

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ»

*На правах рукописи*

Григорян Мигран Самвелович

**Морфофункциональные особенности гиппокампа после введения  
мирицетина в модели PTZ-индуцированных судорог**

1.5.24. Нейробиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук  
Демяшкин  
Григорий Александрович

Москва – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Общие положения .....	12
1.2. Современные подходы к изучению эпилепсии: патогенез, диагностика и терапия.....	13
1.2.1. Эпидемиология и клиническое значение эпилепсии .....	13
1.2.2. Этиопатогенетические механизмы эпилептогенеза .....	15
1.3. Структурные и функциональные изменения головного мозга при эпилепсии	21
1.3.1. Гистологические и молекулярные особенности гиппокампа при эпилепсии	21
1.3.2. Изменения других отделов головного мозга и их вклад в эпилептогенез ....	24
1.4. Экспериментальные модели эпилепсии и их роль в изучении патогенеза .....	25
1.4.1. Химически индуцированные модели эпилепсии.....	26
1.5. Молекулярные и клеточные механизмы нейрональной гибели и нейропротекции.....	30
1.6. Стратегии в лечении эпилепсии: современное состояние и перспективы.....	34
1.7. Заключение по литературному обзору.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	40
2.1. Дизайн эксперимента.....	40
2.2. Методы исследования.....	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	54
3.1. Смертность.....	54
3.2. Поведенческие тесты .....	54
3.3. Оценка маркеров антиоксидативной системы .....	63
3.3 Биохимическое исследование .....	69
3.4 Морфологическое исследование .....	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	98
ВЫВОДЫ .....	108
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	112

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Эпилепсия – это одно из наиболее распространенных хронических заболеваний нервной системы, которое поражает более 50 миллионов человек во всем мире и характеризуется повторяющимися эпилептическими припадками, вызванными патологической, синхронной и гиперсинхронной активностью нейронов головного мозга [73]. Несмотря на значительный прогресс в области разработки противоэпилептических препаратов (ПЭП), до 30% пациентов остаются резистентными к традиционным схемам лечения, что приводит к развитию фармакорезистентных форм эпилепсии и вызывает тяжелые когнитивные нарушения [21, 28, 75]. Одним из наиболее опасных клинических проявлений эпилепсии является эписитатус – состояние, характеризующееся длительными и рецидивирующими судорожными припадками, которые могут провоцировать необратимые структурные изменения в гиппокампе, коре головного мозга и других лимбических структурах, что приводит к стойкому снижению когнитивных и психоэмоциональных функций [119].

Наиболее частым патоморфологическим субстратом медиальной височной эпилепсии (англ. Mesial Temporal Lobe Epilepsy, MTL E) является гиппокампальный склероз (англ. hippocampal sclerosis, HS), который встречается у 60–70% пациентов с фармакорезистентными формами заболевания [35, 39]. Гиппокампальный склероз сопровождается сегментарной утратой пирамидных нейронов и выраженным астроглиозом – реактивным процессом, характеризующимся гипертрофией и пролиферацией астроцитов в ответ на повреждение нервной ткани, что нарушает функции нейрональных сетей и поддерживает гипервозбудимость в головном мозге. Молекулярные исследования показали, что в патогенезе гиппокампального склероза участвуют такие процессы, как дисрегуляция кальциевого гомеостаза, гиперактивация NMDA-рецепторов и

нейровоспалительные процессы, что дополнительно осложняет контроль приступов и снижает эффективность хирургических вмешательств [100].

Сложность патогенеза эпилепсии и ограниченная эффективность существующей фармакотерапии обуславливают необходимость поиска новых терапевтических мишеней и подходов к лечению заболевания. Одним из перспективных направлений является использование природных соединений с антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, которые могут снижать нейрональную гибель, оксидативный стресс и воспаление в тканях мозга. В этом контексте, мирицетин (3,3',4',5, 5',7-гекса-гидроксифлавоноид) – природный флавоноид, обладающий широким спектром нейробиологической активности, включая нейропротективные, антиоксидантные и противовоспалительные эффекты, рассматривается как перспективный кандидат в качестве потенциального противоэпилептического средства [31]. Дальнейшее изучение нейропротективных свойств мирицетина, в частности его воздействия на гиппокамп, может открыть новые терапевтические возможности для профилактики и лечения различных форм эпилепсии, а также способствовать созданию более эффективных подходов к профилактике нейрональной дисфункции.

### **Степень разработанности темы исследования**

Несмотря на широкую распространенность эпилепсии и многочисленные исследования патогенеза заболевания, ключевые молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе эпилептогенеза и нейродегенеративных процессов, остаются недостаточно изученными. Современные работы в основном сосредоточены на экспериментальных моделях хронической эпилепсии, таких как киндлинг-эффект [11], тогда как данные об изменениях в острой фазе эпилептического приступа, особенно касающиеся гиппокампа и других лимбических структур, ограничены. В частности, остаются неясными молекулярно-биологические и нейрохимические механизмы апоптоза и воспаления в ответ на судорожную активность, что затрудняет разработку новых

терапевтических подходов для предотвращения прогрессирующего нейродегенеративного процесса.

В рамках поиска новых стратегий лечения антиоксидантные и противовоспалительные соединения, такие как мирицетин, представляют собой перспективные терапевтические средства. Тем не менее, их влияние на ключевые звенья патогенеза – такие как каспаз-зависимый путь апоптоза, модуляция провоспалительных цитокинов и активация антиоксидантных ферментов в острой фазе эпилептических судорог – остается малоизученными. Дальнейшие исследования необходимы для углубленного понимания специфических молекулярных и морфофункциональных изменений. Эти данные могут стать фундаментальной основой для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на замедление прогрессирующего нейронального повреждения и предотвращение развития резистентных форм эпилепсии.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы – выявление морфофункциональных изменений в гиппокампе при введении мирицетина в модели PTZ-индуцированных судорог.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние мирицетина на поведенческий фенотип мышей линии СВА в модели PTZ-индуцированных судорог.
2. Оценить значения ключевых маркеров функционирования системы перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (MDA) и антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (SOD) и глутатиона (GSH) в гомогенате головного мозга мышей линии СВА после введения мирицетина в модели PTZ-индуцированных судорог.
3. Проанализировать концентрацию провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) цитокинов в сыворотке крови мышей линии СВА после введения мирицетина в модели PTZ-индуцированных судорог.

4. Оценить уровень экспрессии нейронального маркера NeuN в гиппокампе мышей линии СВА после введения мирицетина в модели PTZ-индуцированных судорог.

5. Определить уровень экспрессии маркера внешнего пути апоптоза – каспазы-8 в нейронах гиппокампа мышей линии СВА после введения мирицетина в модели PTZ-индуцированных судорог.

### **Научная новизна**

Новизна диссертационного исследования заключается в получении данных о структурно-функциональных изменениях в гиппокампе и других лимбических структурах головного мозга, возникающих при острых PTZ-индуцированных судорогах. Впервые проведена оценка нейрональной дифференцировки и зрелости нейронов с использованием маркера NeuN, что позволило оценить характер структурных изменений в различных регионах гиппокампа при острых припадках. Установлено, что PTZ-индуцированные судороги характеризуются повышением концентрации маркера дисфункции системы перекисного окисления липидов – малонового диальдегида и понижением концентрации ферментов эндогенной антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы и глутатиона в гомогенате головного мозга. Проведена оценка воспалительного ответа микроглии в гиппокампе с анализом уровней провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), что позволило выявить роль нейровоспаления в патогенезе острого PTZ-индуцированного приступа, что значительно расширяет представления о молекулярных и клеточных механизмах воспалительной активности в ответ на судорожные приступы.

Особую научную значимость представляют новые данные о молекулярных механизмах апоптоза в патогенезе PTZ-индуцированных судорог с подробным изучением активации каспаз-зависимого пути (активация каспазы-8), что позволило определить важный молекулярный маркер гибели нейронов гиппокампа в модели острого приступа. Выявлена корреляция между количеством каспазы-8-

позитивных и NeuN-позитивных нейронов и судорожной активностью в гиппокампе после введения мирицетина в модели PTZ-индуцированных судорог. Количество NeuN-позитивных нейронов в гиппокампе было обратно пропорционально численности каспаза-8-позитивных нейронов и коррелировало с характером поведенческих реакций.

Впервые показано, что введение мирицетина в условиях PTZ-индуцированного приступа способствует снижению уровня маркеров активности оксидативного стресса, снижению интенсивности дегенеративных изменений и апоптоза нейронов гиппокампа, что не исключает его нейропротекторную эффективность.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость данного диссертационного исследования заключается в получении новых фундаментальных данных о морфофункциональных изменениях в гиппокампе при PTZ-индуцированных судорогах, о роли формирования провоспалительного микроокружения, нарушений редокс-гомеостаза, развитии апоптоза в гиппокампе. Установлено, что PTZ-индуцированные судороги приводят к значительным структурно-функциональным изменениям в гиппокампе, включая нейрональную гибель, активацию каспаз-зависимого пути апоптоза (каспазы-8) и выраженную воспалительную реакцию, эти изменения сопровождаются развитием морфологических изменений в гиппокампе. Установлена нейропротективная эффективность мирицетина при PTZ-индуцированном судорожном синдроме, что расширяет представления о возможностях патогенетической коррекции эпилептогенеза.

Результаты исследования имеют практическую значимость, они позволяют определить перспективные молекулярные мишени для фармакологического воздействия и оптимальные условия применения нейропротективных агентов, таких как мирицетин, в комплексной терапии острых эпилептических состояний.

Полученные данные могут быть использованы для разработки новых подходов к защите нейронов и предотвращению процессов нейродегенерации при эпилептогенезе.

Результаты исследования могут быть использованы в образовательной деятельности медицинских вузов и программ последипломного обучения для углубленного изучения эпилептогенеза и применения нейропротекторов.

На основании результатов проведенного диссертационного исследования решена **актуальная научная задача** – охарактеризованы вклад нейровоспаления, повреждения и гибели нейронов гиппокампа в эпилептогенез и возможности его фармакологической коррекции.

### **Методология и методы исследования**

Методологическая основа исследования базировалась на совокупности теоретических и экспериментальных подходов, обеспечивающих достоверность, объективность и воспроизводимость полученных данных. На этапе планирования был проведен детальный анализ специальной научной литературы, что позволило обосновать выбор методов и подходов, используемых в настоящем исследовании, и обеспечило высокое качество и точность результатов.

Экспериментальное исследование было проведено на половозрелых самцах мышей линии СВА (n=340) с применением комплекса методов: морфологического, иммуногистохимического, гистологического, а также функциональных и поведенческих тестов. Дополнительно использовались методы оценки нейрональной активности и уровня апоптоза в тканях головного мозга. Результаты исследования подвергались дальнейшей количественной и статистической обработке для выявления достоверных изменений между экспериментальными группами.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Превентивное введение мирицетина в модели острого PTZ-индуцированного приступа снижает у мышей линии СВА выраженность нарушений сенсомоторных функций, двигательной координации, общей двигательной активности и когнитивных способностей, что позволяет рассматривать его как потенциально эффективное нейропротекторное средство при острых эпилептических припадках.

2. Мирицетин, введенный перед PTZ-индукцией острого приступа, нормализует в тканях головного мозга мышей линии СВА концентрации маркеров системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты (MDA, SOD и GSH), а также снижает значения провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) цитокинов в сыворотке крови.

3. Мирицетин, введенный перед PTZ-индукцией острого приступа, снижает степень нейродегенеративных изменений и апоптоз нейронов гиппокампа у мышей линии СВА, которые коррелируют с характером поведенческих реакций.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями изучаемой проблемы. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы из животных – самцы мышей линии СВА (вес 30 – 35 г; возраст 12 недель; n=340), что соответствует применяемым методикам согласно современным стандартам экспериментальных (доклинических) исследований в области нейробиологии. Корректная статистическая обработка данных, использование валидированных иммуногистохимических, морфологических и поведенческих

тестов, а также контрольные и экспериментальные группы позволили обеспечить высокую степень воспроизводимости и объективности полученных результатов.

Фактический материал, проанализированный в диссертации, полностью соответствует первичной документации.

### **Личный вклад автора**

Все этапы проведенного научного исследования: постановка цели и задач, выбор методов, получение, анализ и статистическая обработка результатов, формулирование основных положений и выводов, теоретической и практической значимости, а также новизны полученных результатов, выполнены автором самостоятельно. Автором лично проведен подбор и анализ научной литературы в русле выбранной темы, разработан дизайн исследования, скомплектованы базы данных и цифровой архив изображений, к анализу привлечен комплекс современных методов нейробиологии для анализа влияния мирицетина на поведенческий фенотип мышей линии СВА в модели PTZ-индуцированных судорог. В ходе реализации научной работы диссертант лично проводил комплекс поведенческих тестов, гистологическое, гистохимическое (окрашивание по Ниссля), иммуногистохимическое (на маркеры NeuN, каспазу-8) исследования, проводил статистический анализ полученных результатов. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

### **Внедрение результатов диссертации в практику**

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность неврологического отделения ГБУЗ «Ейская ЦРБ» Минздрава Краснодарского края, а также в учебный процесс НОРЦ «Молекулярная морфология» ФГАОУ ВО РУДН им. П. Лумумбы.

## **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация на тему «Морфофункциональные особенности гиппокампа после введения мирицетина в модели PTZ-индуцированных судорог» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук паспорту научной специальности 1.5.24. Нейробиология, а именно: пункту 3 – Межклеточная передача сигналов. Синапсы. Нейромедиаторы. Нейромодуляторы. Молекулярные механизмы межклеточной коммуникации. Синаптическая пластичность; пункту 5 – Нейродегенеративные процессы. Механизмы развития нейродегенеративных заболеваний. Болезнь Альцгеймера. Болезнь Хантингтона; пункту 11 – Фундаментальные механизмы развития патологических процессов в ЦНС. ЦНС и гематоэнцефалический барьер. Старение и гибель клеток нервной системы.

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 1 научная статья в издании из базы данных RSCI, 2 статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в издании, индексируемом в международной базе цитирования (Scopus), 2 публикация в сборнике материалов научной конференции.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация написана на 128 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану – состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Таблиц – 2, рисунков – 49. Характеристика списка литературы: всего – 152 источников, отечественных – 25, зарубежных – 127.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общие положения

Эпилепсия остается одной из самых сложных и недостаточно изученных неврологических патологий, представляя серьезную угрозу не только из-за неконтролируемых судорожных приступов, но и по причине необратимых структурных изменений в мозге, которые она вызывает. Несмотря на многочисленные исследования, направленные на разработку противоэпилептических препаратов, ключевые патогенетические механизмы развития заболевания и последующей нейродегенерации остаются неопределенными. Почему, даже после изолированного приступа, возникают столь разрушительные изменения в тканях головного мозга? Каким образом можно предотвратить прогрессирующую гибель нейронов и нейровоспаление, которые становятся основой последующей нейродегенерации? Эти вопросы лежат в центре научных дискуссий, и их решение может существенно изменить подходы к терапии.

Прогноз для пациентов во многом зависит от раннего выявления структурных изменений в головном мозге и разработки верных стратегий, направленных на предотвращение прогрессирующего повреждения. Однако, как определить, что конкретный приступ станет пусковым механизмом для каскада нейродегенеративных процессов? Какие молекулярные маркеры помогут выявить начало этих процессов? И если традиционные препараты оказываются недостаточно эффективными, есть ли альтернативы, способные остановить разрушение нейронов и воспалительные процессы?

В частности, интерес вызывает гиппокампальный склероз – частое осложнение, ассоциированное с медиальной височной эпилепсией. Почему нейроны гиппокампа столь чувствительны к эпилептической активности? Можно ли замедлить или даже остановить процессы, ведущие к его атрофии? Учитывая высокую резистентность заболевания к терапии, крайне важно выявить новые

молекулярные механизмы, способные воздействовать на основные звенья патогенеза эпилептогенеза.

В последние годы особое внимание уделяется поиску эффективных нейропротективных средств, обладающих антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, в контексте предотвращения нейродегенерации при эпилепсии. Природные соединения, такие как мирицетин, рассматриваются как перспективные кандидаты благодаря их способности ингибировать активацию каспазного каскада и подавлять провоспалительный ответ. Но какие именно схемы применения будут оптимальными для защиты нейронов? Можно ли использовать их в комбинации с традиционными противоэпилептическими препаратами для усиления их терапевтического эффекта?

## **1.2. Современные подходы к изучению эпилепсии: патогенез, диагностика и терапия**

### *1.2.1. Эпидемиология и клиническое значение эпилепсии*

Эпилепсия представляет собой гетерогенное хроническое заболевание центральной нервной системы, которое характеризуется стойкой предрасположенностью к развитию спонтанных эпилептических припадков, обусловленных гиперсинхронной активностью нейронов головного мозга [26]. С точки зрения клинической классификации, выделяют несколько форм эпилепсии: фокальные (парциальные), генерализованные и идиопатические (без установленных структурных изменений), каждая из которых имеет свои морфофункциональные особенности и механизм патогенеза [4, 24]. В соответствии с классификацией Международной лиги по борьбе с эпилепсией (ILAE), фокальные формы включают приступы, локализующиеся в одной из долей головного мозга, а генерализованные характеризуются вовлечением обоих полушарий с инициальным распространением эпилептической активности [29, 53].

Современные эпидемиологические данные демонстрируют значительные различия в распространенности эпилепсии в зависимости от возраста, пола, социально-экономического статуса и уровня медицинского обслуживания. Согласно последним мета анализам, распространенность эпилепсии среди детей и подростков варьируется от 7% до 11%, тогда как среди взрослых этот показатель достигает 19% [77]. Особую группу риска составляют пациенты с интеллектуальными нарушениями и аутизмом, где эпилепсия наблюдается почти у 20% случаев, что существенно превышает показатели среди общего населения [16, 109].

Основные клинические проявления зависят от локализации эпилептогенного очага и вовлеченности структур головного мозга. Фокальные приступы (очаг чаще в височной доле) проявляются как – «парциальный феномен» (изменение сознания). Генерализованные припадки – возбуждение моторных нейронов коркового вещества и ствола головного мозга [5, 36].

Факторы риска развития эпилепсии включают как генетические, так и экзогенные влияния: перинатальные травмы, гипоксически-ишемические повреждения головного мозга, врожденные аномалии развития, нейроинфекции, черепно-мозговые травмы и опухоли [118]. Среди детей наиболее высокий риск развития эпилепсии наблюдается в периоде раннего детства, что связано с особенностями нейrogenеза, незрелостью гематоэнцефалического барьера и высокой чувствительностью нервной ткани к метаболическим нарушениям [123]. У пожилых пациентов эпилепсия зачастую ассоциируется с сосудистыми патологиями (инсульты, ишемические атаки), нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Альцгеймера) и опухолевыми процессами [72].

Клиническое многообразие и полиморфизм эпилепсии обуславливают необходимость разработки индивидуализированных диагностических и терапевтических стратегий, направленных на раннюю диагностику и предотвращение прогрессирования заболевания.

### *1.2.2. Этиопатогенетические механизмы эпилептогенеза*

Основу патогенеза эпилепсии составляют изменения в передаче нервных импульсов, вызванные нарушением работы ионных каналов, что приводит к изменению мембранного потенциала и дисбалансу между возбуждающей и тормозной нейротрансмиссией. Большое внимание уделяется генам, кодирующим натриевые (SCN1A, SCN2A), калиевые (KCNQ2, KCNQ3) и кальциевые (CACNA1A) каналы, которые играют центральную роль в регуляции возбудимости нейронов. Например, мутации в гене SCN1A (англ. Sodium Voltage-Gated Channel, Alpha Subunit 1) ассоциированы с синдромом Драве, характеризующимся устойчивой к лечению эпилепсией и высокой смертностью. Патофизиологические исследования выявили, что нарушение функции натриевых каналов NaV1.1 (англ. sodium channel, voltage-gated, Type I, alpha subunit) приводит к снижению активности тормозных интернейронов, что вызывает гиперэксцитабельность – состояние патологически повышенной возбудимости нейронов, и способствует развитию судорожных приступов [55, 120].

Также, выявлены нарушения экспрессии рецепторов ГАМК ( $\gamma$ -аминомасляная кислота) и глутамата (NMDA), которые участвуют в формировании судорожных состояний. Например, дисфункция GABA<sub>A</sub>-рецепторов приводит к снижению тормозной активности, что способствует гипервозбудимости корковых нейронов [82]. В свою очередь, избыточная активация NMDA-рецепторов ведет к нейродегенеративным изменениям, увеличивая концентрацию кальция и приводя к клеточной гибели [7]. Эти данные подчеркивают необходимость дальнейшего изучения взаимодействия ионных каналов и рецепторов в различных нейронных популяциях для создания более целевых методов терапии эпилепсии.

Генетика эпилепсии представляет собой чрезвычайно сложную и многоуровневую область. Идентифицировано более 400 генов, вовлеченных в патогенез заболевания, большинство из которых участвуют в регуляции ионных каналов и синаптической активности. Например, мутации в гене SCN8A, кодирующем натриевый канал NaV1.6, могут вызывать как доброкачественные

эпилептические синдромы, так и тяжелые энцефалопатии [51]. Подобные примеры демонстрируют значительное разнообразие фенотипических проявлений в зависимости от типа мутации, что подчеркивает важность точной диагностики и персонализированного подхода к терапии.

Помимо изменений в генах ионных каналов, значительную роль в эпилептогенезе играют эпигенетические механизмы, такие как метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), модификации гистонов и регуляция микро-РНК. Например, повышение экспрессии  $\alpha$ -синуклеина или белка В может индуцировать образование аномальных ионных каналов, что приводит к нарушению ионного гомеостаза и гипервозбудимости нейронов [113, 115]. Эти процессы иллюстрируют роль молекулярных и генетических изменений в развитии эпилептических состояний и открывают перспективы для новых терапевтических стратегий, направленных на модуляцию эпигенетических механизмов.

Глутаматергическая и ГАМК-ергическая системы нейротрансмиссии являются основными регуляторами баланса возбуждения и торможения в головном мозге [13]. Нарушение этого равновесия играет фундаментальную роль в патогенезе эпилепсии, так как смещение в сторону чрезмерного возбуждения или недостаточной тормозной активности приводит к формированию судорожной активности и развитию эпилептогенеза. Глубокое понимание этих механизмов имеет первостепенное значение для разработки новых стратегий лечения, направленных на восстановление нейронального баланса и предотвращение хронической судорожной активности.

Глутамат – это основной возбуждающий нейромедиатор центральной нервной системы, который играет ключевую роль в формировании возбуждающих постсинаптических потенциалов и регуляции синаптической пластичности. В условиях патологического гипервозбуждения глутамат оказывает нейротоксическое действие, приводя к развитию эксайтотоксичности – процесса гибели нервных клеток вследствие их гиперактивации возбуждающими нейромедиаторами [13]. Патологическая стимуляция глутаматных рецепторов, в частности ионотропных подтипов (AMPA, NMDA), приводит к избыточному

поступлению ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в нейроны и запуску каскадов эксайтотоксичности, что способствует гибели клеток и формированию хронического нейродегенеративного процесса в гиппокампе и других структурах головного мозга [103, 121].

NMDA-рецепторы, которые являются основными модуляторами глутаматергической передачи, играют центральную роль в патогенезе эпилепсии. NMDA-рецепторы состоят из нескольких субъединиц, таких как GluN1, GluN2A-D и GluN3, каждая из которых выполняет специфические функции и регулирует чувствительность рецептора к глутамату. При эпилептических состояниях отмечается нарушение соотношения субъединиц и повышенная экспрессия GluN2B, что усиливает кальциевую проницаемость рецепторов и повышает чувствительность нейронов к эксайтотоксическим повреждениям. Увеличение концентрации внутриклеточного кальция активирует ряд ферментов, таких как кальций-зависимая протеинкиназа C, каспазы и фосфолипазы, что приводит к повреждению клеточных мембран, денатурации белков и ДНК, а также гибели нейронов [40].

Кроме того, глутаматергическая гиперактивность вызывает избыточную активацию постсинаптических AMPA-рецепторов, что сопровождается увеличением кальциевой проницаемости и поддержанием состояния гипервозбудимости [46]. Дисбаланс глутаматергической передачи лежит в основе различных форм эпилепсии, таких как височная и фокальная лобная эпилепсия, где происходит нарушение регуляции глутаматных рецепторов и избыточное высвобождение глутамата из пресинаптических терминалей.

ГАМК – главный тормозной нейромедиатор центральной нервной системы, который регулирует нейрональную активность и ингибирует возбуждающие сигналы. ГАМК-ергическая передача осуществляется через два типа рецепторов: йонотропные GABA<sub>A</sub> и метаботропные GABA<sub>B</sub>-рецепторы. GABA<sub>A</sub>-рецепторы представляют собой хлорные каналы, затем происходит гиперполяризация мембраны и снижение возбудимости клетки – угнетение GABA<sub>A</sub>-рецепторов [10, 42]. Например, мутации в гене GABRG2, кодирующей  $\gamma 2$ -субъединицу, связаны с

развитием генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами, что подчеркивает важность ГАМК-ергической системы в патогенезе эпилепсии [70].

В условиях хронической эпилепсии отмечается уменьшение плотности ГАВАА-рецепторов и снижение их функциональной активности, что усиливает гипервозбудимость [30].

Патологическое взаимодействие глутаматергической и ГАМК-ергической систем является основой формирования эпилептических разрядов. В норме ГАМК-ергические нейроны ингибируют глутаматергическую активность, предотвращая чрезмерное возбуждение. Однако при эпилепсии этот баланс нарушается, что приводит к снижению тормозной активности и чрезмерной активации глутаматных рецепторов. Нарушения в работе ионных каналов, таких как натриевые, калиевые и кальциевые каналы, усиливают этот дисбаланс, способствуя генерации и распространению эпилептических разрядов.

Известно, что при эпилепсии нарушается экспрессия генов, кодирующих ионные каналы, таких как *SCN1A*, *SCN2A*, *KCNQ2*, *KCNQ3* и др. Эти изменения приводят к смещению мембранного потенциала нейронов в сторону деполяризации и поддерживают состояние гипервозбудимости. Дополнительно, активация провоспалительных сигнальных путей (ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ ) способствует снижению ГАМК-ергической передачи и увеличению высвобождения глутамата, что замыкает патологический круг и усиливает нейрональную дисфункцию.

На основании данных о роли глутаматергической и ГАМК-ергической систем в патогенезе эпилепсии разрабатываются новые терапевтические стратегии, направленные на восстановление баланса между возбуждением и торможением. К перспективным методам лечения относятся ингибиторы глутаматных рецепторов (антагонисты NMDA и AMPA-рецепторов), агонисты ГАМК-рецепторов, а также модуляторы ионных каналов, таких как блокаторы натриевых и кальциевых каналов. Дополнительно, нейропротективные агенты, обладающие антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, например мирицетин, могут оказывать положительное влияние на восстановление баланса нейротрансмиссии и уменьшение эксайтотоксичности.

Воспаление играет центральную роль в развитии и поддержании эпилептической активности как при острых, так и при хронических формах эпилепсии. Различные патологические состояния, такие как травмы головного мозга, инфекции или системные воспалительные заболевания, инициируют локальный воспалительный процесс, который приводит к дестабилизации нейрональных сетей, усилению эксайтотоксичности и формированию эпилептогенной сети [107]. Особое внимание уделяется нарушению целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и активации глиальных клеток – микроглии и астроцитов, которые являются основными регуляторами воспалительного ответа в головном мозге (Рисунок 1.1).

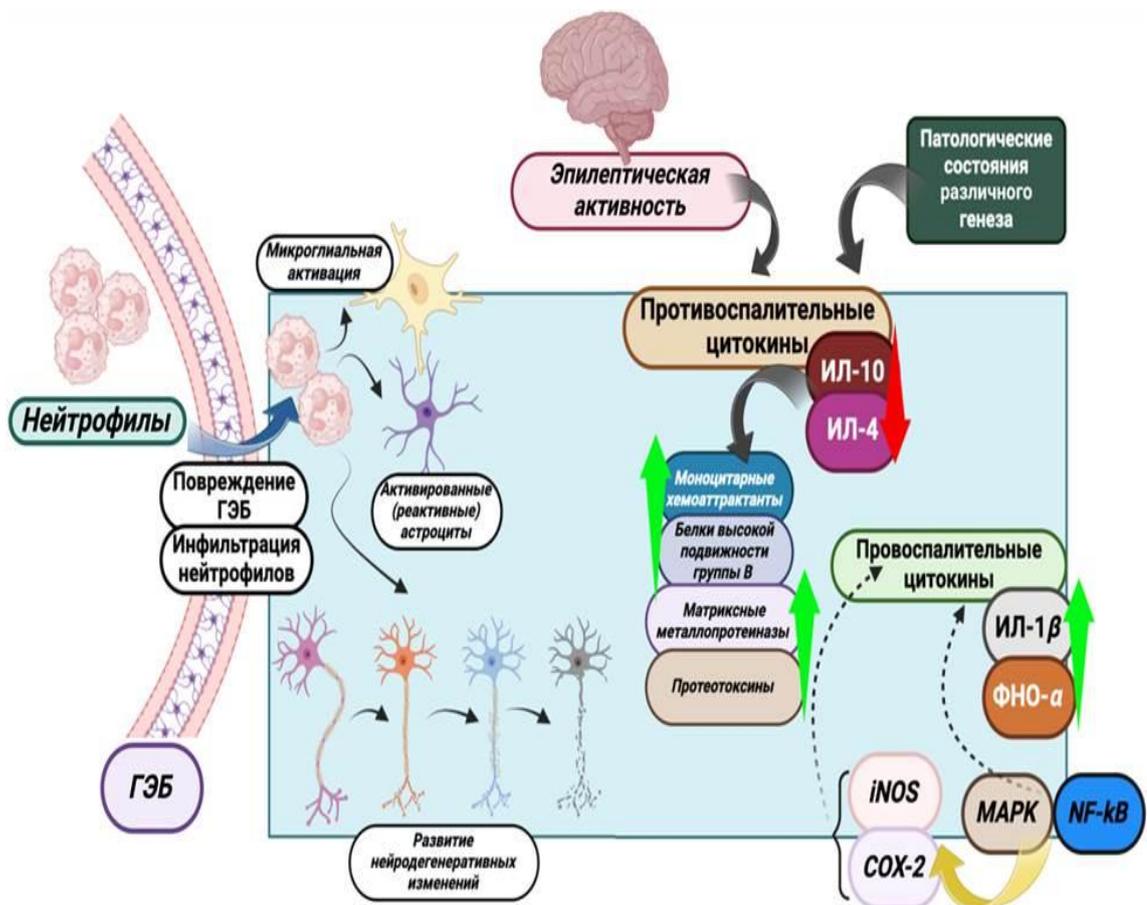


Рисунок 1.1 – Основные механизмы нейровоспаления и их роль в эпилептической активности. ГЭБ – гематоэнцефалический барьер, ИЛ – интерлейкины, ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа, iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота, COX-2 – циклооксигеназа-2, MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа, NF- $\kappa$ B – ядерный фактор каппа В.

При остром эпилептическом статусе и хронических формах эпилепсии повреждение ГЭБ приводит к проникновению в мозговую ткань провоспалительных молекул и периферических иммунных клеток. При этом усиливается степень воспалительной реакции со склонностью к хронизации процесса, в связи с чем эпи-очаги становятся более устойчивые. В результате нарушение ГЭБ рассматривается как один из ранних маркеров эпилептогенеза, а его восстановление – как перспективное направление терапии для предупреждения прогрессирования эпилепсии.

В условии судорожной активности усиливается продукция провоспалительных факторов, простагландинов и хемокинов. В острой фазе эпилепсии эти молекулы усиливают эксайтотоксичность за счет увеличения продукции глутамата и снижения захвата его избытка, что ведет к нарушению тормозных механизмов и ускоренному развитию эпилептогенной сети [122]. В условиях хронической эпилепсии длительная активация глии поддерживает воспалительный процесс и усиливает нейрональную гипервозбудимость, что приводит к формированию резистентных форм эпилепсии и необратимым когнитивным нарушениям [45].

Провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , оказывают мультифакторное влияние на нейрональные сети. ИЛ-1 $\beta$  усиливает передачу возбуждения за счет повышения экспрессии NMDA-рецепторов и активации каспазных путей, что ведет к усилению апоптоза нейронов и снижению нейропластичности [6, 128]. ФНО- $\alpha$  регулирует баланс между возбуждающими и тормозными рецепторами, увеличивая число AMPA-рецепторов и вызывая деградацию GABA-рецепторов, что создает условия для генерации судорог [7, 128]. В хронических формах эпилепсии постоянное повышение уровней этих цитокинов ведет к формированию устойчивой воспалительной среды, которая затрудняет традиционную противоэпилептическую терапию и поддерживает резистентность к препаратам.

С учетом ключевой роли воспаления в патогенезе как острой, так и хронической эпилепсии, подавление воспалительного процесса является перспективным направлением для разработки новых методов лечения. Включение антиоксидантных и противовоспалительных препаратов, например мирицетина, кверцетина, показало способность снижать продукцию провоспалительных цитокинов и восстанавливать функцию ГЭБ, что позволяет уменьшить частоту судорог и улучшить когнитивные функции [43, 124]. Применение ингибиторов сигнальных путей NF- $\kappa$ B, JAK/STAT и MAPK, которые регулируют экспрессию ключевых цитокинов, также демонстрирует потенциал для предотвращения хронизации воспалительного процесса. Таким образом, воспаление является центральным элементом эпилептогенеза, и его модуляция представляет собой перспективное направление для разработки новых терапевтических подходов, направленных на улучшение исходов у пациентов с резистентными формами эпилепсии.

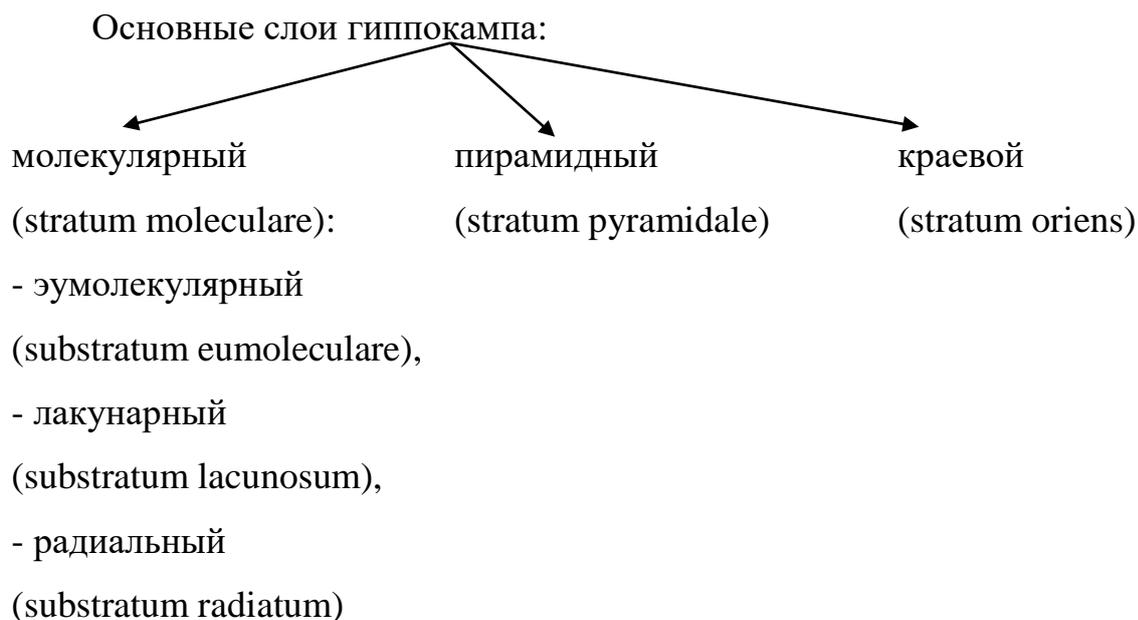
### **1.3. Структурные и функциональные изменения головного мозга при эпилепсии**

#### *1.3.1. Гистологические и молекулярно-биологические изменения гиппокампа при эпилепсии*

Гиппокампальная область, будучи важнейшей частью лимбической системы, играет ключевую роль в процессах памяти и пространственной навигации, а также в регуляции эмоциональных реакций. При эпилепсии гиппокамп нередко становится очагом патологической активности, что связано с его особым гистологическим строением и уязвимостью к метаболическим и воспалительным процессам. Гистологические изменения в гиппокампе включают потерю пирамидных нейронов в области CA1 и CA3, а также дегенерацию гранулярных клеток зубчатой извилины. Эти изменения характерны для так называемого гиппокампального склероза, наблюдаемого при медиальной височной эпилепсии

(МВЭ), который проявляется значительным уменьшением нейрональной плотности и глиозом [85, 104].

