

**ДЕЙСТВИЕ АНАКИНРЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ,
АКТИВИРУЕМЫХ ПЕРОКСИСОМНЫМ ПРОЛИФЕРАТОРОМ В МОЗГЕ
КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2022 г. А. И. Рогинская¹, А. В. Дёмина¹, А. А. Коваленко¹, М. В. Захарова¹,
А. П. Шварц¹, Т. Б. Мелик-Касумов², О. Е. Зубарева^{1, *}

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

²*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

*E-mail: ZubarevaOE@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2022 г.

После доработки 03.03.2022 г.

Принята к публикации 04.03.2022 г.

В последние годы широко обсуждается роль нейровоспаления в механизмах эпилептогенеза. Одним из факторов, влияющих на воспалительные процессы в мозге, может быть изменение экспрессии ядерных транскрипционных факторов, в частности, рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPARs). Агонисты этих рецепторов обладают выраженным нейропротекторным действием в моделях эпилепсии. Исследования, проведенные на клетках различных тканей организма, выявляют тесную функциональную связь, существующую между генами PPARs, провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β (IL-1 β) и противовоспалительного цитокина – антагониста рецепторов интерлейкина 1 (IL-1ra). Целью данной работы явилось изучение особенностей экспрессии генов *Ppara* в структурах мозга крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии и оценка возможного влияния IL-1ra (препарат анакинра) на эти показатели. Пилокарпин вводили крысам Вистар в возрасте 7–8 нед., через сутки после инъекций LiCl. Введение анакинры осуществляли в течение недели после пилокарпина (первая инъекция 100 мкг/кг через час после судорог, далее – 5 дней по 100 мкг/кг и 2 дня по 50 мкг/кг), после чего производился забор образцов мозга для биохимического анализа. Оценку экспрессии генов *Ppara*, *Ppard* и *Pparg* производили методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени в дорзальном и вентральном гиппокампе, височной коре и миндалине. Показано, что пилокарпин-индуцированные судороги приводят к усилению экспрессии генов *Ppard* и *Pparg* в вентральном гиппокампе и снижению экспрессии гена *Ppara* во всех обследованных областях мозга. Анакинра усиливает снижение экспрессии гена *Ppara*, не влияет на продукцию мРНК *Ppard* и нивелирует усиление экспрессии гена *Pparg*. Таким образом, экспрессия генов *Ppara* в мозге меняется в процессе эпилептогенеза, анакинра разнонаправлено регулирует продукцию мРНК *Ppara* и *Pparg*, но не влияет на экспрессию гена *Ppard*.

Ключевые слова: литий-пилокарпиновая модель эпилепсии, рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором, антагонист рецепторов интерлейкина 1, анакинра

DOI: 10.31857/S0869813922040070

Височная эпилепсия является одним из наиболее распространенных и трудно поддающихся лечению неврологических заболеваний [1]. Около трети случаев эпилепсии остаются лекарственно-устойчивыми [2]. Во многом сложности лечения эпилепсии связаны с недостаточной изученностью ее патогенетических механизмов. Наряду с традиционными представлениями, рассматривающими в качестве основного патогенетического механизма эпилепсии нарушение баланса активности возбуждающих (глутаматергических) и тормозных (ГАМК-ергических) систем мозга [3], в последние годы широко обсуждается возможная роль нейровоспаления в развитии эпилептических процессов [4, 5]. Нейровоспаление связано, в частности, с повышенным синтезом в клетках мозга провоспалительных цитокинов – интерлейкина 1β (IL- 1β), интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли α (TNF α) [6]. Роль провоспалительных цитокинов в развитии психоневрологических нарушений в экспериментальных моделях эпилепсии была доказана, в том числе с помощью введений антагониста рецепторов интерлейкина-1 (препарат анакинра, аналог эндогенного белка IL-1ra) [7–9]. Негативное действие провоспалительных цитокинов в мозге ограничивается рядом нейропротекторных механизмов, один из которых связан с активацией рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPARs) [10].

