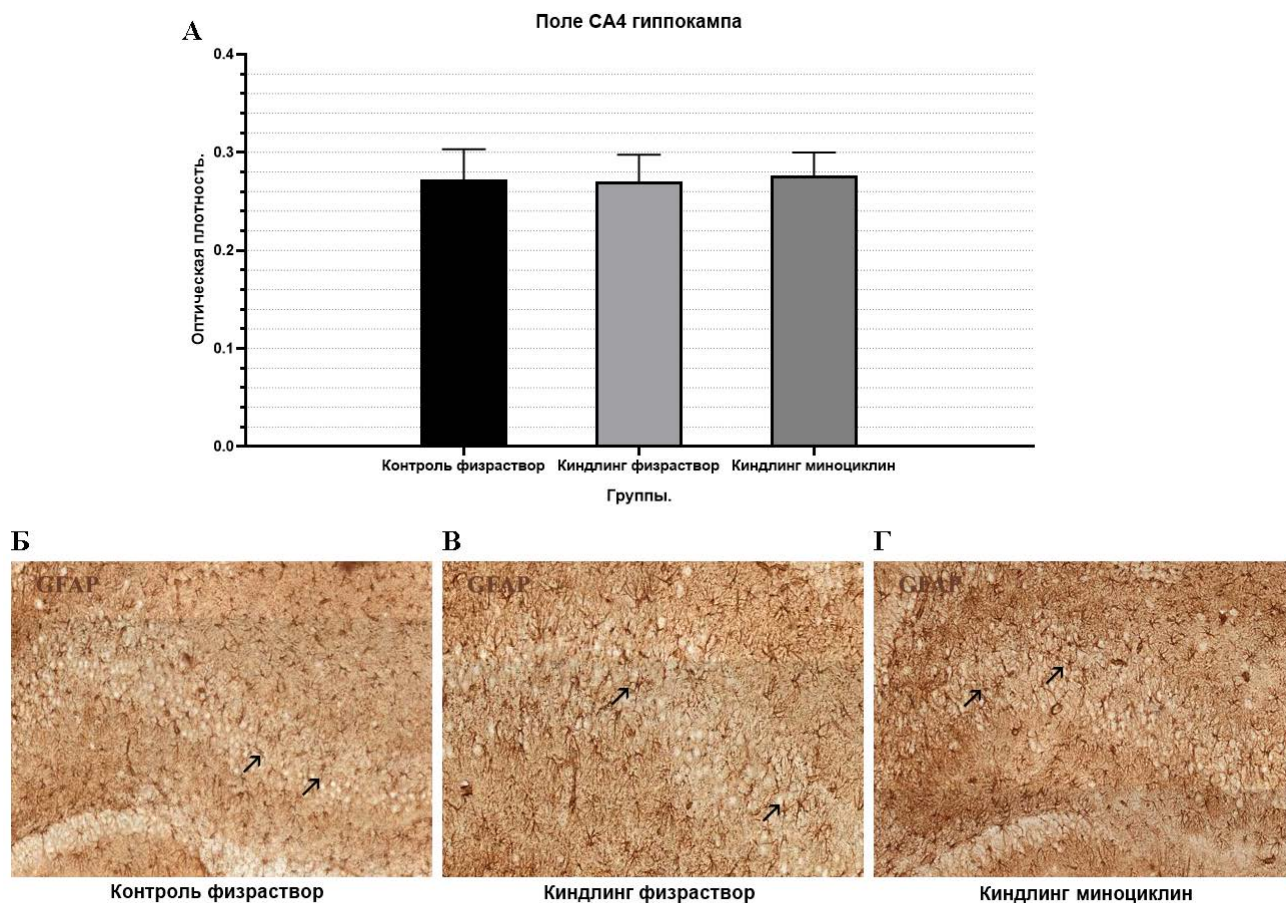


Рисунок 31 – Изменения оптической плотности GFAP-иммунореактивного материала в астроцитах поля СА4 гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на GFAP-иммунопозитивные астроциты.

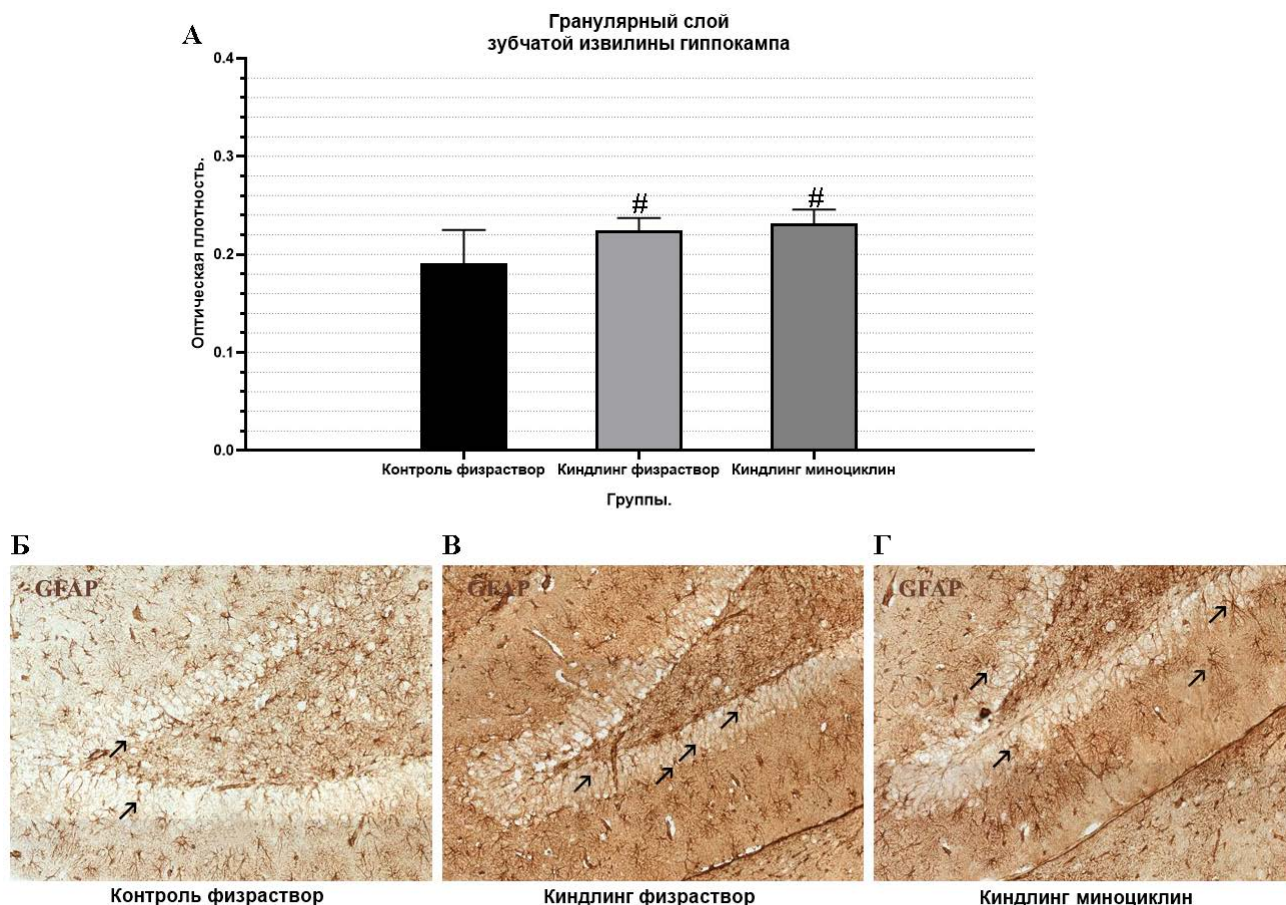


Рисунок 32 – Изменения оптической плотности GFAP-иммунореактивного материала в астроцитах гранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на GFAP-иммунопозитивные астроциты.

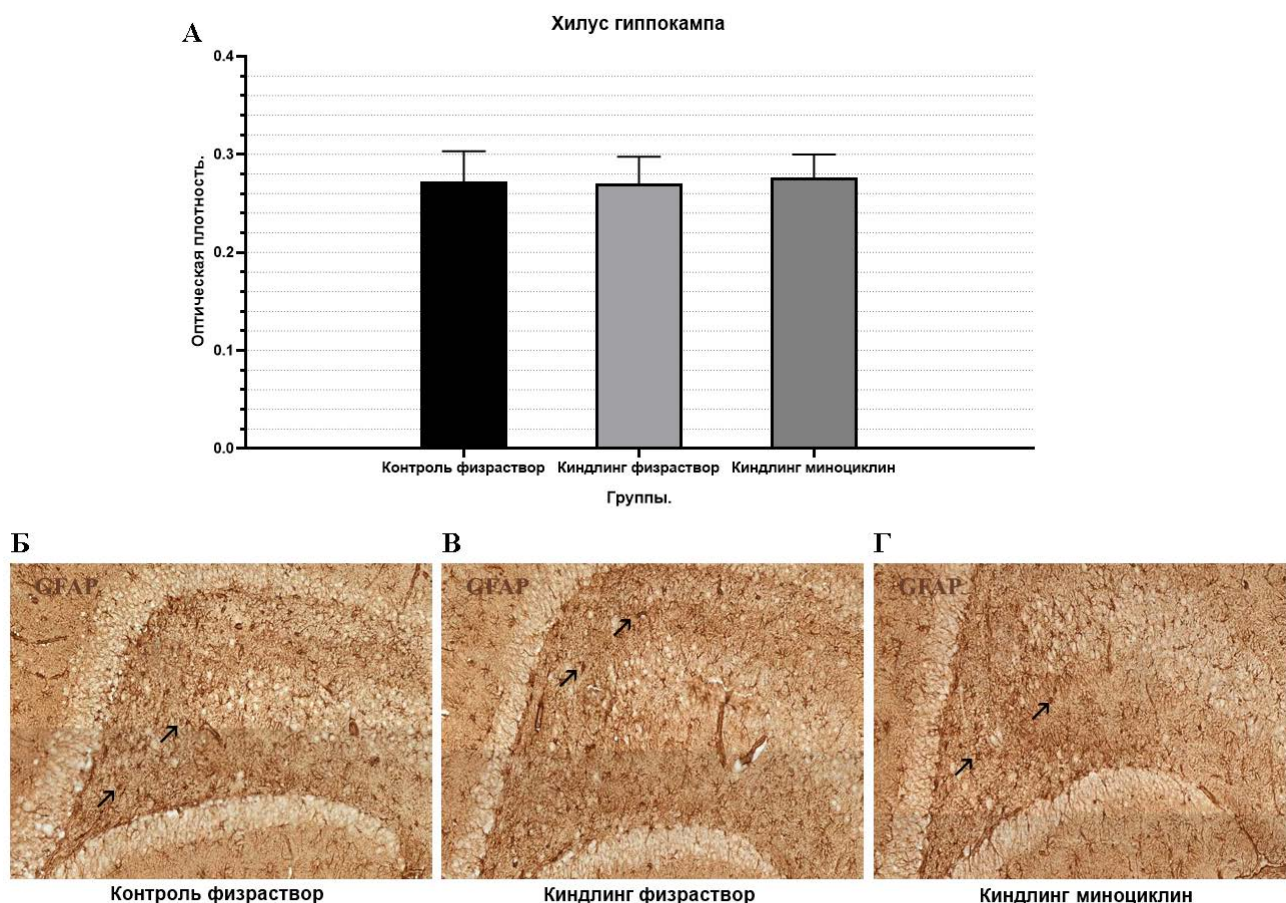


Рисунок 33 – Изменения оптической плотности GFAP-иммунореактивного материала в астроцитах хилуса гиппокампа.

А – график, отражающий изменение оптической плотности.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

По оси ординат: оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Б – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Контроль физраствор,

В – иммуногистохимическое выявление Bcl-2+ клеток в группе Киндлинг физраствор,

Г – иммуногистохимическое выявление GFAP+ клеток в группе Киндлинг миноциклин.

Проявление DAB. Стрелки указывают на GFAP-иммунопозитивные астроциты.



В височной коре животных, подвергшихся киндлингу и получавших физраствор (рисунок 29 А, В), наблюдается статистически значимый ( $p = 0,0002$ ,  $F = 13,05$ ) рост экспрессии GFAP (увеличение количества астроцитов) по сравнению с контролем (рисунок 29 А, Б), соотносящийся с повышением уровня апоптоза в данной области. Таким образом, у крыс линии Крушинского-Молодкиной при длительном аудиогенном киндлинге развивается типичный для эпилепсии астроглиоз. При введении минолексина (рисунок 29 А, Г) также наблюдается развитие глиоза, статистически значимых изменений по сравнению с группой Киндлинг физраствор не выявлено. Апостериорные сравнения подтверждают это: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0006$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0022$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,6793$ .

Аналогичные изменения наблюдаются и в подлежащем белом веществе. Экспрессия GFAP усиливается в группах животных, получавших физраствор (рисунок 30 А, В) либо минолексин (рисунок 30 А, Г), и подвергшихся киндлингу, и статистически значимо отличается от контрольной группы (рисунок 30 А, Б), получавшей физраствор ( $p = 0,0058$ ,  $F = 6,563$ ). Таким образом, введение минолексина эффекта на активацию астроцитов не оказало: Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0005$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0011$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,6471$ .

В поле СА4 гиппокампа (рисунок 31) статистически значимых различий в экспрессии GFAP у всех трёх групп крыс выявлено не было ( $p = 0,9113$ ,  $F = 0,09334$ ): Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,9845$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,9621$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,9079$ .

В гранулярном слое зубчатой извилины экспрессия GFAP достоверно возрастала после киндлинга (рисунок 32 А, В) ( $p = 0,0034$ ,  $F = 7,565$ ), но введение минолексина при киндлинге не оказывало эффекта на уровень глиоза (рисунок 32 А, Г): Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,0307$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,0033$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,8436$ .

В хилусе гиппокампа уровни экспрессии GFAP остались неизменными, какие бы манипуляции с животными ни проводились, будь то киндлинг с введением физраствора или препарата (рисунок 33). Различий в уровне глиоза в этой области мозга не выявлено

( $p = 0,9113$ ,  $F = 0,09334$ ): Контроль физраствор и Киндлинг физраствор  $p = 0,9845$ , Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,9621$ , Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин  $p = 0,9079$ .

Подобные результаты могут быть объяснены изначально высокой активацией астроцитов и уровнем реактивного астроглиоза, связанными с генетическими особенностями данной линии крыс.

В ходе наших экспериментов было выявлено повышение экспрессии GFAP в височной коре, подлежащем белом веществе и гранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа, что согласуется с данными о повышении уровня апоптоза в этих областях, так как активированные астроциты производят провоспалительные и проапоптотические молекулы. В поле СА4 хилусе и гиппокампа на уровень экспрессии GFAP не влияли никакие манипуляции с животными. Во всех рассмотренных областях головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной введение минолексина не оказывало действия на экспрессию GFAP, а, следовательно, активацию астроцитов и формирование глиоза. Сопоставление наших результатов с данными литературы осложнено тем, что исследований о влиянии минолексина на экспрессию GFAP и астроцитарный глиоз имеется не так много, так как основной его мишенью здесь является микроглия. Но, согласно им, миноциклин может снижать экспрессию GFAP. Показано, что миноциклин обладает долгосрочным нейропротективным эффектом в моделях сосудистых когнитивных нарушений у крыс, предотвращая не только гибель нейронов, но и развитие астроглиоза, введение миноциклина уменьшает тяжесть последствий гепатэктомии. Уровни GFAP в тканях гиппокампа соответствовали степени ухудшения пространственной памяти. Отмечено, что миноциклин в данном случае был способен воздействовать непосредственно на активацию GFAP (Jin W-J. et al., 2014).

При изучении влияния липополисахарида на активацию астроцитов и развитие когнитивной дисфункции у мышей установлено, что введение миноциклина не даёт развиваться серьёзным когнитивным нарушениям. При лечении миноциклином число GFAP-позитивных клеток в гиппокампе было ниже по сравнению с группой, которая не получала его при введении липополисахарида. Авторы заключают, что миноциклин подавлял активацию астроцитов и микроглии (Hou Y. et al., 2016).

В другом эксперименте с липополисахаридом оценивали повреждение префронтальной коры головного мозга 50 взрослых самцов крыс линии Sprague-Dawley

и изучали эффекты миноциклина на активацию микроглии и астроцитов, а также окислительный стресс. После введения липополисахарида наблюдался рост уровней GFAP, а после введения миноциклина он снижался, т.е. препарат предотвращал активацию астроцитов (Qaid E.Y.A. et al., 2024).

На крысиной модели гидроцефалии самцам крыс линии Sprague-Dawley вводили каолин, а затем одну из групп таких животных лечили миноциклином, который вводили внутривентрикулярно в дозе 45 мг/кг/день в течение 7 дней, начиная с 15-го дня после инъекции и заканчивая на 21-й день с окончанием эксперимента. В группе животных с гидроцефалией экспрессия GFAP была выше, чем в контрольной, где крысы получали физраствор. Лечение миноциклином значительно снизило экспрессию GFAP и тяжесть гидроцефалии у крыс в сравнении с не получавшими препарат животными (Xu H. et al., 2012).

Также имеются данные о способности миноциклина подавлять активацию астроцитов и снижать экспрессию GFAP у людей при рассеянном склерозе. 142 участника были рандомизированы для приёма миноциклина в дозе 100 мг два раза в день или плацебо с первичным результатом конверсии в рассеянный склероз в течение 6 месяцев после рандомизации. Миноциклин значительно снизил риск конверсии при рассеянном склерозе на 54%. Введение миноциклина также значительно снизило уровни GFAP через 6 месяцев лечения (Camara-Lemarroy C. et al., 2022). Эффекты миноциклина на астроциты гиппокампа продемонстрированы в эксперименте с литий-пилокарпиновым эпилептическим статусом у 24 самцов крыс линии Sprague-Dawley. В группах животных с эпилептическим статусом с лечением и без него наблюдалось значительное повышение числа GFAP-положительных астроцитов по сравнению с контрольными. В случае с CA1 наибольшее число таких астроцитов было именно в группе эпилептический статус+миноциклин, но и в случае с зубчатой извилиной статистически значимых различий между опытными группами не было (Bulduk E.B. et al., 2019).

Минолексин может снижать уровень глиоза и экспрессию GFAP, но в нашем эксперименте его экспрессия и, соответственно, уровни глиоза в исследуемых областях не повышались при киндлинге. Миноциклин не снизил экспрессию GFAP. Возможно, расхождение результатов с имеющимися литературными данными обусловлено особенностями модели.

### 3.7 Анализ экспрессии FAS

На рисунке 18 (А, Б, В) соответственно представлены данные измерения оптической плотности, отражающие уровни экспрессии FAS в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам, при длительном киндлинге и введении минолексина. На рисунке 18 (Г, Д, Е) также представлены фотографии электрофореза белков клеточного лизата для височной коры, подлежащего белого вещества и гиппокампа, а также контроля с тубулином для каждой структуры.