Гистологическая структура гиппокампа характеризуется четкой организацией в виде U-образной формы, которая подразделяется на четыре основные зоны – CA1, CA2, CA3 и CA4.



Некоторые авторы считают, что самым глубоким слоем является – stratum alveolus, который содержит немногочисленные рассеянные мелкие нейроны, а поверхностный stratum oriens включает корзинчатые и горизонтальные нейроны, сходные по структуре во всех областях гиппокампа. Stratum pyramidale, являясь средним слоем, включает крупные пирамидные клетки – основные возбуждающие нейроны, формирующие основу электрической активности гиппокампа.

Следующий слой, stratum radiatum, представлен параллельными волокнами и вставочными нейронами, что особенно выражено в зоне CA3. Stratum lacunosum и stratum moleculare нередко объединяются в один слой из-за схожести, представляя собой сложную сеть дендритов, вставочных нейронов и синапсов.

Зубчатая извилина, окружающая край Cornu Ammonis, состоит из трех слоев: полиморфного (включает интернейроны и аксоны гранулярных клеток), зернистого (плотно упакованные гранулярные нейроны) и молекулярного

(содержит синапсы и интернейроны), формируя интегративные связи между гиппокампом и другими структурами мозга. Субикулум – промежуточная зона между СА1 и энторинальной областью, также демонстрирует высокую степень гистологической сложности и включает несколько подразделений: субикулум, пресубикулум и парасубикулум, образованных плотной сетью нейронов и нервных волокон, участвующих в передаче сигналов на корковые структуры.

Молекулярно-биологические изменения особенности гиппокампа при эпилепсии варьируются в зависимости от стадии заболевания и его формы.

Активация и усиленная продукция прооксидантных ферментов, преимущественно NOX и COX-2 при острой воспалительной реакции усиливает повреждение нейронов [97]. В хронической стадии изменения включают нарушение нейротрансмиссии, что выражается снижением уровня гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и дисбалансом между ГАМКергическими и глутаматергическими путями.

Также важными являются изменения в экспрессии белков, участвующих в регуляции синаптической пластичности, таких как нейрональные кальциевые каналы и NMDA-рецепторы. Исследования показывают, что при хронической эпилепсии наблюдается увеличение экспрессии подтипа рецепторов GluN2B, что приводит к усилению эксайтотоксичности и гибели нейронов [25]. В то же время, в норме гиппокамп демонстрирует высокую степень нейрональной пластичности, что проявляется в способности к компенсации клеточной гибели и восстановлению сетевой активности за счет активации механизма прорастания мшистых волокон [70].

Нарушение нейротрансмиссии в нейронах гиппокампе сопряжено с повреждением Na- и K-евых каналов клеточной поверхности, а также *SCN1A* и *SCN2A* мутациями.

### *1.3.2 Изменения других отделов головного мозга и их вклад в эпилептогенез*

При эпилепсии значительные структурные и функциональные изменения наблюдаются не только в гиппокампе, но и в других структурах головного мозга, таких как миндалевидное тело, таламус и кора головного мозга, что приводит к формированию сложных патологических механизмов. Согласно исследованиям, изменения в этих областях сопровождаются воспалением, гибелью нейронов и ремоделированием клеточной структуры, что вносит вклад в генерацию и поддержание эпилептогенной активности.

Миндалина (*Amygdala*), отвечающая за регуляцию эмоциональных реакций и памяти, подвергается значительной перестройке при эпилепсии, что проявляется в виде увеличения гибели нейронов и активации микроглии. Эти процессы приводят к нарушению функционирования цепей эмоциональной памяти, что связано с повышенной частотой тревожных и депрессивных расстройств у пациентов с эпилепсией. В исследованиях с использованием модели эпилепсии на крысах выявлено значительное увеличение проапоптотических белков и экспрессия воспалительных цитокинов, что указывает на активацию реактивных процессов в миндалине и ее критическую роль в поддержании эпилептических разрядов [18, 68].

Таламус, выполняющий роль сенсорного реле, и участвует в генерации и распространении эпилептической активности, также подвергается структурным и функциональным изменениям. При эпилепсии наблюдается изменение экспрессии ионных каналов и рецепторов в таламусе, что способствует усилению синхронизации нейронов и генерации патологических разрядов, распространяющихся на другие структуры мозга, включая кору [65]. Эти изменения подтверждают центральную роль таламуса как усилителя эпилептической активности, что подтверждено выявлением сильной активации микроглии и гибели нейронов в таламических ядрах у животных моделей.

Кора головного мозга, в свою очередь, претерпевает ремоделирование в ответ на хроническую эпилептическую активность, что приводит к снижению числа

функционально активных нейронов и выраженному реактивному глиозу. Данный процесс проявляется в гипертрофии и пролиферации астроцитов (астроглиоз), а также в активации микроглии. Глиальные клетки после их активации приводят к снижению порога возбудимости нейронов коры, способствуя их дестабилизации и распространению патологических разрядов [90]. Указанные процессы создают основу для формирования устойчивых эпилептических очагов в коре, которые поддерживают длительные эпилептические эпизоды и нейродегенеративные изменения.

Таким образом, структурные и функциональные изменения в гиппокампе, миндалевидном теле, таламусе и коре мозга формируют комплексную сеть взаимодействующих патологических процессов, где нарушения в одной структуре могут инициировать каскад реакций в других отделах мозга. Понимание этих изменений имеет критическое значение для разработки новых терапевтических подходов, направленных на восстановление нормальной нейрональной активности и предотвращение дальнейшего прогрессирования заболевания.

#### **1.4. Экспериментальные модели эпилепсии и их роль в изучении патогенеза**

Экспериментальные животные модели эпилепсии играют ключевую роль в понимании нейробиологических механизмов заболевания и разработке новых терапевтических подходов. Они позволяют воспроизвести основные клинимоρφологические изменения, характерные для различных типов эпилептических синдромов, а также протестировать эффективность противоэпилептических препаратов. Основным преимуществом таких моделей является возможность детального изучения патологических процессов, происходящих в центральной нервной системе, включая нарушения нейротрансмиссии, изменения экспрессии генов, ремоделирование нейрональных сетей и механизмы нейровоспаления.

В настоящее время используются несколько основных типов экспериментальных моделей, каждая из которых применяется для моделирования определенных форм эпилептических припадков, включая спонтанные и

индуцированные формы. Основными видами животных, на которых моделируют эпилепсию, являются грызуны, а также приматы, что обусловлено доступностью, возможностью генетических модификаций и анатомическими сходствами с человеком.

Грызуны, в частности крысы и мыши, являются наиболее часто используемыми видами для изучения эпилепсии благодаря их нейроанатомическому строению, которое позволяет моделировать основные патофизиологические процессы заболевания, а также из-за доступности генетических манипуляций и высокой воспроизводимости результатов.

Приматы являются наиболее близкими по анатомии и физиологии к человеку, что делает их использование в исследованиях эпилепсии особенно ценным. Приматы позволяют изучать не только генерализованные и фокальные формы эпилепсии, но и нейропсихиатрические аспекты заболевания, такие как тревожные и депрессивные расстройства. Однако сложность их содержания и этические ограничения существенно сокращают возможность их использования, и они рассматриваются в основном для доклинических испытаний новых терапевтических стратегий.

#### *1.4.1. Химически индуцированные модели эпилепсии*

Химически индуцированные модели используют различные вещества, вызывающие эпилептическую активность через модуляцию нейротрансмиссии и нарушение нормального функционирования ионных каналов. Эти вещества, называемые хемоконвульсантами, воздействуют на определенные структуры головного мозга, вызывая острые и хронические припадки, что позволяет моделировать сложные патофизиологические механизмы заболевания. Среди наиболее часто используемых хемоконвульсантов – каиновая кислота, пилокарпин и пентилентетразол (PTZ), каждый из которых имеет свои особенности воздействия на нейрональные сети.

Каиновая кислота является производным глутаминовой кислоты и воздействует на ионотропные рецепторы, вызывая избыточное возбуждение нейронов, что приводит к их дегенерации и гибели [3]. Эта модель широко используется для изучения мезиального височного склероза, так как поражает преимущественно гиппокампальную формацию. Модель с каиновой кислотой вызывает повторяющиеся парциальные и генерализованные припадки, сопровождающиеся выраженными изменениями нейрональных цепей и воспалительными процессами в гиппокампе. Основное ограничение этой модели заключается в том, что она вызывает преимущественно локальные повреждения гиппокампа и не отражает широко распространенные повреждения корковых структур, наблюдаемые у пациентов с височной эпилепсией.

Пилокарпин, являющийся мощным агонистом мускариновых рецепторов, при системном или внутримозговом введении вызывает эпилептический статус (ЭС), который характеризуется длительными судорожными припадками, переходящими в хроническую форму эпилепсии [89]. Эта модель достоверно воспроизводит структурные повреждения, характерные для сложных парциальных припадков у людей, такие как поражение гиппокампа и развитие склеротических изменений [79]. Примечательно, что противозэпилептические препараты, эффективные при лечении сложных парциальных припадков у пациентов, оказывают аналогичное терапевтическое действие и на животных с пилокарпин-индуцированной эпилепсией [108]. Между височной эпилепсией у человека и данной моделью наблюдаются значительные нейрохимические и электрофизиологические сходства, включая характерную гиперактивность гиппокампальной формации и сходные паттерны межприступной активности [17, 114]. В обоих случаях отмечается повышенный уровень нейротрофинов в гиппокампе и неокортексе, что указывает на общие механизмы нейропластичности [87, 98]. Кроме того, когнитивные и мнемонические нарушения, такие как ухудшение памяти и сложности с обучением, часто встречающиеся у пациентов с височной эпилепсией, также воспроизводятся в данной модели [92], что

подчеркивает ее высокую валидность для исследований височной эпилепсии и поиска новых терапевтических мишеней.

Пентилентетразол (PTZ) и аналогичные соединения, такие как стрихнин, N-метил-D,L-аспартат и столбнячный токсин, применяются преимущественно для моделирования острых судорожных приступов, а не для создания моделей хронической эпилепсии. Эти хемоконвульсанты вызывают кратковременные судорожные реакции, что делает их полезными для оценки противосудорожной активности препаратов в острых условиях, но они редко приводят к стойким изменениям, характерным для хронической эпилепсии, за исключением специфических протоколов многократного введения [15, 76].

Особый интерес представляет PTZ, который широко используется в моделировании миоклонических приступов и для индукции состояния хронической эпилепсии с помощью «химического киндлинга». В этом методе повторное введение субконвульсивных доз PTZ вызывает прогрессирующее усиление нейрональной возбудимости, что напоминает классическую модель электрического киндлинга [99]. Другие хемоконвульсанты, такие как стрихнин и N-метил-D,L-аспартат, в основном индуцируют генерализованные тонико-клонические припадки [81], что ограничивает их применение преимущественно для оценки эффективности препаратов против этого типа судорог.

Несмотря на способность PTZ-модели воспроизводить некоторые нейропатологические изменения, характерные для эпилепсии, она не охватывает всего спектра клинических симптомов, наблюдаемых у пациентов. Это подчеркивает необходимость разработки новых экспериментальных моделей, которые бы адекватно отражали и начальные стадии эпилептогенеза, и долгосрочные изменения, присущие хронической эпилепсии.

Киндлинг представляет собой метод индукции хронической эпилептической активности, применяемый как в химически, так и в электрически индуцированных моделях. Этот подход основан на многократной субконвульсивной стимуляции лимбических структур (например, гиппокампа или миндалевидного тела), что приводит к постепенному усилению нейрональной активности и формированию

стойкой эпилептической активности. В отличие от острых моделей, киндлинг позволяет контролировать процесс эпилептогенеза и создавать модели с устойчивыми хроническими припадками.

Применение PTZ и других хемоконвульсантов в рамках киндлинга позволяет воспроизвести состояния, такие как фармакорезистентная эпилепсия, и исследовать механизмы формирования эпилептического статуса. Существуют различные варианты протоколов, включая медленный (англ. Slow Kindling, SK) и быстрый киндлинг (англ. Rapid Kindling, RK), которые различаются по скорости индукции эпилептического состояния [4, 61].

Медленный киндлинг требует длительного периода стимуляции, что позволяет лучше изучать латентные стадии эпилептогенеза и механизм устойчивости к терапии. В то же время быстрый киндлинг ускоряет процесс индукции хронической эпилепсии, что делает его более удобным для тестирования фармакологических вмешательств. Выбор конкретного протокола зависит от цели исследования и особенностей изучаемого типа судорожной активности.

#### *1.4.2. Электрически индуцированные модели эпилепсии*

Электрически индуцированные модели эпилепсии занимают важное место в изучении механизмов эпилептогенеза и применяются для воспроизведения хронической эпилепсии, позволяя контролировать место и степень развития патологических разрядов. Наиболее распространенной электрической моделью является киндлинг, при котором многократные субконвульсивные стимуляции приводят к прогрессивному увеличению амплитуды и частоты эпилептиформной активности. Эти изменения сопровождаются постепенным развитием устойчивых судорог, что позволяет исследовать эпилептогенез на разных стадиях [38, 112].

Классический киндлинг подразумевает электрическую стимуляцию лимбических структур (гиппокампа, миндалина и коры) через имплантированные электроды. Такой метод моделирования характеризуется высокой воспроизводимостью и контролем за развитием приступов, что делает его одним из

основных инструментов в исследовании механизмов формирования хронической эпилепсии [84]. Однако продолжительность классических протоколов (в среднем, до 30 дней) ограничивает их применение в некоторых экспериментах. Вариантами данного метода являются медленный (slow kindling) и быстрый (rapid kindling) киндлинг, которые различаются по числу стимуляций и скорости индукции судорог [86].

В медленном киндлинге требуется более длительное время (до 16 дней) с ежедневными субпороговыми стимулами для достижения эпилептогенного состояния. Быстрый киндлинг позволяет достичь устойчивой эпилепсии за 3–4 дня, используя более интенсивные стимулы [83, 86].

Электрически индуцированные модели, хотя и обладают высокой степенью воспроизведения нейрональных изменений и устойчивых эпилептических состояний, требуют значительных временных и технических ресурсов. Необходимость использования глубокой имплантации электродов и длительной стимуляции ограничивает их применимость в контексте высокоэффективного скрининга противоэпилептических препаратов.

### **1.5. Молекулярные и клеточные механизмы нейрональной гибели и нейропротекции**

Основными механизмами гибели нейронов при эпилепсии выступают апоптоз, некроз и каспаз-зависимые пути, активирующиеся на всех этапах эпилептогенеза, начиная с эпилептического статуса (ЭС). Эти процессы усугубляются оксидативным стрессом и нейровоспалением, что усиливает патологическую активность нейронов и способствует хронизации эпилептического состояния.

На молекулярном уровне хроническая эпилепсия сопровождается избыточной продукцией активных форм кислорода (АФК), повышением уровня проапоптотических белков, таких как каспаза-8, и активацией воспалительных

каскадов, что приводит к гибели клеток в таких уязвимых зонах, как гиппокамп и миндалевидное тело [43, 59]. Эти процессы нарушают энергетический обмен и дестабилизируют клеточные мембраны, что ускоряет нейродегенерацию и усугубляет клиническую симптоматику.

Понимание этих молекулярных механизмов критически важно для разработки нейропротекторных стратегий, способных предотвратить хронический эпилептогенез. Модели эпилепсии – химические и электрические, позволяют детализировать эти процессы и выявить новые терапевтические мишени.

### *1.5.1. Апоптотические и некротические механизмы при эпилепсии*

Апоптоз и некроз являются основными механизмами гибели нейронов при эпилепсии и играют центральную роль в развитии нейродегенеративных процессов на фоне повторяющихся эпилептических приступов. Апоптоз, как контролируемый процесс программируемой гибели клеток, может инициироваться через два основных пути – экзогенный (внешний) и эндогенный (внутренний). Экзогенный путь запускается активацией рецепторов смерти (таких как Fas и TNF-рецепторы), которые, взаимодействуя с лигандами (например, FasL или TNF- $\alpha$ ), формируют сигнализирующий комплекс, известный как «death-inducing signaling complex» (DISC) → активация каспазы-8 → активация эффекторных каспаз (каспазы-3) → фрагментация ДНК → гибель клетки [50, 58, 73, 77].

При внутреннем (митохондриальном) пути апоптоза из-за активации проапоптотических белков – цитохрома C и AIF нарушается целостность мембран как большинства органелл нейронов, так и плазмолеммы. Здесь также активируются и другие молекулы: каспазы 9, Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL и др. Особенно это хорошо заметно в гиппокампе и миндалевидном теле при хронической эпилепсии [102, 119, 126]. [102].

Некроз, в отличие от апоптоза, является неконтролируемым процессом, при котором происходит разрыв клеточной мембраны и выброс внутриклеточного содержимого во внеклеточное пространство, вызывая интенсивную

воспалительную реакцию и повреждение окружающих тканей. При эпилептическом статусе некротические изменения часто выявляются в гиппокампе и коре головного мозга, что сопровождается активацией микроглии и выбросом провоспалительных цитокинов (таких как IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) [70, 105, 125], что, в свою очередь, поддерживает нейровоспаление и создает условия для дальнейшего прогрессирования заболевания.

Помимо апоптоза и некроза, гибель нейронов при эпилепсии также может происходить через каспазо-независимые механизмы, такие как пироптоз и ферроптоз, которые активируются в условиях острого оксидативного стресса и дисрегуляции кальциевого гомеостаза [80, 94]. Например, пироптоз сопровождается активацией газдерминов и образованием пор в клеточных мембранах, что приводит к быстрому выбросу проапоптотических факторов и воспалению [33]. Эти механизмы часто активируются параллельно с классическим апоптозом и некрозом, что подчеркивает многоуровневый характер нейрональной гибели при эпилепсии.

### *1.5.2. Оксидативный стресс*

Оксидативный стресс (ОС) является одним из ключевых элементов в развитии эпилепсии и сопутствующей нейрональной гибели. Эпилептические приступы, характеризующиеся гиперэкситацией – патологическим перевозбуждением нейронов, приводят к значительному увеличению продукции активных форм кислорода (АФК), что вызывает каскад повреждений липидов, белков и ДНК. На молекулярном уровне ОС способствует дестабилизации мембран, нарушению энергетического метаболизма и инициации апоптоза через митохондриальную дисфункцию.

Приступы провоцируют дисбаланс между образованием свободных радикалов и системой антиоксидантной защиты, что, в свою очередь, приводит к накоплению таких маркеров оксидативного повреждения, как F2-изопростаны (F2-IsoPs), 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG), малоновый диальдегид (MDA) и

карбонильные производные белков [62, 64, 91]. В головном мозге, обладающем высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот и ионов двухвалентного железа ( $Fe^{2+}$ ), которые являются катализаторами образования АФК, особенно уязвимыми оказываются гиппокамп, миндалевидное тело и корковые структуры. Высокие метаболические потребности мозга, а также относительно низкий уровень антиоксидантных ферментов, таких как каталаза, супероксиддисмутаза (SOD) и глутатионпероксидаза (GPx), увеличивают риск нейродегенеративных изменений при эпилепсии.

Митохондриальная дисфункция является центральным элементом в патогенезе эпилепсии. В условиях эпилептического статуса нарушается нормальная функция митохондрий, что приводит к повышенному высвобождению супероксидного аниона ( $O_2^{\bullet-}$ ), накоплению  $H_2O_2$  и активации реакции Фентона с образованием высокотоксичных гидроксильных радикалов ( $\bullet OH$ ) [52, 60]. Повреждение митохондриальной мембраны сопровождается утечкой цитохрома C и активацией внутриклеточного каскада апоптоза, что в итоге приводит к гибели нейронов [54]. В хронических моделях эпилепсии нарушение энергетического метаболизма, связанное с дефицитом комплексов дыхательной цепи (особенно I комплекса), усиливает окислительное повреждение и способствует устойчивой эпилептической активности [69, 71].

Окислительный стресс также вовлечен в механизмы фармакорезистентности, связанные с изменением экспрессии транспортных белков ABC-транспортеров. Повышенное содержание АФК может индуцировать активацию механизмов, препятствующих проникновению противоэпилептических препаратов (ПЭП) в клетки, что способствует развитию лекарственной резистентности. Например, снижение активности супероксиддисмутазы (SOD) и недостаточная продукция глутатиона (GSH) ассоциированы с увеличением экспрессии белков резистентности, что снижает эффективность лечения [44].

Антиоксидантные стратегии рассматриваются как перспективное направление в терапии эпилепсии. Наряду с классическими ПЭП, такими как фенобарбитал и карбамазепин, которые обладают некоторыми антиоксидантными

свойствами, разрабатываются новые подходы, включающие использование таких соединений, как коэнзим Q10, N-ацетилцистеин и альфа-липоевая кислота, которые стабилизируют митохондриальные мембраны и уменьшают образование АФК. В дополнение ингибиторы апоптоза, направленные на блокирование каспазного каскада, показали свою эффективность в снижении ОС и предотвращении нейродегенерации.

### **1.6. Стратегии в лечении эпилепсии: современное состояние и перспективы**

Современные подходы к терапии эпилепсии опираются на использование противозепилептических препаратов, которые направлены на снижение частоты и интенсивности эпилептических приступов. ПЭП подразделяются на две основные группы: препараты первой линии, используемые в качестве стандартной терапии, и препараты второй линии, которые применяются при лекарственной резистентности. К традиционным ПЭП относятся фенитоин, карбамазепин, вальпроат натрия и фенобарбитал, каждый из которых обладает уникальным механизмом действия, включая блокаду натриевых и кальциевых каналов, модуляцию активности ГАМК-рецепторов и ингибирование эксайтотоксичности через подавление глутаматной передачи [110, 116, 129].

Традиционные ПЭП, несмотря на свою эффективность, часто сопровождаются выраженными побочными эффектами, включая когнитивные нарушения, гепатотоксичность и влияние на систему гемостаза. На этом фоне внимание исследователей все чаще переключается на поиск новых препаратов, обладающих нейропротективными и антиоксидантными свойствами, которые могли бы минимизировать побочные эффекты и повысить эффективность терапии.

### *1.6.1. Традиционные противоэпилептические препараты: достижения и ограничения*

Традиционные ПЭП, такие как фенитоин, карбамазепин и вальпроат натрия, остаются основой терапии при большинстве форм эпилепсии. Их механизм действия включает блокаду натриевых и кальциевых каналов, ингибирование высвобождения возбуждающих нейротрансмиттеров и активацию ГАМК-эргических систем. Например, карбамазепин и фенитоин стабилизируют натриевые каналы, предотвращая генерацию и распространение патологических разрядов, тогда как вальпроат натрия модулирует синтез  $\gamma$ -аминомасляной кислоты [19, 41]. Однако их длительное использование сопряжено с развитием побочных эффектов, включая когнитивные и психомоторные нарушения, гепатотоксичность и риск развития сопутствующих патологических состояний, например, развитие синдрома Стивенса-Джонсона [66, 96, 101].

Новые ПЭП, такие как ламотриджин, леветирацетам и топирамат, направлены на минимизацию побочных эффектов и улучшение переносимости терапии. Ламотриджин, например, стабилизирует натриевые каналы и ингибирует высвобождение глутамата, предотвращая возбуждение нейронов [2]. Леветирацетам воздействует на синаптические везикулярные белки, модулируя высвобождение нейротрансмиттеров, а топирамат оказывает мультифакторное действие, подавляя активность AMPA-рецепторов и ингибируя карбоангидразу, что приводит к снижению внутриклеточного кальция и предотвращению эксайтотоксичности [1, 12]. Тем не менее, примерно у 30% пациентов с эпилепсией сохраняется резистентность к ПЭП, что подчеркивает необходимость поиска новых терапевтических стратегий.

### 1.6.2. Природные соединения как потенциальные нейропротекторы

Среди новых направлений в лечении эпилепсии все большее внимание уделяется природным соединениям, обладающим антиоксидантными, противовоспалительными и нейропротективными свойствами. Природные вещества, такие как куркумин, ресвератрол, эпигаллокатехин и флавоноиды, оказывают модулирующее действие на основные механизмы патогенеза эпилепсии, включая ингибирование эксайтотоксичности, подавление оксидативного стресса и снижение уровня воспалительных маркеров [49, 57]. Однако наиболее перспективным кандидатом среди природных соединений в контексте эпилепсии является мирицитин.

Мирицетин (3,5,7-тригидрокси-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4-хромонон; эмпирическая формула:  $C_{15}H_{10}O_8$ ) – это полигидроксилированный флавоноид, относящийся к подклассу флавонолов (Рисунок 1.2). Основными источниками его получения служат кора и плоды восковницы красной (*Myrica rubra*), ягоды (черника, клюква, черная смородина), виноград, орехи, а также листья чая (*Camellia sinensis*) и некоторых других лекарственных растений. В растениях он чаще всего встречается не в свободной форме (агликон), а в виде гликозидов (например, мирицитрина), где к гидроксильным группам присоединены углеводные остатки.

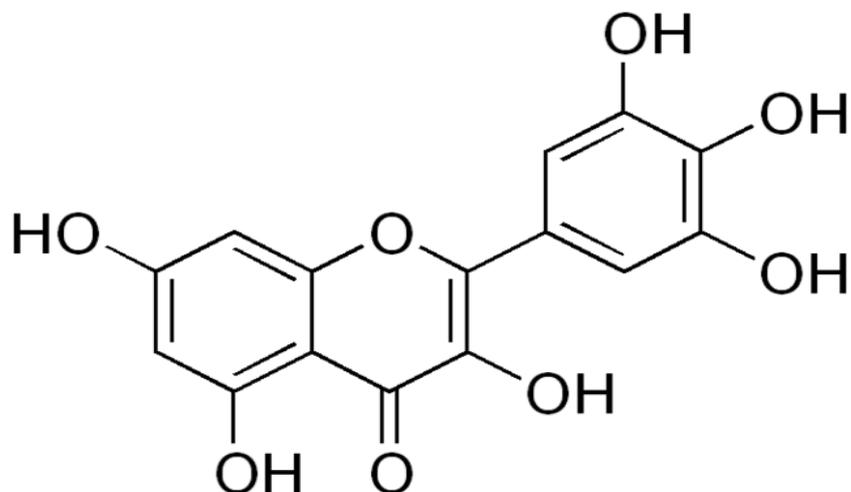


Рисунок 1.2. – Химическая формула мирицетина (3,5,7-тригидрокси-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4-хромонона)

Химическая структура мирицетина определяет его высокую фармакологическую активность. Молекула состоит из хромонового ядра (кольца А и С), к которому присоединено фенильное кольцо В. Ключевой особенностью является наличие шести гидроксильных групп ( $^-\text{OH}$ ). Пирогаллоловый фрагмент в кольце В (положения 3', 4', 5') обуславливает его мощные антиоксидантные свойства. Эти группы делают мирицетин эффективным «упаковщиком» свободных радикалов и «хелатором» ионов металлов переменной валентности ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), прерывая цепные реакции перекисного окисления липидов.

Высокая реакционная способность мирицетина лежит в основе его многоцелевого фармакологического действия, особенно релевантного для нейропротекции. Его противовоспалительный эффект реализуется через ингибирование сигнального пути ядерного фактора «каппа-би» (NF- $\kappa\text{B}$ ), что ведет к подавлению транскрипции генов провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин- $1\beta$  (ИЛ- $1\beta$ ) и фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ).

В контексте нейробиологии, мирицетин демонстрирует способность модулировать фундаментальные процессы, лежащие в основе эпилептогенеза. Он восстанавливает баланс между возбуждающей (глутаматергической) и тормозной (ГАМК-ергической) системами, в частности, за счет модуляции активности ГАМК<sub>a</sub>-рецепторов. Это способствует стабилизации мембранного потенциала нейронов и повышению порога судорожной активности. Более того, мирицетин влияет на сигнальные пути, критически важные для выживания и пластичности нейронов, включая каскад BDNF-TrkB и митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), что предотвращает апоптотическую гибель клеток и улучшает синаптическую функцию [111]. Несмотря на эти многообещающие данные, полученные преимущественно на моделях хронических состояний, фармакокинетика и фармакодинамика мирицетина в условиях острого судорожного приступа остаются недостаточно изученными.

Таким образом, дальнейшее изучение мирицетина и других природных соединений в контексте эпилепсии позволит расширить представления о механизмах нейропротекции и предложить новые стратегии для лечения

фармакорезистентных форм эпилепсии. Мирицитин представляет собой перспективный кандидат для комплексной терапии, направленной на предотвращение нейродегенерации и улучшение когнитивных функций у пациентов с эпилепсией.

### **1.7. Заключение по обзору литературы**

Таким образом, эпилепсия остается одной из наиболее сложных и недостаточно изученных неврологических патологий, которая сопровождается необратимыми изменениями в структуре и функциях головного мозга. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе нейродегенеративных нарушений и разработке мер их профилактики. Да, наблюдается некий прогресс в изучении патогенеза эпилепсии, однако ключевые аспекты, связанные с механизмами гибели нейронов, активацией воспаления и эксайтотоксичности, а также недостаточность существующих противоэпилептических препаратов, по-прежнему остаются актуальными.

В контексте лечения PTZ-индуцированных судорог использование природных нейропротекторов может стать важной альтернативой традиционным противоэпилептическим препаратам, минимизируя побочные эффекты и улучшая клинические исходы. Более глубокое изучение роли природных соединений, таких как мирицитин, в модуляции нейрональных сетей и подавлении воспалительного ответа позволит не только расширить представления о патогенезе заболевания, но и предложить новые подходы к терапии, способные предотвратить хроническую нейродегенерацию.

Введение новых терапевтических стратегий, таких как использование антиоксидантных и противовоспалительных соединений, может обеспечить снижение частоты и интенсивности приступов, а также уменьшить риск нейродегенеративных изменений, часто сопровождающих длительное течение заболевания. Применение мирицетина как потенциального нейропротектора открывает перспективы для разработки комплексных схем терапии, направленных

на модуляцию ключевых патогенетических механизмов, таких как нейровоспаление, эксайтотоксичность и оксидативный стресс.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационная работа была выполнена на базе Научно-образовательного ресурсного центра инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа (молекулярной морфологии) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

### 2.1. Дизайн эксперимента

В экспериментальном исследовании использовали животных – самцов мышей линии СВА (филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, вес 30–35 г; возраст 12 недель; n=340), которые были поделены на шесть групп (Рисунок 2.1):

I группа – контрольная (n=20), которым вводили физиологический 0,9% раствор NaCl;

II группа – опытная (n=110), которым однократно вводили пентилентетразол (англ. *Pentylenetetrazole*, PTZ) в дозе 45 мг/кг для индукции судорог без предварительной терапии;

III группа – опытная (n=90), которым вводили мирицетин (лат. *Muricetin*; англ. *Muricetin*), доза – 200 мг/кг, перорально (через зонд), в течение 5 дней, после чего вводили PTZ в дозе 45 мг/кг для индукции судорог;

IV группа – опытная (n=80), которым вводили препарат сравнения – вальпроевую кислоту (лат. *Acidum valproicum*; англ. *Valproic acid*), доза – 100 мг/кг, интраперитонеально, в течение 5 дней, после чего вводили PTZ в дозе 45 мг/кг для индукции судорог;

V группа – опытная (n=20), которым вводили мирицетин в дозе 200 мг/кг перорально (через зонд) в течение 5 дней, после чего вводили физиологический 0,9% раствор NaCl;

VI группа – опытная (n=20), которым вводили вальпроевую кислоту в дозе 100 мг/кг интраперитонеально в течение 5 дней, после чего вводили физиологический 0,9% раствор NaCl.

Анализ поведенческих реакций и изучение фрагментов головного мозга (гиппокампа) в нескольких временных точках: через 3 часа, 1 сутки, 3 суток, 5 суток после интраперитонеального введения пентилтетразола в дозировке 45 мкг/кг.

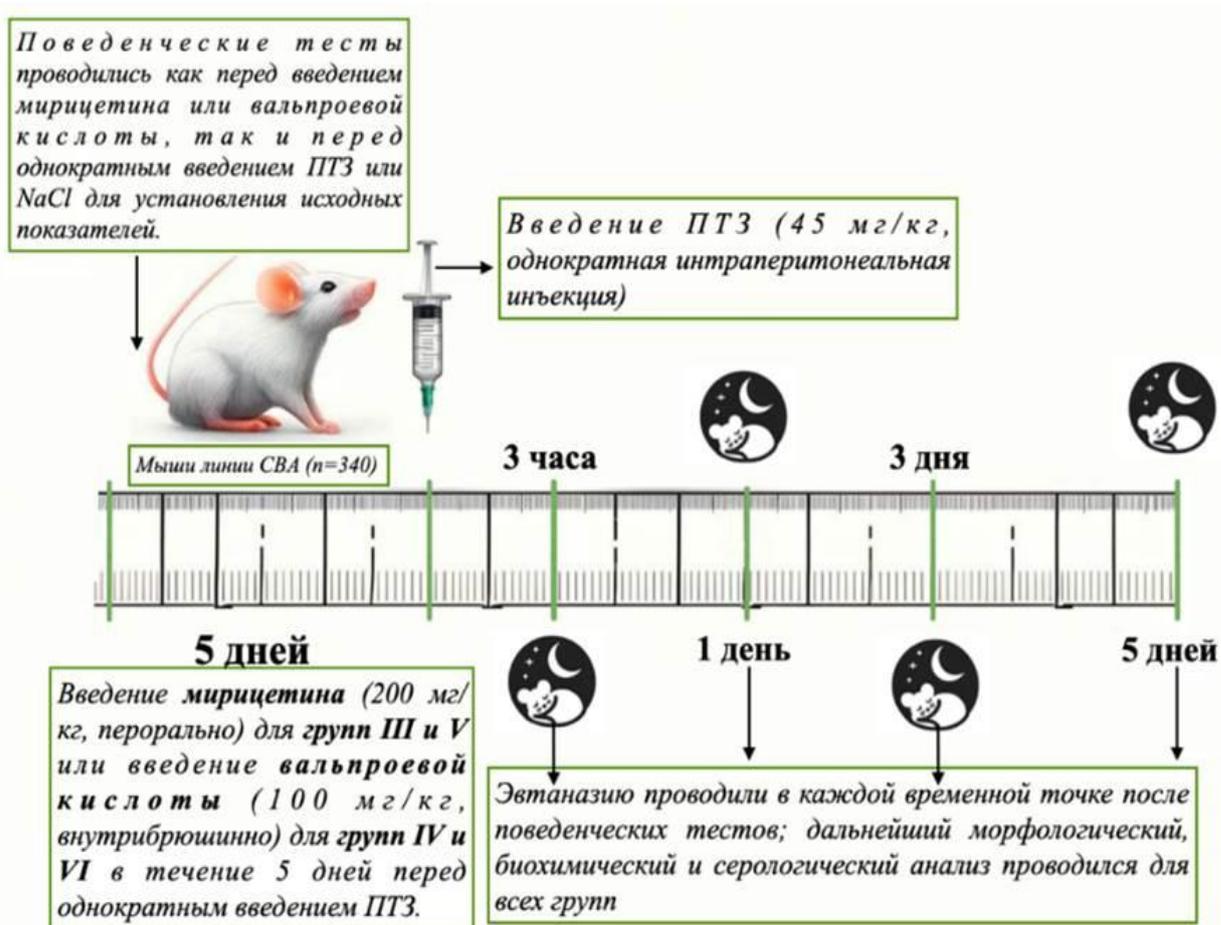


Рисунок 2.1. – Дизайн исследования. Группы: I – контрольная; II – PTZ; III – мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl. ПТЗ – пентилтетразол.