PPARs – это ядерные транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию целого ряда генов, участвующих в обмене углеводов и липидов, и других процессах, включая клеточную дифференцировку и апоптоз [11–13]. Семейство PPARs включает три типа рецепторов: PPAR α , PPAR β и PPAR γ , экспрессия которых выявлена в различных клетках организма, включая клетки центральной нервной системы [14]. Несмотря на то, что отдельные виды PPARs отличаются друг от друга по распределению в различных тканях, некоторой специфичности лигандов и физиологическим функциям [15], общим для них является участие в регуляции воспалительных процессов [16, 17]. Предполагается, что именно с противовоспалительным действием во многом связаны нейропротекторные свойства агонистов PPARs, показанные в различных моделях эпилепсии, включая литий-пилокарпиновую модель [18–21]. При этом особенности экспрессии генов PPARs при развитии эпилептических процессов исследованы недостаточно. Следует также отметить тесную двустороннюю функциональную связь, существующую между генами, кодирующими PPARs, IL- 1β и IL-1ra, в различных клетках организма. Предполагается, что PPARs могут ингибировать воспалительные сигнальные пути, связанные с интерлейкином- 1β в клетках мозга [22]. Доказано, что экспрессия гена IL-1ra в клетках печени регулируется PPAR α [23]. С другой стороны, IL- 1β вызывает подавление продукции мРНК PPAR γ в клетках бурой жировой ткани [24]. Однако возможные эффекты активации рецепторов IL-1 на экспрессию генов PPARs в мозге при развитии эпилептических процессов в мозге остаются неисследованными.

Целью данной работы явилось изучение особенностей экспрессии генов PPARs в структурах мозга крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии и оценка возможного влияния анакинры на эти показатели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились в соответствии с протоколом работы с лабораторными животными, утвержденным этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН и основанным на директиве Европейского сообщества о гуманном обращении с лабораторными животными (Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals) и инструкциях ARRIVE.

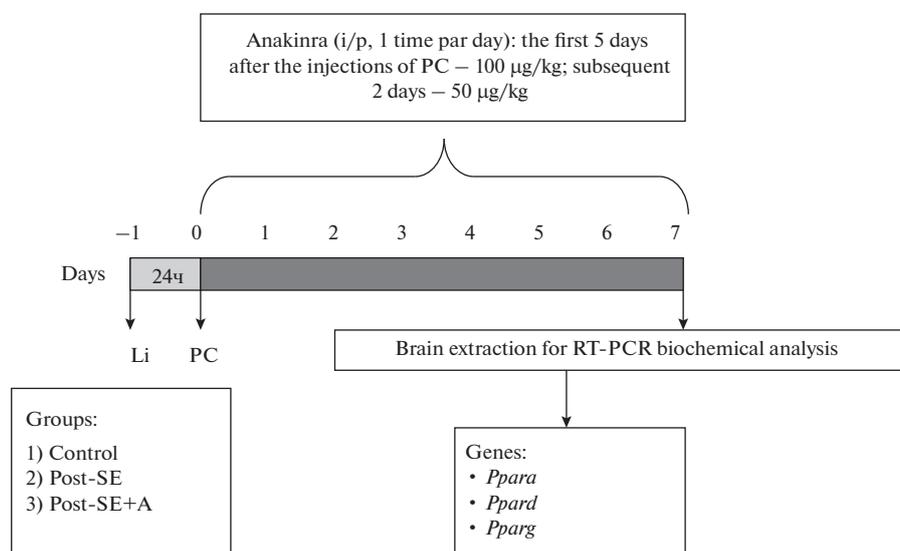


Рис. 1. Схема экспериментов: PC – пилокарпин, SE – эпилептический статус, А – анакинра.