В таблице 7 и на рисунке 34 представлена средняя оптическая плотность FAS-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

Таблица 7 – Средняя оптическая плотность FAS-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,84 (0,53-1,3)	2,1 (1,3-2,8) #	0,96 (0,77-1,4)
Белое вещество	0,45 (0,27-0,53)	0,51 (0,28-0,82)	0,77 (0,42-1,2)
Гиппокамп	0,54 (0,42-0,68)	0,78 (0,59-1,1)	1,4 (1,1-1,5) *#

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

В височной коре головного мозга крыс обнаружены статистически значимые различия между группами ( $p = 0,0308$ ;  $F = 5,249$ ). При киндлинге экспрессия FAS значимо повышается по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,0386$ ), что говорит о повышении экспрессии FAS при экспериментальной эпилепсии. При введении минолексина наблюдается тенденция к снижению экспрессии FAS, но она не носит статистически значимый характер ( $p = 0,941$ ) при уровне значимости  $p = 0,05$  (рисунок 34 А и Г). В подлежащем белом веществе головного мозга статистически значимых различий между тремя группами не выявлено ( $p = 0,2311$ ;  $F = 1,731$ ) (рисунок 34 Б и Д). В гиппокампе (рисунки 34 В и Е) статистически значимые различия между группами выявлены ( $p = 0,0026$ ;  $F = 12,36$ ). При введении минолексина экспрессия FAS значимо повышается как по сравнению с группой Контроль физраствор ( $p = 0,0021$ )

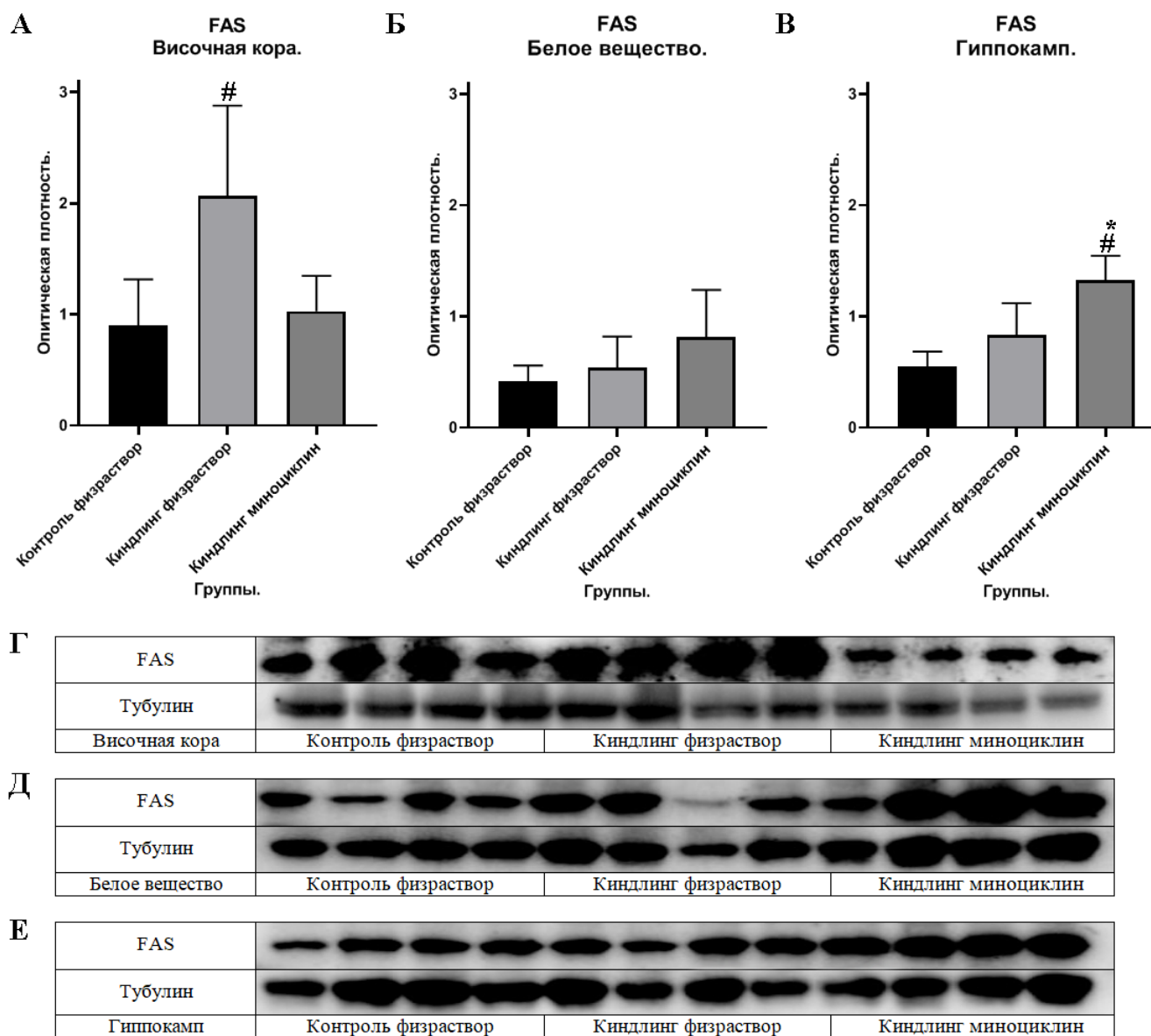


Рисунок 34 – Графики изменения оптической плотности FAS-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс линии

Крушинского-Молодкиной: А – в коре височной доли,

Б – в подлежащем белом веществе, В – в гиппокампе.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Результаты оценки экспрессии FAS методом вестерн-блоттинга в:

Г – в коре височной доли, Д – в подлежащем белом веществе, Е – в гиппокампе.



и Киндлинг физраствор.

Таким образом, разные отделы головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной демонстрируют разную реакцию как на киндлинг, так и на введение минолексина. Реакция на его введение наблюдается в наиболее чувствительных к эпилепсии зонах височной коры и гиппокампа, но не белого вещества.

Наши данные, хотя и не полностью согласуются с имеющимися по другим модельным животным и пациентам с эпилепсией, но подтверждены в рамках исследуемой модели крыс линии Крушинского-Молодкиной, о чём говорит ограниченная роль каспаз в апоптозе у данных крыс. Экспрессия FAS наблюдается в гиппокампе и в норме. На примере его активируемой оптогенетически формы (optoFAS) показано, что здесь FAS в незрелых нейронах зубчатой извилины запускает активацию мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) и последующую секрецию нейротрофического фактора мозга. Повторная активация этого пути приводит к пролиферации нейрональных стволовых клеток и временному увеличению пространственной рабочей памяти у мышей. Таким образом, в норме FAS выступает как регулятор нейрогенеза и памяти у взрослых млекопитающих. Также признана ключевая роль FAS в выживании нейрональных стволовых клеток и их дифференцировке. В нашем эксперименте вероятность активации FAS в гиппокампе при эпилепсии не находит подтверждения, и, возможно, это связано с генетическими особенностями данных крыс и изначальной активацией пути FAS–FADD, отражающей особенности аберрантного нейрогенеза. К тому же ингибирование FAS не всегда может быть полезно. В других экспериментах с мышами с дефицитом FAS или нокаутом его гена наблюдалось как улучшение, так и ухудшение когнитивных функций. Несмотря на хорошо известную повышенную экспрессию FAS при заболеваниях ЦНС, пока нет цельного понимания, как, почему и в каких случаях работает сигнализация FAS и как он влияет на тяжесть заболевания. Однако при большинстве заболеваний мозга отмечена сверхэкспрессия, а не дефицит FAS (Kim S. et al., 2020). Возможно, это обстоит так у крыс линии Крушинского-Молодкиной. В доступной нам литературе не обнаружено исследований по влиянию минолексина на FAS-опосредованный внешнерецепторный путь при эпилепсии.

В экспериментах с травмой спинного мозга самцы крыс Sprague-Dawley получали инъекции минолексина. У них наблюдалось заметное снижение уровня экспрессии FASL, но не FASR, по сравнению с контрольной группой, получавшей только травму и растворитель (Zhang G. et al., 2019). При изучении влияние миноциклина на фульминантный гепатит у мышей линии C57BL/6J, вызванный внутрибрюшинной инъекцией активирующего антитела анти-FAS Jo2, предварительная обработка и лечение животных миноциклином улучшили выживаемость за счёт предотвращения высвобождения цитохрома c и блокирования активации каспазы ниже по пути апоптоза, без воздействия на сам FAS (Chu H-C. et al., 2005), что сходно с нашими результатами, где миноциклин оказывал антиапоптотический эффект во всех исследованных областях мозга, без заметного влияния на FAS.

Анализ экспрессии FAS показал, что у крыс линии Крушинского-Молодкиной имел место различный ответ на киндлинг и введение минолексина в зависимости от области головного мозга. Такое задействование различных механизмов апоптоза может отчасти объяснить лекарственную устойчивость при эпилепсии. При введении минолексина наблюдалось снижение уровня FAS.

### 3.8 Анализ экспрессии белка-посредника FADD

В таблице 8 представлена средняя оптическая плотность FADD-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

Таблица 8 – Средняя оптическая плотность FADD-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	1,4 (0,89-1,8)	0,63 (0,46-0,81)#	0,75 (0,42-0,92)#
Белое вещество	0,94 (0,61-1,5)	0,99 (0,69-2,1)	0,49 (0,25-0,58)
Гиппокамп	0,65 (0,44-0,86)	1,0 (0,96-1,5)	0,64 (0,47-1,1)

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

На рисунке 35 (А, Б, В) соответственно представлены данные измерения оптической плотности, отражающие уровни экспрессии FADD в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам, при длительном киндлинге и введении минолексина. На рисунке 19 (Г, Д, Е) также представлены фотографии электрофореза белков клеточного лизата для височной коры, подлежащего белого вещества и гиппокампа, а также контроли с тубулином.

В височной коре наибольшая экспрессия FADD наблюдается в группе Контроль физраствор и статистически значимо ( $p = 0,0239$ ;  $F = 5,813$ ) снижается в обеих группах животных, подвергавшихся киндлингу  $p = 0,0319$  и  $p = 0,0488$  соответственно. Выраженного эффекта действия минолексина не выявлено (рисунок 35 А и Г).

В подлежащем белом веществе статистически значимых различий между тремя группами не выявлено при уровне значимости  $p = 0,05$  ( $p = 0,1411$ ;  $F = 2,454$ ), но наблюдается тенденция к снижению экспрессии FADD под действием минолексина (рисунок 35 Б и Д).

Также различий не выявлено в гиппокампе ( $p = 0,0741$ ; Kruskal-Wallis statistic = 5,115) при сохранении тех же тенденций (рисунок 35 Г и Е).

Информации о влиянии миноциклина на экспрессию FADD имеется крайне мало и она не касается центральной нервной системы и эпилепсии. Нам удалось найти лишь одно исследование, проводившееся *ex vivo*. Введение миноциклина привело к супрессии апоптоза в клеточной линии HT22, заражённой вирусом Chandipura из семейства Rhabdoviridae, который вызывает гибель нейронов путём индукции окислительного стресса. При введении миноциклина уровни цитоплазматического  $Ca^{2+}$ , ROS, фосфорилирования p38, которые обычно приводят к апоптозу через путь FASL-FADD, снижаются. Уменьшение экспрессии FADD и расщепленной каспазы-8 в тканях мозга заражённых мышей после лечения миноциклином указывает на способность препарата ингибировать внешнерецепторный путь апоптоза (Verma A.K. et al. 2018).

Но это может быть неприменимо к головному мозгу крыс линии Крушинского-Молодкиной в частности и эпилепсии в общем, из-за разных патологических механизмов и объектов исследования. В нашем эксперименте влияние миноциклина на экспрессию FADD обнаружено не было.

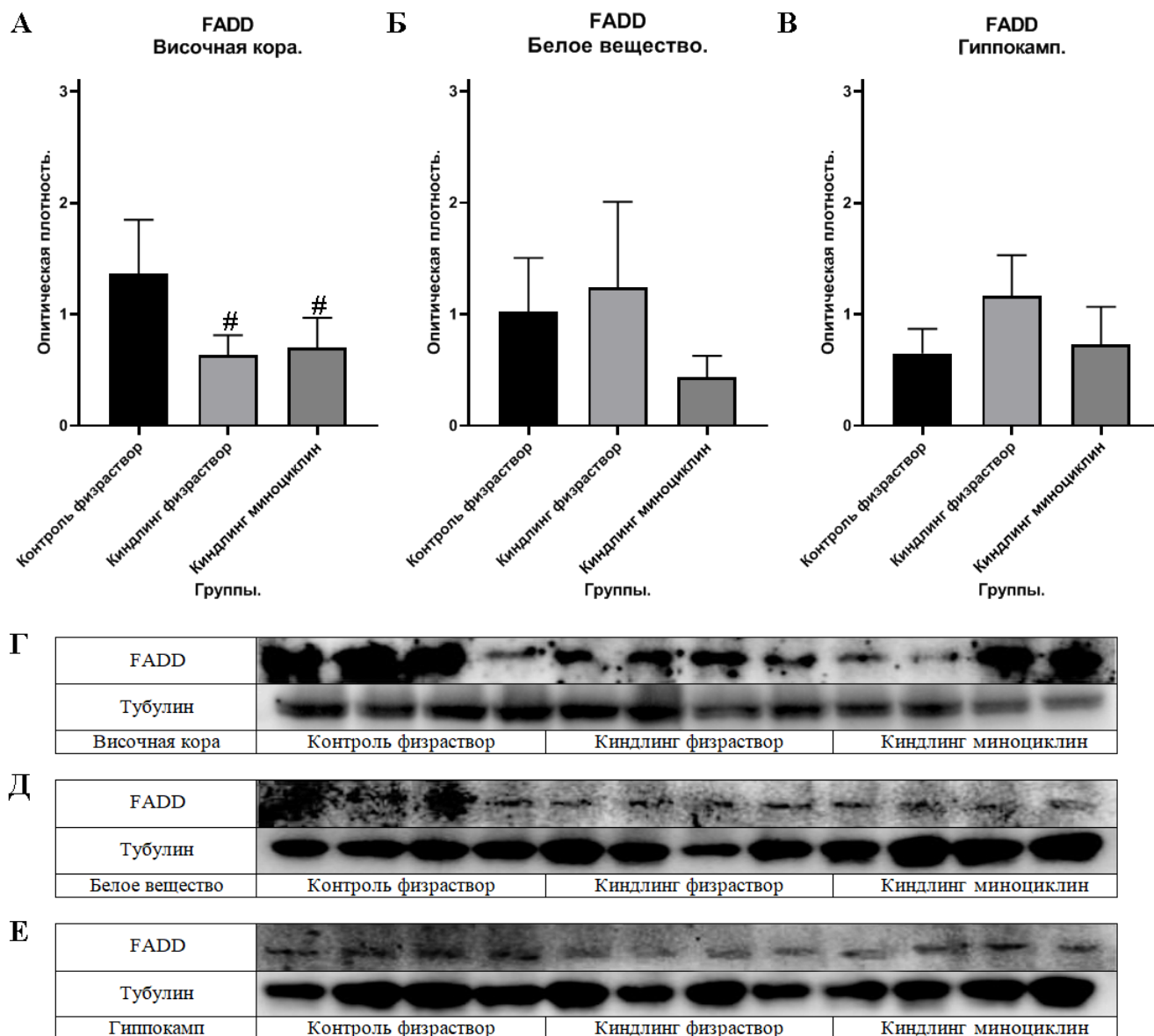


Рисунок 35 – Графики изменения оптической плотности FADD-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс линии

Крушинского-Молодкиной: А – в коре височной доли,

Б – в подлежащем белом веществе, В – в гиппокампе.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Результаты оценки экспрессии FAS методом вестерн-блоттинга в:

Г – в коре височной доли, Д – в подлежащем белом веществе, Е – в гиппокампе.

### 3.9 Результаты оценки экспрессии фактора некроза опухолей альфа

В таблице 9 представлена средняя оптическая плотность TNF- $\alpha$ -иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

Таблица 9 – Средняя оптическая плотность TNF- $\alpha$ -иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,32 (0,19-0,53)	0,80 (0,66-0,86)#	0,44 (0,22-0,56)*
Белое вещество	0,30 (0,23-0,73)	1,0 (0,76-1,3)#	0,50 (0,37-0,60)*
Гиппокамп	0,33 (0,17-0,83)	0,29 (0,17-0,65)#	0,23 (0,19-0,43)*

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

На рисунке 36 (А, Б, В) соответственно представлены результаты измерения оптической плотности, отражающие уровни экспрессии TNF- $\alpha$  в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам, при длительном киндлинге и введении минолексина. На рисунке 36 (Г, Д, Е) также представлены фотографии электрофореза белков клеточного лизата для височной коры, подлежащего белого вещества и гиппокампа, а также контроли с тубулином. Во всех трёх исследуемых отделах отмечались статистически достоверные различия между группами. Уровни TNF- $\alpha$  возрастали при киндлинге и снижались практически до исходных под действием минолексина, что согласуется с литературными данными. Для височной коры (рисунки 36 А и Г) получены следующие данные: ( $p = 0,0105$ ;  $F = 7,897$ ), различия между группами Контроль физраствор и Киндлинг физраствор достоверны при  $p = 0,0132$ , а Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин при  $p = 0,0273$ . Значимых различий между группами Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин не выявлено при  $p = 0,8856$ . Для подлежащего белого вещества (рисунки 36 Б и Д) закономерности сходны: ( $p = 0,0129$ ;  $F = 7,334$ ), различия между группами Контроль физраствор и Киндлинг физраствор достоверны при  $p = 0,0165$ , а Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин при  $p = 0,0316$ .

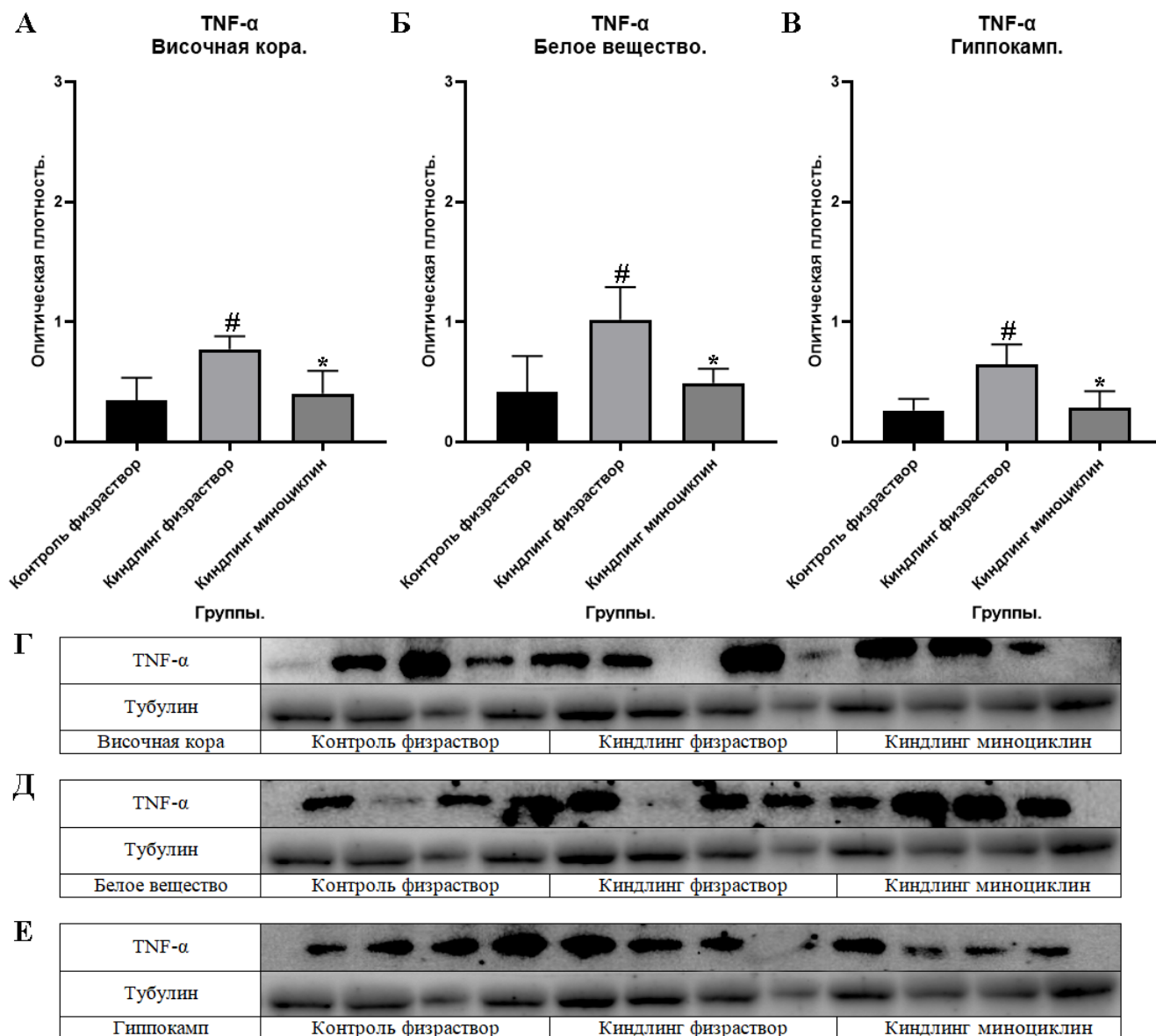


Рисунок 36 – Графики изменения оптической плотности TNF- $\alpha$ -иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс линии

Крушинского-Молодкиной: А – в коре височной доли,

Б – в подлежащем белом веществе, В – в гиппокампе.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Результаты оценки экспрессии FAS методом вестерн-блоттинга в:

Г – в коре височной доли, Д – в подлежащем белом веществе, Е – в гиппокампе.