Дизайн исследования, подбор расчетной дозы и способа введения был обусловлен литературным анализом и проведенным пилотным исследованием [85, 119]. Была выбрана наиболее часто применяемая в экспериментальных исследованиях доза, необходимая для достижения порогового значения,

запускающего проэпилептогенную активность и индуцирующая развитие эпилептического припадка. Выбор временных точек для исследования был обоснован временными характеристиками развития морфологических эквивалентов нейрональной потери в остром эпилептическом припадке (первые 24 часа) [27, 111].

Мыши содержались в виварии с постоянной температурой  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , влажностью 50 – 60%, стандартным световым циклом (12h L / 12h D). Животные имели свободный доступ к воде и стандартному корму *ad libitum*. Перед началом эксперимента животные акклиматизировали к лабораторным условиям в течение 1 недели.

Объектом исследования являлись структуры головного мозга, в частности гиппокамп, который подвергался макроскопической и микроскопической оценке для выявления признаков повреждений, оксидативных изменений, а также воспалительных или апоптотических процессов, возникающих вследствие острого эпилептического приступа, индуцированного пентилентетразолом.

*Введение пентилентетразола и оценка приступа.* Введение PTZ (англ. Pentylenetetrazole) осуществлялось внутримышечным путем в дозе 45 мг/кг, подобранной в рамках пилотного исследования для индукции острых эпилептических припадков. После введения PTZ проводилась оценка степени судорожной активности у подопытных животных с использованием модифицированной шкалы Расина, специально адаптированной для количественного анализа эпилептической активности у мышей [127].

Шкала Расина позволяет различать эпилептические приступы по типу и тяжести, разделяя их на фокальные (баллы от 0 до 2) и генерализованные (баллы от 3 до 6). Максимальное значение (7 баллов) указывает на критическое состояние с развитием тонических судорог и возможной гибелью животного, что используется как конечная точка для оценки летальности препарата (Таблица 2.1).

Животные наблюдались в течение 30 минут после введения PTZ для регистрации начала приступа, его продолжительности и общей клинической картины. Все изменения в поведенческом состоянии фиксировались, а для точного

количественного анализа использовалась система балльной оценки, которая обеспечивает стандартизированное определение степени тяжести судорожного ответа на введение PTZ.

Таблица 2.1 Модифицированная шкала Расина для оценки эпилептического припадка

Вид припадка	Баллы	<i>Поведенческая реакция</i>
–	-1	нормальное поведение
малый/фокальный припадок	0	подергивание усов
	1	внезапное нарушение поведения (неподвижный взгляд)
	2	Подергивание морды
генерализованный припадок	3	подергивание морды и шеи
	4	клонические судороги в положении сидя
	5	клонические судороги лежа на животе
	6	клонические и тонико-клонические судороги с хаотичными движениями по клетке
гибель животного	7	тоническое сокращение, внезапная кардиальная/респираторная недостаточность, смерть

*Пентилентетразол.* Пентилентетразол является традиционным хемоконвульсантом, используемым для моделирования острых и хронических эпилептических припадков в доклинических исследованиях [85, 94]. Механизм действия PTZ заключается в блокировании ГАМК-А-рецепторов, что приводит к нарушению тормозной нейротрансмиссии и значительному повышению нейрональной возбудимости. Индукция судорог происходит за счет подавления

активности ГАМК, что вызывает генерацию патологических разрядов и позволяет воспроизводить основные проявления острой эпилепсии.

В контексте настоящего исследования PTZ был выбран для создания острой эпилептической модели у мышей линии СВА с целью оценки влияния предварительного лечения мирицетином и вальпроевой кислотой на выраженность судорожного синдрома и степень поражения нейронов. Выбранная доза PTZ (45 мг/кг) обусловлена необходимостью вызвать острые судороги без перехода в хроническое состояние [50, 69]. Введение PTZ позволило оценить степень нейропротекции, предлагаемую тестируемыми препаратами, и выявить ключевые патофизиологические изменения, происходящие в условиях острого судорожного приступа.

*Мирицетин.* Мирицетин (лат. Myricetin; англ. Myricetin) представляет собой флавоноид, выделяемый из различных частей китайской мирики (*Myrica rubra*), обладающий многообразными биологическими эффектами, включая нейропротективные, антиоксидантные и противоэпилептические свойства [68].

В рамках настоящего исследования мирицетин применялся с целью оценки его влияния на патогенез острых судорожных реакций, индуцированных пентилентетразолом. Доза 200 мг/кг была выбрана на основании данных пилотного эксперимента, где апробировались различные дозировки препарата (50, 100, 200 и 500 мг/кг). Пилотные испытания показали, что дозировка 200 мг/кг оказывает оптимальный терапевтический эффект, обеспечивая выраженное снижение нейрональной гибели и минимизацию оксидативного стресса в мозговых структурах.

В экспериментальной схеме мирицетин вводился перорально (через зонд) ежедневно на протяжении 5 дней до индукции судорожной активности, что позволило проследить динамику его профилактического действия и оценить степень нейропротекции.

Для группы сравнения в качестве активного контроля использовалась вальпроевая кислота в дозировке 100 мг/кг, вводимая интраперитонеально в течение 5 дней перед индукцией судорожного состояния.

*Вальпроевая кислота.* В нашем исследовании вальпроевая кислота применялась в дозе 100 мг/кг в течение 5 дней до индукции судорог пентилентетразолом.

#### *Выведение животных из эксперимента*

Животные всех экспериментальных групп выводились из исследования гуманным способом после проведения поведенческих тестов и получения необходимых данных на каждом из временных этапов (3 часа, 1 день, 3 дня и 5 дней после индукции судорог). В качестве эвтаназии использовали внутривенное введение раствора натрия пентобарбитала 150 мг/кг. Данная методика обеспечивала быстрое и безболезненное прекращение жизнедеятельности, минимизируя стресс и исключая любые болевые ощущения у животных. Такой подход был выбран в соответствии с международными стандартами гуманного обращения с лабораторными животными, чтобы гарантировать соблюдение этических норм и исключить влияние дополнительных факторов на результаты исследования.

#### *Соответствие этическим правилам и нормам*

Все манипуляции осуществлялись в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (ЕЭС, Страсбург, 1985 г.), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ЕЭС, Страсбург, 1986 г.; ETS №123), Правилами лабораторной практики и приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Приказом №755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказом №742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Хельсинской декларацией (1964).

## 2.2. Методы исследования

В настоящей работе использовался комплексный подход, включающий поведенческие тесты; анализ маркеров системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты (MDA, SOD, GSH); определение уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови; гистохимический (окраска по Нисслию), иммуногистохимический (антитела к NeuN и антитела к Caspase 8) и статистические методы. Дополнительно были проведены.

### 2.2.1. Поведенческие реакции

*Сенсомоторные функции.* Сенсомоторные функции оценивали с помощью теста на удаление клейкой ленты с конечностей. Данный тест позволяет объективно оценить когнитивные и сенсомоторные навыки животных. На пальмарные поверхности передних лап наклеивали два небольших квадрата из липкой ленты размером 5 мм<sup>2</sup>, после чего фиксировали время и последовательность их удаления животным [32]. Этот тест обеспечивает чувствительную оценку сенсомоторных нарушений, что важно для оценки эффекта различных фармакологических вмешательств при моделировании эпилептических приступов.

*Двигательно-координационная функция.* Для анализа двигательной координации использовали тест с вращающейся площадкой – одну из наиболее применяемых методик для исследования нарушения моторики у лабораторных животных. Мышей помещали на вращающийся стержень (скорость 25 оборотов в минуту) и регистрировали время удержания до падения с платформы в течение 3 минут.

*Двигательные функции.* Для оценки двигательной активности использовали тест «открытое поле». Животное помещали в центр экспериментальной площадки, где регистрировалась общая пройденная дистанция в течение 3 минут.

*Когнитивные функции.* Для оценки пространственной памяти использовали тест водного лабиринта Морриса, который широко применяется для выявления

когнитивных нарушений (Рисунок 2.2). Экспериментальный бассейн представлял собой квадратную емкость (сторона квадрата  $\sim 1,4$  м), условно разделенную на четыре сектора и заполненную водой, подкрашенной для маскировки платформы. На протяжении 4 дней перед экспериментом проводилась серия обучающих тестов: каждое животное помещали в воду по определенной схеме на расстоянии 10 см от стенки бассейна и фиксировали время, затраченное на нахождение скрытой платформы. Если грызун не находил платформу в течение 60 секунд, его аккуратно помещали на платформу и оставляли там на 15 секунд для формирования пространственного рефлекса [117]. После введения PTZ животным проводили контрольный тест, при котором платформа из бассейна убиралась, и оценивалось время, проведенное в целевом секторе, а также скорость нахождения сектора, где ранее располагалась платформа.



Рисунок 2.2. – Схематическое изображение водного лабиринта Морриса с визуальными подсказками на стенах

### *2.2.2. Оценка маркеров системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты*

Для проведения анализа маркеров системы перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (MDA) и антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (SOD) и глутатиона (GSH) в гомогенате головного мозга готовили следующим образом: 0,1 г ткани мозга гомогенизировали в 4,5 мл холодного калиевого буфера (pH 7,4). Полученную суспензию центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 5 минут при температуре +4°C. После центрифугирования супернатант отбирали и замораживали при –80°C до проведения дальнейших анализов.

Уровни малонового диальдегида (MDA) – маркера перекисного окисления липидов, оценивали с использованием реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК; образование молекулярного комплекса регистрировали спектрофотометрически при длине волны 532 Нм с помощью прибора Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corp., Япония). Концентрацию супероксиддисмутазы (SOD) в образцах головного мозга определяли с использованием коммерческого набора (Lifespan Biosciences, США) согласно протоколам производителей. Содержание глутатиона (GSH) в образцах оценивали по методу Элмана с использованием 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты), интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически при длине волны 412 нм на приборе Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corp., Япония).

### *2.2.3. Определение уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ в сыворотке крови*

Определение уровней сывороточных маркеров проводилось в образцах крови (1 – 2 мл), взятых после эвтаназии животных. Пробы выдерживали при комнатной температуре 30 мин для свертывания, затем центрифугировали (при 3000 оборотах) в течение 10 мин при 4 °С. Полученную сыворотку аккуратно пипетировали в чистые микропробирки и сразу использовали для анализа или хранили при –80 °С

до проведения ELISA. Для комплексной оценки воспалительных реакций использовали биохимические методы анализа сыворотки. Уровни провоспалительных цитокинов, включая IL-1 $\beta$ , IL-6 (Bender MedSystems, Австрия), и TNF- $\alpha$  (Assaypro, США) измеряли, используя коммерческие ELISA-наборы согласно инструкциям производителей. Измерение оптической плотности осуществляли на планшетном микроанализаторе Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием программного обеспечения SkanIt RE для Multiskan. Считывание велось при длине волны 450 Нм.

#### *2.2.4. Гистологическое исследование*

В гистологической лаборатории исследование материала проводили на вытяжном-открытом столе станции вырезки операционного материала («Медэкс СПб», Россия).

Для гистологического исследования фрагменты головного мозга фиксировали в 10% забуференном формалине (pH 7.2 – 7.4), проводили в аппарате гистологической проводки тканей («Leica Biosystems», Германия): в кассетах обезвоживали в растворах спиртов восходящей концентрации (50%, 60%, 70%, 80%, 96% и абсолютный), просветляли в ксилоле, выдерживали при +37 °C в насыщенном растворе парафина в ксилоле, помещали в парафин при +56 °C. В последующем материал заливали в смесь парафин-воск с образованием парафиновых блоков, из которых на автоматическом ротационном микротоме (Leica RM 2255, Германия) готовили серийные срезы толщиной около 2 – 3 мкм, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином (H&E) или подготавливали для иммуногистохимического исследований на специальных адгезивных предметных стеклах. Для светового микроскопирования окрашенных (гематоксилином и эозином) срезов и адгезивных стекол использовали цифровой микроскоп Leica DM6000 B (Leica Microsystems, Германия) с камерой DFC450 и программным обеспечением LAS X.

Для более детального анализа утраты нейронов дополнительные срезы окрашивали по Нисслию, что позволяло визуализировать тела нейронов и оценить их плотность и целостность.

Количество поврежденных («темных») нейронов подсчитывали на срезах, окрашенных по Нисслию. Плотность нейронов для каждого животного определяли как среднее количество нейронов на оптическое поле, рассчитанное по четырем срезам. В частности, среднее количество клеток подсчитывали по восьми оптическим полям в областях CA1, CA3 и CA4 и по двенадцати оптическим полям в зубчатой извилине (DG) для каждой мыши.

### *2.2.5. Иммуногистохимическое исследование*

Фрагменты головного мозга исследовали иммуногистохимическим методом. Для этого использовали парафиновые срезы толщиной 2 – 3 мкм, которые сначала подвергали депарафинизации, а затем обрабатывали 0,3% раствором перекиси водорода в метаноле в течение 30 минут. После этого срезы подвергались термической обработке в автоклаве в цитратном буфере при pH 6,0 в течение 20 минут. Инкубация с первичными антителами проводилась в течение 12 часов. Использовались первичные антитела к нейрональному маркеру NeuN (клон 1B7, разведение 1:100; Abcam, катал. № ab104224, США) и антитела к Caspase 8 (CASP8, разведение 1:50; Abcam, катал. № ab32397, США) согласно инструкциям производителя. Инкубация с первичными антителами проводилась в течение 12 часов при 4 °C. Вторичные антитела: универсальная система HiDef Detection™ HRP Polymer («Cell Marque», США), содержащая конъюгаты IgG мыши/кролика и пероксидазу хрена (HRP). Для визуализации использовали DAB (3,3'-диаминобензидин) в качестве хромогена, придающего коричневую окраску позитивно окрашенным клеткам. Ядра клеток дополнительно окрашивали гематоксилином Майера для контрастности.

Подсчет количества иммунопозитивных клеток проводили в 10 случайно выбранных полях зрения при увеличении ×400 (в %). Микроскопический анализ

выполнялся с использованием системы видео-микроскопии (микроскоп Leica DM2000, Германия; камера Leica ICC50 HD; компьютер Platrun LG).

Для анализа результатов иммуногистохимических реакций и количественного определения площади позитивно окрашенных структур в поле зрения применялась система компьютерной морфометрии с использованием программного обеспечения ImageJ. Микрофотосъемка проводилась в десяти случайно выбранных полях зрения при увеличении  $\times 200$  на образцах, подвергнутых ИГХ окрашиванию. Полученные изображения подвергались автоматической нормализации, переводу из 24-битного цветового режима (RGB) в 256-градационный серый масштаб и последующей бинаризации с установленными параметрами чувствительности. В ходе обработки отсекались бинарные объекты с яркостью выше порога 150, после чего вычислялась доля площади позитивно окрашенных элементов относительно общей площади микрофотографий.

Морфометрический анализ микропрепаратов головного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, а также по Нисслию, проводили в 10-ти случайно выбранных полях зрения светового микроскопа при увеличении  $\times 400$  с использованием программного обеспечения Leica Application Suite, Version 4.9.0. Компьютерную морфометрию осуществляли при помощи компьютерной системы анализа изображений ImageJ.

Для морфометрического анализа количественная оценка NeuN-положительных клеток проводилась на срезах размером  $0,02 \text{ мм}^2$ . Результаты представлялись в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения. Количество клеток, положительных по каспазе 8, определялось при увеличении  $\times 400$  на 10 полях зрения. Для оценки доли жизнеспособных или поврежденных клеток, экспрессирующих NeuN и каспазу 8, подсчет осуществлялся на срезах, прилегающих к окрашенным по методике гематоксилином и эозином, а также и по Нисслию участкам. Количество нейронов рассчитывали в  $1 \text{ мм}^2$ .

### 2.2.7. Статистические методы

Для статистического анализа данных использовались программные пакеты SPSS версии 12.0 for Windows (IBM Analytics, США) и Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная). Проверка данных на соответствие нормальному распределению осуществлялась с использованием критерия Шапиро-Уилка. В случае выявления нормального распределения рассчитывались среднее значение и стандартное отклонение, которые, вместе с количеством наблюдений, были представлены в итоговых таблицах. Если данные не соответствовали нормальному распределению, применялись медиана и квартильный размах. Оценка наличия выбросов в данных не проводилась. Для анализа независимых выборок, соответствующих нормальному распределению, применялся однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). Гомогенность дисперсий оценивалась с помощью критерия Брауна-Форсайта. В случае оценки зависимых данных использовался дисперсионный анализ с повторными измерениями (Repeated measures ANOVA), а проверка на сферичность дисперсий проводилась с использованием теста Моучли. При выявлении нарушений сферичности применялся критерий с корректировкой методом Гейссера-Гринхауса. В случае обнаружения значимого эффекта фактора дальнейшее сравнение групп осуществлялось с использованием критерия Тьюки. В случаях, когда данные не соответствовали условиям применения параметрических тестов, использовался критерий Краскела-Уоллиса, а для дальнейших post-hoc сравнений групп применялся тест Данна. Для оценки силы и направления взаимосвязи между иммунохимическими показателями (количество NeuN-позитивных и каспаза-8-позитивных клеток) и поведенческими проявлениями (тяжесть судорожной активности) применялся корреляционный анализ. Ввиду того, что не все анализируемые выборки соответствовали критериям нормального распределения, был использован непараметрический метод – коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $\rho$ ). Результаты корреляционного анализа визуализировались с помощью

диаграмм рассеяния с построением линии регрессии. Во всех случаях уровень значимости ( $p$ ) был установлен на уровне  $<0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Смертность

Показатель смертности во II-ой группе достиг 60%, что свидетельствует о высокой летальности, вызванной судорогами, индуцированными PTZ (Рисунок 3.4). В отличие от этого, в III-ей и IV-ой группах смертность была значительно ниже – 25% и 20% соответственно ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.1). Такое значительное снижение смертности указывает на выраженное нейропротекторное действие мирицетина и вальпроевой кислоты при индукции PTZ-индуцированных судорог.

Для стандартизации групп и упрощения статистической обработки данных в дальнейшем исследовании участвовало следующее количество животных, что соответствует рекомендациям по доклиническим исследованиям: группа I ( $n = 20$ ); группа II ( $n = 40$ ); группа III ( $n = 60$ ); группа IV ( $n = 60$ ); группа V ( $n = 20$ ); группа VI ( $n = 20$ ).

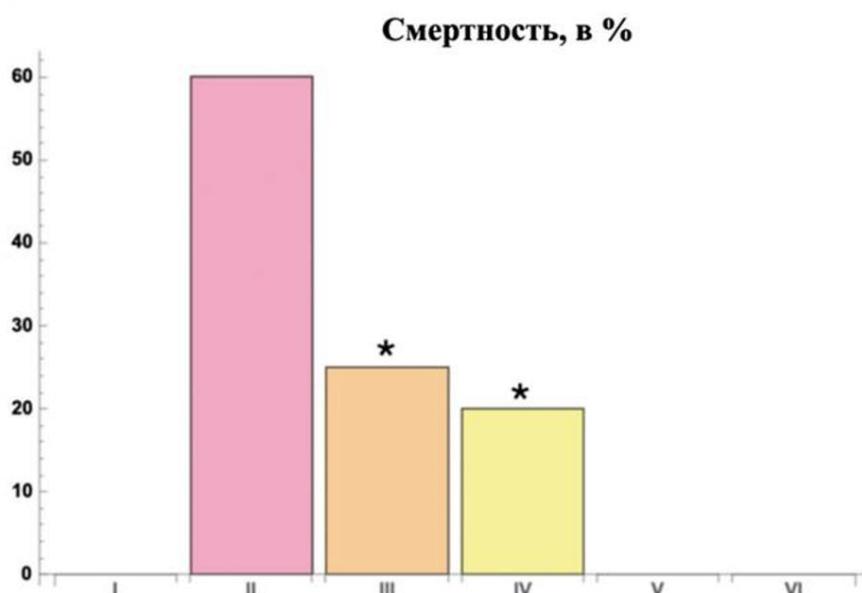


Рисунок 3.1. – Уровень смертности (в %) в различных группах. Примечание: \* – сравнение с группой II (только PTZ) ( $p < 0,05$ ). Группы: I – контрольная; II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

## 3.2. Поведенческие тесты

### 3.2.1. Оценка судорожной активности

Перед инициацией исследования во всех группах животных проводилась оценка исходного поведенческого статуса для выявления признаков судорожной активности. В ходе пятидневного периода приема мирицетина и вальпроевой кислоты у подопытных животных не отмечалось признаков судорожной активности, что соответствовало – 1 баллу по модифицированной шкале Расина и свидетельствовало о стабильном исходном состоянии (Рисунок 3.2).

В I-ой, V-ой и VI-ой группах на протяжении всего эксперимента судорожная активность отсутствовала, что соответствовало стабильному уровню – 1 балл по шкале Расина. Животные данных групп сохраняли свое поведение (на уровне нормы) на всех этапах исследования и служили надежным критерием для сравнения с другими экспериментальными группами, в которых наблюдались судорожные приступы.

Во II-ой группе введение пентилентетразола вызвало развитие судорожных приступов у 100% животных, что привело к высокой летальности. Из всех подопытных животных 60% погибли в результате острых PTZ индуцированных судорог (Рисунок 3.2). Напротив, в III-ей группе (мирицетин + PTZ) судорожная активность была значительно снижена по сравнению с II-ой группой. Частота миоклонических, клонических и тонических судорог по временным точкам составила – 85%, 70% и 50% соответственно (Рисунок 3.2), а смертность снизилась до 25%. Это свидетельствует о выраженном протекторном эффекте мирицетина против судорожных приступов, вызванных введением PTZ.

В IV группе (вальпроевая кислота + PTZ) снижение судорожной активности и летальности было более выраженным в сравнении с III-ей группой. Частота миоклонических, клонических и тонических судорог: 80%, 65% и 40% соответственно, а смертность наблюдалась почти 20% (Рисунок 3.2). Во всех

дальнейших поведенческих и биохимических тестах использовали только выживших животных из каждой экспериментальной группы.

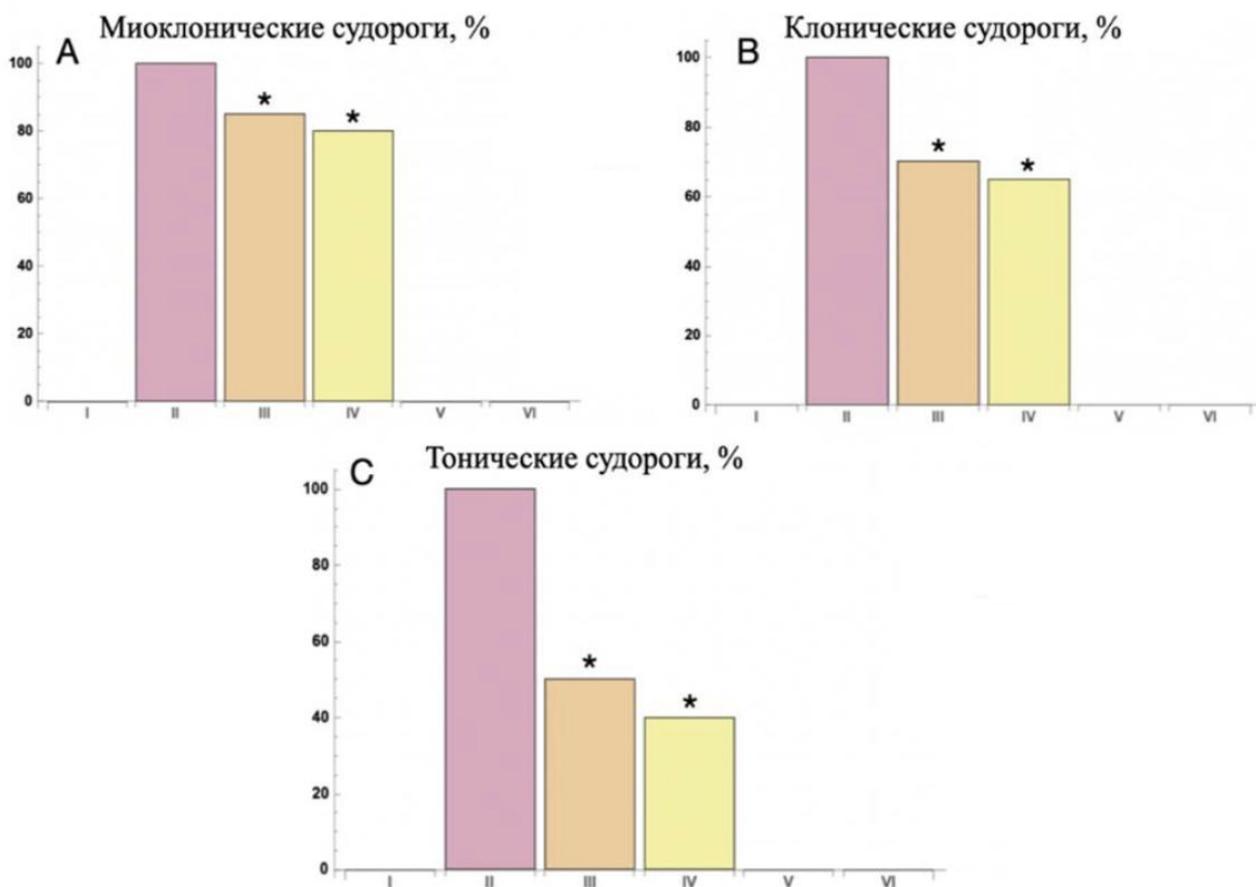


Рисунок 3.2. – Процентное соотношение животных с миоклоническими, клоническими и тоническими судорогами, индуцированными PTZ, в различных группах: А – процент миоклонических судорог; В – процент клонических судорог; С – процент тонических судорог. Примечание: \* – сравнение с группой II (только PTZ) ( $p < 0,05$ ). Группы: I – контрольная; II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

### 3.2.2. Латентный период до начала судорог

Латентный период до начала судорог был значительно увеличен в III-ей и IV-ой группах по сравнению с группой, получавшей только PTZ (Рисунок 3.3). В II-ой группе миоклонические судороги начинались через  $1,02 \pm 0,1$  мин, клонические

судороги – через  $2,10 \pm 0,18$  мин, а тонические судороги – через  $23,4 \pm 1,90$  мин (Рисунок 3.3).

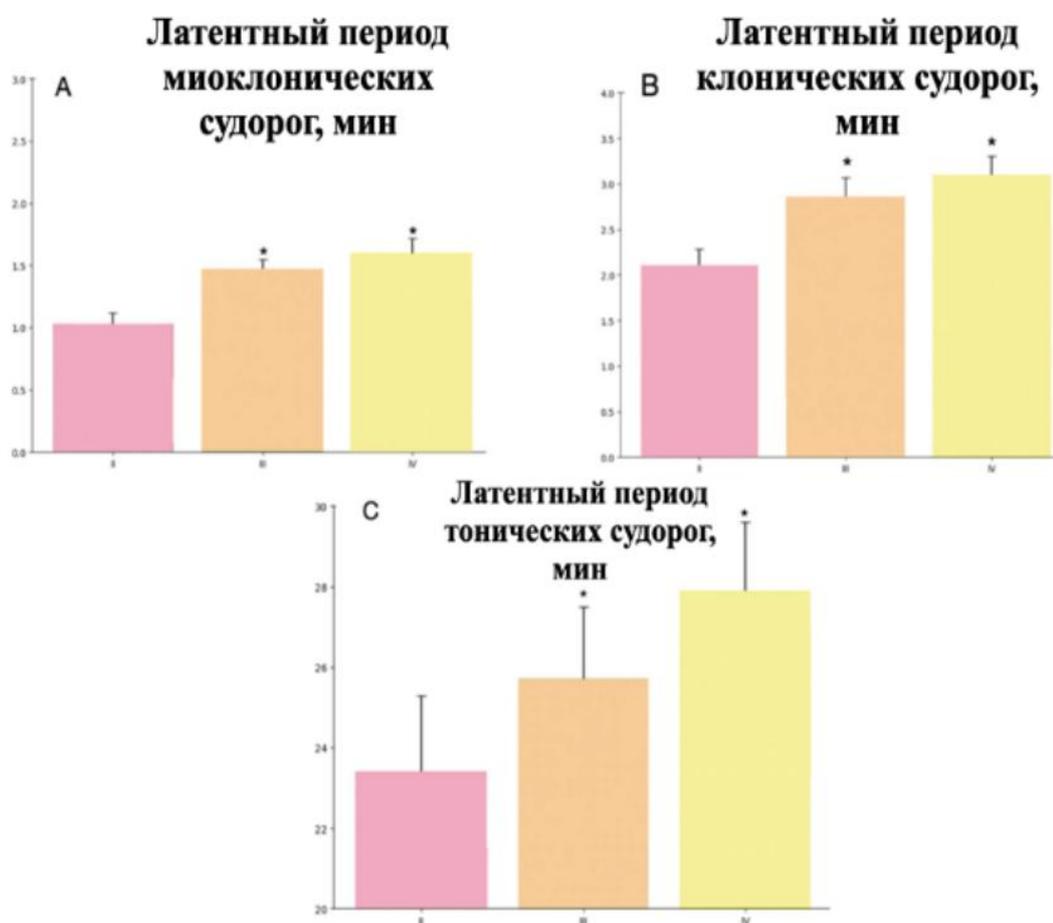


Рисунок 3.3. – Латентный период различных типов судорог, индуцированных PTZ, в разных группах: А – латентный период миоклонических судорог; В – латентный период клонических судорог; С – латентный период тонических судорог. Примечание: \* – сравнение с группой II (только PTZ) ( $p < 0,05$ ). Группы: II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ

В III-ей группе наблюдалось значительное увеличение латентного периода: миоклонические судороги развивались через  $1,45 \pm 0,10$  мин, клонические – через  $2,85 \pm 0,22$  мин, а тонические – через  $25,7 \pm 1,80$  мин. В IV-ой группе был зарегистрирован наиболее выраженный эффект, проявляющийся задержкой миоклонических судорог до  $1,60 \pm 0,12$  мин, клонических – до  $3,10 \pm 0,20$  мин, и тонических – до  $27,9 \pm 1,70$  мин. Различия в латентном периоде до начала судорог

были статистически значимыми ( $p < 0,05$ ) при сравнении II-ой группы III-ей и IV-ой (Рисунок 3.3).

### 3.2.3. Тяжесть судорожных приступов

Длительность и степень тяжести судорог оценивались с использованием модифицированной шкалы Расина (Рисунок 3.4). У животных II-ой группы средний балл для оценки тяжести судорог составил  $5,6 \pm 0,3$ , что указывает на частое возникновение тонико-клонических судорог и хаотичных прыжков. В отличие от них, в III-ей и IV-ой группах данный показатель составил  $3,4 \pm 0,2$  и  $3,1 \pm 0,2$  соответственно, что свидетельствует о значительном снижении тяжести судорожных приступов ( $p < 0,05$  по сравнению с II-ой группой) (Рисунок 3.4).



Рисунок 3.4. – Оценка тяжести судорожной активности в баллах (согласно модифицированной шкале Расина). Примечание: \* – сравнение с группой II (только PTZ) ( $p < 0,05$ ). Группы: II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ

### 3.2.4. Удаление инородного предмета

Тест на удаление инородного предмета проводился для оценки влияния мирицетина и вальпроевой кислоты на судорожную активность, вызванную PTZ, показатели фиксировали в секундах (Рисунок 3.5.).

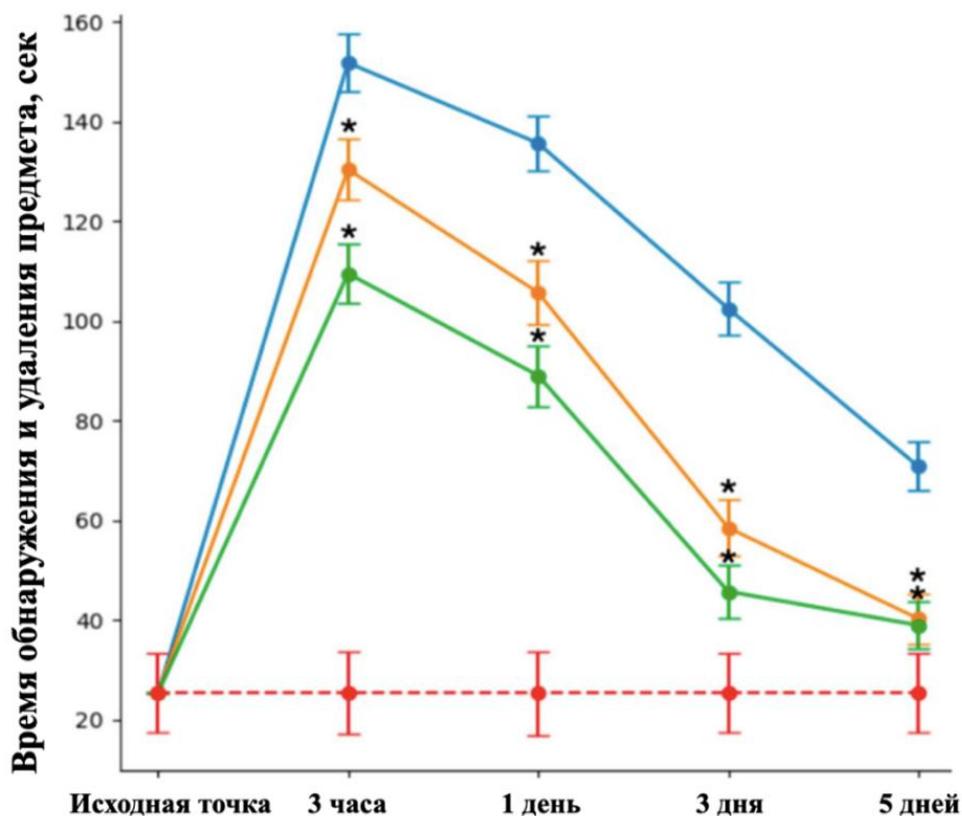


Рисунок 3.5. – Время обнаружения и удаления инородного предмета в различных экспериментальных группах. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Примечание: \* – по сравнению с группой II (только PTZ) ( $p < 0,05$ ). Группы: II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

В исходных условиях у животных контрольной группы (I-ая группа), а также группы мирицетин + NaCl (V-ая группа) и вальпроевая кислота + NaCl (VI-ая группа) выявлены стабильные результаты, демонстрируя среднее время

обнаружения и удаления инородного объекта в диапазоне  $25,29 \pm 8,19$  с. В II-ой группе время распознавания и удаления предмета существенно увеличилось до  $151,75 \pm 5,76$  с через три часа после введения PTZ ( $p < 0,05$ ). На 1-й день показатель уменьшился до  $135,62 \pm 5,45$  с, на 3-й день – до  $102,45 \pm 5,23$  с, а на 5-й день – до  $70,78 \pm 4,90$  с. В III-ей группе наблюдалось менее выраженное ухудшение когнитивных функций: через три часа после введения PTZ время составило  $130,34 \pm 6,12$  с ( $p < 0,05$  по сравнению с группой II), на 1-й день –  $105,67 \pm 6,45$  с, на 3-й день –  $58,45 \pm 5,67$  с, а на 5-й день –  $40,23 \pm 5,12$  с. В IV-ой группе улучшение также было значительным: время составило  $109,45 \pm 5,98$  с через три часа ( $p < 0,05$  по сравнению с группой II),  $89 \pm 6,12$  с на 1-й день,  $45,67 \pm 5,45$  с на 3-й день и  $38,90 \pm 4,78$  с на 5-й день.