Схема экспериментов

Эксперименты выполнены на самцах крыс Вистар в возрасте 7–8 нед. Крысы содержались в стандартных условиях, со свободным доступом к воде и пище, при 12-часовом цикле освещения (с 8:00 до 20:00 – день, с 20:00 до 8:00 – ночь). Отбор крыс в различные группы был случайным. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Использована литий-пилокарпиновая (PC) модель эпилепсии. Особенностью этой модели является то, что однократное введение PC индуцирует развитие длительных эпилептических процессов в мозге [25]. За сутки до введения PC всем крысам, включая контрольных, была произведена инъекция хлорида лития (LiCl) в/б в дозе 127 мг/кг (LiCl; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). За час до введения пилокарпина, животным был введен метилбромидскополамин (1 мг/кг, в/б; Sigma-Aldrich) для блокады периферических мускариновых рецепторов. PC (Sigma-Aldrich) вводили в/б, дробно в дозе 20–40 мг/кг (по 10 мг/кг, 2–4 инъекции с интервалом 30 мин) до развития судорог 4 балла по шкале Racine [26]. По истечении 75 мин, после развития 4-й стадии, эпилептический статус (SE) блокировали введением диазепама (10 мг/кг, в/б; Sigma-Aldrich).

Эксперименты выполнены на 26 животных, которых разделили на три группы: 1) контроль (животным вводился LiCl и физиологический раствор), 2) крысы, перенесшие судороги, нелеченые (LiCl, PC, физиологический раствор), 3) крысы, перенесшие судороги, леченые (LiCl, PC + анакинра). Анакинра (НИИ Особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия) вводилась в течение недели, в/б, растворенная в физиологическом растворе, первая инъекция 100 мкг/кг через час после судорог, далее 1 раз в день, 5 дней по 100 мкг/кг в день, 2 дня по 50 мкг/кг в день. Объем вводимого препарата – 0.5 мл/100 г массы тела.

Доза препарата анакинра была подобрана в предшествующей работе, в которой были обнаружено благоприятное воздействие лечения на психоневрологическое состояние животных, которое проверялось с помощью поведенческих и гистологических методов [7].

Крыс декапитировали через 7 дней после введения РС. Мозг быстро извлекали, замораживали и хранили при -80°C . Дорзальную и вентральную области гиппокампа (DH, VH), височную кору (TC) и миндалевидное тело (Am) выделяли по атласу мозга крыс [27] с помощью микротом-криостата OTF5000 (BrightInstruments, Лутон, Великобритания). Данные области мозга были выбраны в связи с их важной ролью в процессах эпилептогенеза. Для оценки экспрессии генов интереса: *Ppara* (белок – PPAR α), *Ppard* (белок – PPAR β/δ) и *Pparg* (белок – PPAR γ), а также генов домашнего хозяйства, описанных ниже, использовали метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени. Для этого сначала экстрагировали тотальную РНК. Выделение проводили с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) в течение 15 мин с последующим осаждением LiCl и промывкой этанолом. Концентрацию и чистоту РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop™ Lite (ThermoFisherScientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Далее проводили обратную транскрипцию. Для синтеза кДНК использовали 1 мкг (VH и Am) или 2 мкг (TC и DH) тотальной РНК, олиго-dT (0.5 мкг на 1 мкг РНК, ООО “ДНК Синтез”, Москва, Россия) и обратную транскриптазу M-MLV (100 ЕД на 1 мкг РНК; Promega, Мэдисон, Висконсин, США) согласно инструкции производителя.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени применяли технологию TaqMan. ПЦР проводили в триплетах, с использованием полимеразы TaqM (“Алкор Био”, Санкт-Петербург, Россия), зондов и праймеров, синтезированных ООО “ДНК-Синтез” (Москва, Россия). Последовательности использованных праймеров и зондов представлены в табл. 1. Референсные гены для нормализации данных экспрессии были выбраны на основе анализа экспрессии 9 стабильных генов, путем всестороннего ранжирования с использованием онлайн-инструмента RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) и сравнительных алгоритмов delta CT. В табл. 1 приведены последовательности праймеров и зондов генов домашнего хозяйства, которые были использованы в данной работе. Относительную экспрессию генов рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [36], нормирование проводили относительно среднего значения контрольной группы и среднего геометрического для трех наиболее стабильных референсных генов анализируемых областей мозга: DH и VH – *Gapdh*, *Pgk1*, *Ywhaz*; TC – *Gapdh*, *Hprt1*, *Pgk1*; Am – *Pgk1*, *Ppia*, *Rpl13a*.

Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен с использованием пакета программ SPSS Statistics 23 (IBM, Армонк, США). Для проверки нормальности распределения использовался критерий Колмогорова–Смирнова. Равенство дисперсий оценивалось по критерию Ливеня. В случае равенства дисперсий использовался однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными сравнениями групп с помощью критерия Тьюки. В случае, когда предположение об однородности дисперсии было нарушено, применялся критерий Уэлча и апостериорный критерий Геймса–Ховелла. Для всех тестов групповые различия считались статистически значимыми при уровне $p \leq 0.05$. Данные на рисунках представлены в виде среднего и стандартной ошибки.

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов

Символ гена и его номер в базе данных	Кодируемый белок	Последовательности праймеров и зондов (прямой, обратный, TaqMan зонд)	Ссылки
<i>Pparα</i> NM_013196.2	Рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором – альфа PPAR α	AATCCACGAAAGCCATCCTGA GCTTTCTCAGCCATGCACAA FAM-AGGCCCGGTCTATCTCGCAGGAA-VHQ1	[28] (праймеры) Зонд подобран авторами
<i>Pparδ</i> NM_013141.2	Рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором – бета/дельта PPAR β/δ	CAAAACCCAGGTAAAGGCGG TGGCTGTTCATGACTGACC HEX-CCAGGCTGCAGGGCCACGCCA-VHQ2	Праймеры и зонд подобраны авторами
<i>Pparγ</i> NM_013124.3	Рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором – гамма PPAR γ	CCTGAAGCTCCAAAGAATACC GATGCTTATCCCCACAGAC HEX-CCCTCATGGCCATCGAGTGCC-VHQ2	[29] (праймеры) Зонд подобран авторами
<i>Gandh</i> NM_017008	Глицеральдегид-3-фосфатдегидро-геназа GAPDH	TGCACACCAAATGCTTAG GGATGCAGGGATGATCTTC R6G-ATCACGCCACAGCTTCCAGAGGG-VHQ2	[30]
<i>Rpl13a</i> NM_173340	60S рибосомный белок L13a RPL13A	GGATCCCTCCACCCCTATGACA CTGGTACTTCCACCCGACCTC FAM-CTGCCCTCAAGGTTGTGGGGCT-VHQ1	[31] (праймеры) [32] (зонд)
<i>Ppia</i> NM_017101	Пептидил-пролил-транс-изомераза А/Циклофилин А PPIA/СуРА	AGGATTCAATGTGCCAGGGTG CTCAGTCTGGCAGTGCAGA ROX-CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA-VHQ1	[33]
<i>Hprt1</i> NM_012583	Гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза HGPRT	TCCTCAGACCCGCTTTCCTCCG TCATCATCAATAATCAGCAGCTGG FAM-CCGACCCGGTCTGTCTCATGTGACCCCT-VHQ1	[34] (праймеры) [32] (зонд)
<i>Pfk1</i> NM_053291	Фосфолипид-киназа I PGK I	ATGCAAAAGACTGGCCAAAGTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTC R6G-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGGA-VHQ2	[35] (праймеры) [32] (зонд)
<i>Ywhaz</i> NM_013011	14-3-3 белокзета/дельта/ Белок-ингибитор киназы С I KCP-1	GATGAAGCCATTTGCTGAACCTTG GTCTCCTGGGTATCCGATGTC ROX-TGAAGAGTCTGTACAAAGACAGCAGCC-VHQ1	[35] (праймеры) [32] (зонд)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показано, что у животных, перенесших судороги, экспрессия гена *Ppara* (рис. 2) снижается в дорзальном гиппокампе ($F_{(2;23)} = 6.3; p < 0.01$), вентральном гиппокампе ($F_{(2;14.9)} = 10.9; p < 0.01$), височной коре ($F_{(2;10.9)} = 6.0; p = 0.02$) и амигдале ($F_{(2;26)} = 5.3; p = 0.01$). Анакинра не только не уменьшила эти изменения, но даже усилила их. Апостериорные сравнения выявляют достоверное снижение у нелеченых крыс только в дорзальном гиппокампе, у леченых – во всех обследованных структурах мозга.