Значимых различий между группами Контроль физраствор vs. Киндлинг миноциклин не выявлено при  $p = 0,908$ . В гиппокампе (рисунки 36 В и Е) статистически значимые различия также обнаружены: ( $p = 0,0058$ ;  $F = 9,623$ ), различия между группами Контроль физраствор и Киндлинг физраствор достоверны при  $p = 0,009$ , а Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин при  $p = 0,0126$ . Значимых различий между группами Контроль физраствор vs. Киндлинг миноциклин не выявлено при  $p = 0,9732$ .

Нами полностью подтверждены данные о том, что миноциклин может снижать выработку TNF- $\alpha$  в мозге, проходя через гематоэнцефалический барьер. В эксперименте по лечению миноциклином липополисахарид-индуцированного нейровоспаления у взрослых крыс линии Sprague-Dawley, вестерн-блоттинг и иммуногистохимия показали способность миноциклина значительно и дозозависимо (50 мг/кг действовали эффективнее, чем 25 мг/кг) снижать экспрессию как NF- $\kappa$ B, так и TNF- $\alpha$ , а также TLR-4 и COX-2, что говорит о его эффективности и множестве мишеней (Qaid E.Y.A. et al., 2025).

В другом эксперименте с длительной остановкой сердца у крыс, которая вызывает гибель нейронов, а также пролиферацию и активацию микроглии, которые лишь частично смягчаются гипотермией, миноциклин снизил концентрации TNF- $\alpha$  в мозге примерно на 50%, но не вернул к нормальным значениям. У контрольных животных изменения уровня TNF- $\alpha$  ни в одной области мозга (мозжечок, кора, гиппокамп и полосатое тело) не было обнаружено. TNF- $\alpha$  локализовался в нейронах, а не в микроглии. Таким образом, воздействие на путь TNF- $\alpha$  может быть одним из механизмов его нейропротективного действия (Drabek T. et al., 2014). Потенциал миноциклина и его взаимодействие с микроглией и астроцитами изучался при болезни Альцгеймера. Миноциклин вводили мышам J20 APP-tg в течение трех месяцев, либо в молодом возрасте, либо после отложения A $\beta$  через 5–7 месяцев. При введении более молодым мышам наблюдалось незначительное увеличение отложения A $\beta$  в гиппокампе, однако когнитивные способности улучшились. Введение миноциклина уже после отложения A $\beta$  подавляло активацию микроглии, не влияя на уровни A $\beta$  или когнитивные функции. В другом исследовании на мышах линии APP/PS1 в возрасте 11 недель, лечение миноциклином повышало выживаемость клеток в гранулярной зоне зубчатой извилины или даже стимулировало нейрогенез в гиппокампе, но на уровень

бета-амилоида он влияния не оказал (Plantone D. Et al., 2023). Другие ингибиторы пути TNF- $\alpha$  также оказывают сходный эффект. На примере экспериментальных животных и пациентов показано действие инфликсимаба – моноклонального антитела из фрагмента Fc человеческого IgG и фрагмента Fv мыши, мощного селективного антагониста растворимого TNF- $\alpha$ , а также другого моноклонального антитела – адалимумаба. Исследования на крысах и мышах показали, что другой селективный ингибитор – человеческий рекомбинантный сшитый белок TNFR2, этанерцепт – значительно снижает депрессивное поведение и улучшает когнитивную функцию. Также он снижает выраженность симптомов усталости, депрессии и тревоги у пациентов с псориазом и ревматоидным артритом. Пентоксифиллин из группы метилксантинов, ранее применявшийся для лечения множества заболеваний от алкогольного гепатита до кардиомиопатий, неселективно ингибирует выработку TNF- $\alpha$  *in vitro* и *in vivo* у животных и людей (Uzzan S., Azab A.N., 2021). Сигнализация TNFR1 может способствовать гибели нейронов, вызванной судорогами. Связывание TNFR1 с TRADD и TRADD с RIP увеличивается после эпилептического статуса у крыс. Смерть нейронов после приступов вызвана эксайтотоксичностью глутамата и активацией сигнальных путей, связанных с апоптозом. Нейровоспаление также признано важным компонентом патофизиологии повреждения при эпилепсии, одним из ключевых медиаторов его является TNF- $\alpha$ . Эксперименты с крысами и анализ образцов от пациентов с эпилепсией показали активацию рецептора TNFR1 и перспективу блокады этого сигнального пути. Исследование функционального значения сигнализации TNFR1 в гиппокампе мышей, показали, что эпилептический статус повысил уровни TNFR1 и привел к связыванию TNFR1-TNFR-ассоциированного домена смерти (TRADD) и TRADD-FAS-ассоциированного домена смерти (FADD). Сигнализация TNFR1 также, по-видимому, активна при хронической эпилепсии. Блокирование сигнализации TNFR1 комбинацией PKF-242-484 и L685,485, двойным ингибитором матричной металлопротеиназы/TNF- $\alpha$ -превращающего фермента, отвечающего за перевод его в растворимую форму, значительно снизила гибель клеток после судорожной активности у животных. Такого же эффекта можно добиться с помощью антител, нейтрализующих TNF- $\alpha$  (Thompson S.J. et al., 2011).

На односторонней внутрикортикальной каникатной мышинной модели височной эпилепсии было показано, что основным источником TNF- $\alpha$  выступает активированная



микроглия, которая способствует дисфункции астроцитов и развитию тяжёлого эпилептического статуса. Нокаут TNF- $\alpha$ , специфичного для микроглии, предотвратил разобщение щелевых контактов в астроцитах, что, как известно, вовлечено в патогенез височной эпилепсии. Частичное истощение микроглии с использованием ингибитора рецептора колониестимулирующего фактора 1 предотвратило раннее разобщение астроцитов, но увеличило смертность мышей (Henning L. et al., 2023). В нашем случае источником TNF- $\alpha$  также могла выступать активированная микроглия.

Таким образом, уровни экспрессии TNF- $\alpha$  возрастают в эпилептическом мозге, а миноциклин, обладая противовоспалительными свойствами, приводит к их снижению.

### 3.10 Результаты анализа экспрессии TRADD

В таблице 10 представлена средняя оптическая плотность TRADD-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

Таблица 10 – Средняя оптическая плотность TRADD-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,61 (0,23-0,70)	0,46 (0,41-0,77)	0,45 (0,21-0,78)
Белое вещество	0,50 (0,37-0,71)	0,65 (0,48-0,91)	0,50 (0,30-0,72)
Гиппокамп	0,60 (0,48-0,90)	0,48 (0,28-0,73)	0,54 (0,37-0,80)

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

На рисунке 37 (А, Б, В) соответственно представлены результаты измерения оптической плотности, отражающие уровни экспрессии TRADD в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам, при длительном киндлинге и введении минолексина. На рисунке 37 (Г, Д, Е) также представлены фотографии электрофореза белков клеточного лизата для височной коры, подлежащего белого вещества и гиппокампа, а также контроли с тубулином.

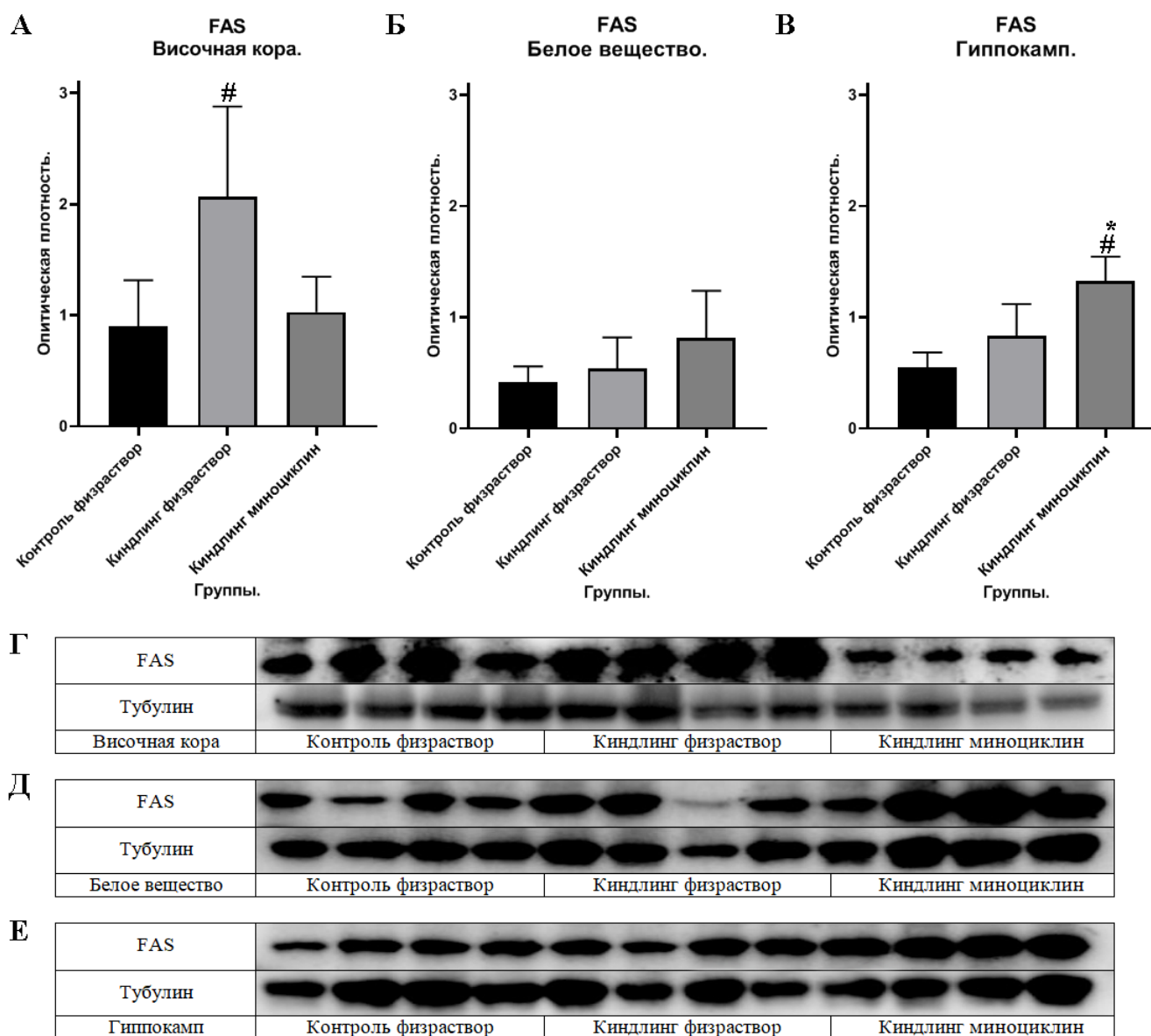


Рисунок 37 – Графики изменения оптической плотности TRADD-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс линии

Крушинского-Молодкиной: А – в коре височной доли,

Б – в подлежащем белом веществе, В – в гиппокампе.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Результаты оценки экспрессии FAS методом вестерн-блоттинга в:

Г – в коре височной доли, Д – в подлежащем белом веществе, Е – в гиппокампе.

Во всех трёх исследуемых отделах головного мозга крыс на уровне TRADD не оказали статистически обнаруживаемого эффекта как киндлинг, так и введение минолексина, что также согласуется с немногочисленными литературными данными.

Статистически значимые различия между группами не выявлены для височной коры ( $p = 0,7398$ ;  $F = 0,3117$ ), подлежащего белого вещества ( $p = 0,4583$ ;  $F = 0,852$ ) и гиппокампа ( $p = 0,6418$ ;  $F = 0,4661$ ).

Несмотря на такие результаты, ингибирование TRADD потенциально может оказаться полезным для лечения заболеваний нервной системы, в том числе, нейродегенеративных. Но этот потенциал ещё предстоит раскрыть. Пока же такие исследования немногочисленны. Например, его ингибирование ICCB-19 или Apt-1 блокирует апоптоз и восстанавливает клеточный гомеостаз, активируя аутофагию в клетках с накопленным мутантным тау-белом,  $\alpha$ -синуклеином или хантингтином. Лечение Apt-1 восстановило протеостаз и предотвратило гибель клеток в мышинной модели протеинопатии, вызванной мутантным тау-белком (Xu D. Et al., 2020).

Роль белков-посредников, таких как TRADD и FADD, в эпилептогенезе изучена недостаточно. Результаты нашего исследования показали, что ни киндлинг, ни введение минолексина значительного влияния на экспрессию TRADD не оказали.

### 3.11 Оценка уровня экспрессии ядерного фактора каппа В

В таблице 11 представлена средняя оптическая плотность NF- $\kappa$ B-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс в формате Median (25% Percentile - 75% Percentile).

Таблица 11 – Средняя оптическая плотность NF- $\kappa$ B-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс.

Области мозга	Контроль физраствор	Киндлинг физраствор	Киндлинг миноциклин
Височная кора	0,58 (0,30-0,82)	1,0 (0,78-1,3)#	0,54 (0,38-0,61)*
Белое вещество	0,24 (0,18-0,50)	1,0 (0,64-1,2)#	0,47 (0,37-0,50)*
Гиппокамп	0,60 (0,50-0,73)	0,94 (0,67-1,2)#	0,40 (0,29-0,50)*

Примечания: # – достоверные различия от группы Контроль физраствор

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор

На рисунке 38 (А, Б, В) соответственно представлены результаты измерения оптической плотности, отражающие уровни экспрессии NF-κB в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам, при длительном киндлинге и введении минолексина. На рисунке 38 (Г, Д, Е) также представлены фотографии электрофореза белков клеточного лизата для височной коры, подлежащего белого вещества и гиппокампа, а также контроля с тубулином. Обнаруженные в результате эксперимента закономерности совпадают с таковыми для TNF-α, что согласуется с данными литературы о том, что минолексин может вмешиваться в оба пути, а эпилептический припадок приводит к повышению уровня общего NF-κB. В височной коре наблюдались статистически значимые различия между группами. Для височной коры (рисунки 38 А и Г) ( $p = 0,0196$ ;  $F = 6,282$ ): различия между группами Контроль физраствор vs. Киндлинг физраствор достоверны при  $p = 0,0439$ , Киндлинг физраствор vs. Киндлинг миноциклин при  $p = 0,0252$ , а Контроль физраствор и Киндлинг миноциклин не различались  $p = 0,9324$ .

Для подлежащего белого вещества (рисунки 38 Б и Д) ( $p = 0,0055$ ;  $F = 9,819$ ) различия между группами Контроль физраствор и Киндлинг физраствор достоверны при  $p = 0,0057$ , а Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин при  $p = 0,0232$ . Значимых различий между группами Контроль физраствор vs. Киндлинг миноциклин не выявлено при  $p = 0,6339$ . Можно предположить, что снижение экспрессии NF-κB при эпилепсии оказывает позитивный эффект, это подтверждается рядом экспериментов на животных. Так, было обнаружено, что ингибирование активности NF-κB селективными ингибиторами или неселективными препаратами (ацетилсалициловая кислота и др.) может помочь при эпилепсии. Результаты нашего эксперимента косвенно подтверждают это, так как наблюдалось выраженное снижение нейровоспаления и апоптоза. Основными селективными ингибиторами NF-κB считаются микро-РНК. Микро-РНК (miRNA) – это высококонсервативные малые некодирующие РНК, которые содержат около 22 нуклеотидов и регулируют гены, коррелирующие с биологическими функциями, а также сигнальными путями.

Многие из них участвуют в патогенезе эпилепсии и связаны так или иначе с NF-κB. Так, в гиппокампе крыс с эпилепсией, вызванной хлоридом лития-пилокарпином, помимо обычной активации NF-κB, было отмечено снижение экспрессии miR-494.

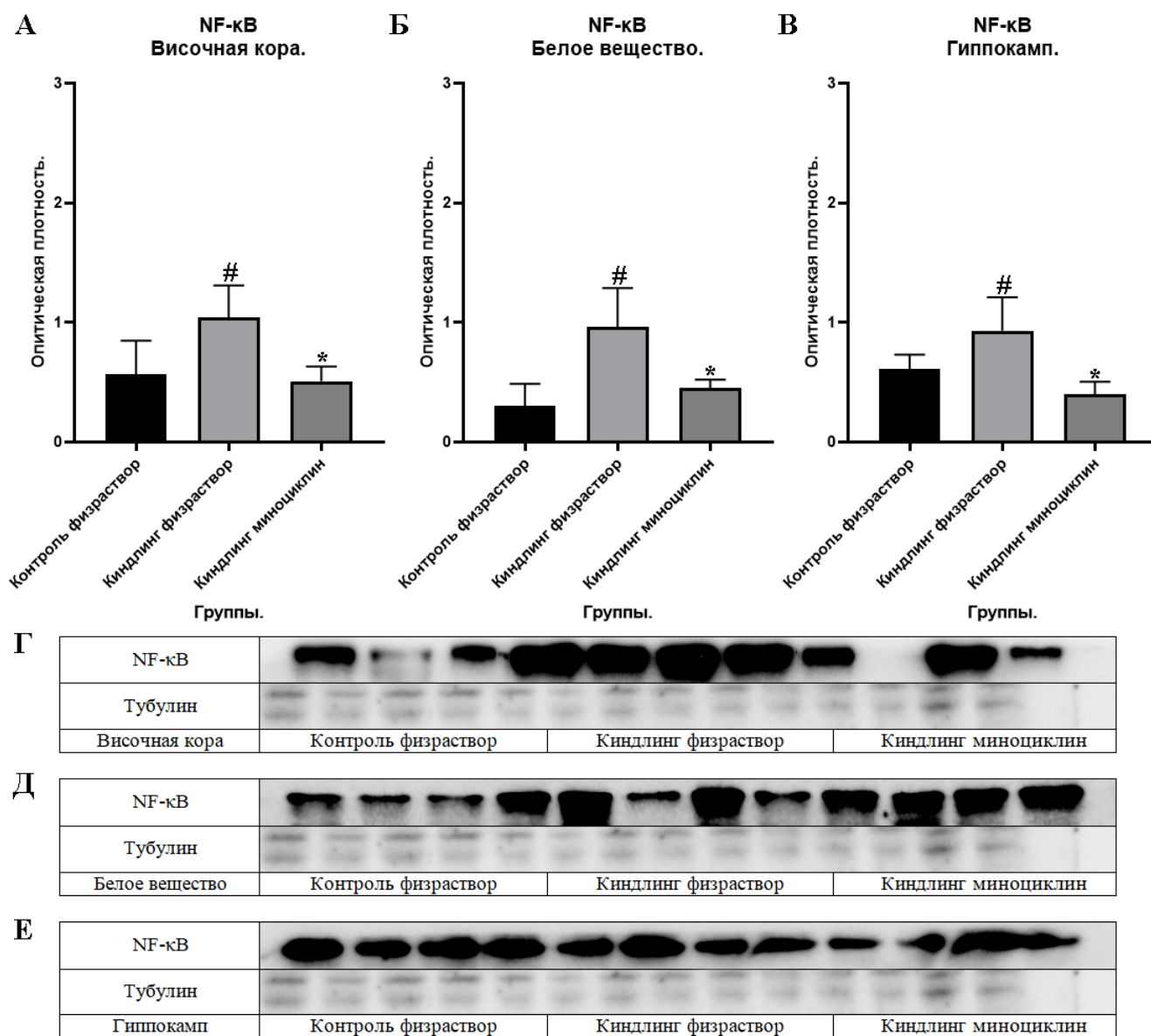


Рисунок 38 – Графики изменения оптической плотности NF-κB-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс линии

Крушинского-Молодкиной: А – в коре височной доли,

Б – в подлежащем белом веществе, В – в гиппокампе.