Двигательные функции: в исходном состоянии двигательная активность всех исследуемых групп оставалась на уровне нормы (общая дистанция, пройденная за 3 минуты, составляла около 5,56 м). Через 3 часа после введения PTZ в II-ой группе наблюдалось значительное снижение двигательной активности до 3,20 м. В течение следующих дней активность постепенно восстанавливалась: на 1-е сутки – до 4,10 м, на 3-е сутки – до 4,90 м и на 5-е сутки – до 5,10 м (Рисунок 3.6). В III-ей группе наблюдалось более быстрое восстановление двигательной активности: 3,85 м через 3 часа, 4,75 м на 1-е сутки, 5,40 м на 3-е сутки и 5,65 м на 5-е сутки (Рисунок 3.6). В IV-ой группе также отмечалась значительная динамика улучшения: 3,90 м через 3 часа, 4,85 м на 1-е сутки, 5,50 м на 3-е сутки и 5,70 м на 5-е сутки (Рисунок 3.6). Таким образом, введение мирицетина и вальпроевой кислоты способствовало более быстрому восстановлению двигательной активности после воздействия PTZ, что подтверждается улучшенными значениями пройденного расстояния по сравнению с группой введения только PTZ.

Координация движений: для оценки координации движений использовался тест на вращающейся платформе. В исходных условиях (до начала исследования) животные всех групп демонстрировали сопоставимые показатели, со средним временем падения около 77,87 с. Через 3 часа после введения PTZ в II-ой группе координация движений значительно ухудшилась, со средним временем падения,

равным 42,08 с. В течение эксперимента у животных этой группы наблюдалось постепенное улучшение координации: на 1-е сутки время увеличилось до 52,45 с, на 3-е сутки – до 63,20 с, и на 5-е сутки – до 70,50 с (Рисунок 3.6).

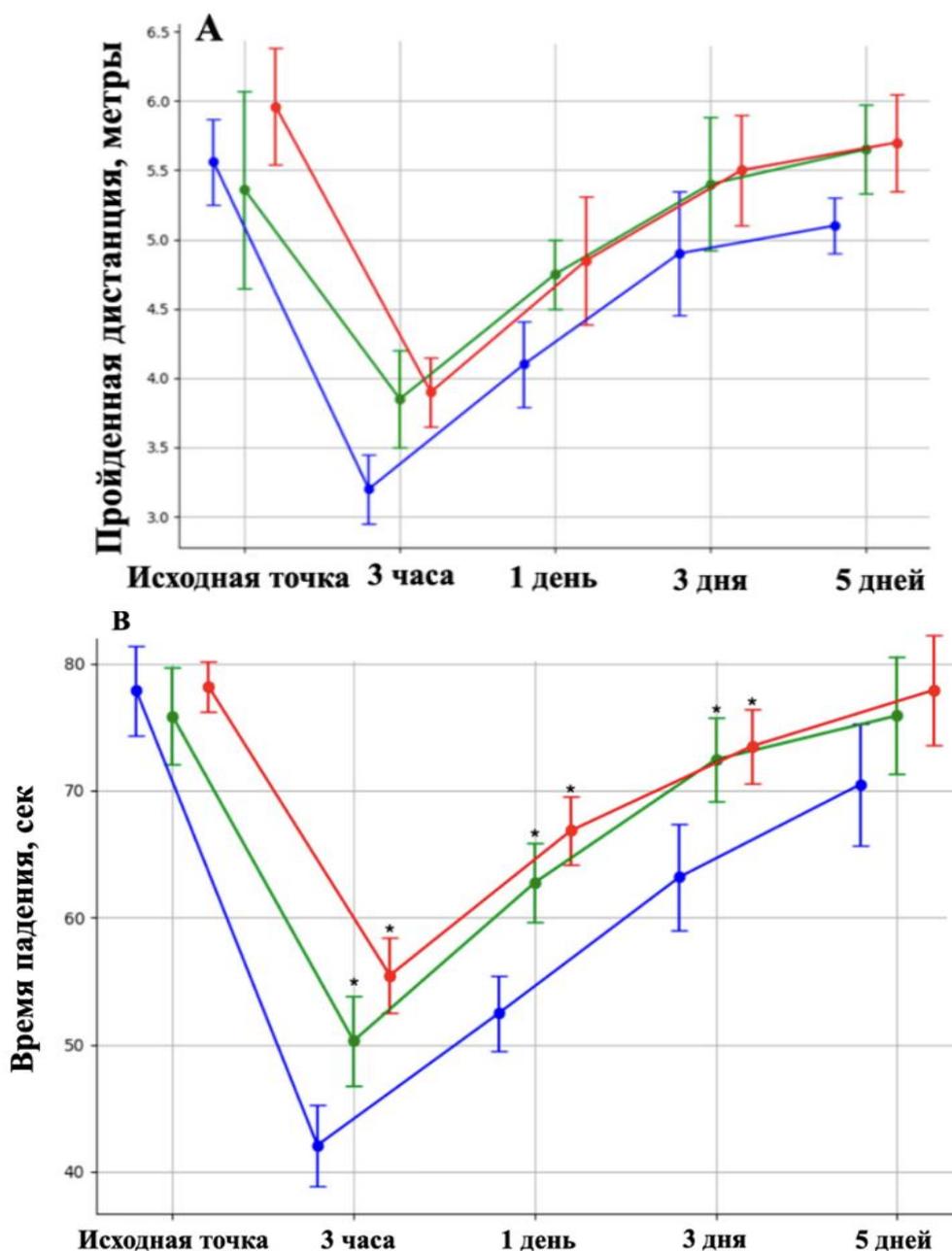


Рисунок 3.6. – А – тестирование на двигательную активность для различных групп; В – тестирование на координацию движений для различных групп. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Примечание: \* – сравнение с группой II ( $p < 0,05$ ). Группы: II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ

В III-ей группе восстановление координации проходило значительно быстрее: 50,30 с через 3 часа ( $p < 0,05$  по сравнению с группой II), 61,75 с на 1-е сутки ( $p < 0,05$ ), 71,45 с на 3-е сутки ( $p < 0,05$ ) и 75,60 с на 5-е сутки (Рисунок 3.6). Аналогично, в IV-ой группе наблюдалось значительное улучшение координации, с показателями 55,45 с через 3 часа ( $p < 0,05$  по сравнению с II-ой группой), 65,85 с на 1-е сутки ( $p < 0,05$ ), 73,50 с на 3-е сутки ( $p < 0,05$ ) и 76,90 с на 5-е сутки (Рисунок 3.6). К 5-м суткам показатели координации в III-ей и IV-ой группах полностью восстановились до исходного уровня.

Пространственная память и когнитивные функции: тренировка всех животных проводилась до начала эксперимента без деления на подгруппы. В последний день обучения время выполнения задания фиксировалось и использовалось в качестве исходного значения (контрольное значение). Все дальнейшие сравнения проводились между группами только PTZ, мирицетин + PTZ, вальпроевая кислота + PTZ, мирицетин + NaCl и вальпроевая кислота + NaCl. Так, через 3 часа после введения PTZ время пребывания в целевом секторе у животных II-ой группы было значительно меньше по сравнению с контрольной группой (контрольное значение). Существенные различия наблюдались также на 1-й и 3-й день после введения PTZ в III-ей и IV-ой группах по сравнению со II-ой группой. На остальных временных промежутках статистически значимых различий не было зафиксировано (Таблица 3.1).

Таблица 3.1. Результаты теста Морриса. Время, проведенное в целевом секторе (в секундах). Данные представлены только для II-ой, III-ей и IV-ой групп

Группа		Время, с	Значение p
Исходное значение		39,64 ± 8,94	-
3 часа	Мирицетин + PTZ	38,14 ± 3,83	<b>0,02</b>
	Вальпроевая кислота + PTZ	39,49 ± 3,11	
	PTZ	31,22 ± 2,85	
1 день	Мирицетин + PTZ	38,33 ± 4,32	0,36
	Вальпроевая кислота + PTZ	37,49 ± 5,11	
	PTZ	35,98 ± 5,41	
3 дня	Мирицетин + PTZ	35,03 ± 5,49	0,29
	Вальпроевая кислота + PTZ	41,05 ± 3,27	
	PTZ	38,61 ± 3,59	
5 дней	Мирицетин + PTZ	39,17 ± 5,04	0,66
	Вальпроевая кислота + PTZ	39,32 ± 3,27	
	PTZ	40,33 ± 4,54	

### 3.3. Оценка маркеров системы перекисного окисления липидов антиоксидантной защиты

Уровни малонового диальдегида (MDA), ключевого биомаркера липопероксидации, были значительно повышены в гомогенате головного мозга животных II-ой группе по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Это повышение уровней MDA свидетельствует о возросшем окислительном стрессе

вследствие судорог, вызванных PTZ. Введение мирицетина (200 мг/кг) и вальпроевой кислоты (100 мг/кг) привело к заметному снижению концентрации MDA (Рисунок 3.7).

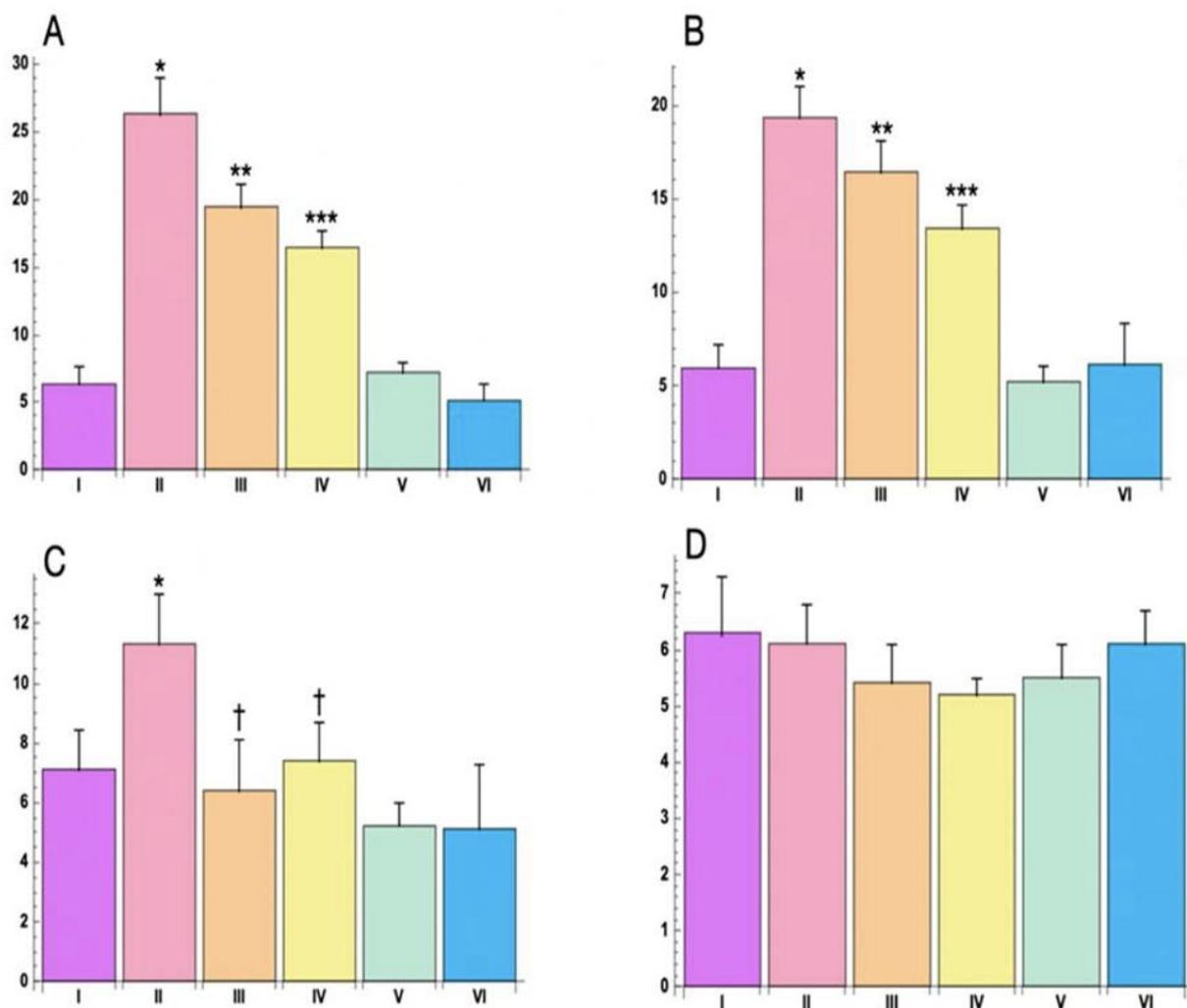


Рисунок 3.7. – Уровни MDA (нмоль/мг) в ткани головного мозга животных в изучаемых группах, измеренные через (А) 3 часа, (В) 1 день, (С) 3 дня и (D) 5 дней. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Примечание: \* ( $p < 0,05$ ); между III-ой и II-ой группами – \*\* ( $p < 0,01$ ); между IV-ой и II-ой группами – \*\*\* ( $p < 0,001$ ); статистически значимые различия через 3 дня между II-ой и III-ей группами обозначены – † ( $p < 0,05$ ). Группы: I – контрольная; II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

Наиболее выраженные изменения наблюдались через 3 часа после введения PTZ. Мирицетин значительно снижал уровни MDA по сравнению с группой, получавшей только PTZ ( $p < 0,01$ ), в то время как вальпроевая кислота показала еще более выраженное снижение ( $p < 0,001$ ). На 1-й день после введения PTZ, как мирицетин, так и вальпроевая кислота продолжали демонстрировать значительное снижение уровней MDA по сравнению с группой, получавшей только PTZ ( $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  соответственно). На 3-й день после введения PTZ уровни MDA в группах, получавших мирицетин и вальпроевую кислоту, оставались значительно ниже, чем в группе, получавшей только PTZ ( $p < 0,05$ ). На 5-й день после введения PTZ статистически значимых различий в уровнях MDA между группами уже не наблюдалось, что указывает на возврат к исходным уровням окислительного стресса ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 3.7).

Концентрация супероксиддисмутазы (SOD) была ниже у животных II-ой группы по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ) через 3 часа после введения PTZ. Это снижение активности SOD свидетельствует о инициации оксидативного стресса (Рисунок 3.8). Введение мирицетина и вальпроевой кислоты способствовало частичному восстановлению активности SOD. В частности, мирицетин значительно ослабил снижение уровня SOD по сравнению с группой, получавшей только PTZ ( $p < 0,01$ ), тогда как вальпроевая кислота продемонстрировала еще более выраженный эффект ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 3.8).

Через сутки после введения PTZ активность SOD у животных III-ей и IV-ой групп оставалась выше по сравнению с II-ой группой. Уровень SOD в группе мирицетина сохранялся на значимо более высоком уровне ( $p < 0,01$ ), а в группе вальпроевой кислоты наблюдалось высоко значительное увеличение активности SOD ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 3.8). К третьему дню активность SOD в обеих группах (мирицетин и вальпроевая кислота) оставалась значительно выше, чем в группе с PTZ, что указывает на постепенное восстановление антиоксидантной защиты ( $p < 0,05$  для обеих групп). На пятый день значимых различий в активности SOD между группами уже не наблюдалось, что свидетельствует о нормализации маркеров оксидативного стресса (Рисунок 3.8).

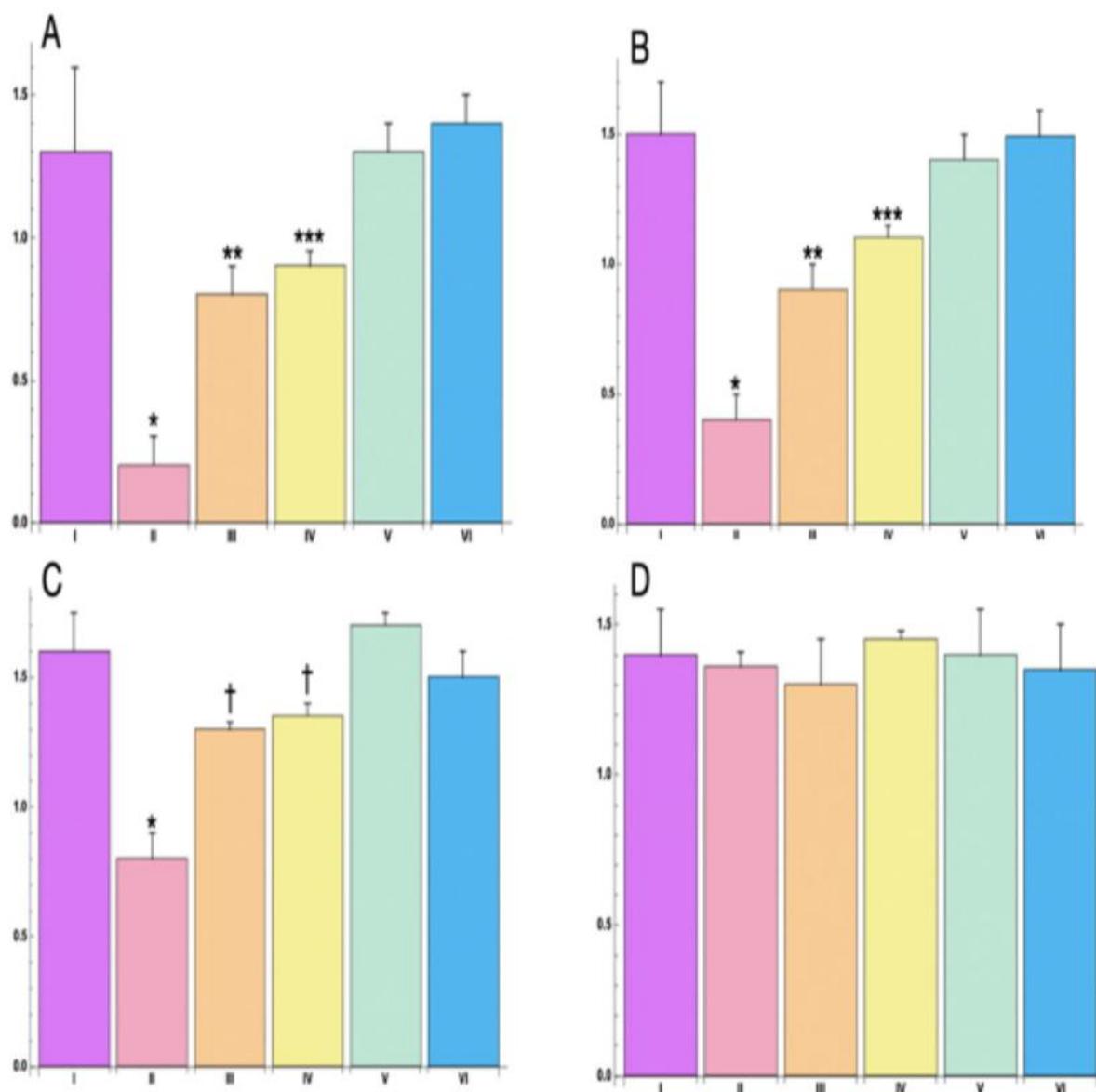


Рисунок 3.8. – Уровни супероксиддисмутазы (SOD) (г/мг) в ткани головного мозга животных в изучаемых группах, измеренные через (A) 3 часа, (B) 1 день, (C) 3 дня и (D) 5 дней. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Примечание: \* ( $p < 0,05$ ); между III-ей и II-ой группами – \*\* ( $p < 0,01$ ); между IV-ой и II-ой группами – \*\*\* ( $p < 0,001$ ); статистически значимые различия через 3 дня между II-ой и III-ей группами обозначены – † ( $p < 0,05$ ). Группы: I – контрольная; II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

В группах, получавших мирицетин или вальпроевую кислоту в комбинации с физиологическим раствором NaCl 0,9% (V-ая и VI-ая группы), не было выявлено значимых изменений в активности SOD по сравнению с исходным уровнем контрольной группы. Это демонстрирует, что данные препараты сами по себе не оказывают влияния на уровень антиоксидантных ферментов.

Уровни глутатиона (GSH) значительно снизились у животных во II-ой группе по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ) через 3 часа после введения PTZ, что подчеркивает повышенный уровень оксидативного стресса, вызванного PTZ (Рисунок 3.9). Однако введение мирицетина и вальпроевой кислоты способствовало снижению этого негативного эффекта. В III-ей группе было отмечено значительное смягчение снижения уровня GSH по сравнению с группой только PTZ ( $p < 0,01$ ), а в IV-ой группе наблюдался еще более выраженный эффект ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 3.9). На 1 день после введения PTZ уровни GSH в группах, получавших мирицетин и вальпроевую кислоту, продолжали демонстрировать значительное улучшение по сравнению с II-ой группой. В III-ей группе уровни GSH оставались значительно выше ( $p < 0,01$ ), а в IV-ой группе наблюдалось значительное увеличение уровня GSH ( $p < 0,001$ ). К 3 дню после введения PTZ уровни GSH в группах с мирицетином и вальпроевой кислотой были сопоставимы с контрольной группой, что свидетельствует о возвращении к исходным показателям антиоксидантной активности ( $p > 0,05$  для обеих групп).

На 5 день уровни GSH оставались на уровне, аналогичном контрольной группе, во всех исследуемых группах, что указывает на полное восстановление антиоксидантной активности без статистически значимых различий (Рисунок 3.9). В контрольных группах, получавших мирицетин или вальпроевую кислоту в сочетании с раствором NaCl 0,9% (V-ая и VI-ая группы), не наблюдалось статистически значимых изменений в уровнях GSH по сравнению с контрольной группой.

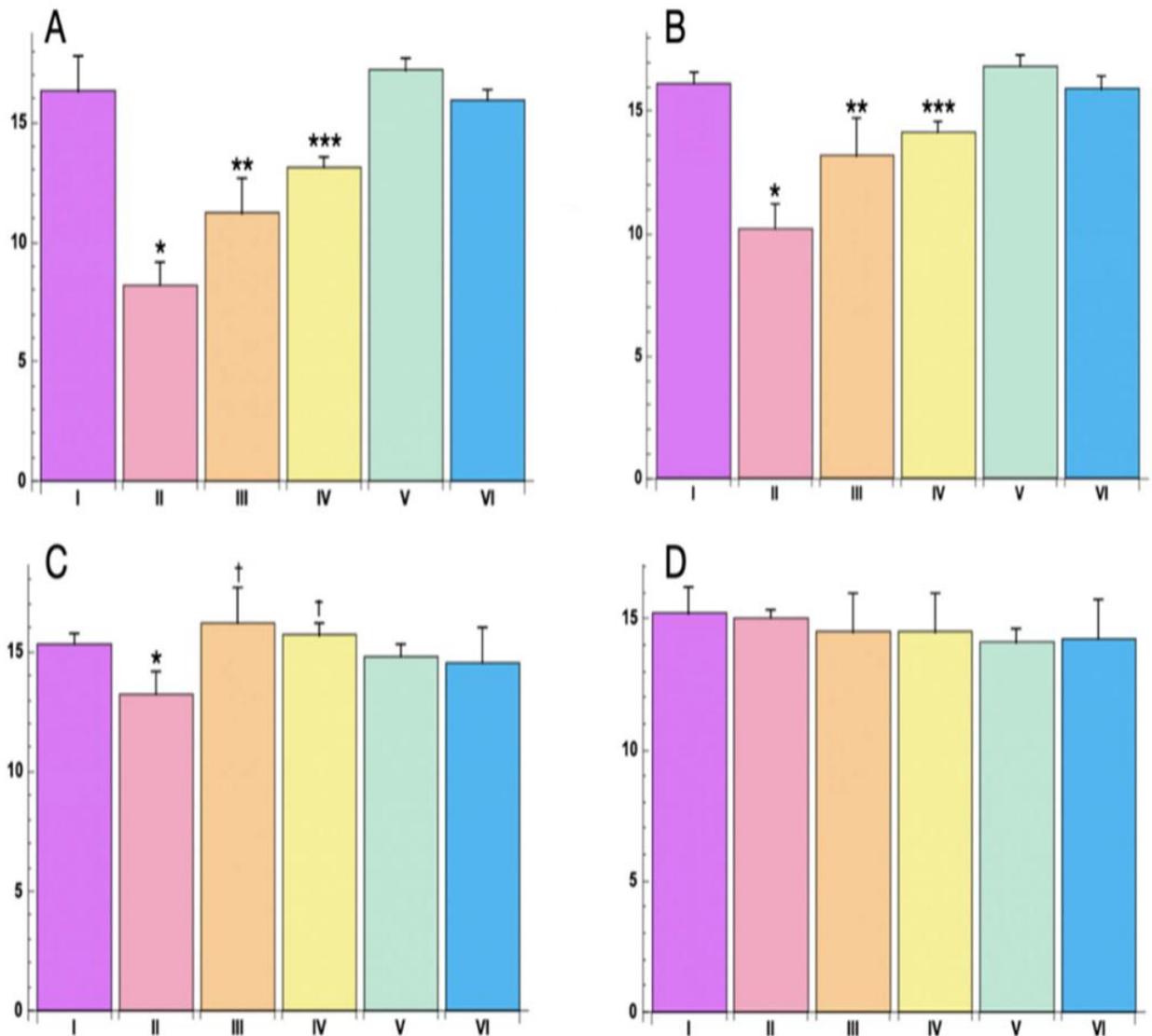


Рисунок 3.9. – Уровни GSH (нмоль/мг) в ткани головного мозга животных в изучаемых группах, измеренные через (А) 3 часа, (В) 1 день, (С) 3 дня и (D) 5 дней. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Примечание: \* ( $p < 0,05$ ); статистически значимые различия между III-ей и II-ой группами обозначены – \*\* ( $p < 0,01$ ); статистически значимые различия между IV-ой и II-ой группами обозначены – \*\*\* ( $p < 0,001$ ); статистически значимые различия через 3 дня между II-ой и III-ей группами обозначены – † ( $p < 0,05$ ). Группы: I – контрольная; II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

### 3.4. Оценка уровней провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ в сыворотке крови

Анализ уровней провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в сыворотке крови экспериментальных животных в различные временные точки после PTZ-индуцированных судорог и лечения мирицетином и вальпроевой кислотой. Уровни цитокинов были проанализированы на всех временных точках: до начала эксперимента (исходная точка), до введения PTZ (после 5 дней лечения препаратами), а затем через 3 часа, 1 день, 3 дня и 5 дней после индукции судорог (Рисунок 3.10).

Измерение биохимических параметров до начала исследования (исходная точка) было критически важным для установления контрольных значений биохимических параметров, а также для того, чтобы любые изменения в уровнях цитокинов после лечения можно было точно отнести к экспериментальным вмешательствам. Сравнивая эти базовые значения с уровнями цитокинов после лечения, мы стремились получить более четкое представление о влиянии применяемых соединений на воспалительный ответ в нашем исследовании.

Так, через 3 часа после PTZ-индуцированных судорог уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в сыворотке значительно повысились в II-ой группе, по сравнению с контролем, хотя это повышение было менее выраженным по сравнению с 24-часовой отметкой. Уровень IL-1 $\beta$  увеличился до  $65,5 \pm 8,2$  пг/мл с базового уровня  $25,4 \pm 5,2$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), уровень IL-6 увеличился до  $45,2 \pm 7,6$  пг/мл с  $15,3 \pm 3,4$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), а уровень TNF- $\alpha$  повысился до  $48,8 \pm 7,3$  пг/мл с  $20,5 \pm 4,7$  пг/мл ( $p < 0,05$ ). В III-ей группе наблюдалось умеренное снижение уровней цитокинов по сравнению со II-ой группой. Уровни IL-1 $\beta$  составили  $50,2 \pm 6,4$  пг/мл ( $p < 0,05$  по сравнению со II-ой группой), уровни IL-6 –  $35,3 \pm 6,0$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), а уровни TNF- $\alpha$  –  $32,6 \pm 5,5$  пг/мл ( $p < 0,05$ ). Аналогично в IV-ой группе также наблюдалось снижение уровней цитокинов. Уровни IL-1 $\beta$  составили  $52,1 \pm 6,7$  пг/мл ( $p < 0,05$  по сравнению со II-ой группой), уровни IL-6 –  $38,8 \pm 5,9$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), а уровни TNF- $\alpha$  –  $35,9 \pm 6,2$  пг/мл ( $p < 0,05$ ). Для контрольных групп, получавших мирицетин или

вальпроевую кислоту без PTZ-индукции, уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  не отличались от контрольных значений.

В то же время, через 24 часа уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в группе, получавшей только PTZ, были значительно повышены по сравнению с контролем и аналогичными результатами (той же группы) через 3 часа после индукции PTZ. Уровень IL-1 $\beta$  достиг  $110,5 \pm 12,3$  пг/мл, уровень IL-6 увеличился до  $85,2 \pm 10,8$  пг/мл, а уровень TNF- $\alpha$  поднялся до  $75,8 \pm 9,6$  пг/мл. В группе мирицетин + PTZ повышение уровней цитокинов было ниже по сравнению со II-ой группой. Уровень IL-1 $\beta$  составил  $45,7 \pm 7,8$  пг/мл ( $p < 0,01$  по сравнению со II-ой группой), уровень IL-6 –  $30,4 \pm 6,1$  пг/мл ( $p < 0,01$ ), а уровень TNF- $\alpha$  –  $35,6 \pm 7,4$  пг/мл ( $p < 0,01$ ). Аналогично, в группе Вальпроевая кислота + PTZ также наблюдалось значительное снижение уровней цитокинов. Уровень IL-1 $\beta$  –  $48,2 \pm 8,0$  пг/мл ( $p < 0,01$  по сравнению со II-ой группой), уровень IL-6 –  $32,8 \pm 5,9$  пг/мл ( $p < 0,01$ ), а уровень TNF- $\alpha$  –  $38,1 \pm 6,8$  пг/мл ( $p < 0,01$ ).

Для контрольных групп, получавших мирицетин и вальпроевую кислоту без индукции PTZ, уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  не отличались от контрольных значений.

Через 3 дня уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в группе, получавшей только PTZ, по сравнению с контрольной группой, начали возвращаться к базовым значениям. Уровень IL-1 $\beta$  был равен  $32,5 \pm 6,3$  пг/мл, уровень IL-6 –  $27,3 \pm 5,8$  пг/мл, а уровень TNF- $\alpha$  –  $30,2 \pm 5,5$  пг/мл ( $p < 0,05$  для всех показателей).

В группе мирицетин + PTZ уровни цитокинов были очень близки к значениям контрольной группы. Уровень IL-1 $\beta$  составил  $28,7 \pm 5,2$  пг/мл ( $p > 0,05$  по сравнению с контролем;  $p < 0,05$  по сравнению с II-ой группой), уровень IL-6 –  $22,4 \pm 4,9$  пг/мл ( $p > 0,05$  по сравнению с контролем;  $p < 0,05$  по сравнению с II-ой группой), а уровень TNF- $\alpha$  –  $24,3 \pm 5,1$  пг/мл ( $p > 0,05$  по сравнению с контролем;  $p < 0,05$  по сравнению с II-ой группой). Аналогичные результаты наблюдались в группе Вальпроевая кислота + PTZ. Уровень IL-1 $\beta$  составил  $29,2 \pm 5,5$  пг/мл ( $p > 0,05$  по сравнению с контролем;  $p < 0,05$  по сравнению с II-ой группой), уровень IL-6 –  $23,6 \pm 5,2$  пг/мл ( $p > 0,05$  по сравнению с контролем;  $p < 0,05$  по сравнению с

II-ой группой), а уровень TNF- $\alpha$  –  $25,0 \pm 5,3$  пг/мл ( $p > 0,05$  по сравнению с контролем;  $p < 0,05$  по сравнению с II-ой группой).

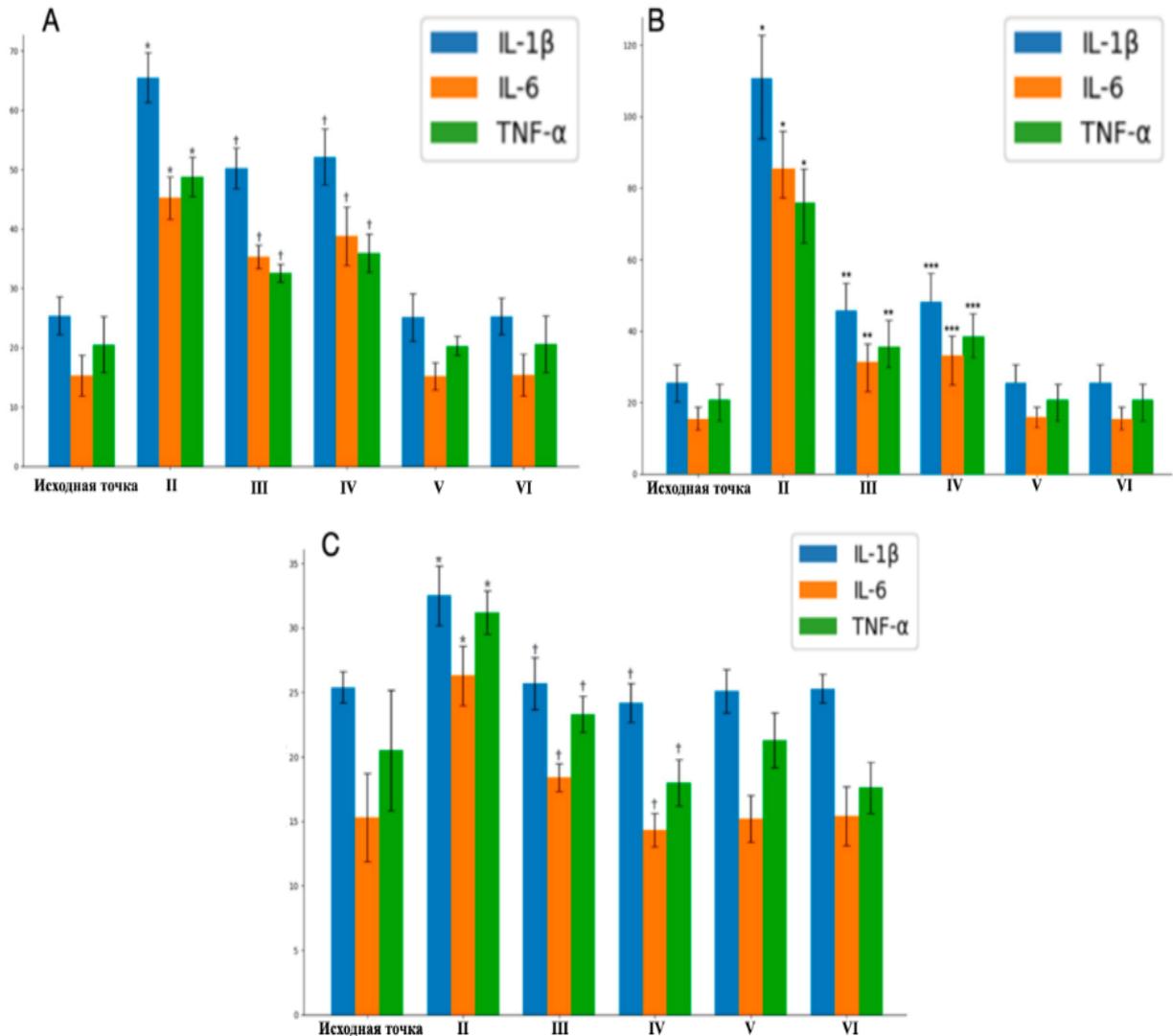


Рисунок 3.10. – Уровни цитокинов (пг/мл) в сыворотке крови после судорог, индуцированных PTZ, в изучаемых группах: (A) – через 3 часа; (B) – через 24 часа; (C) – через 3 дня. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Примечание: \* ( $p < 0,05$ ); различия между III-ей и II-ой группами обозначены – \*\* ( $p < 0,01$ ), и † ( $p < 0,05$ ); статистически значимые различия между IV-ой и II-ой группами обозначены – \*\*\* ( $p < 0,001$ ), и † ( $p < 0,05$ ). Группы: I – контрольная; II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

Для контрольных групп, получавших мирицетин или вальпроевую кислоту без индукции PTZ, уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  не отличались от контрольной группы. Эти результаты показывают, что через 3 дня после индукции PTZ уровни провоспалительных цитокинов в группах, введения анализируемых препаратов в значительной степени нормализовались, что подчеркивает потенциальные противовоспалительные эффекты мирицетина в контексте PTZ-индуцируемых судорог.