В отношении гена *Ppard* (рис. 3) достоверные различия между группами были найдены только в вентральном гиппокампе. У нелеченых экспериментальных животных выявлено усиление экспрессии данного гена ($F_{(2;11.3)} = 87.4; p < 0.01$). Анакинра не влияла на эти изменения.

Изменения экспрессии гена *Pparg* (рис. 4) также были наиболее выражены в вентральном гиппокампе ($F_{(2;21)} = 3.6; p = 0.04$), однако в этом случае анакинра нивелировала действие пилокарпина: апостериорные сравнения с группой контроля выявляют увеличение уровня мРНК *Pparg* у нелеченых животных, перенесших пилокарпин-индуцированные судороги, но не у экспериментальных крыс, которым вводили анакинру.

Таким образом, пилокарпин-индуцированный эпилептический статус приводил к снижению экспрессии гена *Ppara* в обследованных областях мозга, а также к усилению экспрессии генов *Ppard* и *Pparg* в вентральном гиппокампе. Анакинра усиливала эффекты эпилептического статуса в отношении продукции мРНК *Ppara*, нивелировала увеличение экспрессии гена *Pparg* в вентральном гиппокампе и не влияла на продукцию мРНК *Ppard*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первой задачей проведенного исследования было изучение особенностей экспрессии генов семейства *Ppar* в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Нами показано, что через 7 дней после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса происходит изменение экспрессии генов *Ppara*, *Ppard* и *Pparg*, причем характер и выраженность этих изменений зависит от типа рецептора и структуры мозга. Ранее особенности экспрессии генов этих рецепторов в экспериментальных моделях эпилепсии исследованы не были. Однако результаты фармакологических исследований, доказавших нейропротекторные свойства агонистов PPAR α и PPAR γ в различных моделях эпилепсии [18–21, 36, 37] показывают, что обнаруженные нами изменения могут иметь функциональное значение.

Наиболее выраженные изменения обнаружены для гена *Ppara*, причем направленность этих изменений носила иной характер, чем у генов *Ppard* и *Pparg*: продукция мРНК PPAR β/δ и PPAR γ увеличивалась, в то время как PPAR α – снижалась. Уменьшение экспрессии *Ppara* может иметь негативные последствия, приводить к снижению антиоксидантных и противовоспалительных процессов [38], способствуя развитию связанных с судорогами неврологических нарушений. С другой стороны, оно, возможно, носит компенсаторный характер, связанный с вовлеченностью PPAR α (но не PPAR β и PPAR γ) в регуляцию аппетита, массы тела и пищевого поведения [39–41], поскольку было показано, что активация PPAR α вызывает сытость и замедляет увеличение массы тела [39]. Известно, что введение пилокарпина и индуцируемый им эпилептический статус приводит к длительному снижению массы тела экспериментальных животных [7]. Возможно, выявленное нами уменьшение экспрессии гена *Ppara* отражает запуск защитных механизмов, направленных на предотвращение дальнейшей потери массы.