# – достоверные различия от группы Контроль физраствор,

\* – достоверные различия от группы Киндлинг физраствор.

Результаты оценки экспрессии FAS методом вестерн-блоттинга в:

Г – в коре височной доли, Д – в подлежащем белом веществе, Е – в гиппокампе.

Для гиппокампа (рисунки 38 В и Е) ( $p = 0,009$ ;  $F = 8,32$ ) различия между группами Контроль физраствор и Киндлинг физраствор достоверны при  $p = 0,0073$ , а Киндлинг физраствор и Киндлинг миноциклин при  $p = 0,0232$ . Значимых различий между группами Контроль физраствор vs. Киндлинг миноциклин не выявлено при  $p = 0,2918$ .

Повышение уровня miR-494 подавляло экспрессию RIPK1, уменьшая повреждение нейронов, усиливая пролиферацию и подавляя апоптоз посредством инактивации сигнального пути NF- $\kappa$ B (Qi Y. et al., 2020). В модели эпилепсии у крыс, вызванной пилокарпином, было выявлено снижение экспрессии miR-322-5p, что сопровождалось повышением уровня провоспалительных цитокинов, экспрессии NF- $\kappa$ B и снижением уровня  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (GABA). Ингибирование оси TLR4/TRAF6/NF- $\kappa$ B с помощью miR-322-5p уменьшило воспаление и апоптоз нейронов гиппокампа у трёхнедельных самцов крыс линии Sprague-Dawley с эпилептическим статусом, вызванным пилокарпином (Zhou Q. Et al., 2022). В модели эпилепсии, связанной с аутоиммунным энцефаломиелитом на крысах линии Sprague-Dawley, которым вводили хлорид лития в гиппокамп, были получены доказательства того, что другая miR-129-5p подавляет развитие эпилепсии, снижая экспрессию HMGB1 и ингибируя сигнальный путь TLR4/NF- $\kappa$ B (Liu A-H. et al., 2017). В модели эпилептического статуса у мышей miR-15a-5p заглушил длинную некодирующую РНК lncRNA ZFAS1, которая может способствовать прогрессированию эпилепсии, регулируя путь miR-15a-5p/OXSR1/NF- $\kappa$ B. Это привело к супрессии индуцированных приступами воспаления, апоптоза и окислительного стресса в нейронах гиппокампа (Wang Z. et al., 2022). Показано, что кетогенная диета у детей с эпилепсией сдерживает выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов в том числе за счёт подавления активации NF- $\kappa$ B и ингибирования инфламмасомы NLRP3 (Ildarabadi A. et al., 2024). Известно, что NF- $\kappa$ B играет значимую роль не только в патогенезе заболеваний ЦНС, но и при раке яичников. В эксперименте с линиями клеток карциномы яичников OVCAR-3 и SKOV-3 миноциклин снижал конститутивную активацию NF- $\kappa$ B. Кроме того, влияние миноциклина на инициацию пути NF- $\kappa$ B было выявлено *in vivo* у самок голых мышей с опухолями OVCAR-3 в брюшной полости (Ataie-Kachoei P. et al., 2013).

Результаты нашего эксперимента показали, что в эпилептическом мозге экспрессия NF- $\kappa$ B повышается из-за повторяющихся приступов, и снижается при

введении

МИНОЦИКЛИНА.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Итоги работы.** Целью работы явилось экспериментальное обоснование коррекции минолексинном нейровоспаления и апоптоза при фармакорезистентной эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной.

На основании полученных результатов и литературных данных можно заключить, что при аудиогенном киндлинге в головном мозге крыс линии Крушинского-Молодкиной происходят изменения, сходные с таковыми у пациентов с лекарственно-устойчивой эпилепсией. Данная модель подходит для изучения эпилепсии, лежащих в её основе механизмов и поиска новых лекарств.

В качестве таких механизмов нами были выбраны нейровоспаление и апоптоз, имеющие место при всех формах эпилепсии и участвующих в формировании лекарственной устойчивости. Оба эти процесса имеют место у крыс линии Крушинского-Молодкиной.

Эти два механизма во многих случаях являются базовыми при данном заболевании и могут рассматриваться как его причины. Следовательно, фармакологическое воздействие на провоспалительные и апоптотические каскады представляется перспективным направлением преодоления лекарственной устойчивости и дополнением к классическим противоэпилептическим препаратам, которые не оказывают положительного эффекта примерно в 30 % случаев.

В доступной научной литературе нам не удалось найти данные о применении препарата тетрациклинового ряда миноциклина (в нашем эксперименте использован препарат, выпускаемый под торговой маркой «Минолексин») для терапии эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной, что обуславливает научную новизну данной работы.

При оценке изменения длительности латентного периода в модели эпилепсии на крысах Крушинского-Молодкиной продемонстрировано, что при введении крысам миноциклина латентный период увеличивался медленнее, чем без лечения, а животные продолжали проявлять типичную для своей линии реакцию на звуковой стимул. Нами было показано, что миноциклин не обладает противосудорожной активностью и не



способен предотвратить приступ. Было отмечено сокращение времени латентного периода, по сравнению с не получавшими препарат животными от 1 к 14 дню эксперимента.

В настоящее время основными направлениями исследований латентного периода считаются нейродегенерация и аберрантный нейрогенез, разрастание аксонов, активация глии и развитие воспаления, ангиогенез, а также изменения в работе рецепторов и ионных каналов. На все эти процессы требуются разные временные промежутки (Patterson E.N.E., 2013). С практической точки зрения латентный период представляет собой терапевтическое окно для вмешательства в эпилептогенез и предотвращение развития осложнений, включая формирование резистентности. Он также может иметь прогностическое значение. Корреляция между днём от начала эксперимента и длительностью латентного периода, а также другие изменения отражают нарастающие повреждения головного мозга, вызванные многократными эпилептическими припадками.

Изучение двух наиболее эпилептогенных областей головного мозга, височной коры и гиппокампа, в которых чаще всего локализуются эпилептические очаги, особенно при лекарственно-резистентной эпилепсии, а также подлежащего белого вещества, через которое в эпилептогенез вовлекаются всё новые отдалённые области мозга, показало, что после судорог там активируются процессы нейровоспаления и аберрантной гибели клеток путём апоптоза, на что указывало повышение экспрессии соответствующих маркеров. Во всех исследуемых областях мозга киндлинг вызвал увеличение числа TUNEL-позитивных клеток, а применение миноциклина – их снижение, но считать этот тетрациклин универсальным препаратом, предотвращающим гибель клеток, нельзя. Апоптозу могут предшествовать некроптоз, пироптоз, окситоз, ферроптоз и партанатоз (Sánchez-Migallón M.D.C. et al., 2024). В отдельных случаях миноциклин индуцирует апоптоз, в основном в раковых линиях клеток, например, в клетках мультиформной глиобластомы (Afshari A.R. et al., 2020), линии Jurkat, представляющих собой иммортализованную линию Т-лимфоцитов (Ruiz-Moreno C. et al., 2018), линии рака молочной железы человека MCF-7 (Rezaei A. et al., 2024). Индукция апоптоза может быть не целевым, а побочным эффектом миноциклина (Xu W. et al., 2020).

Таким образом, миноциклин в большинстве случаев, в том числе и в нашей модели экспериментальной эпилепсии, проявляет антиапоптотический и противовоспалительный эффект. Это достигается за счёт воздействия на множество канонических и неспецифических путей.

Известно, что за активацию пути апоптоза отвечает консервативный фактор транскрипции p53, запускающий апоптоз множества клеток, в числе которых нейроны, в ответ на стрессовые факторы. Повреждения головного мозга, чем бы они не были вызваны, чаще всего приводят к повышению экспрессии p53.

Иммуногистохимические реакции показали увеличение экспрессии фактора транскрипции p53 во всех отделах, кроме поля СА4 гиппокампа. В височной коре и подлежащем белом веществе, а также хилусе гиппокампа введение миноциклина снижало уровни p53, что подтверждено снижением числа TUNEL-позитивных клеток. В гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа экспрессия p53 при киндлинге также возрастала, но не снижалась под действием миноциклина, а в поле СА4 она не изменялась, но миноциклин снижал апоптоз во всех исследуемых областях мозга. Таким образом, миноциклин способен подавлять активность p53, и не исключается его воздействие на другие пути.

В нашем исследовании на модели крыс линии Крушинского-Молодкиной были рассмотрены и другие про- и антиапоптотические механизмы. Комплексный анализ полученных данных выявил дифференцированную реакцию отделов мозга на киндлинг и введение миноциклина. Как известно, белок Bcl-2 защищает нейроны от широкого спектра неблагоприятных факторов, в частности, окислительного стресса, не давая им погибнуть. При эпилепсии его экспрессия повышается, но эффективность выполнения им своих функций изучена недостаточно. В нашем исследовании в височной коре и подлежащем белом веществе различий в экспрессии Bcl-2 во всех трёх группах животных не обнаружено. Киндлинг также не повышал экспрессию этого белка в гиппокампе, но миноциклин её снижал. При эпилепсии внешний путь апоптоза предшествует внутреннему, возможно, митохондриальный путь не успевает включиться в височной области, либо здесь не задействован.

Данных об участии миноциклина в регуляции экспрессии Bcl-2 в мозге и других органах при различных патологиях и заболеваниях не так много, но почти все говорят об активирующем влиянии. Так, введение миноциклина увеличивало экспрессию Bcl-2,

снижало экспрессию Вах и каспазы-3 в эксперименте с черепно-мозговой травмой и субарахноидальным кровоизлиянием у крыс линии Sprague-Dawley (Li J. et al., 2016), на крысиной модели повреждения головного мозга (He J. et al., 2021). Мы также наблюдали повышение экспрессии Bcl-2 в височной коре крыс линии Крушинского-Молодкиной.

По нашим результатам, антиапоптотический белок Bcl-2 не играет значимой роли в поддержании выживаемости клеток при аудиогенном киндлинге в исследованных областях мозга (височная доля, гиппокамп) крыс Крушинского-Молодкиной. Возможно, активное участие принимают другие белки семейства Bcl-2, например, Mcl-1. Миноциклин действует на экспрессию Bcl-2 также косвенно, через множество других путей и, возможно, эффект не проявляется при генетических аномалиях и нарушениях биохимических путей, которые могут присутствовать в данной линии крыс.

Киндлинг влияет на экспрессию каспаз лишь в белом веществе, но не в коре и гиппокампе, на основании чего можно предположить, что уровни экспрессии каспаз-3 и -8 у крыс линии Крушинского-Молодкиной конститутивно высоки. Согласно имеющимся данным, миноциклин способен снижать экспрессию каспаз, но в нашем эксперименте он показал ограниченный эффект лишь в белом веществе. Активация каспаз не является единственным фактором запуска апоптоза. Корреляционное профилирование белков после инициации FAS-опосредованного апоптоза показало, что изменения белок-белковых взаимодействий происходят задолго и независимо от расщепления этих белков каспазами (Scott N.E. et al., 2017). Запрограммированная гибель клеток с фрагментацией хроматина может быть запущена без каспаз фактором, индуцирующим апоптоз (AIF), гомологичным AIF митохондриально-ассоциированному индуктору смерти (AMID) и эндонуклеазой G (EndoG) (Candé C. et al., 2002). AIF играет двойную и противоположную роль в регуляции выживания клеток и апоптоза, помогая выжить митохондриям благодаря NADH-оксидоредуктазной активности и запуская каспазозависимый путь апоптоза после того, если попадёт в ядро (Luo Q. Et al., 2021). Некоторые данные удалось получить на дрожжах *S. cerevisiae*, однако, по сравнению с каспазозависимой апоптотической гибелью клеток, знания о механизме каспазозависимой гибели неполны (Liang Q. et al., 2008). У крыс линии Крушинского-Молодкиной роль не зависящих от каспаз механизмов апоптоза требует дальнейшего изучения.

Как при киндлинге без лечения, так и с применением миноциклина, у всех крыс наблюдались активация астроцитов и глиоз, что выражалось повышенной экспрессией маркера астроцитов GFAP. Киндлинг вызвал усиление глиоза в височной коре и подлежащем белом веществе, а также гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа, но не в зоне CA4 и хилусе. В нашем случае расхождение результатов с данными предыдущих исследований может быть обусловлено особенностями выбранной модели. Согласно литературным данным, уровни GFAP высоки в группах крыс, проходивших киндлинг, независимо от лечения, и не отличались статистически между собой.

Для исследуемых провоспалительных цитокинов и связанных с ними молекул с помощью метода вестерн-блоттинга были выявлены следующие закономерности.

При исследовании системы FAS/FASL/FADD наблюдалось увеличение экспрессии FAS в группе Киндлинг-физраствор в височной коре и тенденция к её снижению при введении миноциклина. В гиппокампе введение миноциклина, напротив, вызвало увеличение экспрессии FAS по сравнению с другими группами. В менее чувствительном к эпилепсии подлежащем белом веществе изменений не наблюдалось. Киндлинг, независимо от применения миноциклина, снижал концентрацию белка-посредника FADD в височной коре, что может отражать сборку индуцирующего смерть сигнального комплекса DISK и активацию внешнего пути апоптоза. В белом веществе и гиппокампе концентрации FADD значимо не изменялись.

Система FAS-рецептора (FASR)/FAS-лиганда (FASL) и белка-посредника FADD играет важную роль в процессе потери нейронов при неврологических расстройствах, в том числе при эпилепсии. Участие FADD и внешнерепторного пути апоптоза в патогенезе различных заболеваний ЦНС и его перспективах в качестве терапевтической мишени изучены достаточно подробно.

Результаты нашего эксперимента дополняют эту картину. В височной коре головного мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной при киндлинге экспрессия FAS повышается по сравнению с контрольной группой, и имеет место тенденция к её снижению при введении миноциклина. Экспрессия FADD здесь максимальна в группе Контроль физраствор и одинаково снижается в обеих группах животных, подвергавшихся киндлингу. Возможно, это обусловлено его связыванием при инициации апоптоза. В подлежащем белом веществе значимых различий между тремя

группами не выявлено для FAS и FADD. В гиппокампе введение миноциклина, но не киндлинг, повышает экспрессию FAS, а экспрессия FADD остаётся в целом неизменной.

Таким образом, полученные нами результаты показывают изменение активации каскада FAS-FADD при экспериментальной эпилепсии на данной модели, отличающееся от вариантов инициации этого каскада при изучении на других моделях. Так, в гиппокампе мышей дикого типа C57BL/6 при моделировании эпилепсии введением каината с помощью ПЦР в реальном времени была обнаружена повышенная активность генов, которые участвуют во внешнерецепторной сигнализации апоптоза, такие как *tnf*, *fas* и *fasL*, а также генов каспаз (каспаза-4, -8 и -3). Важность пути FASR/FASL, не подтвердившаяся в наших экспериментах, продемонстрирована на линии мышей C57BL/6, у которых отсутствовал функциональный рецептор смерти FAS (*lpr*). После введения каиновой кислоты и последующих судорог апоптоз у них проявлялся слабее, и не наблюдалось значительных изменений в транскрипционной активности генов, связанных с апоптозом в гиппокампе.

Таким образом, сигнализация FAS играет ключевую роль в индукции апоптоза в пораженном эпилепсией гиппокампе, и ингибирование этого пути потенциально может обеспечить нейропротекцию (Ettcheto M. et al., 2015) в большинстве случаев. У крыс линии Крушинского-Молодкиной это показано в височной коре, являющейся важным эпилептогенным участком мозга. Также в этой области мозга нами показано снижение экспрессии FADD при введении миноциклина, что согласуется с данными литературы. Данных по прямому ингибированию FADD нами обнаружено не было, и всё ранее описанное касается снижения его уровня при косвенном воздействии препаратов с не до конца ясным механизмом действия.

Так, блокирование рецептора суперсемейства TNF TNFRSF25, приводящее к подавлению экспрессии FADD с помощью мелоксикама, предотвращает апоптоз нейронов в мышинной модели болезни Альцгеймера (Guan P. Et al., 2023). Ингибирование внешнего пути апоптоза с помощью ацетилпуэраина показало нейропротективный эффект в модели ишемического повреждения гиппокампа крыс после кислородно-глюкозной депривации/реперфузии *in vitro*. В эксперименте наблюдалось дозозависимое снижение активации каспазы-8 и -3, экспрессии FASL, FADD и TNF- $\alpha$  (Liu D-M. et al., 2013). Лечение крыс с транзиторной ишемией поглотителем свободных радикалов эдаваоном с невыясненным механизмом действия,

значительно снизило уровни апоптоза, в том числе за счёт снижения экспрессии FADD и его мРНК (Xiao B. et al., 2007).

В нашем эксперименте с миноциклином имеет место дифференциальная реакция экспрессии FAS и FADD в исследуемых отделах мозга и, следовательно, комплексное задействование различных механизмов и путей апоптоза при эпилепсии и формировании лекарственной устойчивости. Это согласуется с литературными данными о различных функциях пути FAS–FADD в мозге и не противоречит полученным ранее данным о том, что миноциклин снижает апоптоз у крыс линии Крушинского-Молодкиной. В любом случае, участие этой системы в патогенезе эпилепсии в настоящее время во многом еще не изучено.

Со стороны системы TNF- $\alpha$ /TRADD/NF- $\kappa$ B различной реакции разных отделов мозга на киндлинг и введение миноциклина не наблюдалось. Уровни TNF- $\alpha$  повышались при аудиогенном киндлинге и снижались до статистически неразличимых с контролем под действием миноциклина. Полученные данные согласуются с результатами предшествующих исследований о роли повышенной экспрессии этого цитокина в патогенезе множества состояний.

Блокирование сигналов TNF- $\alpha$  было оценено при различных воспалительных заболеваниях и успешно используется для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона и псориаз. Однако попытки лечения болезней Паркинсона и Альцгеймера блокаторами TNF- $\alpha$ , удачные на лабораторных животных, у людей не дали положительного результата или даже ухудшили течение заболевания (No authors listed, 1999). В целом эффект от ингибирования TNF- $\alpha$  лучше проявлялся у пациентов с медленно прогрессирующей патологией (Michev A. et al., 2022).

При определении уровней цитокинов в области дорсального полосатого тела и в стволе мозга у крыс Крушинского-Молодкиной и у контрольной линии «0» с использованием мультиплексного иммунофлуоресцентного магнитного анализа обнаружено, что уровни TNF- $\alpha$  через четыре часа после судорог были ниже, чем в контроле. Уровень TNF- $\alpha$  в стволе мозга после аудиогенных припадков был ниже, чем в фоновом состоянии (Surina N.M. et al., 2023). В проведенном нами исследовании экспрессии TNF- $\alpha$  при аудиогенном киндлинге у крыс линии Крушинского-Молодкиной была подтверждена способность миноциклина снижать его экспрессию в трёх рассмотренных отделах головного мозга после повышения вследствие киндлинга, до

значений, статистически неотличимых от таковых в контрольной группе. При этом, вероятно, мишенью выступала активированная микроглия, но не астроциты, так как на астроглиоз минолексин влияния в данном случае не оказал. Активация микроглии и её роль у крыс линии Крушинского-Молодкиной, а также терапевтическая ценность миноциклина в этом случае требуют дальнейшего изучения.

Однако, из-за двойственной роли TNF- $\alpha$  при эпилептогенезе, он может привести к негативным последствиям. Чтобы избежать этого, нужны селективные ингибиторы, различающие сигнализацию TNFR1 и TNFR2 для подавления провоспалительных и проэпилептических путей, активируемых TNFR1 и поддержания механизмов нейропротекции и восстановления тканей, активируемых TNFR2.