Наконец, через 5 дней после введения PTZ уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  нормализовались во всех экспериментальных группах. Не было выявлено статистически значимых различий в уровнях цитокинов между группой, получавшей только PTZ, группой мирицетин + PTZ, группой вальпроевая кислота + PTZ и контрольными группами. Это указывает на возвращение к базовым уровням маркеров воспаления, что свидетельствует о временном характере воспалительного ответа, индуцированного PTZ, и его разрешении к пятому дню.

### **3.5. Морфологическое исследование**

В микропрепаратах головного мозга животных контрольной группы, окрашенных гематоксилином и эозином в гиппокампе наблюдали типичную гистологическую картину: нейроны округлой или овальной формы с голубой цитоплазмой и светло-голубым ядром, четкие границы (Рис. 3.11).

В гиппокампе животных 2-ой группы обнаружили нейрональные изменения в организации зубчатой извилины гиппокампа, нарушение гистоархитектоники пирамидных и гранулярных клеток: некоторые нейроны были сморщены, «темные», без различимой границы между ядром и цитоплазмой.

В образцах гиппокампа животных которым вводили мирицетин (доза – 200 мг/кг, перорально, в течение 5 дней) и индуцировали острые припадки последующем введением PTZ (доза – 45 мг/кг), а также в группе, которым вводили вальпроевую кислоты и индуцировали припадки введением PTZ (доза – 45 мг/кг) наблюдали незначительные изменения гистоархитектоники вещества головного

мозга и зон гиппокампа и его нейронного состава, степень дистрофических изменений нейронов был менее выражен.

В микропрепаратах головного мозга животных V-ой группы (мирицетин в дозе 200 мг/кг) и VI-ой группа (вальпроевая кислота в дозе 100 мг/кг) морфологическая картина тождественна контрольной группе.

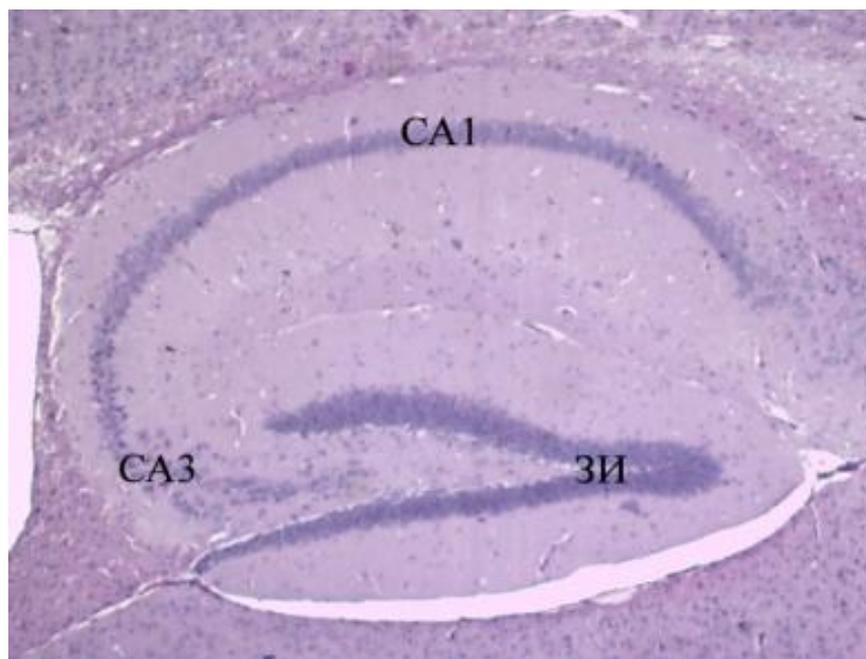


Рисунок 3.11. – Морфологическая картина гиппокампа контрольной группы через 3 часа, окрашивание – гематоксилином и эозином, увелич.  $\times 50$ . ЗИ – зубчатая извилина

Для более детального анализа повреждений нейронов гиппокампа у животных, которым однократно вводили пентилентетразол в дозе 45 мг/кг для индукции судорог без предварительной терапии, а также нейропротективного действия мирицетин (доза – 200 мг/кг, перорально, в течение 5 дней) срезы были окрашены по Нисслю.

Исследование срезов гиппокампа, окрашенных по Нисслю через 3 часа после введения PTZ, не выявило изменений в структуре тканей. Однако через 24 часа после введения PTZ наблюдалось увеличение количества «темных» нейронов с

признаками пикноза и гиперхромного окрашивания, что указывало на необратимое повреждение клеток. На 3-й и 5-й день после введения PTZ отмечалась тенденция к снижению числа патологически измененных нейронов. Клетки с характерным профилем повреждения положительно окрашивались на каспазу-8. Границы клеток некоторых нейронов гиппокампа в областях СА3, зубчатой извилины и хилуса были менее четкими, но пикнотические ядра не были видны. Также отмечалось увеличение числа «темных» нейронов в таламусе и гипоталамусе, а также в моторных структурах, таких как хвостатое ядро и черная субстанция (Рисунок 3.12 – Рисунок 3.21).

Морфологические изменения в III-ей группе были менее выраженными по сравнению с группой, получавшей только PTZ. Через 24 часа после введения PTZ на фоне мирицетина количество нейронов в полях СА1, СА3, СА4 и зубчатой извилине было близко к контрольным значениям, а количество «темных» нейронов было единичным. Аналогичную картину наблюдали в таламусе, гипоталамусе и моторных структурах, таких как хвостатое ядро и черная субстанция при окрашивании по Нисслю. Этот тренд сохранялся на 3-й и 5-й день после введения PTZ на фоне мирицетина, что подтверждает его защитный эффект.

Препарат сравнения показал наилучшую гистологическую и гистохимическую картину на всех этапах исследования.

В группах контроля и введения NaCl 0,9% гистологическая картина и клеточный состав гиппокампа оставались неизменными.

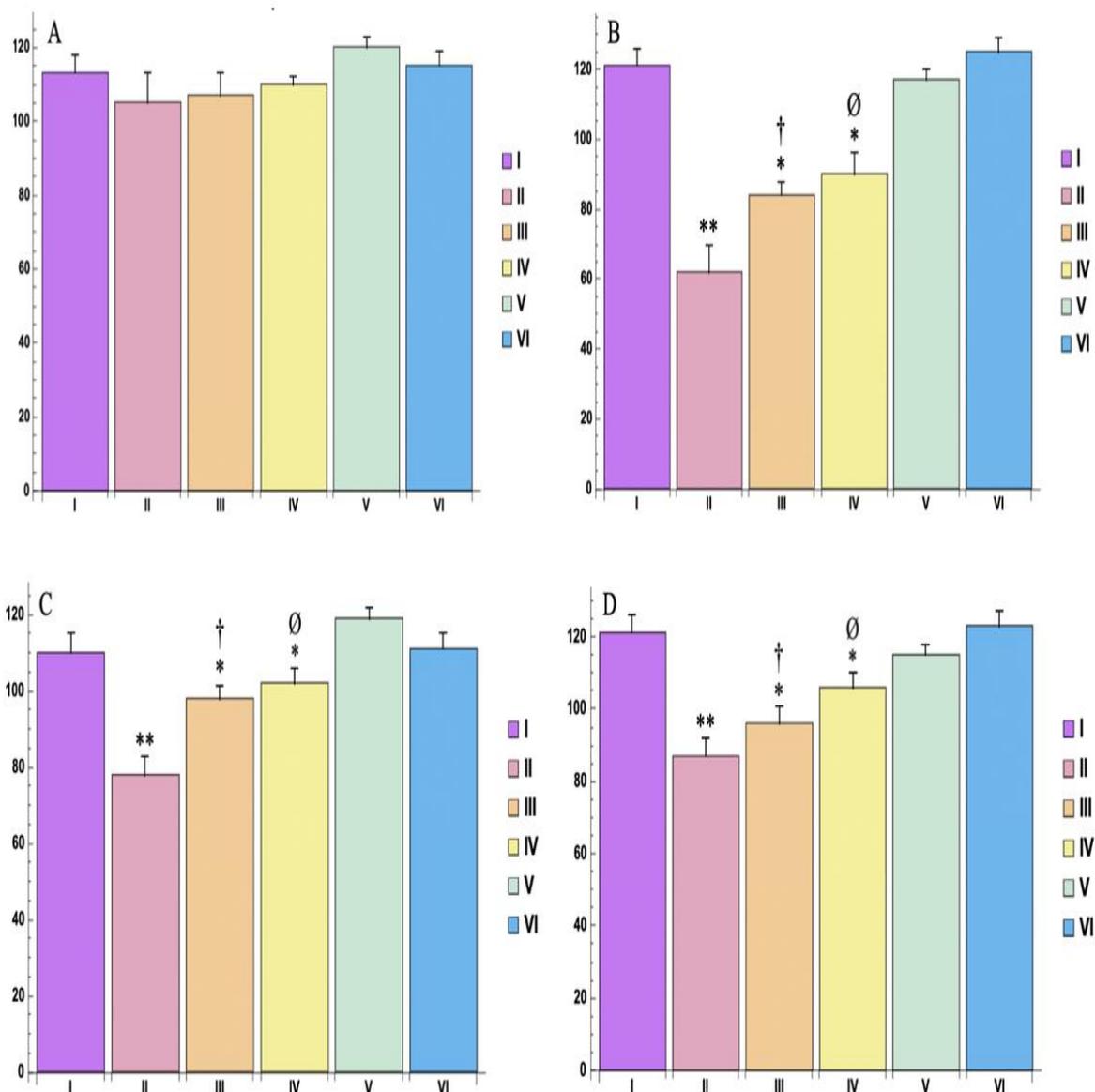


Рисунок 3.12. – Количество нейронов, позитивных по Нисслю, в зубчатой извилине (зона гиппокампа) в разных временных точках, на мм<sup>2</sup>: А – через 3 часа, В – через 1 день, С – через 3 дня, D – через 5 дней. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (M ± SD). Примечание: \* (p < 0,05); статистически значимые различия между III-ей и II-ой группами обозначены † (p < 0,01); статистически значимые различия между IV-ой и II-ой группами обозначены ∅ (p < 0,001). Группы: I – контрольная; II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

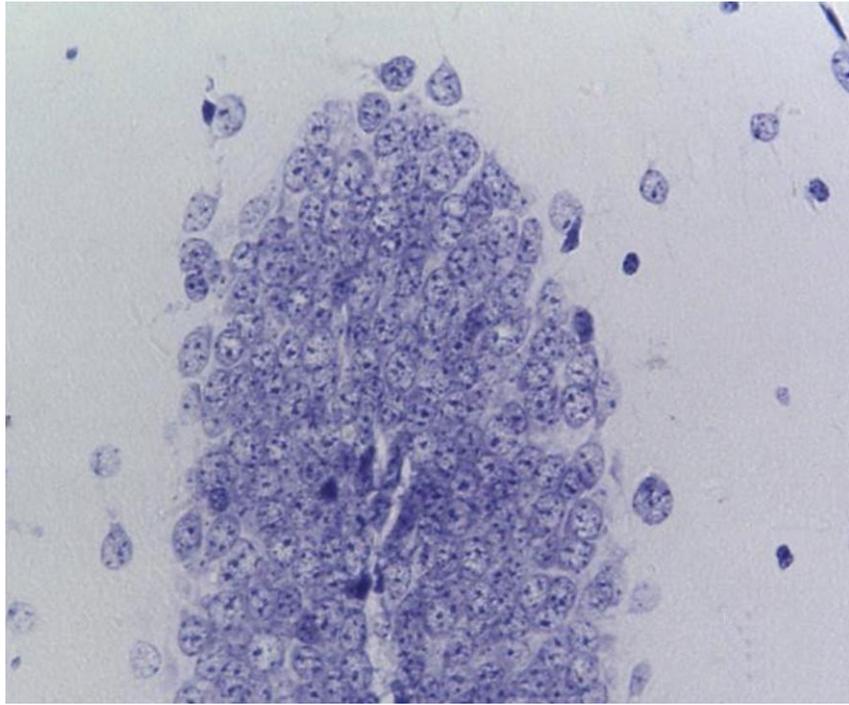


Рисунок 3.13. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) контрольной группы через 3 часа, окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$ .

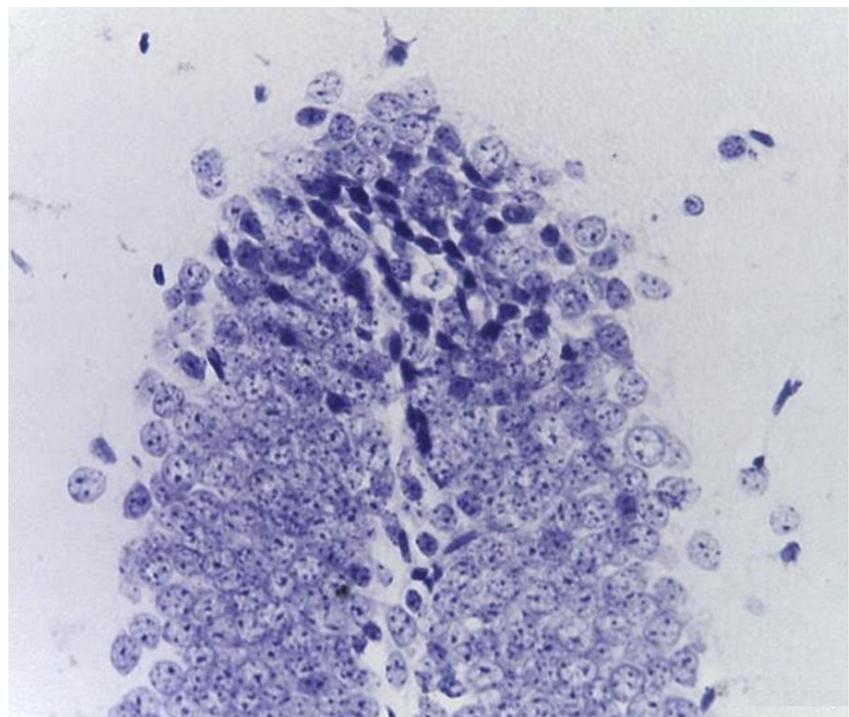


Рисунок 3.14. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 3 часа. Деструкция «темных» нейронов с признаками кариопикноза, без четкой дифференциации между цитоплазмой и ядром. Окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$

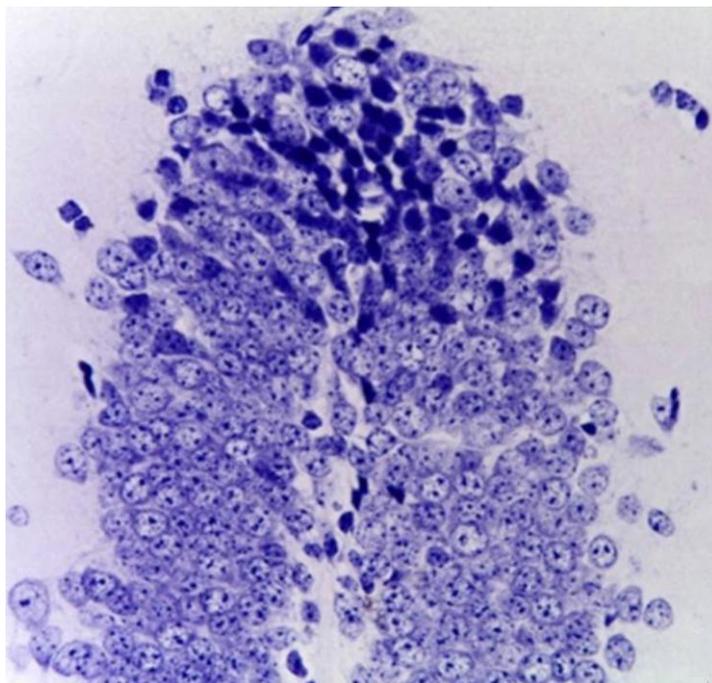


Рисунок 3.15. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 24 часа. Деструкция «темных» нейронов с признаками кариопикноза, без четкой дифференциации между цитоплазмой и ядром. Окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$

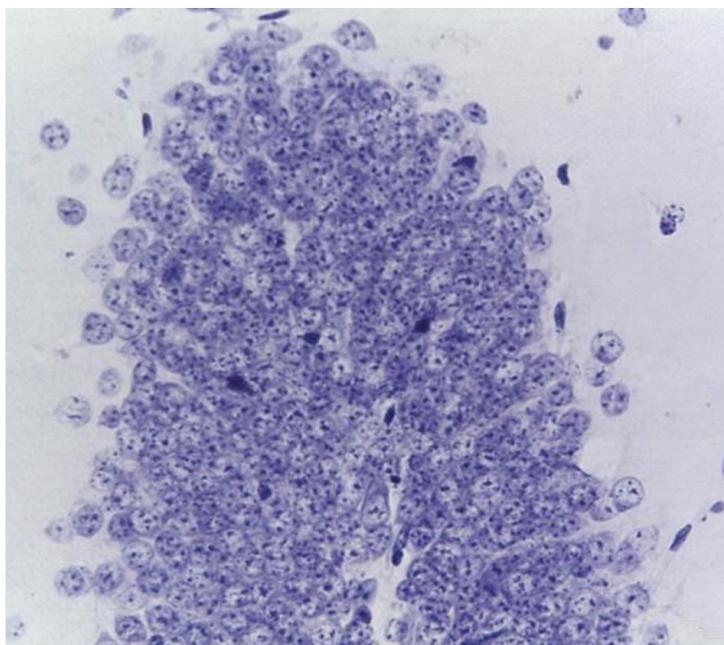


Рисунок 3.16. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 3 дня. Деструкция «темных» нейронов с признаками кариопикноза, без четкой дифференциации между цитоплазмой и ядром. Окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$

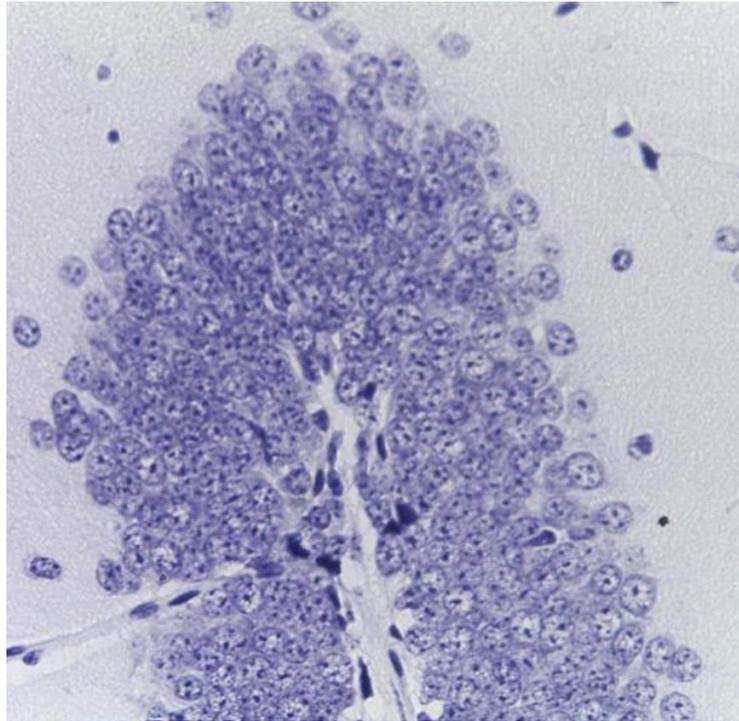


Рисунок 3.17. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 5 дней. Окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$

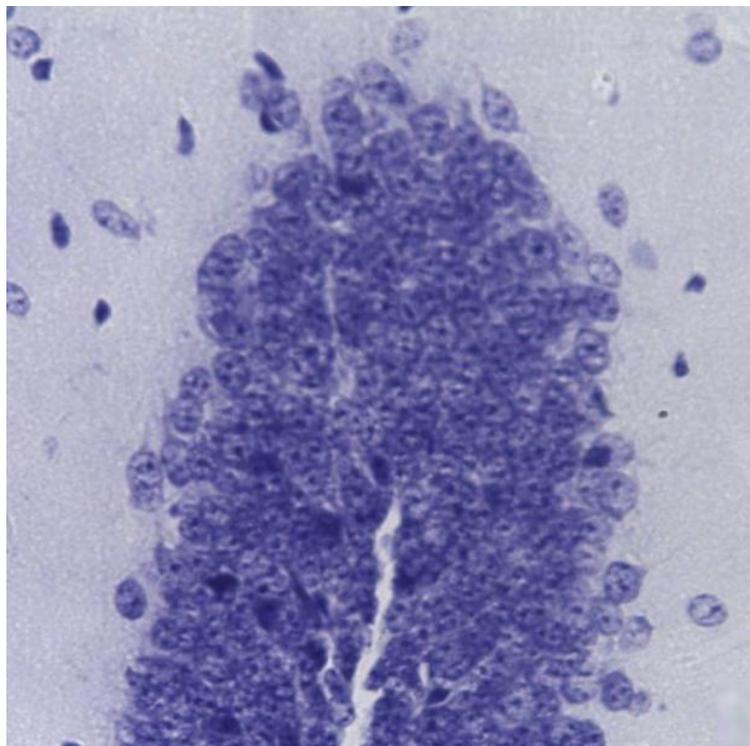


Рисунок 3.18. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 3 часа. Окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$

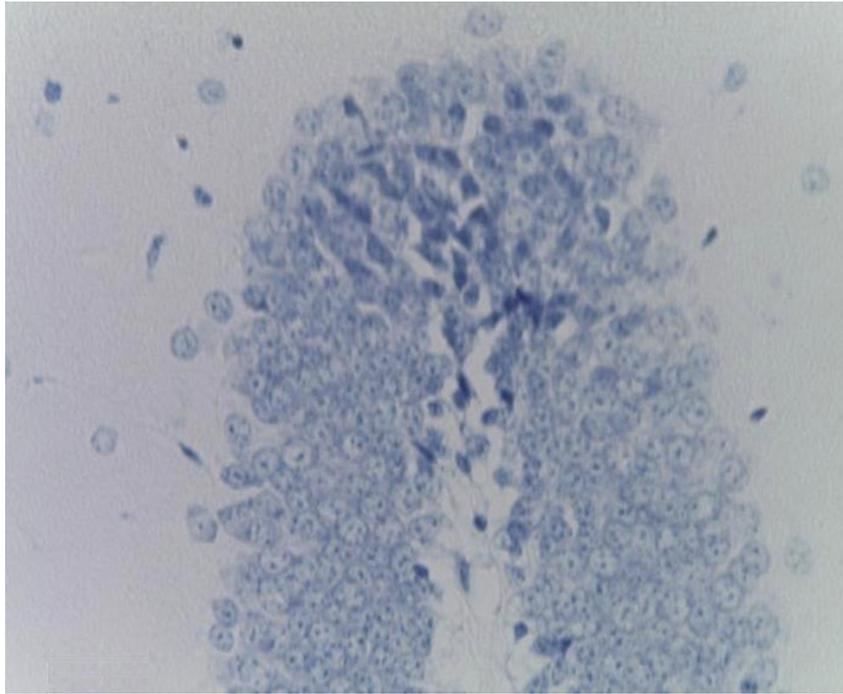


Рисунок 3.19. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 24 часа. Окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$

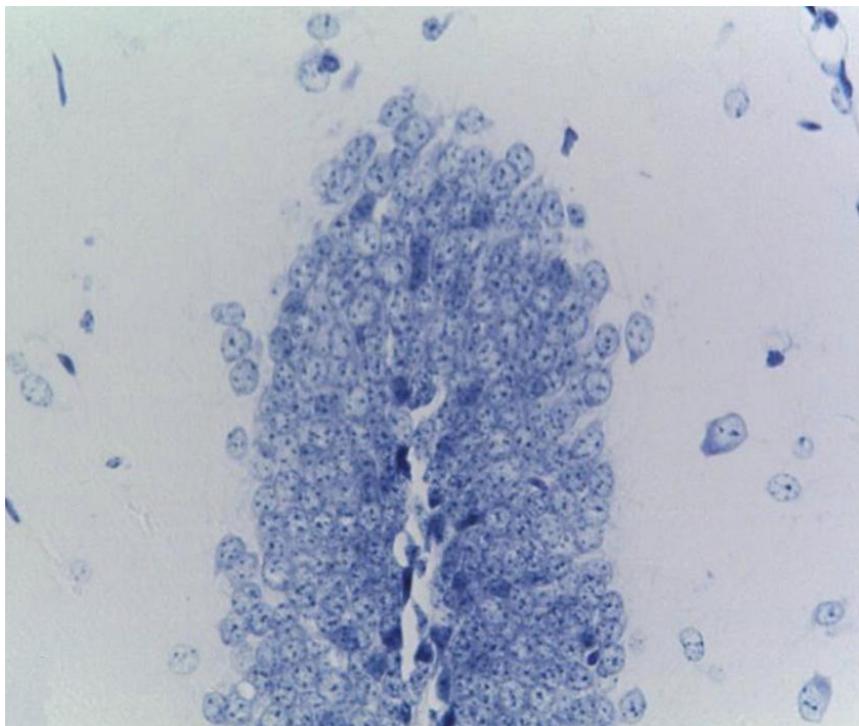


Рисунок 3.20. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 3 дня. Окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$

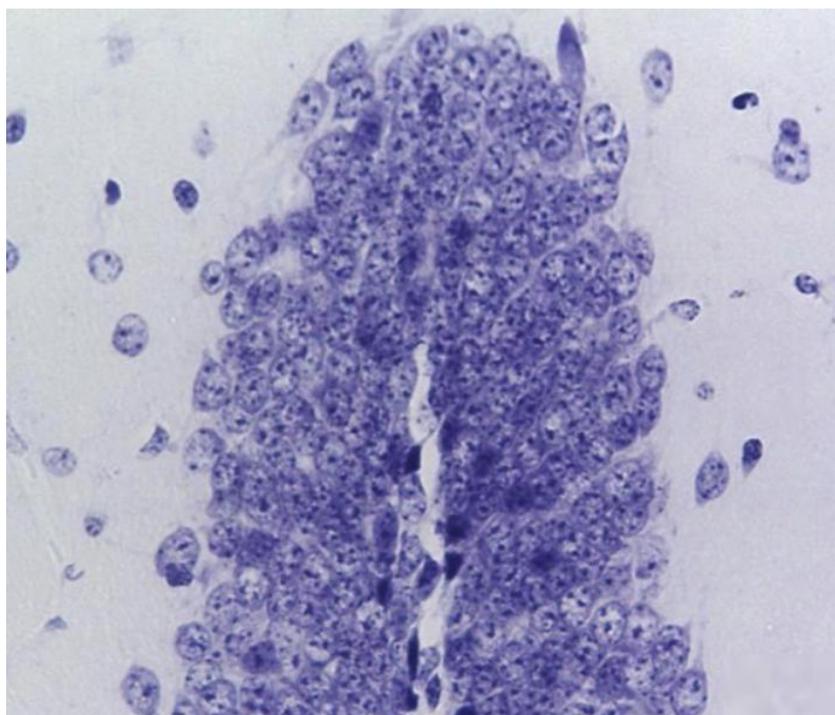


Рисунок 3.21. – Морфологическая картина гиппокампа (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 5 дней. Окрашивание по Нисслю, увелич.  $\times 400$

#### *Иммуногистохимические реакции с антителами к NeuN*

Иммуногистохимическое исследование образцов головного мозга с использованием антител к NeuN представлены на рисунках 3.22 – 3.31. В микропрепаратах выявлены изменения количества NeuN-позитивных клеток в различных областях гиппокампа и других структурах мозга на разных временных этапах эксперимента. Так, PTZ-индуцированные судороги во II-ой группе привели к значительному снижению количества NeuN-позитивных клеток в гиппокампе через 24 часа (после инъекции PTZ), что свидетельствует о повреждении нейронов. NeuN-позитивные клетки были распределены в гиппокампе (области CA1 и CA3) и в гранулярном слое зубчатой извилины. Хотя интенсивность окраски NeuN варьировала в разных областях и временных точках, область CA3 демонстрировала наибольшие признаки повреждения, характеризующиеся светлыми ядрами, что указывало на утрату нейронов ( $p < 0,05$ ).

Аналогичное снижение количества NeuN-позитивных клеток наблюдалось в областях CA1 и CA4, а также в зубчатой извилине, таламических и гипоталамических ядрах и двигательных структурах, таких как хвостатое ядро и черная субстанция ( $p < 0,05$ ). На 3-й и 5-й дни после введения PTZ наблюдалась тенденция к увеличению количества NeuN-позитивных нейронов в гиппокампе и других областях мозга. Однако количество NeuN-позитивных клеток не вернулось к исходным значениям.

В группе III-ей и IV-ой группах количество NeuN-позитивных клеток было близко к контрольным значениям на всех последующих временных точках. Улучшенная выживаемость нейронов с более выраженным окрашиванием NeuN была выявлена в областях CA1, CA3 и CA4, а также в зубчатой извилине ( $p < 0,05$ ). Через 3 дня после введения PTZ количество NeuN-позитивных клеток в группах мирицетина и вальпроевой кислоты было сопоставимо с контрольной группой, что указывает на значительную нейропротекцию ( $p > 0,05$ ). На 5-й день окрашивание NeuN в этих группах оставалось на уровне контрольных значений, что свидетельствует о стойком нейропротекторном эффекте.

В контрольных группах, получавших мирицетин или вальпроевую кислоту в комбинации с 0,9% NaCl, количество NeuN-позитивных клеток не отличалось от исходных значений контрольной группы.

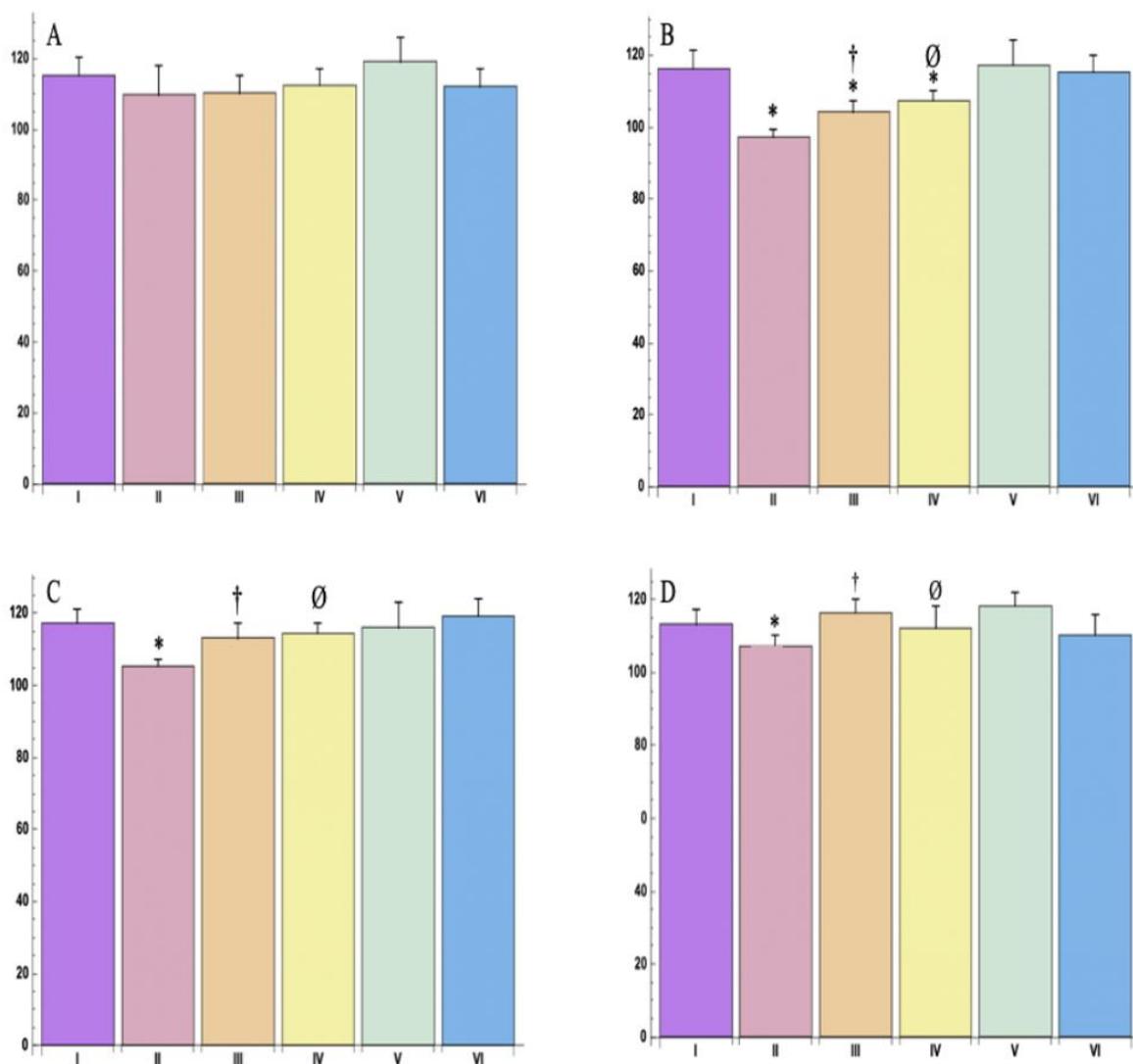


Рисунок 3.22. – Количество NeuN-позитивных клеток зубчатой извилины (область гиппокампа) в разных временных точках, на мм<sup>2</sup>: А – 3 часа, В – 1 день, С – 3 дня, D – 5 дней. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Примечание: \* ( $p < 0,05$ ); статистически значимые различия между III-ей и II-ой группами обозначены † ( $p < 0,05$ ); статистически значимые различия между IV-ой и II-ой группами обозначены ∅ ( $p < 0,001$ ). Группы: I – контрольная; II – только PTZ; III – Мирицетин + PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

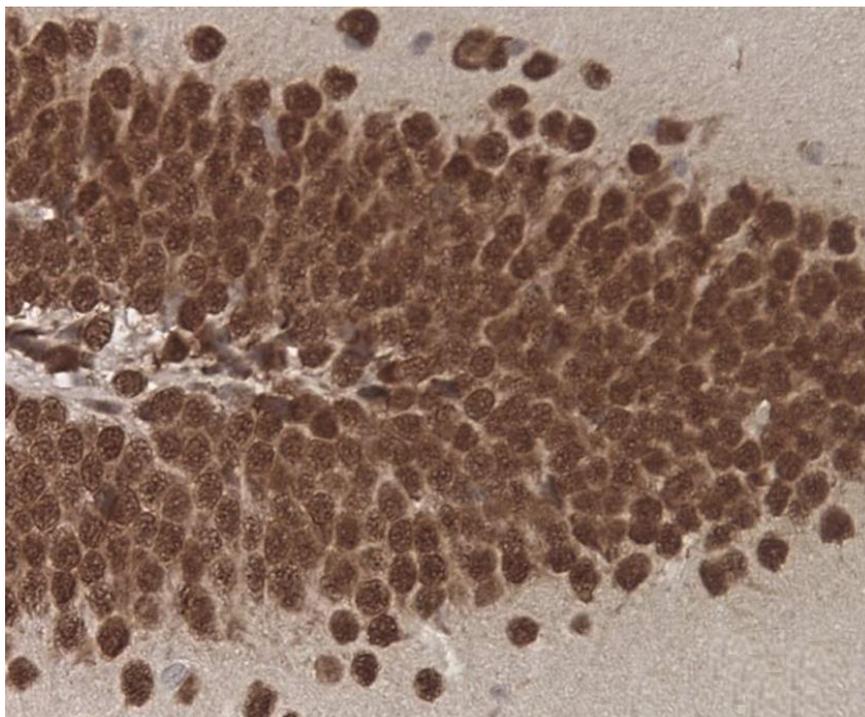


Рисунок 3.23. – Морфологическая картина NeuN-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) контрольной группы через 3 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич.  $\times 400$