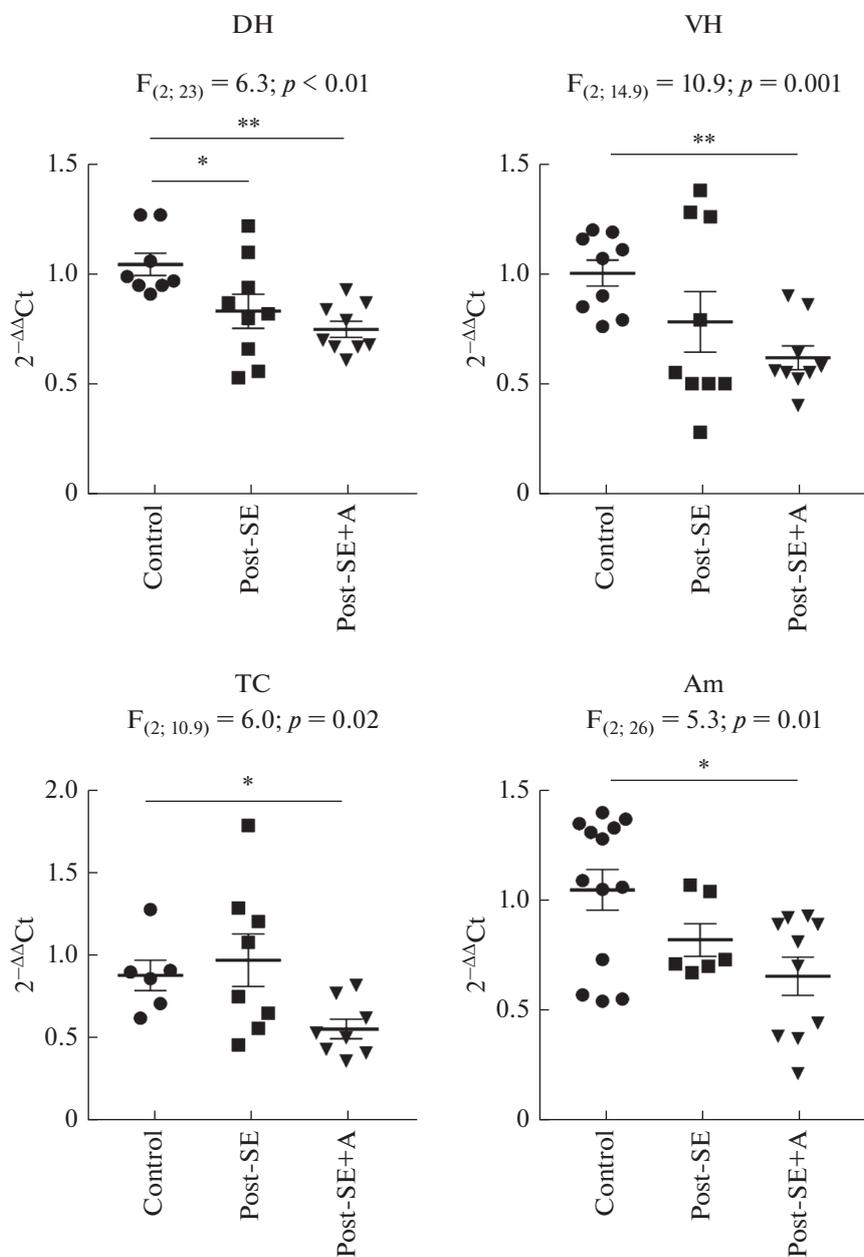


Рис. 2. Экспрессия гена *Ppara* в структурах мозга контрольных крыс (Control) и через 7 дней после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса, в течение которых вводили физиологический раствор (Post-SE) либо анакинру (Post-SE+A). DH – дорзальный гиппокамп, VH – вентральный гиппокамп, TC – височная кора, Am – миндалина. F – критерий Фишера, однофакторный дисперсионный анализ, либо критерий Уэлча. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ соответственно, апостериорные сравнения с помощью критерия Тьюки или Геймса–Ховелла.