Белок-посредник TRADD задействован во множестве путей, итог которых может варьировать от апоптоза до выживания клетки. Также он связан с активацией NF- $\kappa$ B с такой же двойственной ролью. Обе этих молекулы рассмотрены нами в контексте патогенеза эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной и возможности её коррекции миноциклином. В нашем эксперименте миноциклин не оказал заметного влияния на экспрессию TRADD, не было найдено аналогичных работ, способных подтвердить или опровергнуть наш результат, но исследования по данной тематике продолжаются. В работе, посвящённой паноптозу (скоординированному взаимодействию процессов пироптоза, апоптоза и некроптоза) при неалкогольной жировой болезни печени, в числе генов-кандидатов, выявленных секвенированием отдельных клеток был TRADD, на основе чего была построена компьютерная модель. Молекулярные исследования стыковки указали на миноциклин как перспективное средство терапии данного заболевания (Tian F. et al., 2025). Однако нами экспериментально изменений экспрессии наименее изученного в патогенезе эпилепсии белка-посредника TRADD выявлено не было.

Уровни экспрессии NF- $\kappa$ B подчинялись тем же закономерностям, что и TNF- $\alpha$ , поскольку их пути тесно связаны. Защитный эффект взаимодействия TNF- $\alpha$  с рецептором TNFR2 зависит от активации NF- $\kappa$ B, как и противоположный с TNFR1. Индукция NF- $\kappa$ B в астроцитах и микроглии способствует воспалению и нейродегенерации, а нейрональный NF- $\kappa$ B, состоящий из других субъединиц, является нейропротектором. В нашем случае из-за ограничения применяемого метода выяснить источник NF- $\kappa$ B не представлялось возможным. Но, по косвенным данным, это

активированная микроглия. Ингибирование пути NF-κB показало себя при заболеваниях ЦНС, и это один из механизмов действия нейропротекторов, таких как флавоноиды. В эксперименте с эпилепсией у мышей, вызванной каиновой кислотой, кверцитин ослабил судороги, снизил активацию микроглии и синтез провоспалительных цитокинов, включая TNF-α и IL-1β, а также активацию NF-κB (Wu D. et al., 2020).

NF-κB/NLRP3 опосредует и другую форму клеточной гибели, наблюдаемую в гиппокампе при эпилепсии – пироптоз. Он наблюдается как у пациентов с рефрактерной эпилепсией, так и в модели судорог у мышей, вызванных пентилентетразолом. Было обнаружено, что с NF-κB в образцах тканей гиппокампа пациентов связан фермент киназа 4, ассоциированная с рецептором интерлейкина-1 (IRAK4). Его ингибирование остановило пироптоз и облегчило судороги у животных (Zhao T. et al., 2024).

С другой стороны, ингибирование пути NF-κB может привести к негативным последствиям. Так, вальпроевая кислота снижает гибель нейронных клеток-предшественников именно посредством активации сигнализации NF-κB, который может способствовать выживанию нейронов, а не только их гибели (Go H.S. et al., 2011). Разные противоэпилептические препараты могут играть разные роли в пути NF-κB.

Необходимы дальнейшие исследования для определения функции различных димеров NF-κB в эпилепсии перед тем, как разрабатывать препараты, нацеленные на его путь.

В нашем эксперименте снижение миноциклином уровней его экспрессии сочетается с выраженным антиапоптотическим и противовоспалительным эффектом, что свидетельствует о положительном значении этого механизма его действия.

Таким образом, нами показаны нейропротективные – антиапоптотические и противовоспалительные эффекты миноциклина на модели аудиогенной эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной. Выявлено два основных механизма его действия: нейропротективного – снижение экспрессии p53, что уменьшает потерю нейронов, и противовоспалительного – воздействие на ось TNF-α–NF-κB, где их снижение уменьшало воспаление.

Преодоление лекарственной устойчивости при эпилепсии – сложная и комплексная задача, требующая лекарственных препаратов с новыми мишенями и механизмами действия на более общие процессы, чем изменение соотношений тормозных и возбуждающих нейромедиаторов.



К таким процессам относятся аберрантная гибель нейронов и нейровоспаление, воздействие на которые имеет большой терапевтический потенциал и представляется перспективным дополнением к существующим методам лечения.

**Перспективы дальнейшей разработки.** Полученные в данном исследовании результаты могут быть использованы для дальнейшего изучения патогенеза фармакорезистентной эпилепсии, роли апоптоза и нейровоспаления в формировании резистентности, а также возможностей их коррекции различными соединениями, в том числе миноциклином, который может стать добавкой к классическим противосудорожным препаратам и их комбинациям.

Раскрытые механизмы апоптоза и работы провоспалительных цитокиновых каскадов с молекулами-посредниками при аудиогенных судорогах у крыс линии Крушинского-Молодкиной неполны и требуют дальнейшего изучения. Так, было показано, что у них при эпилепсии имеет место FAS- и каспазозависимый апоптоз, механизм которого, например, участие апоптоз-индуцирующего фактора AIF, предстоит раскрыть. В более подробном изучении нуждается глиальный компонент, астроциты и активированная микроглия, каскад TNF- $\alpha$  с двумя его основными рецепторами, а также сигнальный путь NF- $\kappa$ B с выявлением продуцирующих его клеток и различных форм, от которых зависит его эффект. Также необходимо изучение других провоспалительных цитокинов в контексте влияния миноциклина на их экспрессию при аудиогенном киндлинге.

Целесообразно дальнейшее изучение механизмов действия миноциклина в целях расширения показаний его применения как антиапоптотического и нейропротективного препарата при широком спектре заболеваний ЦНС. Также необходимо изучение роли микроглии, продукции ей провоспалительных и связанных с апоптозом молекул и влияния на неё миноциклина.

## ВЫВОДЫ

1. При аудиогенном киндлинге уровни апоптоза в височной доле и гиппокампе крыс Крушинского-Молодкиной повышаются. Минолексин демонстрирует антиапоптотический нейропротективный эффект во всех изученных областях головного мозга: височной коре, подлежащем белом веществе, гранулярном слое зубчатой извилины, хилусе, поле СА4 гиппокампа. Антиапоптотический эффект минолексина обусловлен в основном супрессией проапоптотического белка p53, уровни которого повышаются при киндлинге в исследуемых областях головного мозга крыс. Выявлена дифференцированная реакция различных отделов мозга крыс на киндлинг и введение минолексина. Значимой роли Bcl-2 в гиппокампе не выявлено, в височной коре его экспрессия при киндлинге снижается. Выявлено тканеспецифичное супрессирующее воздействие минолексина на экспрессию каспазы-3 и -8.

2. Уровень экспрессии GFAP был высоким и не различался у крыс контрольной и опытных групп. Введение минолексина влияния не оказывало.

3. Минолексин может действовать на цитокины и связанные с ними молекулы. При киндлинге рост уровня FAS отмечался только в височной коре, для FADD там же отмечалось его снижение. При введении минолексина экспрессия FAS и FADD снижается в височной коре, но не в белом веществе и гиппокампе, уменьшается экспрессия TNF- $\alpha$  и NF- $\kappa$ B, возросших при киндлинге, в изученных отделах мозга. На экспрессию TRADD киндлинг и минолексин выраженных эффектов не оказывают.

4. Комплексный анализ воздействия минолексина на развитие нейровоспаления и апоптоза при экспериментальной эпилепсии на модели крыс Крушинского-Молодкиной подтвердил его антиапоптотические и противовоспалительные эффекты, обусловленные в основном подавлением экспрессии проапоптотического белка p53, фактора некроза опухолей TNF- $\alpha$  и фактора транскрипции NF- $\kappa$ B во всех исследуемых отделах головного мозга. Показана эффективность применения минолексина.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Аудиогенный киндлинг у крыс линии Крушинского-Молодкиной может быть использован для фундаментальных и прикладных исследований эпилептогенеза и механизмов формирования лекарственной устойчивости, а также исследования фармакологической коррекции нейровоспаления и апоптоза.
2. Препарат тетрациклинового ряда миноциклин может быть использован для купирования последствий эпилептических припадков как дополнение к стандартным схемам лечения эпилепсии.
3. Необходимо продолжение исследования механизмов нейровоспаления и апоптоза при фармакорезистентной эпилепсии в различных зонах головного мозга.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ANOVA – (analysis of variance) дисперсионный анализ

Bcl-2 – регулятор апоптоза В-клеточная лейкемия/лимфома 2 (B Cell Lymphoma/Leukaemia 2)

CA 1-4 – поле гиппокампа (Cornu Ammonis area 1-4)

FADD – FAS-ассоциированный белок с доменом смерти (FAS-associated protein with death domain)

FAS (CD95) – апоптозный антиген 1, кластер дифференцировки 95, рецептор смерти

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein)

NF- $\kappa$ B – транскрипционный ядерный фактор «каппа-би» (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

p53 – фактор транскрипции и супрессор опухолей

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухолей альфа (Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ )

TRADD – адаптерный DD-содержащий адапторный белок, ассоциированный с доменом смерти (tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein)

TUNEL – метод маркировки терминальной трансферазы dUTP (terminal dUTP Nick End-Labeling)

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДИ – доверительный интервал

в/б – внутривенное введение

ЦНС – центральная нервная система

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Александрова Е.П. Хронические нарушения регуляции глутаматергической трансмиссии в гиппокампе крыс линии Крушинского-Молодкиной, вызванные многократными судорожными припадками. / Александрова Е.П., Ивлев А.П., Куликов А.А., Никитина Л.С., Глазова М.В., Черниговская Е.В. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2023. – Т. 59, №5. – С. 427–440.
- 2 Бажанова Е.Д. Механизмы апоптоза при фармакорезистентной эпилепсии / Бажанова Е.Д., Козлов А.А. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – Vol. 122, N 5. – Р. 43 – 50.
- 3 Витаев С.И. Специфические особенности крыс линии Крушинского-Молодкиной как генетической модели генерализованных судорожных припадков. / Витаев С.И. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, №6. – С. 667-679.
- 4 Горбачёва Е.Л. Особенности функционального состояния гипоталама-гипофизарно-адренокортикальной системы у крыс линии Крушинского-Молодкиной. /Горбачёва Е.Л., Куликов А.А., Черниговская Е.В., Глазова М.В., Никитина Л.С. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 2. – С. 150-164.
- 5 Дорофеева Н.А. Функциональное состояние нигростриатной системы крыс линии Крушинского–Молодкиной в ходе аудиогенных судорог. / Дорофеева Н.А., Никитина Л.С., Зосен Д.В., Глазова М.В., Черниговская Е.В. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20, №2. – С. 204-211.
- 6 Козлов А.А., Соколова Ю.О., Коваленко А.Л., Бажанова Е.Д. Влияние лизинакриднацетата на уровень апоптоза и экспрессию апоптозассоциированных белков на фоне актионкогенной терапии при колоректальном раке у мышей. / Козлов А.А., Соколова Ю.О., Коваленко А.Л., Бажанова Е.Д. // Бюллетень экспериментальной медицины и биологии. – 2023. – Т. 176, №8. – С. 242-248.
- 7 Криволапов С.А., Ершов Б.Г. Половые особенности припадка и поведения крыс линии Крушинского-Молодкиной / 1 Криволапов С.А., Ершов Б.Г. // Журнал высшей нервной деятельности. – 2015. – Т. 65, №6. – С. 756-765.

- 8 Полетаева И.И. Аудиогенная эпилепсия грызунов. / Полетаева И.И. // Природа. – 2017. – Т. 9, № 1225. – С. 40-47.
- 9 Сурина Н.М. Модель эпилепсии – крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ). / Сурина Н.М., Полетаева И.И., Федотова И.Б. // XIII международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». – 2017. <https://istina.msu.ru/conferences/presentations/92560701/> (дата обращения 27.01.2025).
- 10 Сурина Н.М. Развитие фармакорезистентности у крыс линии Крушинского-Молодкиной. / Сурина Н.М., Гюнтнер С.М., Решетникова А.А., Федотова И.Б., Полетаева И.И. // Всероссийская Конференция (Конгресс) : VI Съезд фармакологов России. – 2023. – Т. 86, №11. – С. 142.
- 11 Федотова И.Б. Влияние этосуксемида на аудиогенную эпилепсию крыс линии Крушинского—Молодкиной. / Федотова И.Б., Перепелкина О.В., Николаев Г.М., Сурина Н.М., Полетаева И.И. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167, №4. – С. 447-450.
- 12 Abarrategui B. Temporal lobe epilepsy: A never-ending story. / B. Abarrategui, R. Mai, I. Sartori, S. Francione, V. Pelliccia, M. Cossu, L. Tassi // *Epilepsy Behav.* – 2019. – Vol. 122: 108122.
- 13 Abbadie C. High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. / C. Abbadie, N. Kabrun, F. Bouali, J. Smardova, D. Stéhelin, B. Vandenbunder, et al. // *Cell.* – 1993. – Vol. 75, N 5. – P. 899-912.
- 14 Abdel-Salam O.M.E. Capsaicin Exerts Anti-convulsant and Neuroprotective Effects in Pentylenetetrazole-Induced Seizures. / O.M.E. Abdel-Salam, A.A. Sleem, M.A. El B. M. Sayed, E.R. Youness, N. Shaffie // *Neurochem Res.* – 2020. – Vol. 45, N 5. – P. 42-45. 1045-1061.
- 15 Afshari A.R. Minocycline in Treating Glioblastoma Multiforme: Far beyond a Conventional Antibiotic. / A.R. Afshari, H. Mollazadeh, A. Sahebkar // *J Oncol.* – 2020. – Vol. 2020: 8659802.
- 16 Agostini M. The p53 Family in Brain Disease. / M. Agostini, G. Melino, F. Bernassola // *Antioxid Redox Signal.* – 2018. – Vol. 29, N 1. – P. 1-14.
- 17 Aleksandrova E.A. Audiogenic kindling activates glutamatergic system in the hippocampus of rats with genetic predisposition to audiogenic seizures. / E.A. Aleksandrova,

A.P. Ivlev, A.A. Kulikov, A.A. Naumova, M.V. Glazova, E.V. Chernigovskaya // Brain Res. – 2024. – Vol. 1829: 148792.

18 Alese O.O. Upregulation of hippocampal synaptophysin, GFAP and mGluR3 in a pilocarpine rat model of epilepsy with history of prolonged febrile seizure. / O.O. Alese, M.V. Mabandla // J Chem Neuroanat. – 2019. – Vol. 100: 101659.

19 Ananias Teocchi M.A., D'Souza-Li L. Apoptosis through Death Receptors in Temporal Lobe Epilepsy-Associated Hippocampal Sclerosis. / M.A. Ananias Teocchi, L. D'Souza-Li // Mediators Inflamm. – 2016. – Vol. 2016: 8290562.

20 Ataie-Kachoie P. Minocycline targets the NF- $\kappa$ B Nexus through suppression of TGF- $\beta$ 1-TAK1-I $\kappa$ B signaling in ovarian cancer. / P. Ataie-Kachoie, S. Badar, D.L. Morris, M.H. Pourgholami // Mol Cancer Res. – 2013. – Vol. 11, N 10. – P. 1279-1291.

21 Avakyan G.N. Ilae classification of the epilepsies: The 2017 revision and update. / G.N. Avakyan, D.V. Blinov, A.V. Lebedeva, S.G. Burd, G.G. Avakyan // Epilepsy Paroxysmal Cond. – 2017. – Vol. 9. – P. 6-25.

22 Bartolini E. Drug-resistant epilepsy at the age extremes: Disentangling the underlying etiology. / E. Bartolini, A.R. Ferrari, S. Lattanzi, S. Pradella, G. Zaccara // Epilepsy Behav. – 2022. – Vol. 132: 108739.

23 Bazhanova E.D. Mechanisms of apoptosis in drug-resistant epilepsy. / E.D. Bazhanova, A.A. Kozlov // Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova. – 2022. – Vol. 122, N 5. – P. 43-50.

24 Bazhanova E.D. Mechanisms of Drug Resistance in the Pathogenesis of Epilepsy: Role of Neuroinflammation. A Literature Review. / E.D. Bazhanova, A.A. Kozlov, A.V. Litovchenko // Brain Sci. – 2021. – Vol. 11, N 5: 663.

25 Benlefki S. Differential effect of Fas activation on spinal muscular atrophy motoneuron death and induction of axonal growth. / S. Benlefki, R. Younes, D. Challuau, N. Bernard-Marissal, C. Hilaire, F. Scamps, M. Bowerman [et al.] // Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). – 2023. – Vol. 69, N 10. – P. 1-8.

26 Blecharz-Lang K.G. Minocycline Attenuates Microglia/Macrophage Phagocytic Activity and Inhibits SAH-Induced Neuronal Cell Death and Inflammation. / K.G. Blecharz-Lang, V. Patsouris, M. Nieminen-Kelhä, S. Seiffert, U.C. Schneider, P. Vajkoczy // Neurocrit Care. – 2022. – Vol. 37, N. 2. – P. 410-423.

27 Bonnetblanc J. M. [Doxycycline]. / J. M. Bonnetblanc // *Ann Dermatol Venereol.* – 2002. – Vol. 129, N 6-7. – P. 874-882.

28 Botterill J.J. An Excitatory and Epileptogenic Effect of Dentate Gyrus Mossy Cells in a Mouse Model of Epilepsy. / J.J. Botterill, Y.L. Lu, J.J. LaFrancois, H.L. Bernstein, D. Alcantara-Gonzalez [et al.] // *Cell Rep.* – 2019. – Vol. 29. – P. 2875-2889.e6.

29 Boulenouar M. Drug-resistant epilepsy: Definition, pathophysiology, and management. / M. Boulenouar, F. Brigo, S. Lattanzi, B. Abou-Khalil, H. Al Hail, A. Asadi-Pooya // *J Neurol Sci.* – 2023. – Vol. 452: 120766.

30 Brenner M. Regulation of GFAP Expression. / M. Brenner, A. Messing // *ASN Neuro.* – 2021. – Vol. 13: 1759091420981206.

31 Bulduk E.B. The Effects of Minocycline on the Hippocampus in Lithium-Pilocarpine Induced Status Epilepticus in Rat: Relations with Microglial/Astrocytic Activation and Serum S100B Level. / E.B. Bulduk, G. Kurt, S. Barun, O. Aydemir, M. Kiziltas, M. Oktem, T. Turhan [et al.] // *Turk Neurosurg.* – 2019. – Vol. 29, N 1. – P. 95-105.

32 Cai M. The Function of NF-Kappa B During Epilepsy, a Potential Therapeutic Target. / M. Cai, W. Lin // *Front Neurosci.* – 2022. – Vol. 16: 851394.

33 Cai Y. Ferroptosis and Its Role in Epilepsy. / Y. Cai, Z. Yang // *Front Cell Neurosci.* – 2021. – Vol. 15: 15:696889.

34 Camara-Lemarroy C. Minocycline treatment in clinically isolated syndrome and serum NfL, GFAP, and metalloproteinase levels. / C. Camara-Lemarroy, L. Metz, J. Kuhle, D. Leppert, E. Willemse, D.K. Li, A. Traboulsee [et al.] // *Mult Scler.* – 2022. – Vol. 28, N 13. – P. 2081-2089.

35 Candé C. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. / C. Candé, I. Cohen, E. Daugas, L. Ravagnan, N. Larochette, N. Zamzami, G. Kroemer // *Biochimie.* – 2002. – Vol. 84, N 2-3. – P. 215-222.

36 Cankaya S. The therapeutic role of minocycline in Parkinson's disease. / S. Cankaya, B. Cankaya, U. Kilic, E. Kilic, B. Yulug // *Drugs Context.* – 2019. – Vol. 6, N 8: 212553.

37 Chang C-J. Minocycline partially inhibits caspase-3 activation and photoreceptor degeneration after photic injury. / C-J. Chang, C-H. Cherng, W-S. Liou, C-L. Liao // *Ophthalmic Res.* – 2005. – Vol. 37, N 4. – P. 202-213.