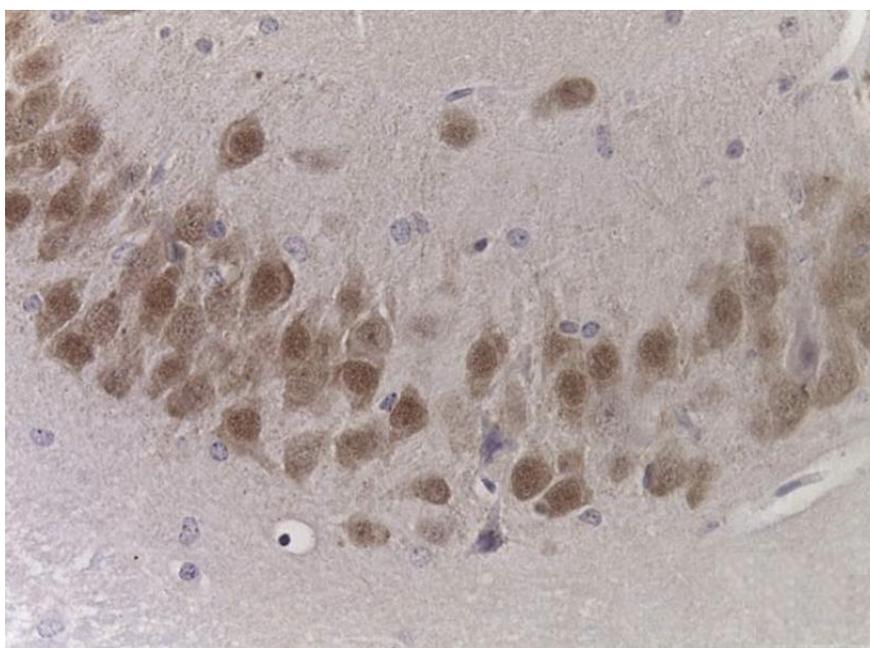


Рисунок 3.24. – Морфологическая картина NeuN-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 3 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич.  $\times 400$

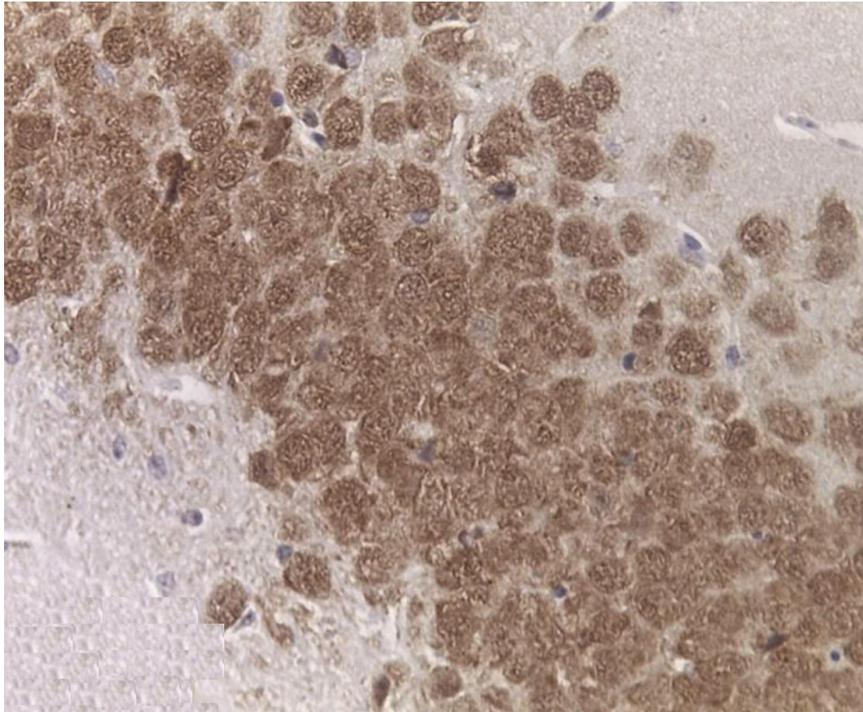


Рисунок 3.25. – Морфологическая картина NeuN-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 24 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич. ×400

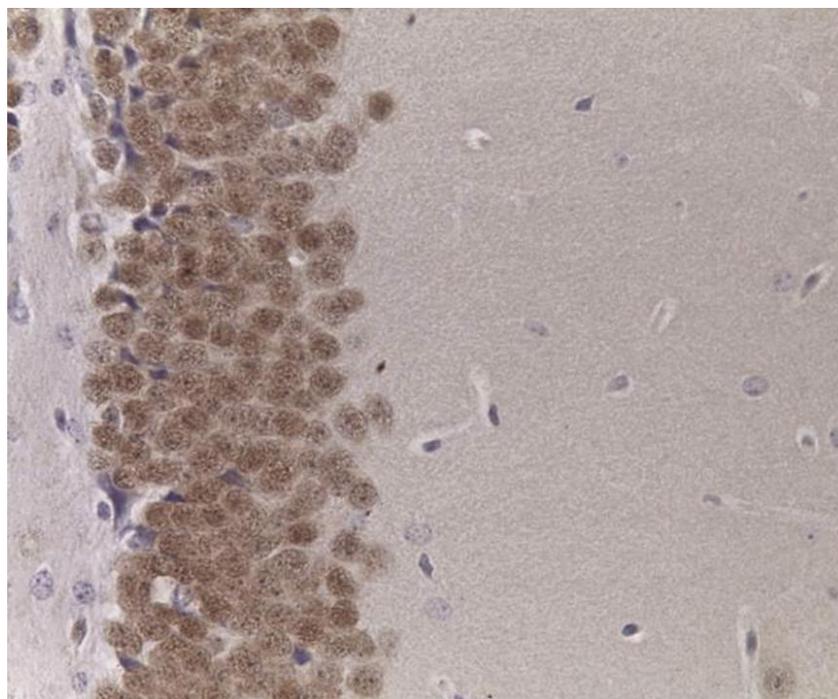


Рисунок 3.26. – Морфологическая картина NeuN-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 3 дня; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич. ×400

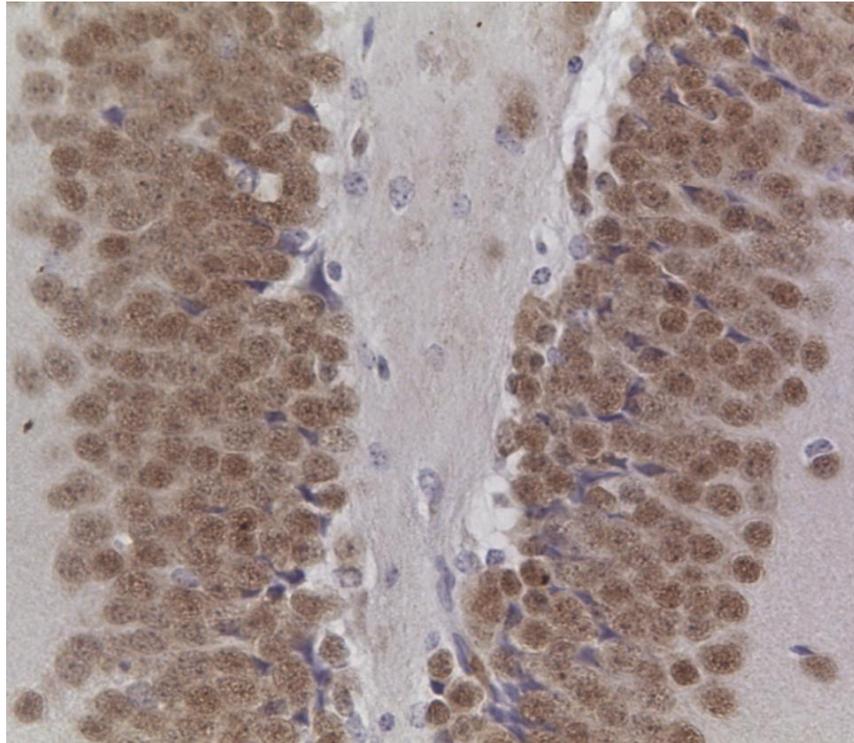


Рисунок 3.27. – Морфологическая картина NeuN-положительных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 5 дней; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич.  $\times 400$

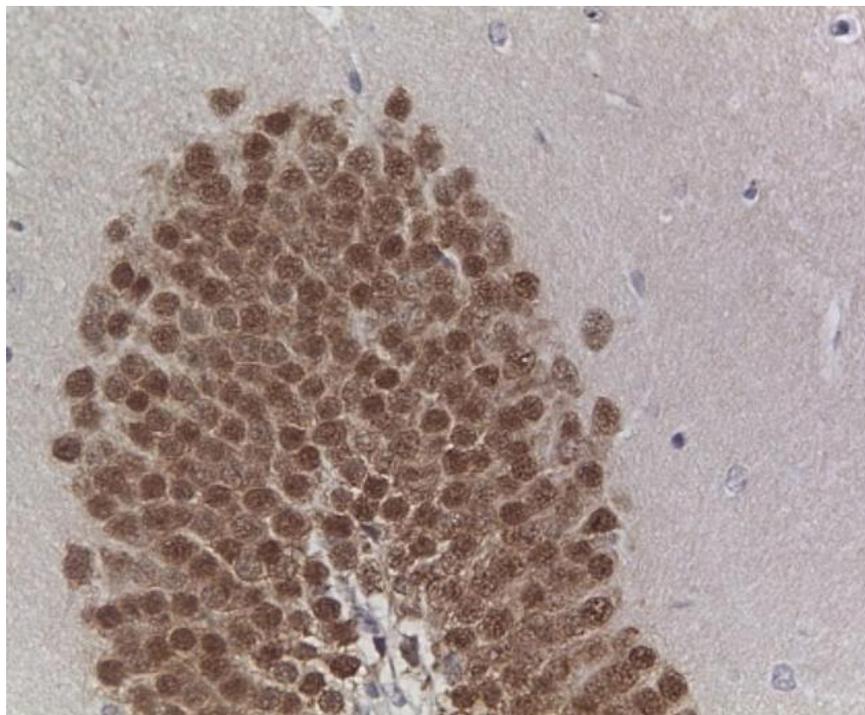


Рисунок 3.28. – Морфологическая картина NeuN-положительных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 3 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич.  $\times 400$

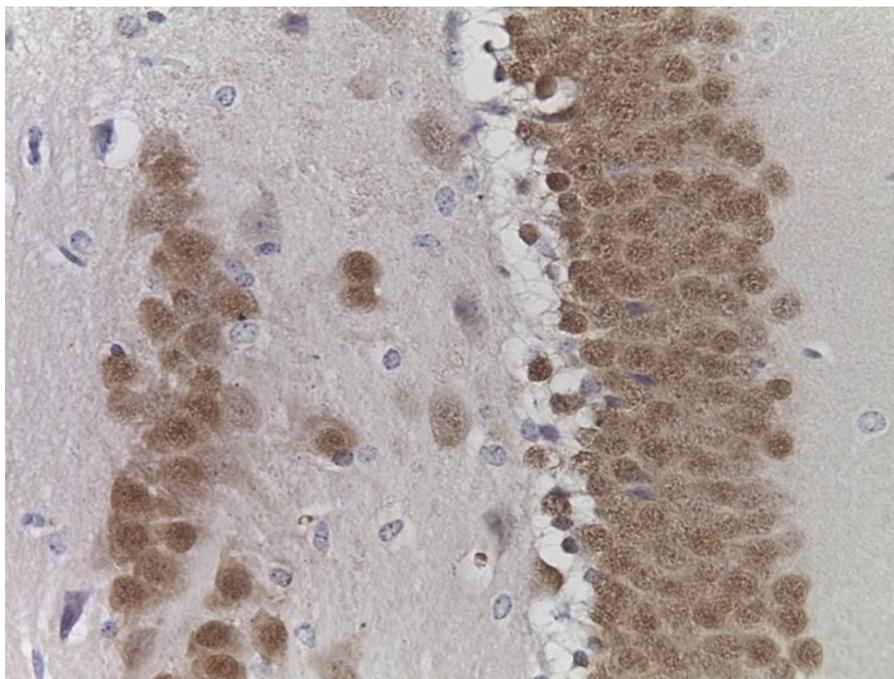


Рисунок 3.29. – Морфологическая картина NeuN-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 24 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич.  $\times 400$

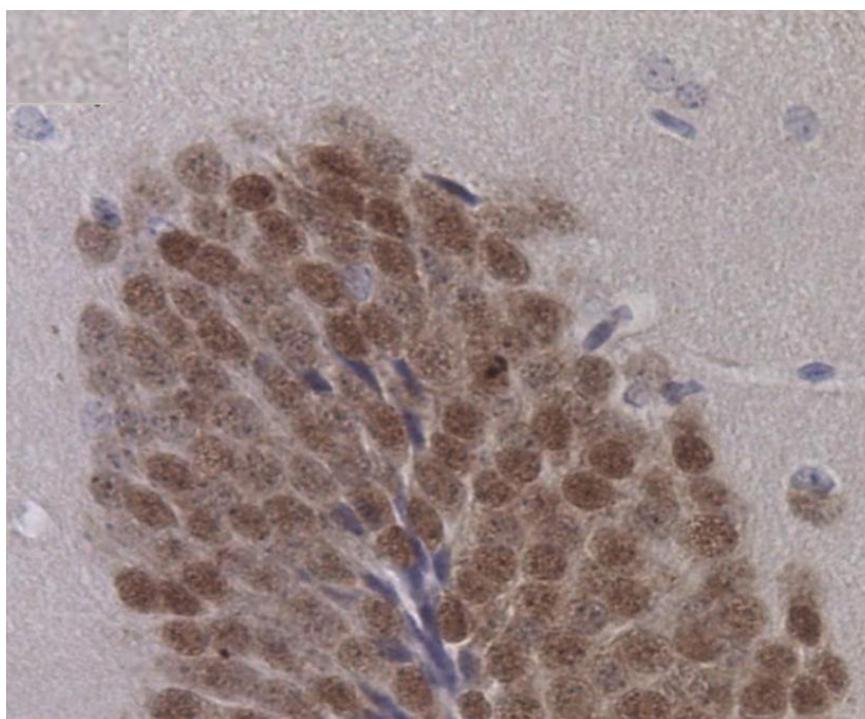


Рисунок 3.30. – Морфологическая картина NeuN-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 3 дня; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич.  $\times 400$

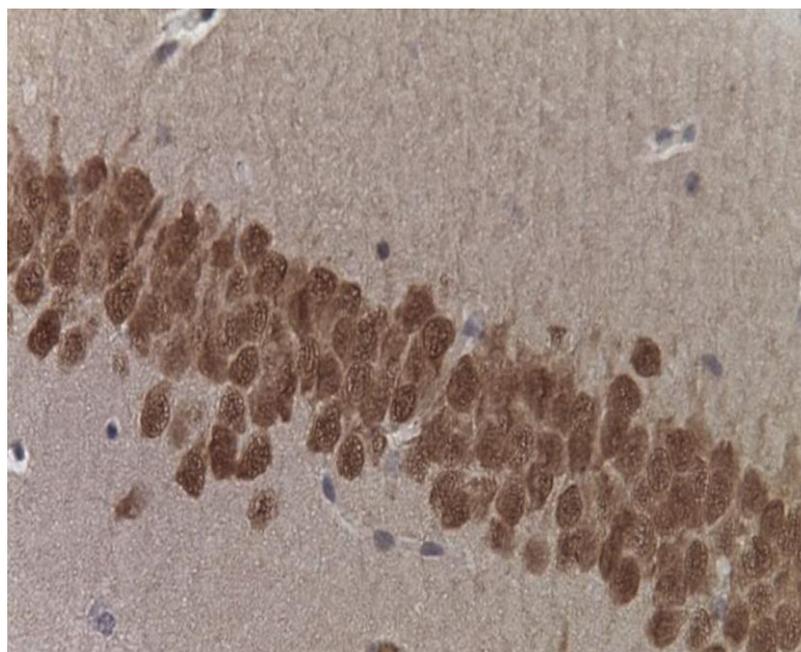


Рисунок 3.31. – Морфологическая картина NeuN-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 5 дней; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NeuN; увелич. ×400

*Иммуногистохимические реакции с антителами к маркеру инициации апоптоза – каспазы-8*

Иммуногистохимическое исследование образцов головного мозга с использованием антител к Caspase 8 (каспазе-8) представлены на рисунках 3.32 – 3.41. Так, во II-ой группе были обнаружены значительные иммунохимические изменения в гиппокампе с использованием антител против каспазы-8 (наблюдали диффузное окрашивание цитоплазмы). Через 24 часа после введения PTZ было выявлено значительное увеличение количества каспаза-8-позитивных нейронов гиппокампа, что свидетельствует об апоптозе нейронов на фоне уменьшения количества NeuN-позитивных клеток, что указывает на гибель нейронов в областях CA1, CA3 и зубчатой извилины. На 3-й и 5-й дни после введения PTZ наблюдалась

тенденция к снижению количества каспаза-8-позитивных клеток в структурах гиппокампа и других областях мозга.

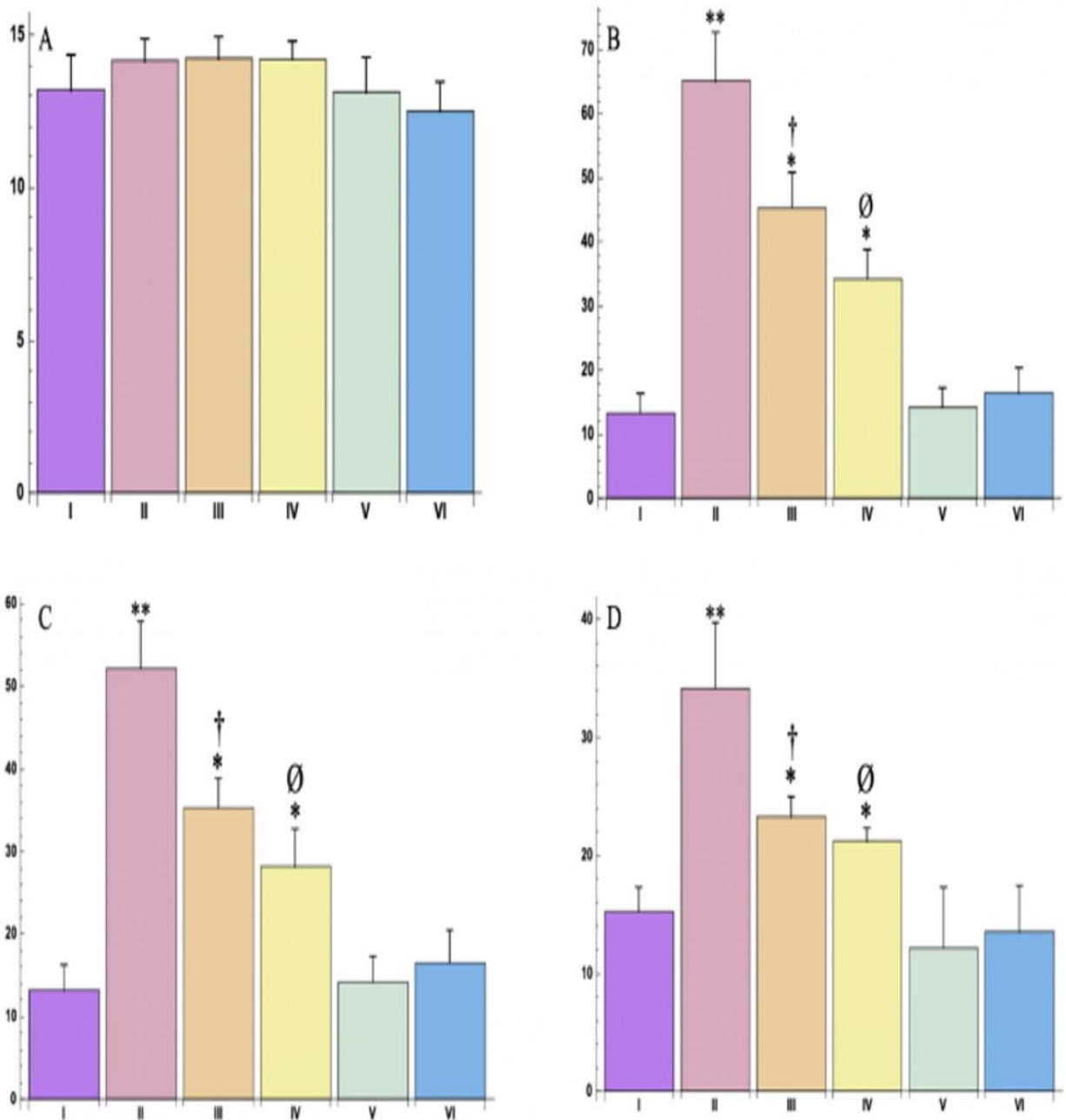


Рисунок 3.32. – Количество каспаза-8-позитивных клеток зубчатой извилины (зона гиппокампа) в разных временных точках, на мм<sup>2</sup>: А – 3 часа, В – 1 день, С – 3 дня, D – 5 дней. Экспериментальные группы пронумерованы в соответствии с дизайном исследования. Данные представлены как среднее значение ± SD. Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой обозначены – \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001). Группы: I – контрольная; II – PTZ; III – Мирицетин +

PTZ; IV – Вальпроевая кислота + PTZ; V – Мирицетин + NaCl; VI – Вальпроевая кислота + NaCl

В группе Мирицетин + PTZ был явно выражен нейропротекторный эффект мирицетина. Количество каспаза-8-позитивных нейронов в областях CA1, CA4 и зубчатой извилины было ниже, чем в группе, получавшей только PTZ, что указывает на снижение нейронального апоптоза.

Группы, получавшие мирицетин или вальпроевую кислоту с NaCl 0,9%, не продемонстрировали значительных различий в количестве клеток с каспазой-8 по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о том, что эти препараты не приводили к нейрональному повреждению.

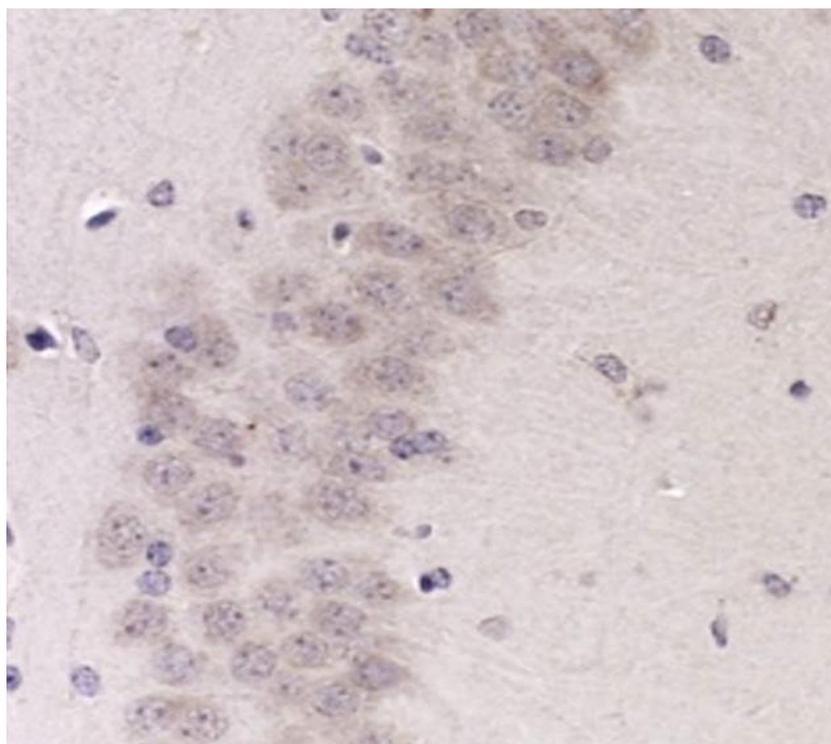


Рисунок 3.33. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) контрольной группы через 3 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$

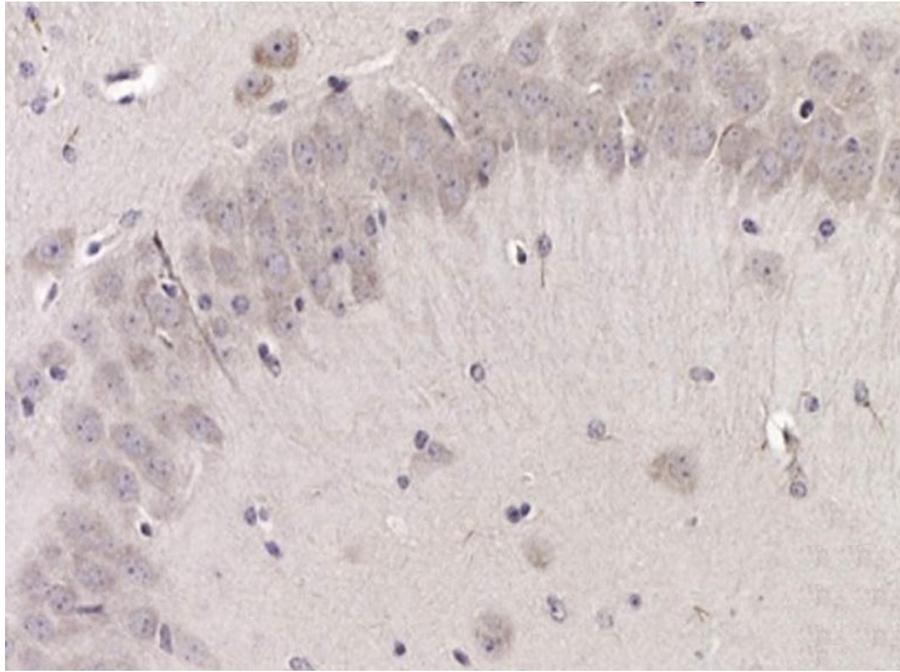


Рисунок 3.34. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 3 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$

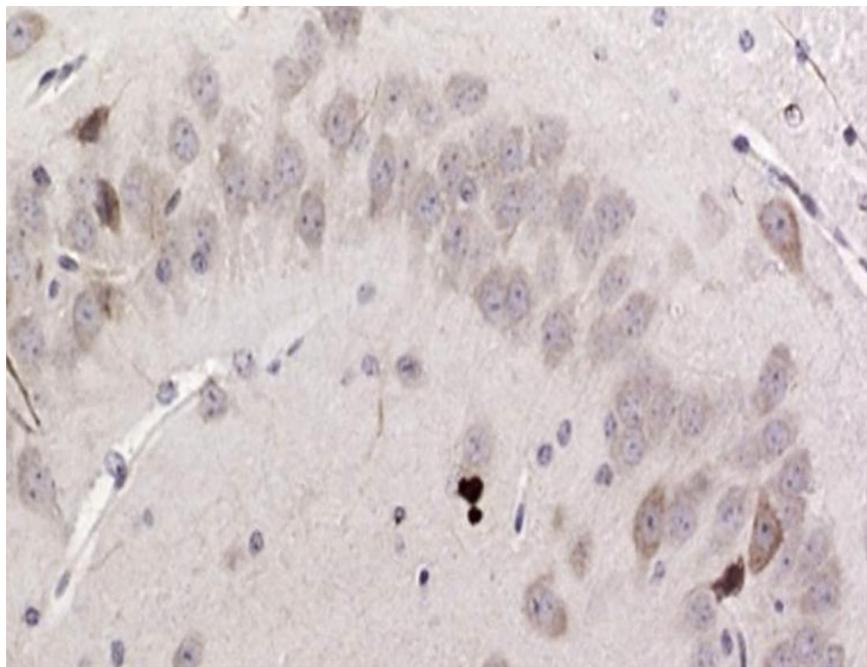


Рисунок 3.35. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 24 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$

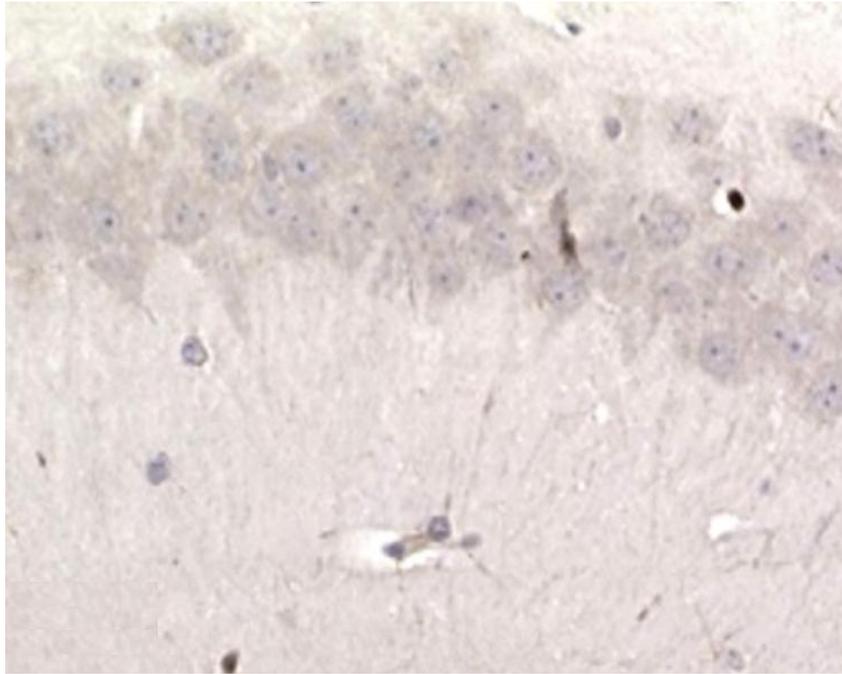


Рисунок 3.36. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 3 дня; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$

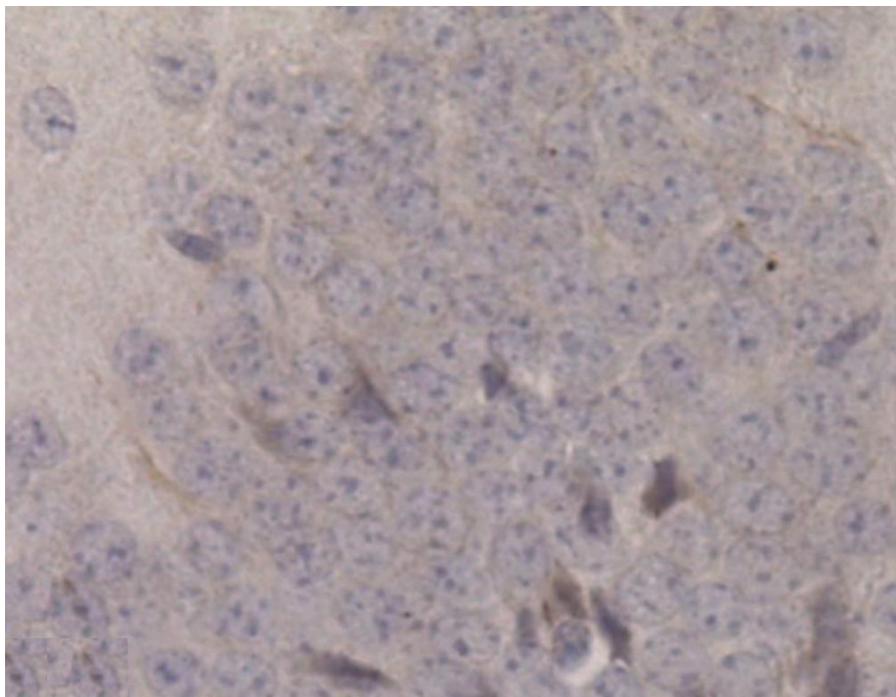


Рисунок 3.37. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) II-ой группы (только PTZ) через 5 дней; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$

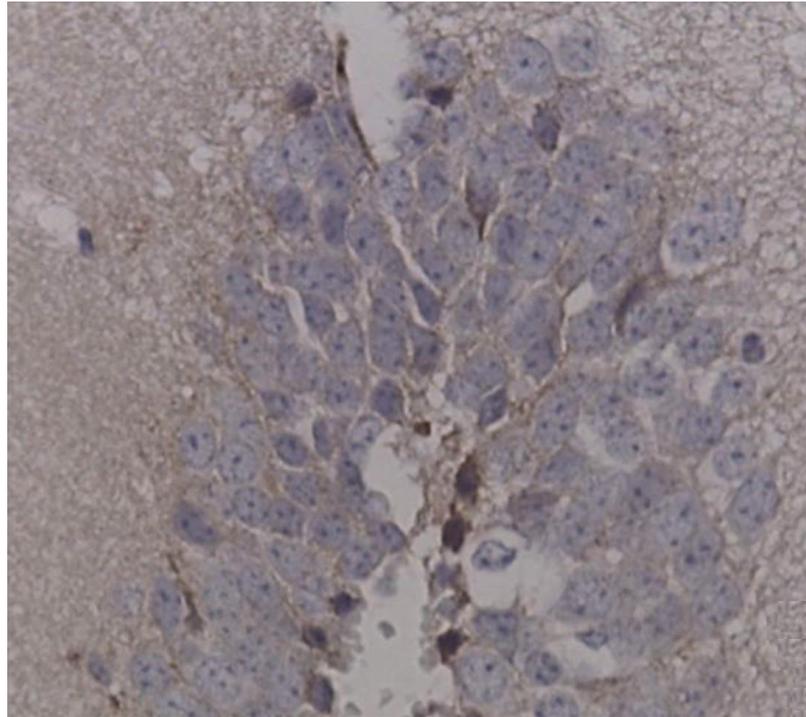


Рисунок 3.38. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 3 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$

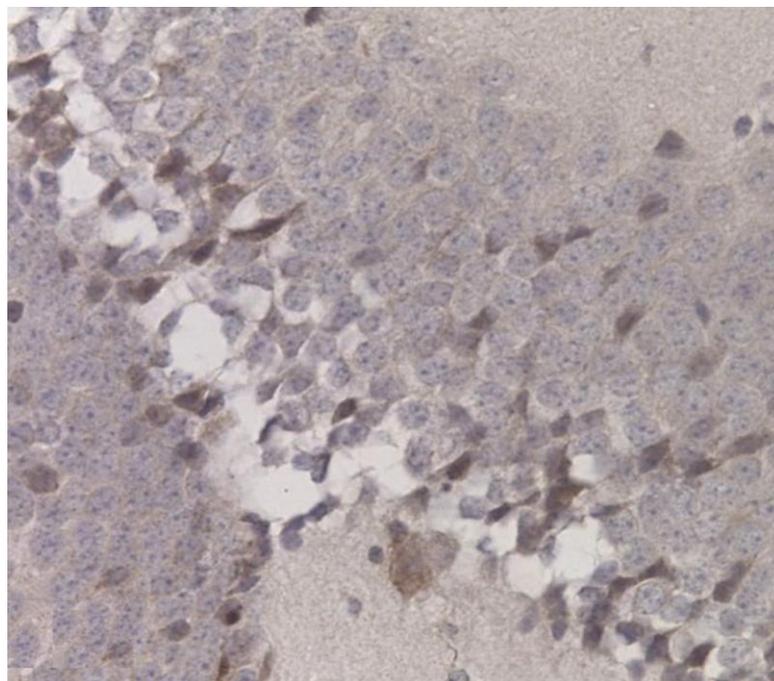


Рисунок 3.39. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 24 часа; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$

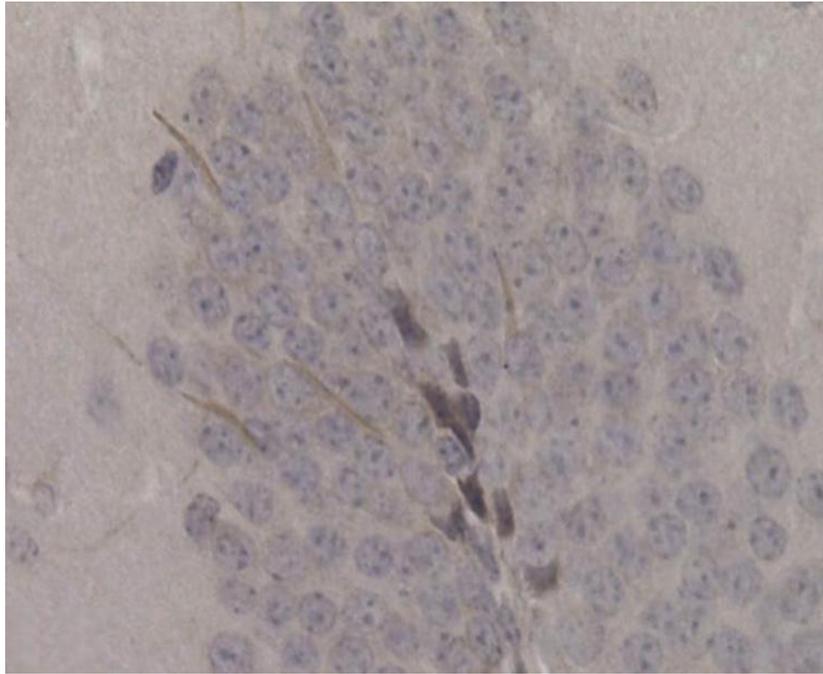


Рисунок 3.40. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 3 дня; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$ .