38 Chauhan P. Minocycline for the management of multiple sclerosis: repositioning potential, opportunities, and challenges. / P. Chauhan, A.K. Kakkar, H. Singh, C.S. Gautam // *Expert Rev Neurother.* – 2021. – Vol. 21, N 1. – P.35-43.

39 Chen M. Complement in the Development of Post-Traumatic Epilepsy: Prospects for Drug Repurposing. / M. Chen, S.R. Edwards, D.C. Reutens // *J Neurotrauma.* – 2020. – Vol. 37, N 5. – P. 692-705.

40 Chen M. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. / M. Chen, V.O. Ona, M. Li, R.J. Ferrante, K.B. Fink, S. Zhu, J. Bian [et al.] // *Nat Med.* – 2000. – Vol. 6, N 7. – P. 797-801.

41 Chen N-J. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. / N-J. Chen, I.I.C. Chio, W-J. Lin, G. Duncan, H. Chau, D. Katz, H-L. Huang, K.A. Pike [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105, N 34. – P. 12429-12434.

42 Chen Y. Neuroinflammatory mediators in acquired epilepsy: an update. / Y. Chen, M.M. Nagib, N. Yasmen, M.N. Sluter, T.J. Littlejohn, Y. Yu, J. Jiang // *Inflamm Res.* – 2023. – Vol. 72, N 4. – P.683-701.

43 Cheng D. Minocycline, a classic antibiotic, exerts psychotropic effects by normalizing microglial neuroinflammation-evoked tryptophan-kynurenine pathway dysregulation in chronically stressed male mice. / D. Cheng, Z-S. Qin, Y. Zheng, J-Y. Xie, S-S. Liang, J-L. Zhang, Y-B. Feng, Z-J. Zhang // *Brain Behav Immun.* – 2023. – Vol. 107. – P. 305-318.

44 Choudhury S. A comparative analysis of BCL-2 family. / S. Choudhury // *Bioinformation.* – 2019. – Vol. 15, N 4. – P. 299-306.

45 Chu H-C. Effects of minocycline on Fas-mediated fulminant hepatitis in mice. / H-C. Chu, Y-L. Lin, H-K. Sytwu, S-H. Lin, C-L. Liao, Y-C. Chao // *Br J Pharmacol.* – 2005. – Vol. 144, N 2. – P. 275-282.

46 Chuvakova L.N. Transcriptome of the Krushinsky-Molodkina Audiogenic Rat Strain and Identification of Possible Audiogenic Epilepsy-Associated Genes. / L.N. Chuvakova, S. Yu. Funikov, A.P. Rezvykh, A.I. Davletshin, M.B. Evgen'ev, S.A. Litvinova, I.B. Fedotova, I.I. Poletaeva, D.G. Garbuz // *Front Mol Neurosci.* – 2021. – Vol. 14: 738930.

47 Cui W. White matter network disorder in mesial temporal epilepsy: An fMRI study. / W. Cui, K. Shang, B. Qiu, J. Lu, J. Gao // *Epilepsy Res.* – 2021. – Vol. 172:106590.

48 Dai C. Minocycline attenuates colistin-induced neurotoxicity via suppression of apoptosis, mitochondrial dysfunction and oxidative stress. / C. Dai, G.D. Ciccotosto, R. Cappai, Y. Wang, S. Tang, X. Xiao, T. Velkov // *J Antimicrob Chemother.* – 2018. – Vol. 72, N. 6. – P. 1635-1645.

49 de Deus J.L. Inflammatory markers in the hippocampus after audiogenic kindling. / J.L. de Deus, M.R. Amorim, P.C.G. de Barcellos Filho, J.A.C. de Oliveira, M.E. Batalhão, N. Garcia-Cairasco [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2020. – Vol. 721: 134830.

50 de Lanerolle N.C. Astrocytes and epilepsy. / N.C. de Lanerolle, T-S. Lee, D.D. Spencer // *Neurotherapeutics.* – 2010. – Vol. 7, N 4. – P. 424-438.

51 Dengler C. Normal and epilepsy-associated pathologic function of the dentate gyrus. / C. Dengler, D. Coulter // *Prog Brain Resn Biomolecules.* – 2016. – Vol. 226. – P. 155-178.

52 Devinsky O. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. / O. Devinsky, A. Vezzani, S. Najjar, N.C. De Lanerolle, M.A. Rogawski // *Trends Neurosci.* – 2013. – Vol. 36, N 3. – P. 174-184.

53 Díaz F. Enhanced Astrocyte Activity and Excitatory Synaptic Function in the Hippocampus of Pentylentetrazole Kindling Model of Epilepsy. / F. Díaz, F. Aguilar, M. Wellmann, A. Martorell, C. González-Arancibia, L. Chacana-Véliz, I. Negrón-Oyarzo [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, N 19: 14506.

54 Ding D-X. Dynamic expression patterns of ATF3 and p53 in the hippocampus of a pentylentetrazole-induced kindling model. / D-X. Ding, F-F. Tian, J-L. Guo, K. Li, J-X. He, M-Y. Song, L. Li, X. Huang // *Mol Med Rep.* – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. 645-651.

55 Dixit V. NF-kappaB signaling. Many roads lead to Madrid. / V. Dixit, T.W. Mak // *Cell.* – 2002. – Vol. 111, N 5. – P. 615-619.

56 Dossi E. Human astrocytes in the diseased brain. / E. Dossi, F. Vasile, N. Rouach // *Brain Res. Bull.* – 2018. – Vol. 136. – P. 139-156.

57 Drabek T. Minocycline attenuates brain tissue levels of TNF- $\alpha$  produced by neurons after prolonged hypothermic cardiac arrest in rats. / T. Drabek, A. Janata, C.D. Wilson, J. Stezoski, K. Janesko-Feldman, S.A. Tisherman, L.M. Foley, J.D. Verrier, P.M. Kochanek // *Resuscitation.* – 2014. – Vol. 85, N 2. – P. 284-291.

58 Druzhkova T.A. Elevated Serum Cortisol Levels in Patients with Focal Epilepsy, Depression, and Comorbid Epilepsy and Depression. / T.A. Druzhkova, A.A. Yakovlev, F.K.

Rider, M.S. Zinchuk, A.B. Guekht, N.V. Gulyaeva // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, N 18: 10414.

59 Du C. Exploring novel AEDs from drugs used for treatment of non-epileptic disorders. / C. Du, F. Zheng, X. Wang // *Expert Rev Neurother.* – 2016. – Vol. 16, N 4. –P. 449-461.

60 Du X. A proteomic analysis of Bcl-2 regulation of cell cycle arrest: insight into the mechanisms. / X. Du, J. Xiao, X. Fu, B. Xu, H. Han, Y. Wang, X. Pei // *J Zhejiang Univ Sci B.* – 2021. – Vol. 22, N 10. – P. 839-855.

61 Eischen C.M. The Fas pathway in apoptosis. / C.M. Eischen, P.J. Leibson // *Adv Pharmacol.* – 1997. – Vol. 41. P. 107-132.

62 El-Hodhod M.A. Serum Fas and Bcl-2 in patients with epilepsy. / M.A. El-Hodhod, H.Y. Tomoum, M.M.A. Al-Aziz, S.M. Samaan // *Acta Neurol Scand.* – 2006. – Vol. 113, N 5. – P. 315-321.

63 Engel T. Elevated p53 and lower MDM2 expression in hippocampus from patients with intractable temporal lobe epilepsy. / T. Engel, B.M. Murphy, C.K. Schindler, D.H. Henshall // *Epilepsy Res.* – 2007. – Vol. 77, N 2-3. – P. 151-156.

64 Engel T. Loss of p53 results in protracted electrographic seizures and development of an aggravated epileptic phenotype following status epilepticus. / T. Engel, K. Tanaka, E.M. Jimenez-Mateos, A. Caballero-Caballero, J.H.M. Prehn, D.C. Henshall // *Cell Death Dis.* – 2010. – Vol. 1, N 10: e79.

65 Erekat N.S. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. / N.S. Erekat // *Clin Anat.* – 2022. – Vol. 35, N 1. – P. 65-78.

66 Eskandari E. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. / E. Eskandari, C.J. Eaves // *J Cell Biol.* – 2022. – Vol. 221, N 6: e202201159.

67 Ettcheto M. Mice Lacking Functional Fas Death Receptors Are Protected from Kainic Acid-Induced Apoptosis in the Hippocampus. / M. Ettcheto, F. Junyent, L. de Lemos, M. Pallas, J. Folch, C. Beas-Zarate, E. Verdaguer [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2015. – Vol. 52, N 1. – P. 120-129.

68 Yong V.W. The promise of minocycline in neurology. / V. W. Yong, J. Wells, F. Giuliani, S. Casha, C. Power, L. M. Metz // *Lancet Neurol.* – 2004. – Vol. 3, N 12. P. – 744-751.

69 Falco-Walter J. Epilepsy-Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology / J. Falco-Walter // *Semin Neurol.* – 2020. – Vol. 40, N 6. – P. 617-623.

70 Fan Y. miR  
epilepsy model by downregulating GFAP. / Y. Fan, W. Wang, W. Li, X. Li // *Mol Med Rep.* – 2020. – Vol. 22, N 4. – P. 3504-3512.

-15a

71 Fedotova I.B. Genetic analysis of the predisposition to audiogenic seizure fits in Krushinsky-Molodkina rat strain. / I.B. Fedotova, Z.A. Kostyna, I.I. Poletaeva, V.G. Kolpakov, N.N. Barykina, T.I. Aksenovich // *Genetika.* – 2005. – Vol. 41, N 11. – P. 1487-1494.

72 Feng F. Ferroptosis and Pyroptosis in Epilepsy. / F. Feng, R. Luo, D. Mu, Q. Cai // *Mol Neurobiol.* – 2024. – Vol. 61, N 10. – P.7354-7368.

73 Feng J. Mitochondrial damage in hippocampal neurons of rats with epileptic protein expression of Fas and caspase-3. / J. Feng, L. Feng, G. Zhang // *Exp Ther Med.* – 2018. – Vol. 16, N 3. – P. 2483-2489.

74 Fricker M. Neuronal Cell Death. / M. Fricker, A.M. Tolkovsky, V. Borutaite, M. Coleman, G.C. Brown // *Physiol Rev.* – 2018. – Vol. 98, N 2, – P. 813-880.

75 Fritsch M. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. / M. Fritsch, S.D. Günther, R. Schwarzer, M-C. Albert, F. Schorn, J.P. Werthenbach, L.M. Schiffmann [et al.] // *Nature.* – 2019. – Vol. 575, N 7784. – P. 683-687.

76 Garbuz D.G. Rodent Models of Audiogenic Epilepsy: Genetic Aspects, Advantages, Current Problems and Perspectives. / D.G. Garbuz, A.A. Davletshin, S.A. Litvinova, I.B. Fedotova, N.M. Surina, I.I. Poletaeva // *Biomedicines.* – 2022. – Vol. 10, N 11: 2934.

77 García-Martínez Y. Quantitative characterization of proliferative cells subpopulations in the hilus of the hippocampus of adult Wistar rats: an integrative study. / Y. García-Martínez, K. Sánchez-Huerta, J. Pacheco-Rosado // *J Mol Histol.* – 2020. – Vol. 51. – P. 437-453.

78 Giovannini G. FADD gene pathogenic variants causing recurrent febrile infection-related epilepsy syndrome: Case report and literature review. / G. Giovannini, M.P. Giannoccaro, M.C. Cioclu, N. Orlandi, R. Liguori, S. Meletti // *Epilepsia.* – 2024. – Vol. 65, N 7. – P. e119-e124.

79 Go H.S. Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. / H.S. Go, J.E. Seo, K.C. Kim, S.M. Han, P. Kim, Y.S. Kang [et al.] // J Biomed Sci. – 2011. – Vol. 18, N 1: 48.

80 Gogishvili D. The GFAP proteoform puzzle: How to advance GFAP as a fluid biomarker in neurological diseases. / D. Gogishvili, M.I.J. Honey, I.M.W. Verberk, L. Vermunt, E.M. Hol, C.E. Teunissen, S. Abeln // J Neurochem. – 2025. – Vol. 169, N 1: e16226.

81 Gordon P.H. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. / P.H. Gordon, D.H. Moore, R.G. Miller, J.M. Florence, J.L. Verheijde, C. Doorish, J.F. Hilton et. al. // Lancet Neurol. – 2007. – Vol. 6, N 12. – P.1045-1053.

82 Guan P. Meloxicam Inhibits Apoptosis in Neurons by Deactivating Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 25, Leading to the Decreased Cleavage of DNA Fragmentation Factor Subunit  $\alpha$  in Alzheimer's Disease. / P. Guan, D. Zhu, P. Wang // Mol Neurobiol. – 2023. – Vol. 60, N 1. – P. 395-412.

83 Harbachova E.L. Audiogenic kindling activates expression of vasopressin in the hypothalamus of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to reflex epilepsy. / E.L. Harbachova, E.V. Chernigovskaya, M.V. Glazova, L.S. Nikitina // J Neuroendocrinol. – 2020. – Vol. 32, N 4: e12846.

84 He J. Minocycline attenuates neuronal apoptosis and improves motor function after traumatic brain injury in rats. / J. He, J. Mao, L. Hou, S. Jin, X. Wang, Z. Ding [et al.] // Exp Anim. – 2021. – Vol. 70, N 4. – P. 563-569.

85 Henning L. Reactive microglia are the major source of tumor necrosis factor alpha and contribute to astrocyte dysfunction and acute seizures in experimental temporal lobe epilepsy. / L. Henning, H. Antony, A. Breuer, J. Müller, G. Seifert, E. Audinat, P. Singh [et al.] // Glia. – 2023. – Vol. 71, N 2. – P. 168-186.

86 Henning O. Temporal lobe epilepsy. / O. Henning, K. Heuser, V. Larsen, E. Kyte, H. Kostov, P. Marthinsen, A. Egge, K. Alfstad, K. Nakken // Tidsskr Nor Laegeforen. – 2023. – Vol. 143, N 2.

87 Henshall D.C. Caspase-2 activation is redundant during seizure-induced neuronal death. / D.C. Henshall, S.L. Skradski, D.P. Bonislawski, J.Q. Lan, R.P. Simon // J Neurochem. – 2001. – Vol. 77, N 3. – P. 886-895.

88 Henshall D.C. Death-associated protein kinase expression in human temporal lobe epilepsy. / D.C. Henshall, C.K. Schindler, N.K. So, J-Q. Lan, R. Meller, R.P. Simon // *Ann Neurol.* – 2004. – Vol. 55, N 4. – P. 485-494.

89 Henshall D.C. Epilepsy and apoptosis pathways. / D.C. Henshall, R.P. Simon // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2005. – Vol. 25, N 12. – P. 1557-1572.

90 Hirsch E.C. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. / E.C. Hirsch, T. Breidert, E. Rousset, S. Hunot, A. Hartmann, P.P. Michel // *Ann N Y Acad Sci.* – 2003. – Vol. 991. – P. 214-228.

91 Hollis A. Role of inflammasomes and neuroinflammation in epilepsy. / A. Hollis, J.R. Lukens // *Immunol Rev.* – 2025. – Vol. 329, N 1: e13421.

92 Hollville E. Apoptotic cell death regulation in neurons / E. Hollville, S.E. Romero, M. Deshmukh // *FEBS J.* – 2019. – Vol. 286, N 17. – P. 3276-3298.

93 Horiuchi T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. / T. Horiuchi, H. Mitoma, S. Harashima, H. Tsukamoto, T. Shimoda // *Rheumatology (Oxford).* – 2010. – Vol. 49, N 7. – P. 1215-1228.

94 Hou Y. Minocycline protects against lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. / Y. Hou, G. Xie, X. Liu, G. Li, G. Jia, J. Xu, B. Wang // *Psychopharmacology (Berl).* – 2016. – Vol. 233, N 5. – P. 905-916.

95 Idriss H.T. TNF  $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). / H.T. Idriss, J.H. Naismith // *Microsc Res Tech.* – 2000. – Vol. 50, N 3. – P. 184-195.

96 Ildarabadi A. Inflammation and oxidative stress in epileptic children: from molecular mechanisms to clinical application of ketogenic diet. / A. Ildarabadi, S.N.M.M. Ali, F. Rahmani, N. Mosavari, E. Pourbakhtyaran, N. Rezaei // *Rev Neurosci.* – 2024. – Vol. 35, N 4. – P. 473-488.

97 Janson M.T. Continuing Burden of Refractory Epilepsy. / M.T. Janson, J.L. Bainbridge // *Ann Pharmacother.* – 2021. – Vol. 55, N 3. – P. 406-408.

98 Jessen R.K. Glial cells. / R.K. Jessen // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36, N 10. – P. 1861-1867.

99 Jesus K. Tetracyclines: four rings to rule infections through resistance and disease tolerance. / K. Jesus, L.F. Moita // *J Clin Invest.* – 2022. – Vol. 132, N 17: e162331.

- 100 Jiang B-P. Minocycline inhibits ICAD degradation and the NF- $\kappa$ B activation induced by 6-OHDA in PC12 cells. / B-P. Jiang, L. Le, L-J. Xu, P-G. Xiao // Brain Res. – 2014. – Vol. 1586. – P. 1-11.
- 101 Jiang J. Editorial: Neuroinflammation in acquired epilepsy. / J. Jiang, V. Santhakumar, X. Zhu // Front Cell Dev Biol. – 2022. – Vol. 7, N 10: 1074537.
- 102 Jin W-J. Minocycline improves postoperative cognitive impairment in aged mice by inhibiting astrocytic activation. / W-J. Jin, S-W. Feng, Z.F. Feng, S-M. Lu, T. Qi, Y-N. Qian // Neuroreport. – 2014. – Vol. 25, N 1. – P. 1-6.
- 103 Jonas M. Minocycline / M. Jonas, B.A. Cunha // Ther Drug Monit. – 1982. – Vol.4, N 2. – P. 137-145.
- 104 Juvalle I.A. Possible interplay between the theories of pharmacoresistant epilepsy. / I.A. Juvalle, A.T. Che Has // Eur J Neurosci. – 2021. – Vol. 53, N 6, – P. 1998-2026.
- 105 Kaltschmidt B. Potential involvement of the transcription factor NF-kappa B in neurological disorders. / B. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle, C. Kaltschmidt // Mol Aspects Med. – 1993. – Vol. 14, N 3. – P. 171-190.
- 106 Kamaşak T. HMGB-1, TLR4, IL-1R1, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ : novel epilepsy markers? / T. Kamaşak, B. Dilber, S.Ö. Yaman, B.D. Durgut, T. Kurt, E. Çoban, E.A. Arslan // Epileptic Disord. – 2020. – Vol. 22, N 2. – P. 183-193.
- 107 Kegler A. Relationship between seizure type, metabolic profile, and inflammatory markers in blood samples of patients with epilepsy. / A. Kegler, E.T. Pascotini, A.L.F. Caprara, J. Arend, P. Gabbi, M.M. Duarte, L.F.F. Royes, M.R. Fighera // Epileptic Disord. – 2021. – Vol. 23, N 1. – P. 74-84.
- 108 Khaboushan A.S. Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. / A.S. Khaboushan, N. Yazdanpanah, N. Rezaei // Mol Neurobiol. – 2022. – Vol. 59, N 3. – P. 1724-1743.
- 109 Khachigian L.M. Repurposing Drugs for Skin Cancer. / L.M. Khachigian // Curr Med Chem. – 2020. – Vol. 27, N 42. – P. 7214-7221.
- 110 Khatoon R. Mitochondria-Related Apoptosis Regulation by Minocycline: A Study on a Transgenic Drosophila Model of Alzheimer's Disease. / R. Khatoon, P. Kaushik, S. Parvez // ACS Omega. – 2022. – Vol. 7, N. 23. – P. 19106-19112.
- 111 Kim H-S. Minocycline and neurodegenerative diseases. / H-S. Kim, Y-H. Suh // Behav Brain Res. – 2009. – Vol. 196, N 2. – P. 168-179.