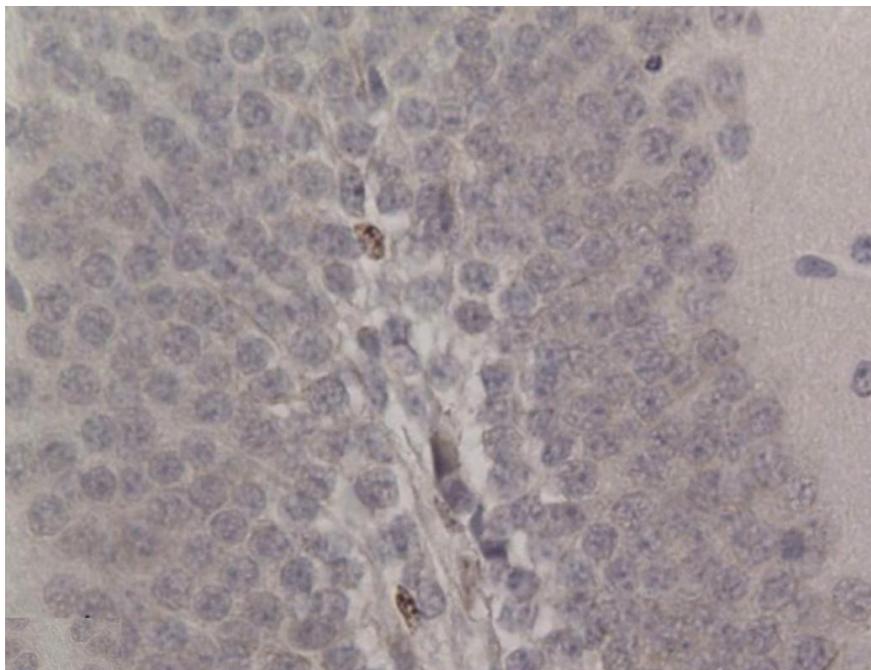


Рисунок 3.41. – Морфологическая картина каспаза-8-позитивных клеток в гиппокампе (зубчатая извилина) III-ей группы (Мирицетин + PTZ) через 5 дней; иммуногистохимическое окрашивание с антителами к каспазе-8; увелич.  $\times 400$ .

### **3.5. Корреляция между каспаза-8-позитивными клетками, NeuN-позитивными клетками и судорожной активностью в гиппокампе**

Повреждение нейронов, вызванное воздействием PTZ, сопровождается метаболическими изменениями в концентрации ферментов и метаболитов (маркеров системы перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (MDA) и антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (SOD) и глутатиона (GSH) в гомогенате), которые ответственны за окислительный стресс, а также воспалительных маркеров (IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ), что приводит к кумулятивному эффекту. Этот метаболический дисбаланс становится причиной гистологических и иммуногистохимических изменений в нейронах.

В модели, индуцированной PTZ, у выживших животных (n = 40) было выявлено значительное увеличение числа поврежденных нейронов (темных и положительных на каспазу-8) по сравнению с контрольными значениями почти во всех структурах. Наиболее выраженное увеличение числа поврежденных нейронов наблюдалось не только в гиппокампе, но и в некоторых структурах лимбической системы (особенно в задних отделах), а также в таламических и гипоталамических ядрах и двигательных структурах, таких как хвостатое ядро и черная субстанция. Для количественного подтверждения этой взаимосвязи был проведен корреляционный анализ, который установил сильную, статистически значимую отрицательную корреляцию между уровнем каспаза-8-позитивных клеток и числом NeuN-позитивных нейронов в гиппокампе (коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = -0.91$ ,  $p < 0.01$ ). Напротив для группы введения мирицетина наблюдалась менее выраженная корреляционная зависимость (коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = -0.74$ ,  $p < 0.01$ ) (Рисунок 3.42, Рисунок 3.43, Рисунок 3.43).

Выявленные морфологические и иммуногистохимические изменения (NeuN и каспаза-8) в составе нейронов различных областей мозга, в первую очередь гиппокампа, также статистически значимо коррелировали с интенсивностью поведенческих реакций, что подтверждает функциональную значимость наблюдаемой нейродегенерации.

Согласно полученным биохимическим данным, введение мирицетина, подобно вальпроевой кислоте, оказывает антиоксидантное воздействие на нейроны, что способствует восстановлению метаболического и морфофункционального баланса. Умеренное увеличение количества поврежденных нейронов было зафиксировано в париетальной коре ( $n = 28$ ), гиппокампе и зубчатой извилине ( $n = 40$ ) в группах с введением мирицетина и вальпроевой кислоты. Подобная картина наблюдалась также в сенсорных зонах и структурах лимбической системы, таких как мамиллярное тело и ядра мозжечка.

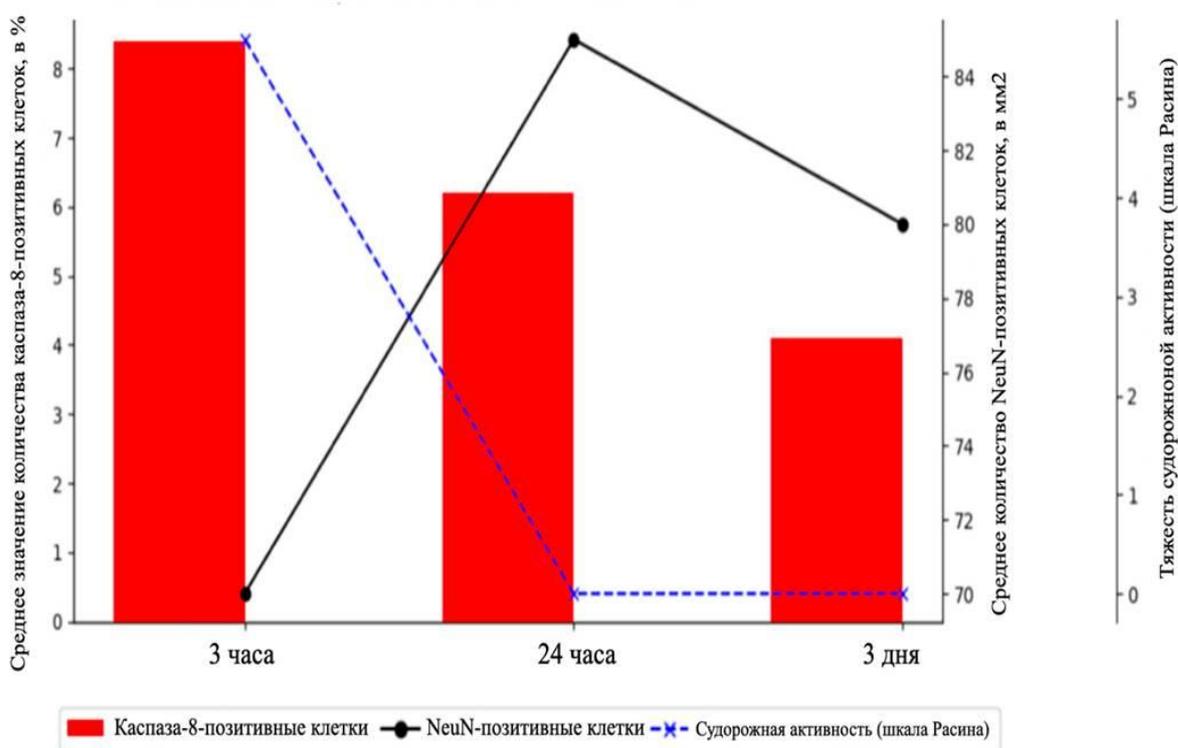


Рисунок 3.42. – Взаимосвязь между каспаза-8- и NeuN-позитивными клетками в гиппокампе и судорожной активностью. График иллюстрирует процент каспаза-8-позитивных клеток (указывает на нейрональный апоптоз), количество NeuN-позитивных клеток (указывает на дегенерацию нейронов) и степень судорожной активности (по шкале Расина) после введения PTZ. Данные представлены для временных точек: 3 часа, 24 часа, 72 часа после введения PTZ. Результаты показывают снижение количества каспаза-8-позитивных клеток, увеличение количества NeuN-позитивных клеток и снижение степени судорожной активности только в начале эксперимента после введения PTZ.

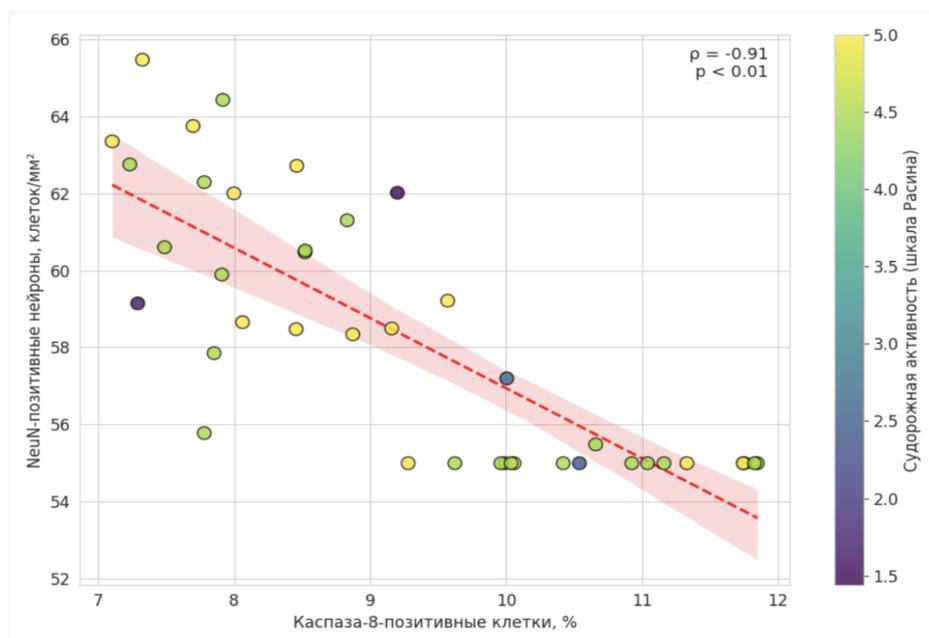


Рисунок 3.43. – Корреляция между каспаза-8- и NeuN-позитивными клетками в гиппокампе и судорожной активностью для животных II-ой группы График иллюстрирует корреляционную зависимость каспаза-8-позитивных клеток, количество NeuN-позитивных клеток и степень судорожной активности (по шкале Расина) после введения PTZ

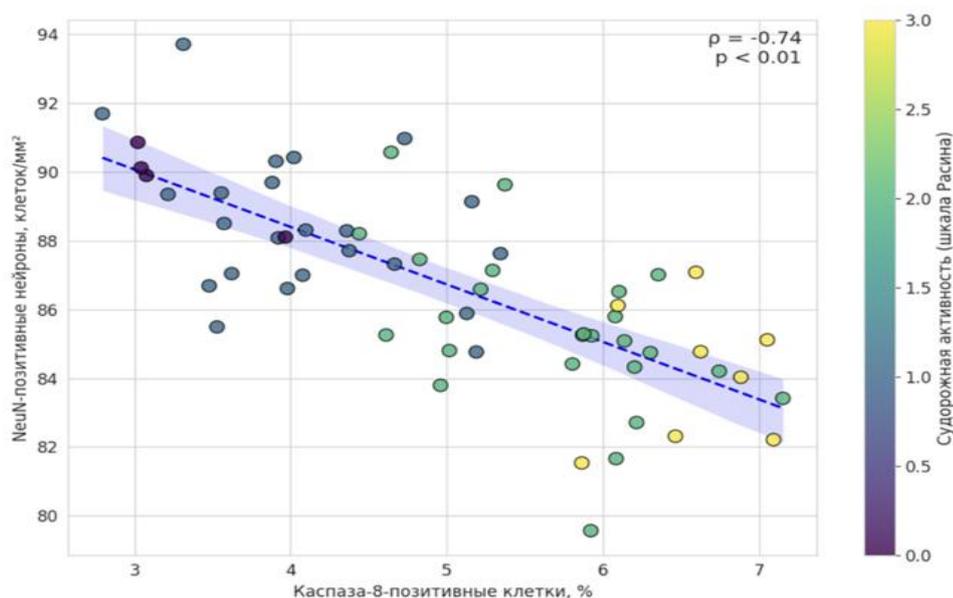


Рисунок 3.44. – Корреляция между каспаза-8- и NeuN-позитивными клетками в гиппокампе и судорожной активностью для животных III-ей группы График иллюстрирует корреляционную зависимость каспаза-8-позитивных клеток, количество NeuN-позитивных клеток и степень судорожной активности (по шкале Расина) после введения PTZ

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Диссертационное исследование направлено на детальное нейробиологическое, гистологическое и иммуногистохимическое исследование изменений в головном мозге при моделировании PTZ-индуцированных эпилептических припадков и введения мирицетина. При этом, акцент сделан на анализ нейропротекторных свойств мирицетина и вальпроевой кислоты, а также на изучение нейрональных повреждений, таких как снижение численности NeuN-позитивных нейронов и увеличение позитивных по каспазе-8, в ключевых структурах мозга, в первую очередь – гиппокамп. В рамках исследования также был проведен биохимический анализ, который позволил оценить антиоксидантную активность препаратов, анализируя концентрации MDA, SOD, GSH в гомогенате головного мозга, а также уровни воспалительных маркеров IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ .

Традиционные модели, например, киндлинг, широко используются в научной практике для изучения эпилептогенеза, когнитивных и поведенческих изменений, связанных с эпилепсией, а также для оценки эффективности новых противоэпилептических препаратов [111]. Однако данная диссертационная работа предлагает новый ускоренный метод моделирования острых судорог, вызванных пентилентетразолом, который был подтвержден пилотными исследованиями и экспериментальными данными текущей работы. В отличие от метода киндлинг, который требует длительной, многократной стимуляции, наш подход основан на быстрой индукции системных судорог с использованием субконвульсивных доз PTZ. Такой подход позволяет исследовать острые судороги и непосредственные эффекты лечения в более сжатые сроки, открывая новый взгляд на начало и прогрессию эпилептической активности.

Пентилентетразол, как химический агент для индукции судорожной активности, был выбран из-за его хорошо документированной высокой эпилептогенной активности и воспроизводимости эффектов при интраперитонеальном введении. В то время как PTZ широко используется в исследованиях, подобных киндлинг, наша работа впервые описывает

динамические иммуногистохимические изменения в гиппокампе после острых PTZ-индуцированных судорог, таких как экспрессия каспазы-8.

В ходе поведенческих тестов выявлены значительные когнитивные и двигательные нарушения у животных из группы, получавшей только PTZ, что соответствует зависимости этих процессов от гиппокампа, и подтверждается предыдущими исследованиями других авторов [8, 9, 78, 93]. Эти нарушения ожидаемы, учитывая уязвимость гиппокампа к повреждениям, что также сопровождалось астроглиальной реакцией в гиппокампе без значительных потерь нейронов, что соответствует предыдущим данным [8, 9, 93, 127]. Результаты поведенческих тестов, отражающих функции гиппокампа продемонстрировали статистически значимые различия преимущественно через 3 часа после судорог. Эти данные требуют осторожной интерпретации, учитывая дисбаланс нейротрансмиттеров и энергетические дефициты у пораженных животных. Быстрое повреждение нейронов гиппокампа согласуется с ранее опубликованными данными [8, 9, 130].

Для подтверждения нашей гипотезы о ключевой роли апоптотических механизмов в повреждении нейронов была проведена оценка экспрессии, инициирующей каспазы-8. Вовлечение каспазы-8 в запуск апоптоза в структурах гиппокампа после PTZ-индуцированных судорог до настоящего момента было изучено недостаточно.

Вальпроевая кислота (лат. *Acidum valproicum*; англ. *Valproic acid*) является одним из наиболее широко применяемых противоэпилептических препаратов, обладающих многофакторным механизмом действия, включающим модуляцию ГАМК-ергической нейротрансмиссии, блокаду натриевых и кальциевых каналов, а также снижение выделения возбуждающих нейромедиаторов, таких как глутамат. В неврологической практике она используется для лечения различных форм эпилепсии благодаря способности подавлять как генерализованные, так и фокальные судороги. В настоящей работе, для группы сравнения в качестве активного контроля вальпроевая кислота использовалась в дозировке 100 мг/кг, вводимая интраперитонеально в течение 5 дней перед индукцией судорожного

состояния. В то же время вальпроевая кислота остается хорошо изученным противоэпилептическим препаратом с доказанной эффективностью [37, 67]. Однако ограничения, связанные с применением вальпроевой кислоты, такие как токсичность при длительном применении, подчеркивают необходимость поиска альтернативных терапевтических средств с более благоприятным профилем безопасности.

Настоящее исследование является одним из первых, где выявляются потенциальные противоэпилептические эффекты мирицетина (3,3',4',4,5,5',7-гексагидроксифлавоноид) – флавоноида, известного своими широкими биоактивными свойствами, включая антиоксидантное, противоопухолевое, нефропротекторное и противовоспалительное действие [20, 56]. Как и ожидалось, наши поведенческие исследования показали значительные когнитивные и моторные нарушения у животных, получавших только PTZ, что соответствует известным эффектам PTZ-индуцированных судорог [44].

Окислительный стресс – это основной фактор, способствующий повреждению нейронов и судорожной активности при эпилепсии. Полученные результаты исследования маркеров оксидативного стресса (MDA, SOD и GSH) свидетельствуют о том, что мирицетин и вальпроевая кислота эффективно снижают уровень оксидативного стресса, вызванного PTZ.

Основной механизм, посредством которого мирицетин подавляет оксидативный стресс, заключается в снижении уровня реактивных форм кислорода (РФК) через два ключевых пути: нейтрализацию свободных радикалов ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$  и  $ROO^{\bullet}$ ) за счет наличия множества гидроксильных групп в химической структуре соединения и ингибирование прооксидантных ферментов (ксантиноксидаза, липооксигеназы и НАДФН-оксидазы). Кроме того, мирицетин, подобно другим флавоноидам, может активировать гены, кодирующие антиоксидантные ферменты, такие как SOD, MDA, GSH, CAT и GPx, через транскрипционный фактор Nrf2. Модуляция баланса оксидативного стресса также может происходить через сигнальные пути, такие как PI3K/Akt, MAPK и NF- $\kappa$ B, на которые воздействует мирицетин.

Мирицетин продемонстрировал выраженные антиоксидантные и нейропротекторные эффекты, что привело к значительным улучшениям когнитивных и моторных функций у животных по сравнению с группой, получавшей только PTZ. В группе, получавшей вальпроевую кислоту, наблюдались аналогичные результаты, что подтверждает ее эффективность как противоэпилептического средства. Эти результаты подчеркивают потенциал мирицетина и вальпроевой кислоты в качестве эффективных терапевтических средств для лечения эпилепсии, что требует дальнейшего изучения их долгосрочных эффектов и механизмов действия.

Особое внимание в контексте эпилептогенеза следует уделить воспалительным процессам, так как воспаление играет системную роль в развитии эпилептического припадка [124]. Нейровоспалительные маркеры, в том числе цитокины, представляют собой надежные предикторы эпилепсии, поскольку они участвуют в патофизиологических процессах, приводящих к гипервозбудимости нейронов и нейрональной гибели. Настоящее исследование было направлено на оценку влияния PTZ-индуцированных судорог и последующего лечения мирицетином и вальпроевой кислотой на уровни провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в сыворотке крови экспериментальных животных. Также стоит учитывать, что увеличение уровней провоспалительных цитокинов, например, IL-1 $\beta$ , является важным маркером начального этапа повреждения вещества головного мозга, так как они способствуют усилению воспаления и дальнейшему развитию судорожной активности. Так, мы наблюдали значительное увеличение уровней IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в группе животных, получивших инъекции PTZ без лечения, по сравнению с контрольной группой, что подчеркивает роль воспалительных факторов в повреждении нейронов и возникновении судорожной активности.

На фоне лечения мирицетином и вальпроевой кислотой уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  были существенно снижены, что указывает на противовоспалительные свойства данных соединений. Эти результаты демонстрируют, что как мирицетин, так и вальпроевая кислота способны эффективно уменьшать воспаление, вызванное PTZ, что, в свою очередь, способствует нейропротекции и улучшению

исходов судорог. Такой противовоспалительный эффект позволяет рассматривать мирицетин как перспективное терапевтическое средство для лечения эпилепсии.

Дополнительно, гистохимический анализ с использованием окраски по Нисслию, а также иммуногистохимическое исследование с антителами к NeuN и каспазе-8, предоставили доказательства нейропротекторного эффекта мирицетина и вальпроевой кислоты в контексте PTZ-индуцированных судорог.

Окраска по Нисслию выявила значительное снижение повреждений нейронов в группе, получавшей мирицетин, по сравнению с группой, подвергавшейся воздействию только PTZ. Гистопатологический анализ показал, что в гиппокампе, особенно в областях CA1, CA3, CA4 и зубчатой извилины, сохранялась более высокая плотность жизнеспособных нейронов, а количество «темных» нейронов, характеризующихся кариопикнозом и гиперхромазией ядер, это было значительно уменьшено. Эти результаты свидетельствуют о том, что мирицетин эффективно снижает повреждение нейронов, вызванное PTZ, оказывая выраженную протективную активность.

Иммуногистохимический анализ показал значительное снижение количества NeuN-позитивных нейронов гиппокампа через 24 часа после судорог, что коррелировало с морфологическими изменениями, вызванными системным введением PTZ, и было оценено с помощью шкалы Расина [74]. В группах мирицетин + PTZ и Вальпроевая кислота + PTZ количество NeuN-позитивных клеток было значительно выше, чем в группе, получавшей только PTZ, на всех временных этапах. NeuN-позитивные клетки, свидетельствующие о сохранности нейронов, сохранялись в аналогичных областях мозга. К 3-ому и 5-ому дням после введения PTZ количество NeuN-позитивных клеток в этих группах было сопоставимо с контрольной группой, что указывает на значительную нейропротекцию и подтверждает, что как мирицетин, так и вальпроевая кислота способствуют сохранению жизнеспособности и функции нейронов.

Для дальнейшего изучения молекулярных механизмов клеточной гибели при острых генерализованных судорогах было исследовано участие каспазного каскада с акцентом на каспазу-8, инициирующей апоптоз. Настоящее исследование

является первым, в котором с помощью иммуногистохимического метода изучена активация каспазы-8 в модели острого PTZ-индуцированного эпилептического припадка. Предыдущие работы показали ключевую роль каспазы-8 как инициатора апоптоза при повреждениях нейронов гиппокампа [134], при этом имеются данные, что ингибирование каспазы-8 способствует увеличению выживаемости нейронов. Наши результаты демонстрируют, что нейрональная гибель в гиппокампе, вызванная PTZ, сопровождается экспрессией каспазы-8 – ключевого маркера процесса клеточной гибели. Распределение поврежденных нейронов может варьировать в зависимости от региона мозга и типа эпилепсии, что, вероятно, связано с активацией специфических сигнальных путей, участвующих в химических и метаболических процессах.

Кроме того, полученные данные частично согласуются с результатами предыдущих исследований, которые указывают на повышение экспрессии каспазы-8 после системных PTZ-индуцированных судорог у мышей. Работа Р. Меллера и соавторов показала, что активация каспазы-8 приводит к гибели нейронов при PTZ-индуцированных судорогах в клеточных культурах. Однако стоит отметить, что в этих работах использовался метод иммуноблоттинга, который не позволяет проводить количественный анализ, в то время как наше исследование представляет первую количественную оценку активации каспазы-8 после PTZ-индуцированных судорог.

Иммуногистохимическое исследование с использованием антител к каспазе-8 дало представление об апоптотических процессах в гиппокампе. Учитывая ключевую роль каспазы-8 как инициатора внешнего пути апоптоза, повышение уровня этого белка в настоящем исследовании с высокой вероятностью указывает на то, что PTZ-индуцированная активность после однократного введения высокой дозы PTZ способствует активации апоптотического пути, ведущего к гибели клеток. В группах, получавших мирицетин + PTZ и вальпроевую кислоту + PTZ, было отмечено уменьшение числа каспаза-8-позитивных клеток по сравнению со II-ой группой (только PTZ), что указывает на снижение уровня апоптоза. Снижение каспазы-8 совпадало с сохранением NeuN-позитивных клеток, что подтверждает

нейропротекторную роль данных соединений. Однако, тем не менее необходимы дальнейшие исследования (в том числе на других моделях животных) для определения апоптотического пути, который приводит к гибели нейронов после однократных или повторяющихся судорог, особенно в таких структурах, как таламус, фимбрии и миндалина.

В ходе работы установлено, что системные PTZ-индуцированные судороги у мышей приводят к значительным нарушениям нейрональных функций через 24 часа после судорог, которые нормализуются к 5-му дню эксперимента. Вероятно, нейрональная гибель происходит через внешний путь апоптоза, опосредованный активацией каспазы-8. Наибольшие отклонения в поведенческих тестах были зафиксированы через 3 часа после судорог, что указывает на предположительный критический период эпилептогенеза, требующий дальнейшего изучения. Значительное повышение уровней провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ) через 24 часа после введения PTZ свидетельствует о мощной воспалительной реакции, которая была смягчена благодаря применению мирицетина и вальпроевой кислоты. Эти препараты также продемонстрировали выраженное антиоксидантное действие, что подтверждается снижением уровней маркеров оксидативного стресса (MDA) и восстановлением активности антиоксидантных ферментов (SOD и GSH). Иммуногистохимические данные, включая окрашивание NeuN и каспазы-8, подкрепляют защитные эффекты мирицетина и вальпроевой кислоты в предотвращении PTZ-индуцированного апоптоза нейронов. Улучшенные результаты в поведенческих тестах дополнительно подтверждают их нейропротекторный и терапевтический потенциал.

Таким образом, мирицетин продемонстрировал значительные нейропротекторные свойства в условиях PTZ-индуцированных судорог, снижая воспаление, апоптоз и восстанавливая маркеры редокс-системы (Рисунок 4.1.). Это делает его перспективным кандидатом для использования в терапии эпилептических приступов, особенно в случаях острого припадка. Наши данные подчеркивают необходимость дальнейших исследований, направленных на

оптимизацию дозировки, режимов введения и комбинаций мирицетина с другими антиоксидантами и противоэпилептическими средствами.

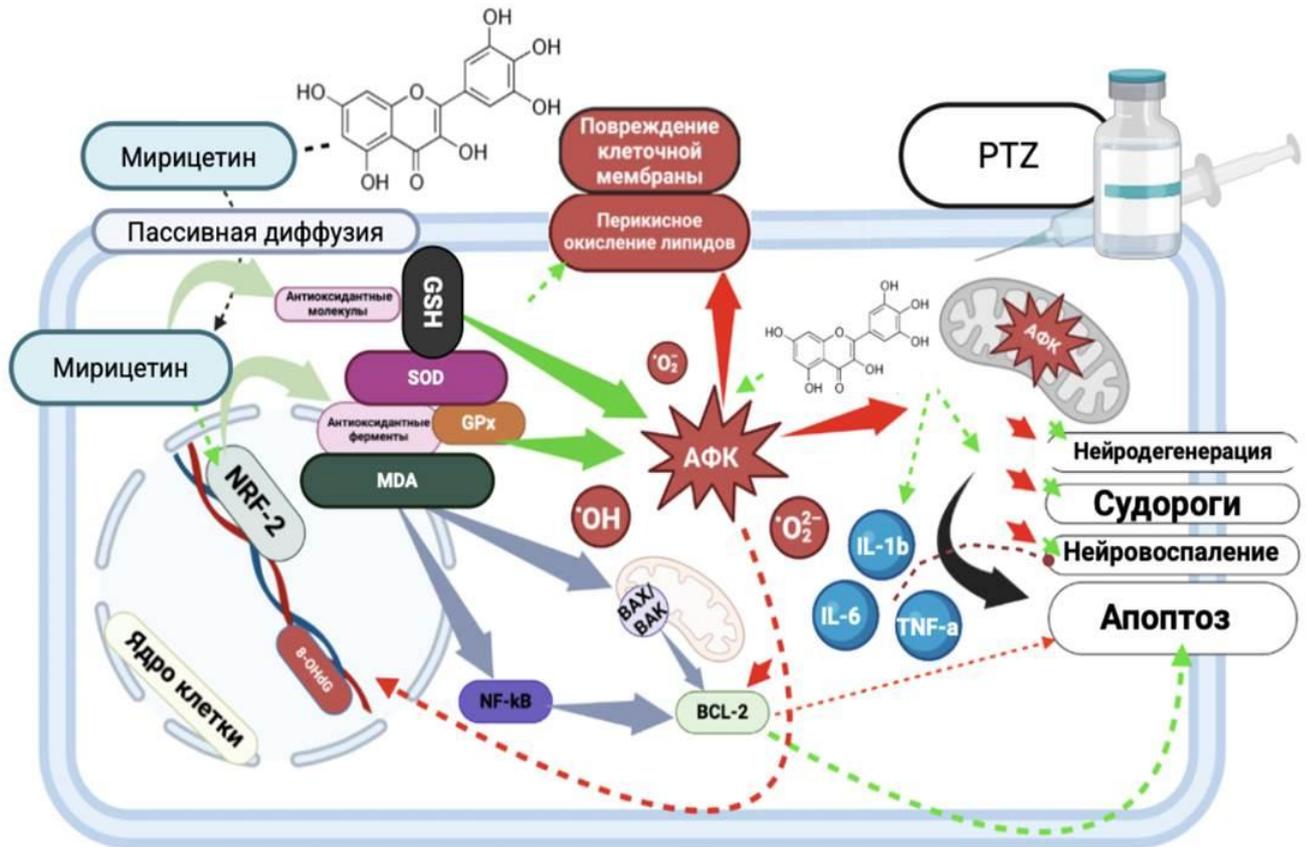


Рисунок 4.1. – Схема молекулярно-клеточного действия мирицетина при PTZ-индуцированных судорогах: механизмы антиоксидантной и противовоспалительной активности. Красные стрелки – указывают на процессы клеточного повреждения, активации сигнальных путей апоптоза и индукции нейровоспаления. Зеленые стрелки – обозначают защитные механизмы мирицетина. АФК – активные формы кислорода, SOD (англ. superoxide dismutase) – супероксиддисмутаза, GPx (англ. glutathione peroxidase) – глутатионпероксидаза, NRF-2 (англ. nuclear factor Erythroid 2-Related factor 2) – ядерный фактор, ассоциированный с эритроидным фактором 2 (NRF-2), NF-kB – транскрипционный ядерный фактор-kB, BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) – белок В-клеточной лимфомы 2, BAX/BAK (Bcl-2-Associated X Protein / Bcl-2 antagonist killer) – белки, регулирующие апоптоз (BAX/BAK)

Дополнительные исследования позволят глубже понять механизмы его действия и подтвердить его эффективность в клинической практике. В перспективе мирицетин может быть включен в терапевтические протоколы для лечения эпилепсии, что поможет улучшить результаты терапии и минимизировать побочные эффекты длительного приема противоэпилептических препаратов.

### **Итоги выполнения диссертационной работы**

В настоящее время нейропротекторные свойства мирицетина, а также его влияние на механизмы клеточной гибели и восстановление нейронов при судорогах различного генеза и, в первую очередь, при эпилепсии, остаются недостаточно изученными. Одной из ключевых задач современной неврологии и фармакологии является разработка экспериментальных моделей на животных для изучения патогенетических механизмов эпилепсии и поиска эффективных терапевтических средств с минимальными побочными эффектами. Несмотря на существующие данные о применении других антиоксидантов и нейропротекторов при эпилепсии, мирицетин представляет собой перспективное направление из-за малого количества сопутствующих побочных явлений, требующее более глубокого изучения.

Изучение воздействия мирицетина на центральную нервную систему в условиях PTZ-индуцированных судорог остается актуальной темой для научных исследований. Настоящее диссертационное исследование позволяет не только раскрыть механизмы нейропротекторного действия мирицетина, но и предложить новые подходы к профилактике и лечению эпилептических состояний, а также оптимизировать дозы и режимы применения этого соединения.

Проведенная комплексная работа продемонстрировала значительное снижение уровня оксидативного стресса, воспалительных реакций и апоптоза нейронов при введении мирицетина в условиях PTZ-индуцированных судорог. Морфологические и иммуногистохимические исследования показали, что мирицетин способствует сохранению клеточной структуры гиппокампа, снижению

числа поврежденных и апоптотических нейронов, что подтверждает его нейропротекторные свойства.

Таким образом, мирицетин проявляет выраженные нейропротекторные и антиоксидантные эффекты в условиях PTZ-индуцированных судорог, что делает его перспективным кандидатом для использования в терапии эпилепсии. Эти данные подчеркивают необходимость дальнейших исследований для оптимизации условий применения мирицетина в качестве терапевтического агента, что может стать основой для его включения в клинические рекомендации по лечению эпилептических судорог.

## ВЫВОДЫ

1. Превентивное введение мирицетина (200 мг/кг, перорально) в течение 5 дней до введения PTZ в дозе 45 мг/кг для индукции судорог, снижает у мышей выраженность нарушений сенсомоторных функций, двигательной координации, общей двигательной активности и когнитивных функций.

2. Превентивное введение мирицетина (200 мг/кг, перорально) в течение 5 дней до введения PTZ в дозе 45 мг/кг, сохраняет баланс уровней ключевых маркеров системы перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (на 3 сутки –  $7,2 \pm 2,1$  нмоль/мг;  $p < 0,05$ ) и антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (на 3 сутки –  $1,3 \pm 0,2$  г/мг;  $p < 0,05$ ) и глутатиона (на 3 сутки –  $13,4 \pm 1,24$  нмоль/мг;  $p < 0,05$ ) в ткани головного мозга мышей: связывает активные формы кислорода и продукты пероксидации, активирует продукцию ферментов эндогенной антиоксидантной защиты.

3. Мирицетин (200 мг/кг, 5 дней) поддерживает относительно нормальную концентрацию провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$  ( $28,7 \pm 5,2$  пг/мл;  $p > 0,05$ ), IL-6 ( $22,4 \pm 4,9$  пг/мл;  $p > 0,05$ ), TNF- $\alpha$  ( $24,3 \pm 5,1$  пг/мл;  $p > 0,05$ ) в системном кровотоке у мышей до появления PTZ-индуцированных судорог, что указывает на его противовоспалительный эффект.

4. Превентивное введение мирицетина (200 мг/кг, перорально) в течение 5 дней до введения PTZ в дозе 45 мг/кг для индукции судорог, снижает количество незрелых нейронов гиппокампа у мышей, что подтверждается уровнем экспрессии и распределением NeuN (1 сутки –  $104,1 \pm 2,2$  кл/мм<sup>2</sup>;  $p > 0,05$ ), близком значениям контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

5. Мирицетин в дозировке 200 мг/кг, в отличие от вольпроевой кислоты, частично предотвращает апоптотическую гибель нейронов гиппокампа по данным оценки уровня экспрессии каспазы-8 (1 сутки –  $44,2 \pm 4,1$  кл/мм<sup>2</sup>;  $p > 0,05$ ).