- 112 Kim S. Dynamic Fas signaling network regulates neural stem cell proliferation and memory enhancement. / S. Kim, N. Kim, J. Lee, S. Kim, J. Hong, S. Son, W.D. Heo // *Sci Adv.* – 2020. – Vol. 6, N 17: eaaz9691.
- 113 Klein P. Recent Advances in Pharmacologic Treatments of Drug-Resistant Epilepsy: Breakthrough in Sight / P. Klein, D. Friedman, P. Kwan // *CNS Drugs.* – 2024. – Vol. 38, N 12. – P. 949-960.
- 114 Klodowski D.A. Seizure latency and epilepsy localization as predictors of recurrence following epilepsy surgery. / D.A. Klodowski, B.J. George, M.R. Sperling // *Epilepsia.* – 2022. – Vol. 63, N 5. – P. 1074-1080.
- 115 Kopczynska M. Complement system biomarkers in epilepsy. / M. Kopczynska, W.M. Zelek, S. Vespa, S. Touchard, M. Wardle, S. Loveless, R.H. Thomas [et al.] // *Seizure.* – 2018. – Vol. 60, – P.1-7.
- 116 Kovács Z. Doxycycline could aggravate the absence-like epileptic seizures of WAG/Rij rats via matrix metalloproteinase inhibition. / Z. Kovács, K.A. Kékesi, P. Baracska, G. Juhász, A. Czurkó // *Neurochem Int.* – 2011. – Vol. 59, N 5. – P. 563-566.
- 117 Kulikov A.A. Audiogenic kindling stimulates aberrant neurogenesis, synaptopodin expression, and mossy fiber sprouting in the hippocampus of rats genetically prone to audiogenic seizures. / A.A. Kulikov, A.A. Naumova, E.P. Aleksandrova, M.V. Glazova, E.V. Chernigovskaya // *Epilepsy Behav.* – 2021. – Vol.125: 108445.
- 118 Kulikov A.A. Dynamics of neurodegeneration in the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats correlates with the progression of limbic seizures. / A.A. Kulikov, A.N. Naumova, N.A. Dorofeeva, A.P. Ivlev, M.G. Glazova, E.V. Chernigovskaya // *Epilepsy Behav.* – 2022. – Vol.134: 108846.
- 119 Kulikov A.A. Impaired postnatal development of the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to audiogenic seizures. / A.A. Kulikov, N.A. Dorofeeva, A.A. Naumova, E.L. Harbachova, M.V. Glazova, E.V. Chernigovskaya // *Epilepsy Behav.* – 2020. – Vol. 113: 107526.
- 120 Kumbhar P. Drug repurposing: An emerging strategy in alleviating skin cancer. / P. Kumbhar, K. Kole, T. Yadav, A. Bhavar, P. Waghmare, R. Bhokare [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2022. – Vol. 926: 175031.
- 121 Kyrylkova K. Detection of apoptosis by TUNEL assay / K. Kyrylkova, S. Kyryachenko, M. Leid, C. Kioussi // *Methods Mol Biol.* – 2012. – Vol. 887. – P. 41-47.



- 122 Lagos-Cabré R. Connexins in Astrocyte Migration. / R. Lagos-Cabré, F. Burgos-Bravo, A.M. Avalos, L. Leyton // *Front Pharmacol.* – 2020. – Vol. 15, N 10: 1546.
- 123 Lagunas-Rangel F.A. Fas (CD95)/FasL (CD178) system during ageing. / F.A. Lagunas-Rangel // *Cell Biol Int.* – 2023. – Vol. 47, N 8. P. 1295-1313.
- 124 Lattanzi S. Latency of poststroke epilepsy can predict drug resistance. / S. Lattanzi, E. Trinká, G. Turcato, C. Rinaldi, C. Cagnetti, N. Foschi, S. Broggi [et al.] // *Eur J Neurol.* – 2022. – Vol. 29, N 8. – P. 2481-2485.
- 125 Leipp F. Glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease: a narrative review. / F. Leipp, J. Vialaret, P. Mohaupt, S. Coppens, A. Jaffuel, A-C. Niehoff, S. Lehmann, C. Hirtz // *Brain Commun.* – 2024. – Vol. 6, N 6: fcae396.
- 126 Lévesque M. Evolution of interictal spiking during the latent period in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. / M. Lévesque, A.D.B. Macey-Dare, S. Wang, M. Avoli // *Curr Res Neurobiol.* – 2021. – Vol. 2: 100008.
- 127 Levkovitch-Verbin H. Minocycline mechanism of neuroprotection involves the Bcl-2 gene family in optic nerve transection. / H. Levkovitch-Verbin, Y. Waserzoog, S. Vander, D. Makarovsky, P. Ilia // *Int J Neurosci.* – 2014. – Vol. 124, N. 10. – P. 755-761.
- 128 Li C., Impact of minocycline on neurodegenerative diseases in rodents: a meta-analysis. / C. Li, K. Yuan, H. Schluesener // *Rev Neurosci.* – 2013. – Vol. 24, N 5. – P. 553-562.
- 129 Li H. New Insights into the Roles of p53 in Central Nervous System Diseases. / H. Li, Z. Zhang, H. Li, X. Pan, Y. Wang // *Int J Neuropsychopharmacol.* – 2023. – Vol. 26, N 7. – P. 465-473.
- 130 Li J. Minocycline Protects Against NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation and P53-Associated Apoptosis in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. / J. Li, J. Chen, H. Mo, J. Chen, C. Qian, F. Yan, G. Chi [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2016. – Vol. 53, N. 4. – P. 2668-2678.
- 131 Li Z. Functional roles in cell signaling of adaptor protein TRADD from a structural perspective. / Z. Li, W. Yuan, Z. Lin // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2020. – Vol. 18. – P. 2867-2876.
- 132 Liang J. Minocycline Attenuates Sevoflurane-Induced Postoperative Cognitive Dysfunction in Aged Mice by Suppressing Hippocampal Apoptosis and the Notch Signaling

Pathway-Mediated Neuroinflammation. / J. Liang, S. Han, C. Ye, H. Zhu, J. Wu, Nie Y., G. Chai [et al.] // Brain Sci. – 2023. – Vol. 13, N. 3: 512.

133 Liang Q. Caspase-independent apoptosis in yeast. / Q. Liang, W. Li, B. Zhou // Biochim Biophys Acta. – 2008. – Vol. 1783, N 7. – P. 1311-1319.

134 Liu A-H. MicroRNA-129-5p inhibits the development of autoimmune encephalomyelitis-related epilepsy by targeting HMGB1 through the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. / A-H. Liu, Y-T. Wu, Y-P. Wang // Brain Res Bull. – 2017. – Vol. 132. – P. 139-149.

135 Liu D-M. Acetylpuerarin increases cell viability and reduces apoptosis in rat hippocampal neurons following oxygen English Literature  
Wang, L. Liu, X-M. Zhang, F-L. Lou // Mol Med Rep. – 2013. – Vol. 8, N 5. – P. 1453-1459.

136 Liu W. Hippocampal TNF-death receptors, caspase cell death cascades, and IL-8 in alcohol use disorder. / W. Liu, R.P. Vetreno, F.T. Crews // Mol Psychiatry. – 2021. – Vol. 26, N 6. – P. 2254-2262.

137 Liu Y. FADD as a key molecular player in cancer progression. // Y. Liu, X. Li, X. Zhou, J. Wang, X. Ao // Mol Med. – 2022. – Vol. 28, N 1: 132.

138 Luo Q. OTUD1 Activates Caspase-Independent and Caspase-Dependent Apoptosis by Promoting AIF Nuclear Translocation and MCL1 Degradation. / Q. Luo, X. Wu, P. Zhao, Y. Nan, W. Chang, X. Zhu, D. Su [et al.] // Adv Sci (Weinh). – 2021. – Vol. 8, N 8: 2002874.

139 Martinez B. MicroRNAs in mouse and rat models of experimental epilepsy and potential therapeutic targets / B. Martinez, P.V. Peplow // Neural Regen Res. – 2023. – Vol. 18, N 10. – P. 2108-2118.

140 Medeiros M. The multifaceted NF- $\kappa$ B: are there still prospects of its inhibition for clinical intervention in pediatric central nervous system tumors? / M. Medeiros, M.F. Candido, E.T. Valera, M.S. María Sol Brassesco // Cell Mol Life Sci. – 2021. – Vol. 78, N 17-18. – P. 6161-6200.

141 Meller R. Activation of the caspase 8 pathway mediates seizure-induced cell death in cultured hippocampal neurons. / R. Meller, C. Clayton, D.J. Torrey, C.K. Schindler, J.Q. Lan, J.A. Cameron, X.P. Chu [et al.] // Epilepsy Res. – 2006. – Vol. 70, N 1. – P. 3-14.

142 Méndez-Armenta M. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. / M. Méndez-Armenta, C. Nava-Ruíz, D. Juárez-Rebollar, E. Rodríguez-Martínez, P.Y. Gómez // Oxid Med Cell Longev. – 2014: 293689.

- 143 Merry D.E. Bcl-2 gene family in the nervous system. / D.E. Merry, S.J. Korsmeyer // *Annu Rev Neurosci.* – 1997. – Vol. 20. – P. 245-267.
- 144 Michaelis M. Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. / M. Michaelis, M.C. Kleinschmidt, H.W. Doerr, Jr. J. Cinatl // *J Antimicrob Chemother.* – 2007. – Vol.60, N. 5. – P. 981-986.
- 145 Michev A. An Overview of The Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Epileptogenesis and Its Therapeutic Implications. / A. Michev, A. Orsini, V. Santi, F. Bassanese, D. Veraldi, I. Brambilla, G.L. Marseglia [et al.] // *Acta Biomed.* – 2022. – Vol. 92, N S4: e2021418.
- 146 Mizutani M. Histopathological validation and clinical correlates of hippocampal subfield volumetry based on T2-weighted MRI in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. / M. Mizutani, D. Sone, T. Sano, Y. Kimura, N. Maikusa, Y. Shigemoto [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2021. – Vol. 177: 106759.
- 147 Mohseni-Moghaddam P. Role of Necroptosis, a Regulated Cell Death, in Seizure and Epilepsy. / P. Mohseni-Moghaddam, H. Khaleghzadeh-Ahangar, R. Atabaki // *Neurochem Res.* – 2024. – Vol. 49, N 1. – P.1-13.
- 148 Morgan M. Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. / M. Morgan, J. Thorburn, P.P. Pandolfi, A. Thorburn // *J Cell Biol.* – 2002. – Vol. 157, N 6. – P. 975-984.
- 149 Morrison R.S. p53-dependent cell death signaling in neurons. / R.S. Morrison, Y. Kinoshita, M.D. Johnson, W. Guo, G.A. Garden // *Neurochem Res.* – 2003. – Vol. 28, N 1. – P.15-27.
- 150 Morrison R.S. The role of p53 in neuronal cell death. / R.S. Morrison, Y. Kinoshita // *Cell Death Differ.* – 2000. – Vol. 7, N 10. – P. 868-879.
- 151 Motaghinejad M. Molecular, histological and behavioral evidences for neuroprotective effects of minocycline against nicotine-induced neurodegeneration and cognition impairment: Possible role of CREB-BDNF signaling pathway. / M. Motaghinejad, N. Farokhi, M. Motevalian, S. Safari // *Behav Brain Res.* – 2020. – Vol. 386, N. 112597.
- 152 Motaghinejad M. The possible role of CREB-BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of minocycline against alcohol-induced neurodegeneration: molecular and behavioral evidences. / M. Motaghinejad, R. Mashayekh, M. Motevalian, S. Safari // *Fundam Clin Pharmacol.* – 2021. – Vol. 35, N. 1. – P. 113-130.

- 153 Motaghinejad M., Motevalian M. Neuroprotective Properties of Minocycline Against Methylphenidate-Induced Neurodegeneration: Possible Role of CREB/BDNF and Akt/GSK3 Signaling Pathways in Rat Hippocampus. / M. Motaghinejad, M. Motevalian // *Neurotox Res.* – 2022. – Vol. 40, N. 3. – P. 689-713.
- 154 Mukherjee S. Neuroinflammatory mechanisms of post-traumatic epilepsy. / S. Mukherjee, G.M. Aris, K. Mims, G. Hollingsworth, K. O'Neil, L.A. Shapiro // *J Neuroinflammation.* – 2020. – Vol. 17, N 1: 193.
- 155 Nagarakanti S. Is Minocycline an Antiviral Agent? A Review of Current Literature. / S. Nagarakanti, E. Bishburg // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2016. – Vol. 118, N 1. – P. 4-8.
- 156 Nazarian S. Minocycline. / S. Nazarian, H. Akhondi // In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan.
- 157 Neuvonen P.J. Effect of antiepileptic drugs on the elimination of various tetracycline derivatives / P.J. Neuvonen, O. Penttilä, R. Lehtovaara, K. Aho // *Eur J Clin Pharmacol.* – 1975. – Vol. 9, N 2-3. – P. 147-154.
- 158 No authors listed. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. / No authors listed // *Neurology.* – 1999. – Vol. 53, N 3. – P. 457-465.
- 159 Nuñez-Lumbreras M. de L.A. How far are we from the best preclinical models of drug-resistant epilepsy? / M. de L.A. Nuñez-Lumbreras, L. Rocha // *Epilepsy Behav.* – 2024. – Vol. 161: 110029.
- 160 Panina Y.S. Biomarkers of Drug Resistance in Temporal Lobe Epilepsy in Adults. / Y.S. Panina, E.E. Timechko, A.A. Usoltseva, K.D. Yakovleva, E.A. Kantimirova, D.V. Dmitrenko // *Metabolites.* – 2023. – Vol. 13, N 1: 83.
- 161 Park Y-H. DED Interaction of FADD and Caspase-8 in the Induction of Apoptotic Cell Death. / Y-H. Park, C.W. Han, M.S. Jeong, S.B. Jang // *J Microbiol Biotechnol.* – 2022. – Vol. 32, N 8. – P. 1034-1040.
- 162 Patterson E.N.E. Epileptogenesis and companion animals. / E.N.E. Patterson // *Top Companion Anim Med.* – 2013. – Vol. 28, N 2. – P. 42-45.

- 163 Pawlik M.J. Selected Molecular Targets for Antiepileptogenesis. / M.J. Pawlik, B. Miziak, A. Walczak, A. Konarzewska, M. Chrościńska-Krawczyk, J. Albrecht, S.J. Czuczwar // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 18: 9737.
- 164 Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates. / G. Paxinos, C. Watson // Academic Press. – 1998. – P. 273.
- 165 Pekny M. Astrocyte activation and reactive gliosis. / M. Pekny, M. Nilsson // *Glia.* – 2005. – Vol. 50, N 4. – P. 427-434.
- 166 Plantone D. The Role of TNF- $\alpha$  in Alzheimer's Disease: A Narrative Review. / D. Plantone, M. Pardini, D. Righi, C. Manco, B.M. Colombo, N. De Stefano // *Cells.* – 2023. – Vol. 13, N 1: 54.
- 167 Poletaeva I.I. The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65years. / I.I. Poletaeva, N.M. Surina, Z.A. Kostina, O.V. Perepelkina, I.B. Fedotova // *Epilepsy Behav.* – 2017. – Vol. 71. – P. 130-141.
- 168 Pracucci E. Neuroinflammation: A Signature or a Cause of Epilepsy? / E. Pracucci, V. Pillai, D. Lamers, R. Parra, S. Landi // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 13: 6981.
- 169 Qaid E.Y.A. Minocycline attenuates TLR-4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and COX-2 protein expression after lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in the rat medial prefrontal cortex (mPFC). / E.Y.A. Qaid, Z. Abdullah, R. Zakaria, I. Long // *J Mol Histol.* – 2025. – Vol. 56, N 3: 138.
- 170 Qaid E.Y.A. Minocycline protects against lipopolysaccharide-induced glial cells activation and oxidative stress damage in the medial prefrontal cortex (mPFC) of the rat. / E.Y.A. Qaid, Z. Abdullah, R. Zakaria, I. Long // *Int J Neurosci.* – 2024. – Vol. 134, N 1. – P. 56-65.
- 171 Qi Y. Overexpressed microRNA-494 represses RIPK1 to attenuate hippocampal neuron injury in epilepsy rats by inactivating the NF- $\kappa$ B signaling pathway. / Y. Qi, R. Qian, L. Jia, X. Fei, D. Zhang, Y. Zhang, S. Jiang, X. Fu // *Cell Cycle.* – 2020. – Vol. 19, N 11. – P. 1298-1313.
- 172 Rami A. Exclusive Activation of Caspase-3 in Mossy Fibers and Altered Dynamics of Autophagy Markers in the Mice Hippocampus upon Status Epilepticus Induced by Kainic Acid. / A. Rami, A. Benz // *Mol Neurobiol.* – 2018. – Vol. 55, N 5. – P. 4492-4503.

173 Rana A. The role of inflammation in the development of epilepsy. / A. Rana, A.E. Musto // *J Neuroinflammation*. – 2018. – Vol. 15, N 1: 144.

174 Rebik A.A. Social Behavioral Deficits in Krushinsky-Molodkina Rats, an Animal Model of Audiogenic Epilepsy. / A.A. Rebik, V.D. Riga, K.S. Smirnov, O.V. Sysoeva, I.S. Midzyanovskaya // *J Pers Med*. – 2022. – Vol. 12, N 12: 2062.

175 Rezaei A. Minocycline induced apoptosis and suppressed expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the breast cancer MCF-7 cells. / A. Rezaei, A. Moqadami, M. Khalaj-Kondori, M.A.H. Feizi // *Mol Biol Rep*. – 2024. – Vol. 51, N. 1:463.

176 Robel S. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. / S. Robel, B. Berninger, M. Gotz // *Nat Rev Neurosci*. – 2011. – Vol. 12. – P. 88-104.

177 Romero-Miguel R. Minocycline in neurodegenerative and psychiatric diseases: An update. / R. Romero-Miguel, N. Lamanna-Rama, M. Casquero-Veiga, V. Gómez-Rangel, M. Desco, M.L. Soto-Montenegro // *Eur J Neurol*. – 2021. – Vol. 28, N 3. – P. 1056-1081.

178 Roshanaee M.K. Protective Effect of Minocycline on Bax and Bcl-2 Gene Expression, Histological Damages and Oxidative Stress Induced by Ovarian Torsion in Adult Rats. / M.K. Roshanaee, S.H. Abtahi-Eivary, M. Shokoohi, M. Fani, A. Mahmoudian, M. Moghimian // *Int J Fertil Steril*. – 2022. – Vol. 16, N. 1. – P. 30-35.

179 Ross K.S. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. / K.S. Ross, J.R. Coleman // *Neurosci Biobehav Rev*. – 2000. – Vol. 24, N 6. – P. 639-653.

180 Rubio R. Activation of the Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Cerebellum of Kindled Rats. / R. Rubio, C. Mendoza, C. Trejo, V. Custodio, M. Rubio-Osornio, L. Hernández, E. González [et al.] // *Cerebellum*. – 2019. – Vol. 18, N 4. – P. 750-760.

181 Ruiz-Moreno C. Minocycline induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia Jurkat cells. / C. Ruiz-Moreno, C. Velez-Pardo, M. Jimenez-Del-Rio // *Toxicol In Vitro*. – 2018. – Vol. 50. – P. 336-346.

182 Russmann V. Minocycline fails to exert antiepileptogenic effects in a rat status epilepticus model. / V. Russmann, J. Goc, K. Boes, T. Ongerth, J.D. Salvamoser, C. Siegl, H. Potschka // *Eur J Pharmacol*. – 2016. – Vol. 771. – P. 29-39.

183 Sánchez-Migallón M.D.C. Minocycline Administration Does Not Have an Effect on Retinal Ganglion Cell Survival in a Murine Model of Ocular Hypertension. / M.D.C.