6. Выявленные гистологические и иммунохимические изменения (NeuN и каспаза-8) в составе нейронов гиппокампа коррелировали с характером поведенческих реакций (коэффициент корреляции Спирмена  $\rho = -0,74$ ,  $p < 0,01$ ):

введение мирицетина обеспечивает баланс концентрации маркеров системы перекисного окисления липидов – малонового диальдегида и антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы и глутатиона в веществе головного мозга, снижает степень нейровоспаления и нейродегенерации в гиппокампе.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Применение мирицетина в неврологической практике может рассматриваться как перспективное средство для снижения оксидативного стресса, уменьшения воспалительного ответа и предотвращения нейрональной гибели в гиппокампе. Целесообразно рассмотреть мирицетин как потенциальный компонент комплексной терапии эпилептических расстройств, направленной на защиту нейронов от повреждений, вызванных оксидативным стрессом и воспалением. Он может быть рекомендован в качестве дополнительного средства наряду с традиционными противосудорожными лекарственными препаратами для улучшения когнитивных и моторных функций у неврологических пациентов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- BAХ – белок, связанный с апоптозом
- BCL-2 – В-клеточная лимфома 2
- CAT – каталаза
- GPx – глутатионпероксидаза
- GSH (англ. Glutathione) – глутатион
- GST – глутатион-S-трансфераза
- ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии-1
- iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота
- MDA (англ. Malondialdehyde) – малоновый диальдегид
- NF-κB – транскрипционный ядерный фактор-κB
- NLRP3 – цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства NALP
- NRF-2 – ядерный фактор, ассоциированный с эритроидным фактором 2
- PTZ (англ. Pentylenetetrazole) – пентилентетразол
- SASP – ассоциированный с клеточным старением секреторный фенотип
- SOD (англ. Superoxide dismutase) – супероксиддисмутаза
- SVCTs – натрий-зависимые транспортеры витамина С
- TGF-β – трансформирующий фактор роста-β
- VCAM – васкулярная молекула клеточной адгезии
- VEGF – васкулярно-эндотелиальный фактор роста
- АФК – активные формы кислорода
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИГХ – иммуногистохимия
- ИЛ – интерлейкин
- ОС – оксидативный стресс
- ПЭП – противозPILEПТИЧЕСКИЙ препарат
- РФА – реактивные формы азота
- ФНО-α – фактор некроза опухоли-α

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Нейротоксическое действие  $\beta$ -амилоида сопровождается изменением митохондриальной динамики и аутофагии нейронов и клеток церебрального эндотелия в экспериментальной модели болезни Альцгеймера / А. С. Аверчук, М. В. Рязанова, Т. И. Баранич [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 175, № 3. – С. 291-297.
2. Балакирева Е.А. О применении леветирацетама при эпилепсии у детей / Е.А. Балакирева, А.Ф. Неретина // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90, № 5. – С. 641-644.
3. Белова Ю.А., Рудакова И.Г. Ламотриджин в практике взрослого epileптолога. *Consilium Medicum*. 2018; 20 (2): 142–144.
4. Берестовицкая В., Васильева О., Остроглядов Е., Дубовцева Е. Производные глутаминовой кислоты: способы получения и биологическая активность. *Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена*. 2004;(8):160-178.
5. Эпилептические синдромы, ассоциированные со снижением слуха / С. Г. Бурд, А. В. Лебедева, Ю. В. Рублева [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2023. – Т. 123, № 1. – С. 28-33.
6. Власов П.Н., Червяков А.В., Дрожжина Г.Р., Антонюк М.В., Орехова Н.В., Гнездицкий В.В., Носкова Т.Ю., Федин П.А. Дерезализационные расстройства при эпилепсии // *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*, vol. – 3, № 4. – 2011, С. 14–21.
7. Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Романова Н.А., Серегин Ю.А. Роль фактора некроза опухолей-альфа в иммунопатогенезе заболеваний различной этиологии и его значимость в развитии антицитокиновой терапии моноклональными антителами // *Медицинская иммунология*. – 2018. – Т. 20, № 6. – С. 797–806.
8. Горохов, К. Р. Патоморфологические особенности воспаления червеобразного отростка у детей с COVID-19: автореферат диссертации на

соискание ученой степени кандидата медицинских наук / К. Р. Горохов. – Москва, 2025. – 24 с.

9. Давыдова О.Н., Болдырев А.А. Глутаматные рецепторы в клетках нервной и иммунной систем // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2007, № 4., С. 28–34.

10. Демяшкин Г.А., Григорян М.С., Ветров И.В., Ветров Ф.В., Раужева В.П., Зорин И.А., Шаповалова Е.Ю. Особенности нейрональной потери в гиппокампе при остром генерализованном припадке (экспериментальное исследование) // *Медицинский академический журнал*. – 2023. – Т. 23, № 2. – С. 75–85.

11. Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю., Григорян М.С., Зорин И.А. Особенность экспрессии каспазы-3 в гиппокампе при моделировании острого эпилептического припадка // *Морфологические ведомости*. – 2023. – Т. 31, № 2. – С. 77–81.

12. Демяшкин, Г. А. Морфологический анализ сперматогенеза – основа диагностики мужского идиопатического бесплодия (иммуногистохимический аспект): специальность 14.03.02 «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2017. – 142 с.

13. Демяшкин, Г. А. Сперматогенез: внутригонадные механизмы регуляции, их нарушения в модели локального  $\beta$ -облучения семенников, реабилитация экзогенными факторами роста тромбоцитов: специальность 1.5.22. «Клеточная биология», 3.3.2. «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2023. – 266 с.

14. Есин Р.Г., Есин О.Р., Хакимова А.Р. Эффективная нейро- и органопротекция - активация эндогенных механизмов саногенеза // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*, vol. – 12, № 3. – 2020, С. 123–127.

15. Коболев Е.В., Десятский В.В., Годлевский Л.С., Мустяца В.Ф., Дроздова Г.А. Изменения функциональной активности лимфоцитов у

киндлинговых крыс и эффекты пентоксифиллина // Вестник Российского университета дружбы народов. – Серия: Медицина, № 2. – 2010, С. 5–9.

16. Куликов, В. П. Потенцирование гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими нейропротекторами / В. П. Куликов, Л. А. Каланова, П. П. Трегуб // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 21-25.

17. Мухин К.Ю., Тысячина М.Д., Петрухин А.С. Леветирацетам в лечении юношеской миоклонической эпилепсии (предварительные результаты) // Русский журнал детской неврологии, по. – 1. – 2009, С. 3–11.

18. Пугачева, Е. Н. Морфологические особенности овофолликулогенеза после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Е.Н. Пугачева. – Москва, 2025. – 24 с.

19. Изменение популяции незрелых нейронов пириформной коры экспериментальных животных в отдаленном периоде после стресса раннего периода жизни / А. Б. Салмина, Ю. А. Успенская, Ю. А. Панина [и др.] // Цитология. – 2023. – Т. 65, № 2. – С. 206-214.

20. Саранцева, Е. И. Молекулярные механизмы звукового открытия гематоэнцефалического барьера у грызунов / Е. И. Саранцева, Т. Д. Искра, О. В. Семячкина-Глушковская // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2023. – Т. 23, № 1. – С. 94-103.

21. Семячкина-Глушковская, О. В. Фотостимуляция лимфатического вывода  $\beta$ -амилоида из мозга мыши: новая стратегия терапии болезни Альцгеймера / О. В. Семячкина-Глушковская, Е. И. Саранцева, Т. Д. Искра // Естественные науки. – 2024. – № 3(16). – С. 4-20.

22. Якименко, В. А. Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / В.А. Якименко. – Москва, 2025. – 24 с.

23. Hif-1 – альтернативные сигнальные механизмы активации и формирования толерантности к гипоксии/ишемии / П. П. Трегуб, В. П. Куликов, Н. А. Малиновская [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Т. 63, № 4. – С. 115-122.

24. Ханухова, Л. М. Показатели времени реакции для оценки когнитивных функций / Л. М. Ханухова, С. А. Гуляев, Д. М. Ханухов // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2025. – Т. 75, № 1. – С. 3-14.

25. Реабилитационные потребности пациентов с фармакорезистентной эпилепсией нейрохирургического профиля с позиции биопсихосоциальной концепции / Д. Ю. Шалыгин, Е. Н. Лебедева, А. Г. Михеева [и др.] // Российский нейрохирургический журнал имени профессора А.Л. Поленова. – 2025. – Т. 17, № 2. – С. 111-119..

26. Alachkar, A., Ojha, S., Sadeq, A., et al. Experimental models for discovery of novel anticonvulsant drugs: Focus on Pentylenetetrazole-induced seizures and associated memory deficits. // Current Pharmaceutical Design, vol. – 2020. – P. 1155–1166.

27. Amiet, C., Gourfinkel-An, I., Bouzamondo, A., et al. Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and gender: evidence from a meta-analysis. // Biological Psychiatry, vol. – 2008. – P. 577–582.

28. Arabadzisz, D., Antal, K., Parpan, F., Emri, Z., and Fritschy, J.M. Epileptogenesis and chronic seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy are associated with distinct EEG patterns and selective neurochemical alterations in the contralateral hippocampus. // Experimental Neurology, vol. – 2005. – P. 76–90.

29. Aroniadou-Anderjaska, V., Fritsch, B., Qashu, F., and Braga, M.F. Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy.. // Epilepsy Research, vol. – 2008. – P. 102–116.

30. Ahmad, N., Hui-Yin, Y., and Makmor-Bakry, M. Mechanisms of natural products as potential antiepileptic drugs. // Pakistani Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. – 2022. – P. 1043–1053.

31. Bai, Y.; Liu, X.; Chen, Q.; Chen, T.; Jiang, N.; Guo, Z. Myricetin ameliorates ox-LDL-induced HUVECs apoptosis and inflammation via lncRNA GAS5 upregulating the expression of miR-29a-3p. // *Sci.* – 2021.
32. Baram TZ, Eghbal-Ahmadi M, Bender RA. Is neuronal death required for seizure-induced epileptogenesis in the immature brain? *Prog Brain Res.* 2002;135:365-75. doi: 10.1016/S0079-6123(02)35033-7. PMID: 12143355; PMCID: PMC3084550
33. Berg, A.T. Identification of pharmaco-resistant epilepsy.// *Neurologic Clinics*, vol. – 2009. – P. 1003–1013.
34. Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. // *Epilepsia*, vol. – 2010. – P. 676–685.
35. Bahrayni Toosi, M.T., Kasiri, A., Torabinejad, S., et al. Preliminary Results of the Effects of Localized High-Dose Radiotherapy Combined with Total Body Low-Dose Irradiation on Tumor Growth and Stimulating the Immune System in Tumor-Bearing Mice. // *Journal of Biomedical Physics and Engineering*, vol. – 2023. – P. 323–332.
36. Bazhanova, E.D., Kozlov, A.A., and Sokolova, Y.O. Etiopathogenetic mechanisms of epilepsy and comparative characteristics of audiogenic epilepsy experimental models.// *Epilepsy and Paroxysmal Conditions*, vol. – 2023. – P. 372–383.
37. Beesley, S., Sullenberger, T., Lee, C., and Kumar, S.S. GluN3 subunit expression correlates with increased vulnerability of hippocampus and entorhinal cortex to neurodegeneration in a model of temporal lobe epilepsy.. // *Journal of Neurophysiology*, vol. – 2022. – P. 1496–1510.
38. Beghi, E., Giussani, G., and Sander, J.W. The natural history and prognosis of epilepsy. // *Epileptic Disorders*, vol. – 2015. – P. 243–253.
39. Beghi, E., Giussani, G., and Sander, J.W. The natural history and prognosis of epilepsy. // *Epileptic Disorders*, vol. – 2015. – P. 243–253.
40. Berg, A.T. Identification of pharmaco-resistant epilepsy.// *Neurologic Clinics*, vol. – 2009. – P. 1003–1013.

41. Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. // *Epilepsia*, vol. – 2010. – P. 676–685.
42. Blair, R.E., Sombati, S., Lawrence, D.C., et al. Epileptogenesis causes acute and chronic increases in GABAA receptor endocytosis that contributes to the induction and maintenance of seizures in the hippocampal culture model of acquired epilepsy.. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. – 2004. – P. 871–880.
43. Boriero, D., Carcereri de Prati, A., Antonini, L., Ragno, R., Sohji, K., Mariotto, S., Butturini, E. The anti-STAT1 polyphenol myricetin inhibits M1 microglia activation and counteracts neuronal death. // *FEBS Journal*, vol, 288, no. – 2021. – P. 2347–2359.
44. Bouet, V., Boulouard, M., Toutain, J., et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. // *Nature Protocols*, vol. – 2009. – P. 1560–1564.
45. Broz, P., Pelegrín, P., and Shao, F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. // *Nature Reviews Immunology*, vol. – 2020. – P. 143–157.
46. Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. // *Nat Rev Immunol.* – 2020. – Vol. 20, no. 3. – P. 143–157.
47. Bruxel, E.M., do Canto, A.M., Bruno, D.C.F., et al. Multi-omic strategies applied to the study of pharmacoresistance in mesial temporal lobe epilepsy. // *Epilepsia Open*, vol. – 2022.
48. Cavanna, A.E., and Monaco, F. Brain mechanisms of altered conscious states during epileptic seizures. // *Nature Reviews Neurology*, vol. – 2009. – P. 267–276.
49. Caiment, F., Wolters, J., Smit, E., et al. Valproic acid promotes mitochondrial dysfunction in primary human hepatocytes in vitro; impact of C/EBP $\alpha$ -controlled gene expression. // *Archives of Toxicology*, vol. – 2020. – P. 3463–3473.
50. Çela, E., McFarlan, A., Chung, A., et al. An Optogenetic Kindling Model of Neocortical Epilepsy. // *Scientific Reports*, vol. – 2019.

51. Cendes, F., Sakamoto, A.C., Spreafico, R., Bingaman, W., and Becker, A.J. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. // *Acta Neuropathologica*, vol. – 2014. – P. 21–37.
52. Chen, S., Xu, D., Fan, L., Fang, Z., Wang, X., and Li, M. Roles of N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDARs) in Epilepsy. // *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. – 2022. – Article 797253.
53. Czapiński, P., Błaszczuk, B., & Czuczwar, S. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2005. – Vol. 5, no. 1. – P. 3–14.
54. Deidda, G., Bozarth, I.F., and Cancedda, L. Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. – 2014. – Article 119.
55. Demyashkin, G.; Blinova, E.; Grigoryan, M.; Parshenkov, M.; Skovorodko, P.; Ius, V.; Lebed, A.; Shegay, P.; Kaprin, A. Neuroprotective Effects of Myricetin on PTZ-Induced Seizures in Mice: Evaluation of Oxidation, Neuroinflammation and Metabolism, and Apoptosis in the Hippocampus. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2024, 46, 8914–8944.
56. de Melo, A.D.; Freire, V.A.F.; Diogo, Í.L.; Santos, H.L.; Barbosa, L.A.; de Carvalho, L.E.D. Antioxidant Therapy Reduces Oxidative Stress, Restores Na,K-ATPase Function and Induces Neuroprotection in Rodent Models of Seizure and Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. // *Antioxidants*. – 2023.
57. Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N.C., and Rogawski, M.A. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. // *Trends in Neurosciences*, vol. – 2013. – P. 174–184.
58. Di, S., Jiang, Z., Wang, S., et al. Labile Calcium-Permeable AMPA Receptors Constitute New Glutamate Synapses Formed in Hypothalamic Neuroendocrine Cells during Salt Loading. // *eNeuro*, vol. – 2019. – Article ENEURO.0112.

59. Díaz, F., Aguilar, F., Wellmann, M., et al. Enhanced Astrocyte Activity and Excitatory Synaptic Function in the Hippocampus of Pentylentetrazole Kindling Model of Epilepsy. // *International Journal of Molecular Sciences*, vol. – 2023. – Article 14506.
60. Dodds, L., Whitehead, E., Joseph, K.S., et al. Relation of pregnancy and neonatal factors to subsequent development of childhood epilepsy: a population-based cohort study. // *Pediatrics*, vol. – 2006. – P. 1298–1306.
61. Drion, C.M., van Scheppingen, J., Arena, A., et al. Effects of rapamycin and curcumin on inflammation and oxidative stress in vitro and in vivo - in search of potential anti-epileptogenic strategies for temporal lobe epilepsy // *Journal of Neuroinflammation*, vol. – 2018. – Article 212.
62. Engel, T., and Henshall, D.C. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? // *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, vol. – 2009. – P. 97–115.
63. Estacion, M., O'Brien, J.E., Conravey, A., et al. A novel de novo mutation of SCN8A (Nav1.6) with enhanced channel activation in a child with epileptic encephalopathy. // *Neurobiology of Disease*, vol. – 2014. – P. 117–123.
64. Folbergrová, J., Ješina, P., Kubová, H., Druga, R., and Otáhal, J. Status Epilepticus in Immature Rats Is Associated with Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. – 2016. – Article 136.
65. Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. // *Epilepsia*, vol. – 2017. – P. 522–530.
66. Franklin, J.L. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. // *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. – 2011. – P. 1437–1448.
67. Hammer, M.F., Ishii, A., Johnstone, L., et al. Rare variants of small effect size in neuronal excitability genes influence clinical outcome in Japanese cases of SCN1A truncation-positive Dravet syndrome. // *PLoS One*, vol. – 2017. – Article e0180485.
68. Hassan, S.M.; Khalaf, M.M.; Sadek, S.A.; Abo-Youssef, A.M. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. // *Pharm.* – 2017.

69. He LY, Hu MB, Li RL, et al. Natural Medicines for the Treatment of Epilepsy: Bioactive Components, Pharmacology and Mechanism. // *Front Pharmacol.* – 2021.
70. Henshall, D.C. Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy. // *Biochemical Society Transactions*, vol. – 2007. – P. 421–423.
71. Henshall, D., and Simon, R. Epilepsy and Apoptosis Pathways. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. – 2005. – P. 1557–1572.
72. Ignacio-Mejía, I., Contreras-García, I.J., Pichardo-Macías, L.A., et al. Effect of Levetiracetam on Oxidant-Antioxidant Activity during Long-Term Temporal Lobe Epilepsy in Rats. // *International Journal of Molecular Sciences*, vol. – 2024. – Article 9313.
73. Imran M, Saeed F, Hussain G, Imran A, Mehmood Z, Gondal TA, El-Ghorab A, Ahmad I, Pezzani R, Arshad MU, Bacha U, Shariarti MA, Rauf A, Muhammad N, Shah ZA, Zengin G, Islam S. Myricetin: A comprehensive review on its biological potentials. *Food Sci Nutr.* 2021 Aug 11;9(10):5854-5868. doi: 10.1002/fsn3.2513. PMID: 34646551; PMCID: PMC8498061
74. Jain S, Agarwal NB, Mediratta PK, Sharma KK. Evaluation of anticonvulsant and nootropic effect of ondansetron in mice. *Hum Exp Toxicol.* 2012 Sep;31(9):905-12. doi: 10.1177/0960327112436406. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22354082
75. Jalilifar, M., Yadollahpour, A., Moazedi, A.A., and Ghotbeddin, Z. Low Frequency Electrical Stimulation Either Prior to Or after Rapid Kindling Stimulation Inhibits the Kindling-Induced Epileptogenesis. // *BioMed Research International*, vol. – 2017. – Article 8623743.
76. Kamal, F.Z., Lefter, R., Jaber, H., et al. The Role of Potential Oxidative Biomarkers in the Prognosis of Acute Ischemic Stroke and the Exploration of Antioxidants as Possible Preventive and Treatment Options. // *International Journal of Molecular Sciences*, vol. – 2023. – Article 6389.

77. Kamasak, T.; Dilber, B.; Yaman, S.Ö.; Durgut, B.D.; Kurt, T.; Çoban, E.; Arslan, E.A.; Şahin, S.; Karahan, S.C.; Cansu, A. HMGB-1, TLR4, IL-1R1, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ : Novel epilepsy markers? *Epileptic Disord.* 2020, 22, 183–193.
78. Kamal FZ, Lefter R, Jaber H, Balmus IM, Ciobica A, Iordache AC. The Role of Potential Oxidative Biomarkers in the Prognosis of Acute Ischemic Stroke and the Exploration of Antioxidants as Possible Preventive and Treatment Options. // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24(7). – P. 6389.
79. Kanyshkova, T., Ehling, P., Cerina, M., et al. Regionally specific expression of high-voltage-activated calcium channels in thalamic nuclei of epileptic and non-epileptic rats. // *Molecular and Cellular Neuroscience.* – 2014. – P. 110–122.
80. Keränen, T., and Sivenius, J. Side effects of carbamazepine, valproate and clonazepam during long-term treatment of epilepsy. // *Acta Neurologica Scandinavica Supplementum*, vol. – 1983. – P. 69–80.
81. Khodayar, M.J.; Kalantari, H.; Khorsandi, L.; Ahangar, N.; Samimi, A.; Alidadi, H. Taurine attenuates Valproic acid-induced hepatotoxicity via modulation of RIPK1/RIPK3/MLKL-mediated necroptosis signaling in mice. // *Mol.* – 2021.
82. Kullmann, D.M. What's wrong with the amygdala in temporal lobe epilepsy? // *Brain*, vol. – 2011. – P. 2800–2801.
83. Kunz, W.S., Kudin, A.P., Vielhaber, S., et al. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. // *Annals of Neurology*, vol. – 2000. – P. 766–773.
84. Lee CJ, Lee SH, Kang BS, et al. Effects of L-Type Voltage-Gated Calcium Channel (LTCC) Inhibition on Hippocampal Neuronal Death after Pilocarpine-Induced Seizure. // *Antioxidants (Basel).* – 2024. – Vol. 13(4). – P. 389.
85. Liotta, A., Lorocho, S., Wallach, I., et al. Metabolic Adaptation in Epilepsy: From Acute Response to Chronic Impairment. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2024.
86. Lipatova, L.V. Principles of treatment of epilepsy in elderly patients. // *S.* – 2013. – Vol. 113, no. 4. – P. 52–57.

87. Liu J, Yu Z, Maimaiti B, Meng Q, Meng H. The Potential Role of Polyamines in Epilepsy and Epilepsy-Related Pathophysiological Changes. // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12(11). – P. 1596. – 2022.
88. Lopim, G.M., Campos, D.V., da Silva, S.G., et al. Relationship between seizure frequency and number of neuronal and non-neuronal cells in the hippocampus throughout the life of rats with epilepsy. // *Brain Research*, vol. – 1634. – P. 179–186.
89. López González, F.J., Rodríguez Osorio, X., Gil-Nagel Rein, A., et al. Drug-resistant epilepsy: definition and treatment alternatives. // *Neurología*. – 2015. – P. 439–446.
90. Löscher, W., Hönack, D., Fassbender, C., & Nolting, B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. // *III*. – 1991. – P. 1016.
91. Liu, J., Yu, Z., Maimaiti, B., Meng, Q., and Meng, H. The Potential Role of Polyamines in Epilepsy and Epilepsy-Related Pathophysiological Changes. // *Biomolecules*. – 2022.
92. Lu, Z.; Teng, Y.; Wang, L.; Jiang, Y.; Li, T.; Chen, S.; Wang, B.; Li, Y.; Yang, J.; Wu, X.; et al. Abnormalities of hippocampus a frontal lobes in heart failure patients and animal models with cognitive impairment or depression: A systematic review // *PLoS ONE*. – 2022. – Vol. 17. – P. e0278398.
93. Mátyás, A., Borbély, E., Mihály, A. Hippocampal Sclerosis in Pilocarpine Epilepsy: Survival of Peptide-Containing Neurons and Learning and Memory Disturbances in the Adult NMRI Strain Mouse. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – vol. 204.
94. Mao XY, Zhou HH, Jin WL. Redox-Related Neuronal Death and Crosstalk as Drug Targets: Focus on Epilepsy. // *Front Neurosci*. – 2019. – Vol. 13. – P. 512.
95. Mareš, P., and Mikulecká, A. Different effects of two N-methyl-d-aspartate receptor antagonists on seizures, spontaneous behavior, and motor performance in immature rats. // *Epilepsy & Behavior*. – 2009. – P. 32–39.

96. Mele, M., Costa, R.O., and Duarte, C.B. Alterations in GABAA-Receptor Trafficking and Synaptic Dysfunction in Brain Disorders. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2019. – Vol.77.
97. McIntyre, D., Kelly, M., and Dufresne, C. FAST and SLOW amygdala kindling rat strains: comparison of amygdala, hippocampal, piriform and perirhinal cortex kindling. // *Epilepsy Research*. – 1999. – P. 197–209.
98. McNamara, J. Kindling: An animal model of complex partial epilepsy. // *Annals of Neurology*, vol. – 1984. – P. 211–224.
99. Monteiro ÁB, Alves AF, Ribeiro Portela AC, Oliveira Pires HF, Pessoa de Melo M, Medeiros Vilar Barbosa NM, Bezerra Felipe CF. Pentylentetrazole: A review. *Neurochem Int*. 2024 Nov;180:105841. doi: 10.1016/j.neuint.2024.105841. Epub 2024 Aug 28. PMID: 39214154
100. Moorthi, P., Premkumar, P., Priyanka, R., Jayachandran, K.S., and Anusuyadevi, M. Pathological changes in hippocampal neuronal circuits underlie age-associated neurodegeneration and memory loss: positive clue toward SAD. // *Neuroscience*. – 2015. – P. 90–105.
101. Morales, J., Álvarez-Ferradas, C., Roncagliolo, M., Fuenzalida, M., Wellmann, M., Nualart, F., and Bonansco, C. A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2014. – Vol. 200
102. Mudò, G., Jiang, X.H., Timmusk, T., Bindoni, M., and Belluardo, N. Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine. // *Epilepsia*. – 1996. – P. 198–207.
103. Muller, C.J., Bankstahl, M., Gröticke, I., et al. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. // *European Journal of Pharmacology*. – 2009. – P. 15–24.
104. Müller, C.J., Bankstahl, M., Gröticke, I., and Löscher, W. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of

spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage.. // *European Journal of Pharmacology*. – 2009. – P. 15–24.

105. Olah, V.J., Goettemoeller, A.M., Rayaprolu, S., et al. Biophysical Kv3 channel alterations dampen excitability of cortical PV interneurons and contribute to network hyperexcitability in early Alzheimer's. // *Elife*. – 2022. – P. e75316.

106. Patel M, Liang LP, Roberts LJ 2nd. Enhanced hippocampal F2-isoprostane formation following kainate-induced seizures. // *J Neurochem*. – 2001. – Vol. 79, no. 5. – P. 1065–1069.

107. Park, K.M., Kim, J.E., Choi, I.Y., and Cho, K.O. Assessment of Memory Function in Pilocarpine-induced Epileptic Mice. // *Journal of Visualized Experiments*. – 2020. – P. 60751.

108. Pavlova, T., Stepanichev, M., and Gulyaeva, N. Pentylentetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. // *Neuroscience Letters*. – 2006. – P. 154–158.

109. Petrillo S, Pietrafusa N, Trivisano M, et al. Imbalance of Systemic Redox Biomarkers in Children with Epilepsy: Role of Ferroptosis. // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10(8). – P. 1267.

110. Pirker, S., Schwarzer, C., Czech, T., et al. Increased expression of GABA(A) receptor beta-subunits in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 2003. – P. 820–834.

111. Pieper NT, Grossi CM, Chan WY, et al. Anticholinergic drugs and incident dementia, mild cognitive impairment and cognitive decline: a meta-analysis. // *Age Ageing*. – 2020. – Vol. 49, no. 6. – P. 939–947.

112. Rawat, V., Eastman, C.L., Amaradhi, R., et al. Temporal Expression of Neuroinflammatory and Oxidative Stress Markers and Prostaglandin E2 Receptor EP2 Antagonist Effect in a Rat Model of Epileptogenesis. // *ACS Pharmacology & Translational Science*. – 2022. – P. 128–138.

113. Raza, M., Blair, R.E., Sombati, S., et al. Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogenesis cause

acquired epilepsy. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – P. 17522–17527.

114. Rodin, E., Rodin, M., and Lavine, L. Electroclinical and ultrastructural changes associated with subconvulsant doses of pentylenetetrazol.. // Experimental Neurology. – 1979. – P. 386–400.

115. Rosenmund, C., Feltz, A., and Westbrook, G.L. Calcium-dependent inactivation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. // Journal of Neurophysiology. – 1995. – P. 427–430.

116. Rusina E, Bernard C, Williamson A. The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. eNeuro. 2021 Apr 9;8(2):ENEURO.0337-20.2021.

117. Safiri, S., and Ashrafi-Asgarabad, A. The risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in new users of antiepileptic drugs: Comment on data sparsity. // Epilepsia. – 2018. – P. 1083–1084.

118. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – Vol. 5(4). – P. a008714.

119. Sattler, R., and Tymianski, M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. // Molecular Neurobiology. – 2001. – P. 107–129.

120. Scharfman, H.E. the CA3 ‘backprojection’ to the dentate gyrus. // Progress in Brain Research. – 2007. – P. 627–637.

121. Schartz ND, Herr SA, Madsen L, et al. Spatiotemporal profile of Map2 and microglial changes in the hippocampal CA1 region following pilocarpine-induced status epilepticus. // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 24988.

122. Schousboe, A., Bak, L.K., and Waagepetersen, H.S. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. // Frontiers in Endocrinology. – 2013. – Vol. 102.

123. Semple, B.D., Dill, L.K., and O’Brien, T.J. Immune Challenges and Seizures: How Do Early Life Insults Influence Epileptogenesis? // Frontiers in Pharmacology. – 2020. – Vol.2

124. Shimada T, Yamagata K. Pentylenetetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *J Vis Exp*. 2018 Jun 12;(136):56573.
125. Smolders, I., Khan, G.M., Manil, J., Ebinger, G., and Michotte, Y. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. // *British Journal of Pharmacology*. – 1997. – P. 1171–1179.
126. Strasser, L., Downes, M., Kung, J., Cross, J.H., and De Haan, M. Prevalence and risk factors for autism spectrum disorder in epilepsy: a systematic review and meta-analysis. // *Developmental Medicine & Child Neurology*. – 2018. – P. 19–29.
127. Striano P, Belcastro V, Coppola A, Minetti C, Striano S. Antiepileptic Drugs Under Investigation for Treatment of Focal Epilepsy. // *Clin Neuropharmacol*. – 2016. – Vol. 39, no. 6. – P. 281–287.
128. Sun, Z., Meng, F., Tu, L., and Sun, L. Myricetin attenuates the severity of seizures and neuroapoptosis in pentylenetetrazole kindled mice by regulating the BDNF-TrkB signaling pathway and modulating matrix metalloproteinase-9 and GABAA. // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2019. – P. 3083–3091.
129. Tescarollo, F.C., Valdivia, D., Chen, S., and Sun, H. Unilateral optogenetic kindling of hippocampus leads to more severe impairments of the inhibitory signaling in the contralateral hippocampus. // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2023. – Article 1268311.
130. Tolö, J., Taschenberger, G., Leite, K., et al. Pathophysiological Consequences of Neuronal  $\alpha$ -Synuclein Overexpression: Impacts on Ion Homeostasis, Stress Signaling, Mitochondrial Integrity, and Electrical Activity. // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2018. – Vol. 49.
131. Upadhyya, D., Kodali, M., Gitai, D., et al. A Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy Presenting Constantly Rhythmic and Robust Spontaneous Seizures, Comorbidities and Hippocampal Neuropathology. // *Aging and Disease*. – 2019. – P. 915–936.
132. Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy Behav*. 2019 Jun;95:51-55.

133. Vicario, M., Cieri, D., Brini, M., and Cali, T. The Close Encounter Between Alpha-Synuclein and Mitochondria. // *Frontiers in Neuroscience*. – 2018. – Article 388.
134. Vidaurre J, Herbst J. Nuevos fármacos antiepilépticos [New antiepileptic drugs]. // *Medicina (B Aires)*. – 2019.
135. Vorhees, C.V., and Williams, M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. // *Nature Protocols*. – 2006. – P. 848–857.
136. Walsh, S., Donnan, J., Fortin, Y., et al. A systematic review of the risks factors associated with the onset and natural progression of epilepsy. // *Neurotoxicology*. – 2017. – P. 64–77.
137. Wang, C., and Youle, R.J. The role of mitochondria in apoptosis. // *Annual Review of Genetics*. – 2009. – P. 95–118.
138. Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., et al. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. // *Science*, vol. – 5395. – P. 1890–1893.
139. Wang, Y., and Qin, Z.H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. // *Apoptosis*. – 2010. – P. 1382–1402.
140. Webster, K.M., Sun, M., Crack, P., O'Brien, T.J., Shultz, S.R., and Semple, B.D. Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury.. // *Journal of Neuroinflammation*. – 2017. – Article 10.
141. Whitehead, E., Dodds, L., Joseph, K.S., et al. Relation of pregnancy and neonatal factors to subsequent development of childhood epilepsy: a population-based cohort study. // *Pediatrics*. – 2006. – P. 1298–1306.
142. Wu, Y., Wei, H., Li, P., Zhao, H., Li, R., and Yang, F. Quercetin Administration Following Hypoxia-Induced Neonatal Brain Damage Attenuates Later-Life Seizure Susceptibility and Anxiety-Related Behavior: Modulating Inflammatory Response. // *Frontiers in Pediatrics*. – 2022. – P. 791815.
143. Wyatt-Johnson SK, Herr SA, Brewster AL. Status Epilepticus Triggers Time-Dependent Alterations in Microglia Abundance and Morphological Phenotypes in the Hippocampus. // *Front Neurol*. – 2017. – Vol. 8:700.

144. Xi-xia, L. An effect study of  $\alpha$ -Asarone on the expression of Bax and Bcl-2 in hippocampal neurons of epilepsy rats. // *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2013.
145. Yang, N., Guan, Q.W., Chen, F.H., Xia, Q.X., Yin, X.X., Zhou, H.H., and Mao, X.Y. Antioxidants Targeting Mitochondrial Oxidative Stress: Promising Neuroprotectants for Epilepsy. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2020.
146. Yuan, Y., Zhao, Y., Shen, M., et al. Spinal NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 $\beta$  release and contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia by regulating NMDA receptor NR1 subunit phosphorylation and GLT-1 expression in rats.. // *Molecular Pain*. – 2022.
147. Zaccara, G., and Perucca, E. Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs. // *Epileptic Disorders*. – 2014. – P. 409–431.
148. Zhang, L., Guo, Y., Hu, H., Wang, J., Liu, Z., and Gao, F. FDG-PET and NeuN-GFAP immunohistochemistry of hippocampus at different phases of the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.. // *International Journal of Medical Sciences*. – 2015. – P. 288–294.
131. Zhang, P., Zou, Q., Liu, J., et al. Status of epilepsy in the tropics: An overlooked perspective. // *Epilepsia Open*. – 2023. – P. 32–45.
149. Zhao, Y., Yuan, Y., Chen, Y., et al. Protective effects of resveratrol on sodium valproate-induced hepatotoxicity in rats. // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2021. – Article 334.
150. Zhao, Y., Yuan, Y., Shen, M., et al. Spinal NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 $\beta$  release and contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia by regulating NMDA receptor NR1 subunit phosphorylation and GLT-1 expression in rats.. // *Molecular Pain*. – 2022.
151. Zou, H., Wen, S., Wang, L., et al. Induction of mitochondrial apoptosis pathway mediated through caspase-8 and c-Jun N-terminal kinase by cadmium-activated Fas in rat cortical neurons. // *Metallomics*. – 2021.

152. Zou, H., Wen, S., Wang, L., et al. Induction of mitochondrial apoptosis pathway mediated through caspase-8 and c-Jun N-terminal kinase by cadmium-activated Fas in rat cortical neurons. // *Metallomics*. – 2021. – vol. 13.