Sánchez-Migallón, J.D. Pierdomenico, A. Gallego-Ortega, D. García-Ayuso, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso, F.J. Valiente-Soriano // *Aging Dis.* – 2024. – Vol. 15, N. 5. – P. 2241-2254.

184 Sanz P. Neuroinflammation and Epilepsy: From Pathophysiology to Therapies Based on Repurposing Drugs. / P. Sanz, T. Rubio, M.A. Garcia-Gimeno // *Int J Mol Sci.* – 2024. – Vol. 25, N 8: 4161.

185 Sanz P. Reactive Glia Inflammatory Signaling Pathways and Epilepsy. / P. Sanz, M.A. Garcia-Gimeno // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 11: 4096.

186 Sazhina T.A. Functional Imbalance of Glutamate- and GABAergic Neuronal Systems in the Pathogenesis of Focal Drug-Resistant Epilepsy in Humans. / T.A. Sazhina, D.A. Sitovskaya, Yu.M. Zabrodskaya, E.D. Bazhanova // *Bull Exp Biol Med.* – 2020. – Vol. 168, N 4. – P. 529-532.

187 Scott N.E. Interactome disassembly during apoptosis occurs independent of caspase cleavage. / N.E. Scott, L.D. Rogers, A. Prudova, N.F. Brown, N. Fortelny, C.M. Overall [et al.] // *Mol Syst Biol.* – 2017. – Vol. 13, N 1: 906.

188 Shacka J.J. Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration by members of the Bcl-2 family: therapeutic implications. / J.J. Shacka, K.A. Roth // *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* – 2005. – Vol. 4, N 1. – P. 25-39.

189 Sharma R. Neuroinflammation in Post-Traumatic Epilepsy: Pathophysiology and Tractable Therapeutic Targets. / R. Sharma, W.L. Leung, A. Zamani, T.J. O'Brien, P.M.C. Espinosa, B.D. Semple // *Brain Sci.* – 2019. – Vol. 9, N 11: 318.

190 Sharma R. TUNEL assay-Standardized method for testing sperm DNA fragmentation / R. Sharma, C. Iovine, A. Agarwal, R. Henkel // *Andrologia.* – 2021. – Vol. 53, N 2: e13738.

191 Sharma V.K. Apoptotic Pathways and Alzheimer's Disease: Probing Therapeutic Potential. / V.K. Sharma, T.G. Singh, S. Singh, N. Garg, S. Dhiman // *Neurochem Res.* – 2021. – Vol. 46, N 12. – P. 3103-3122.

192 Shayan M. Minocycline as a Neuroprotective Agent in Arsenic-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. / M. Shayan, S. Mehri, B.M. Razavi, H. Hosseinzadeh // *Biol Trace Elem Res.* – 2023. – Vol. 201, N. 6. – P. 2955-2962.

- 193 Shayan M. Minocycline Protects PC12 Cells Against Cadmium-Induced Neurotoxicity by Modulating Apoptosis. / M. Shayan, S. Mehri, B.M. Razavi, H. Hosseinzadeh // *Biol Trace Elem Res.* – 2023. – Vol. 201, N. 4. – P. 1946-1954.
- 194 Shorvon S.D. The etiologic classification of epilepsy. / S.D. Shorvon // *Epilepsia.* – 2011. – Vol. 52, N6. – P. 1052-1057.
- 195 Singh S. Minocycline and Doxycycline: More Than Antibiotics. / S. Singh, D. Khanna, S. Kalra // *Curr Mol Pharmacol.* – 2021. – Vol. 14, N 6. – P. 1046-1065.
- 196 Singh S. Role of Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) Signalling in Neurodegenerative Diseases: An Mechanistic Approach. / S. Singh, T.G. Singh // *Curr Neuroparmacol.* – 2020. – Vol. 18, N 10. – P. 918-935.
- 197 Singh T. Reconnoitering the transformative journey of minocycline from an antibiotic to an antiepileptic drug. / T. Singh, S. Thapliyal, S. Bhatia, V. Singh, M. Singh, H. Singh, A. Kumar, A. Mishra // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 15, N293: 120346.
- 198 Sitovskaya D. Expression of Cytoskeletal Proteins (GFAP, Vimentin), Proapoptotic Protein (Caspase-3) and Protective Protein (S100) in the Epileptic Focus in Adults and Children with Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsy Associated with Focal Cortical Dysplasia. / D. Sitovskaya, Y. Zabrodskaya, P. Parshakov, T. Sokolova, D. Kudlay, A. Starshinova, K. Samochernykh // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, N 19: 14490.
- 199 Skardoutsou A. Bcl-2 and caspase-9 serum levels in children and adolescents with idiopathic epilepsy and active seizures. / A. Skardoutsou, P. Primikiris, C. Tsentidis, A. Marmarinos, D. Gourgiotis // *Minerva Pediatr (Torino).* – 2022. – Vol. 74, N 1. – P. 40-48.
- 200 Sloviter R.S. Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the "latent period" and other concepts. / R.S. Sloviter // *Epilepsia.* – 2008. – Vol. 49, Suppl. 9. – P. 85-92.
- 201 Sofroniew M.V. Astrogliosis. / M.V. Sofroniew // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2014. – Vol. 7, N 2: a020420.
- 202 Sokolova T.V. Relationship between Neuroglial Apoptosis and Neuroinflammation in the Epileptic Focus of the Brain and in the Blood of Patients with Drug-Resistant Epilepsy. / T.V. Sokolova, Y.M. Zabrodskaya, A.V. Litovchenko, N.M. Paramonova, V.R. Kasumov, S.V. Kravtsova, E.N. Skiteva [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, N 20: 12561.



- 203 Sun E. The Pivotal Role of NF- $\kappa$ B in the Pathogenesis and Therapeutics of Alzheimer's Disease. / E. Sun, A. Motolani, L. Campos, T. Lu // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, N 16: 8972.
- 204 Sun H. The role of Fas-FasL-FADD signaling pathway in arsenic-mediated neuronal apoptosis in vivo and in vitro. / H. Sun, Y. Yang, M. Gu, Y. Li, Z. Jiao, C. Lu, B. Li [et al.] // *Toxicol Lett.* – 2022. – Vol. 1, N 356. – P. 143-150.
- 205 Suraweera C.D. Metazoans and Intrinsic Apoptosis: An Evolutionary Analysis of the Bcl-2 Family. / C.D. Suraweera, S. Banjara, M.G. Hinds, M. Kvansakul // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, N 7: 3691.
- 206 Surina N.M. Neuroinflammation in Pathogenesis of Audiogenic Epilepsy: Altered Proinflammatory Cytokine Levels in the Rats of Krushinsky-Molodkina Seizure-Prone Strain. / N.M. Surina, I.B. Fedotova, G.M. Nikolaev, V.V. Grechenko, L.V. Gankovskaya, A.D. Ogurtsova, I.I. Poletaeva // *Biochemistry (Mosc).* – 2023. – Vol. 88, N 4. – P. 481-490.
- 207 Thomas M. Minocycline in Huntington's disease: a pilot study. / M. Thomas, T. Ashizawa, J. Jankovic // *Mov Disord.* – 2004. – Vol. 19, N 6. – P.692-695.
- 208 Thompson S.J. Suppression of TNF receptor-1 signaling in an in vitro model of epileptic tolerance. / S.J. Thompson, M.D. Ashley, S. Stöhr, C. Schindler, M. Li, K.A. McCarthy-Culpepper, A.N. Pearson [et al.] // *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* – 2011. – Vol. 3, N 2. – P. 120-132.
- 209 Tian F. Interpretable Machine Learning reveals the Role of PANoptosis in the Diagnosis and Subtyping of NAFLD. / F. Tian, Y. Zhao, X. He, Y. Zhang, M. Hu, Y. Liang, Z. Tian [et al.] // *Immunobiology.* – 2025. – Vol. 230, N 3: 152909.
- 210 Toscano E.C de B. Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy. / E.C de B. Toscano, E.L.M. Vieira, A.C.D.C. Portela J.L.J. Reis, M.V. Caliari, A.V. Giannetti [et al.] // *Neuropathology.* – 2019. – Vol. 39, N 5. – P. 348-357.
- 211 Tourneur L. FADD: a regulator of life and death. / L. Tourneur, G. Chiocchia // *Trends Immunol.* – 2010. – Vol. 31, N 7. – P. 260-269.
- 212 Tsujimoto Y. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. / Y. Tsujimoto, L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell, C.M. Croce // *Science.* – 1984. – Vol. 226. – P. 1097-1099.

- 213 Tummers B. Caspase-8-Dependent Inflammatory Responses Are Controlled by Its Adaptor, FADD, and Necroptosis. / B. Tummers, L. Mari, C.S. Guy, B.L. Heckmann, D.A. Rodriguez, S. Rühl, J. Moretti [et al.] // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52, N 6. – P. 994-1006.e8.
- 214 Uzzan S. Anti-TNF- $\alpha$  Compounds as a Treatment for Depression. / S. Uzzan, A.N. Azab // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, N 8: 2368.
- 215 Van Bodegraven E.J. New GFAP splice isoform (GFAP $\mu$ ) differentially expressed in glioma translates into 21 kDa N-terminal GFAP protein. / E.J. van Bodegraven, J.A. Sluijs, A.K. Tan, P.A.J.T. Robe, E.M. Hol // *FASEB J*. – 2021. – Vol. 35, N 3: e21389.
- 216 Vega-García A. Cortical expression of IL1- $\beta$ , Bcl-2, Caspase-3 and 9, SEMA-3a, NT-3 and P-glycoprotein as biological markers of intrinsic severity in drug-resistant temporal lobe epilepsy. / A. Vega-García, S. Orozco-Suárez, A. Villa, L. Rocha, I. Feria-Romero, M.A. Alonso Vanegas, R. Guevara-Guzmán // *Brain Res*. – 2021. – Vol. 1758: 147303.
- 217 Vergnes M. Kindling of audiogenic seizures in the rat. / M. Vergnes, M. Kiesmann, C. Marescaux, A. Depaulis, G. Micheletti, J.M. Warter // *Int J Neurosci*. – 1987. – Vol. 36, N 3-4. – P. 167-176.
- 218 Verma A.K. Chandipura Virus Induced Neuronal Apoptosis via Calcium Signaling Mediated Oxidative Stress. / A.K. Verma, S. Ghosh, A. Basu // *Front Microbiol*. – 2018. – Vol. 9: 1489.
- 219 Vezzani A. Immunity and inflammation in status epilepticus and its sequelae: possibilities for therapeutic application. / A. Vezzani, R. Dingledine, A.O. Rossetti // *Expert Rev Neurother*. – 2015. – Vol. 15, N 9. – P. 1081-1092.
- 220 Vinogradova, L.V. Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. / L.V. Vinogradova // *Epilepsy & Behavior*. – 2017. – Vol. 71(Pt B). – P. 142-153.
- 221 Wang B. TNF- $\alpha$ : A serological marker for evaluating the severity of hippocampal sclerosis in medial temporal lobe epilepsy? / B. Wang, Q. Li, H. Wang, X. Du, Q. Lai, X. Li, Y. Wang, P. Hu, H. Fan // *J Clin Neurosci*. – 2024. – Vol. 123. – P. 123-129.
- 222 Wang C. Microglial NF- $\kappa$ B drives tau spreading and toxicity in a mouse model of tauopathy. / C. Wang, L. Fan, R.R. Khawaja, B. Liu, L. Zhan, L. Kodama, M. Chin [et al.] // *Nat Commun*. – 2022. – Vol. 13, N 1: 1969.

- 223 Wang D.D. Minocycline- and tetracycline-class antibiotics are protective against partial seizures in vivo. / D.D. Wang, D.J. Englot, P.A. Garcia, M.T. Lawton, W.L. Young // *Epilepsy Behav.* – 2012. – Vol. 24, N 3. – P. 314-318.
- 224 Wang G. Inflammatory response in epilepsy is mediated by glial cell gap junction pathway (Review). / G. Wang, J. Wang, C. Xin, J. Xiao, J. Liang, X. Wu // *Mol Med Rep.* – 2021. – Vol. 24, N1: 493.
- 225 Wang L. Minocycline alleviates microglia ferroptosis by inhibiting HO-1 during cerebral ischemia-reperfusion injury. / L. Wang, Y. Wang, M. Wu, X. Jin, Y. Chen, Z. Guo, X. Meng, J. Zhang, F. Ji // *Inflamm Res.* – 2024. – Vol. 73, N 10 – P. 1727-1745.
- 226 Wang P. Effects of GABAB receptor positive allosteric modulator BHF177 and IRS-1 on apoptosis of hippocampal neurons in rats with refractory epilepsy via the PI3K/Akt pathway. / P. Wang, S. Nan, Y. Zhang, J. Fan // *Cell Biol Int.* – 2022. – Vol. 46, N 11. – P. 1775-1786.
- 227 Wang Z. LncRNA ZFAS1 regulates the hippocampal neurons injury in epilepsy through the miR-15a-5p/OXSR1/NF- $\kappa$ B pathway. / Z. Wang, Z. Na, Y. Cui, C. Wei, S. Wang // *Metab Brain Dis.* – 2022. – Vol. 37, N 7. – P. 2277-2290.
- 228 Wei X. Minocycline prevents gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. / X. Wei, L. Zhao, J. Liu, R.C. Dodel, M.R. Farlow, Y. Du // *Neuroscience.* – 2005. – Vol. 131, N 2. – P. 513-521.
- 229 Wei Y. The complement C3-C3aR pathway mediates microglia-astrocyte interaction following status epilepticus. / Y. Wei, T. Chen, D.B. Bosco, M. Xie, J. Zheng, A. Dheer [et al.] // *Glia.* – 2021. – Vol. 69, N 5. – P.1155-1169.
- 230 Williams E.W. Pentad: A reproducible cytoarchitectonic protocol and its application to parcellation of the human hippocampus. / E.W. Rosenblum, N. Pihlstrom, J. Llamas-Rodríguez, S. Champion, M.P. Frosch, J.C. Augustinack // *Front Neuroanat.* – 2023. – Vol. 17: 1114757.
- 231 Wu D. Ameliorating effect of quercetin on epilepsy by inhibition of inflammation in glial cells. / D. Wu, Z. Zheng, S. Fan, X. Wen, X. Han, S. Wang, Y. Wang [et al.] // *Exp Ther Med.* – 2020. – Vol. 20, N 2. – P. 854-859.
- 232 Wu L-H. SIRT1 activation by minocycline on regulation of microglial polarization homeostasis. / L-H. Wu, B-R. Huang, S-W. Lai, C. Lin, H-Y. Lin, L-Y. Yang, D-Y. Lu // *Aging (Albany NY).* – 2020. – Vol. 12, N. 18. – P. 17990-18007.

233 Wu Z. Minocycline is effective in intracerebral hemorrhage by inhibition of apoptosis and autophagy. / Z. Wu, X. Zou, W. Zhu, Y. Mao, L. Chen, F. Zhao // *J Neurol Sci.* – 2016. – Vol. 371. – P. 88-95.

234 Xiao B. Edaravone neuroprotection effected by suppressing the gene expression of the Fas signal pathway following transient focal ischemia in rats. / B. Xiao, F-F. Bi, Y-Q. Hu, F-F. Tian, Z-G. Wu, H.M. Mujlli, L. Ding [et al.] // *Neurotox Res.* – 2007. – Vol. 12, N 3. – P. 155-162.

235 Xiong G. Minocycline attenuates the bilirubin-induced developmental neurotoxicity through the regulation of innate immunity and oxidative stress in zebrafish embryos. / G. Xiong, T. Hu, Y. Yang, H. Zhang, M. Han, J. Wang, Y. Jing [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2024. – Vol. 484: 116859.

236 Xu D. Modulating TRADD to restore cellular homeostasis and inhibit apoptosis. / D. Xu, H. Zhao, M. Jin, H. Zhu, B. Shan, J. Geng, S.A. Dziedzic [et al.] // *Nature.* – 2020. – Vol. 587, N 7832. – P. 133-138.

237 Xu H. Minocycline reduces reactive gliosis in the rat model of hydrocephalus. / H. Xu, G. Tan, S. Zhang, H. Zhu, F. Liu, C. Huang, F. Zhang [et al.] // *BMC Neurosci.* – 2012. – Vol. 13: 148.

238 Xu S. Neuronal apoptosis in the resected sclerotic hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. / S. Xu, Q. Pang, Y. Liu, W. Shang, G. Zhai, M. Ge // *J Clin Neurosci.* – 2007. – Vol. 14, N 9. – P. 835-840.

239 Xu W. Minocycline induces apoptosis of photoreceptor cells by regulating ER stress. / W. Xu, M. Tao, Z. Hu, T. Chang, Y. Wang // *Exp Eye Res.* – 2020. – Vol. 190: 107887.

240 Yamamoto A. Evidence of tumor necrosis factor receptor 1 signaling in human temporal lobe epilepsy. / A. Yamamoto, C.K. Schindler, B.M. Murphy, C. Bellver-Estelles, N.K. So, W. Taki, R. Meller, R.P. Simon, D.C. Henshall // *Exp Neurol.* – 2006. – Vol. 202, N 2. – P. 410-420.

241 Yang G. Minocycline Pretreatment Prevents Blood-Brain Barrier Disruption in Septic Rats. / G. Yang, Y. Cao, P. Wang, L. Mei, J. Chen, W. Lu // *J Surg Res.* – 2022. – Vol. 273. – P. 247-254.

242 Zhan F. Minocycline alleviates LPS-induced cognitive dysfunction in mice by inhibiting the NLRP3/caspase-1 pathway. / F. Zhan, Y. Dong, L. Zhou, X. Li, Z. Zhou, G. Xu // *Aging* (Albany NY). – 2024. – Vol. 16, N. 3. – P. 2989-3006.

243 Zhang G. Minocycline impedes mitochondrial-dependent cell death and stabilizes expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in spinal cord injury. / G. Zhang, J. Zha, J. Liu, J. Di // *Arch Med Sci.* – 2019. – Vol. 15, N 2. – P. 475-483.

244 Zhang L. The inhibitory effect of minocycline on radiation-induced neuronal apoptosis via AMPK $\alpha$ 1 signaling-mediated autophagy. / L. Zhang, P. Huang, H. Chen, W. Tan, J. Lu, W. Liu, J. Wang [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, N. 1: 16373.

245 Zhang Y. Relationship of serum ATPase activity and the levels of neuron-specific enolase, S100B and B-cell lymphoma/leukemia-2 with cognitive function after epileptic seizure. / Y. Zhang, S. Zhang, Y. Ji, X. Yang, P. Liu, G. Yu // *Ann Palliat Med.* – 2020. – Vol. 9, N 5. – P. 3366-3372.

246 Zhao K. The mechanisms of minocycline in alleviating ischemic stroke damage and cerebral ischemia-reperfusion injury. / K. Zhao, P. Wang, X. Tang, N. Chang, H. Shi, L. Guo, B. Wang, P. Yang, T. Zhu, X. Zhao // *Eur J Pharmacol.* – 2023. – Vol. 15, N 955: 175903.

247 Zhao T. Inhibiting the IRAK4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway can reduce pyroptosis in hippocampal neurons and seizure episodes in epilepsy. / T. Zhao, X. Zhang, X. Cui, S. Su, L. Li, Y. Chen, N. Wang [et al.] // *Exp Neurol.* – 2024. – Vol. 377: 114794.

248 Zhou Q. MicroRNA 322-5p reduced neuronal inflammation via the TLR4/TRAF6/NF- $\kappa$ B axis in a rat epilepsy model. / Q. Zhou, Q. Wang, B. He, H. Kong, H. Luo, X. Wang, W. Wang // *Open Med (Wars).* – 2022. – Vol. 17, N 1. – P. 907-914.

249 Zidi I. TNF-alpha and its inhibitors in cancer. / I. Zidi, S. Mestiri, A. Bartegi, N.B. Amor // *Med Oncol.* – 2010. – Vol. 27, N 2. – P. 185-198.