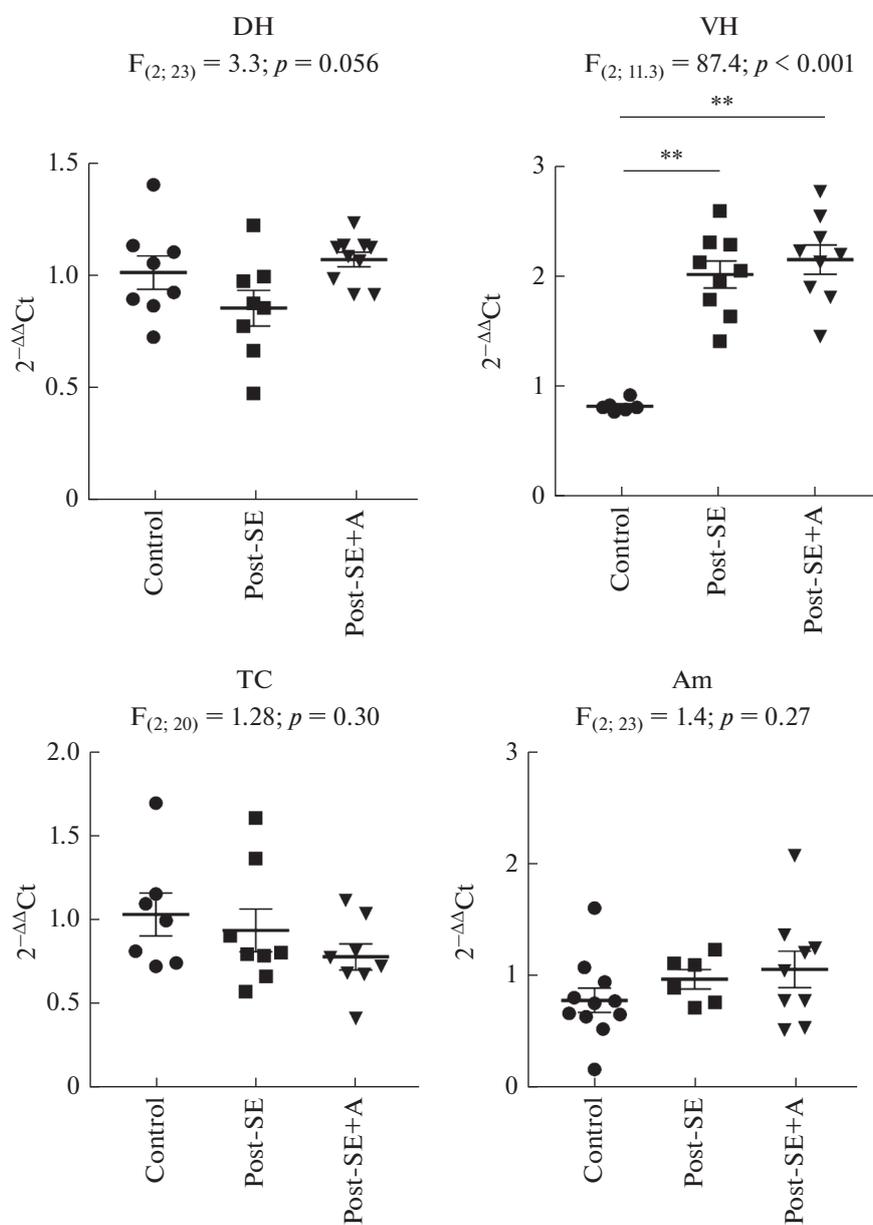


Рис. 3. Экспрессия гена *Pparg* в структурах мозга контрольных крыс (Control) и через 7 дней после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса, в течение которых вводили физиологический раствор (Post-SE) либо анакинру (Post-SE + A). DH – дорзальный гиппокамп, VH – вентральный гиппокамп, TC – височная кора, Am – миндалина. F – критерий Уэлча. ** – $p < 0.01$, апостериорные сравнения с помощью критерия Геймса–Ховелла.

Защитным механизмом, вероятно, является и показанное в данной работе усиление экспрессии гена *Pparg* в вентральном гиппокампе. Гиппокамп является одной из структур мозга наиболее уязвимых для действия судорог: повреждение и гибель нейронов обнаруживается уже в первые часы и дни после введения пилокар-

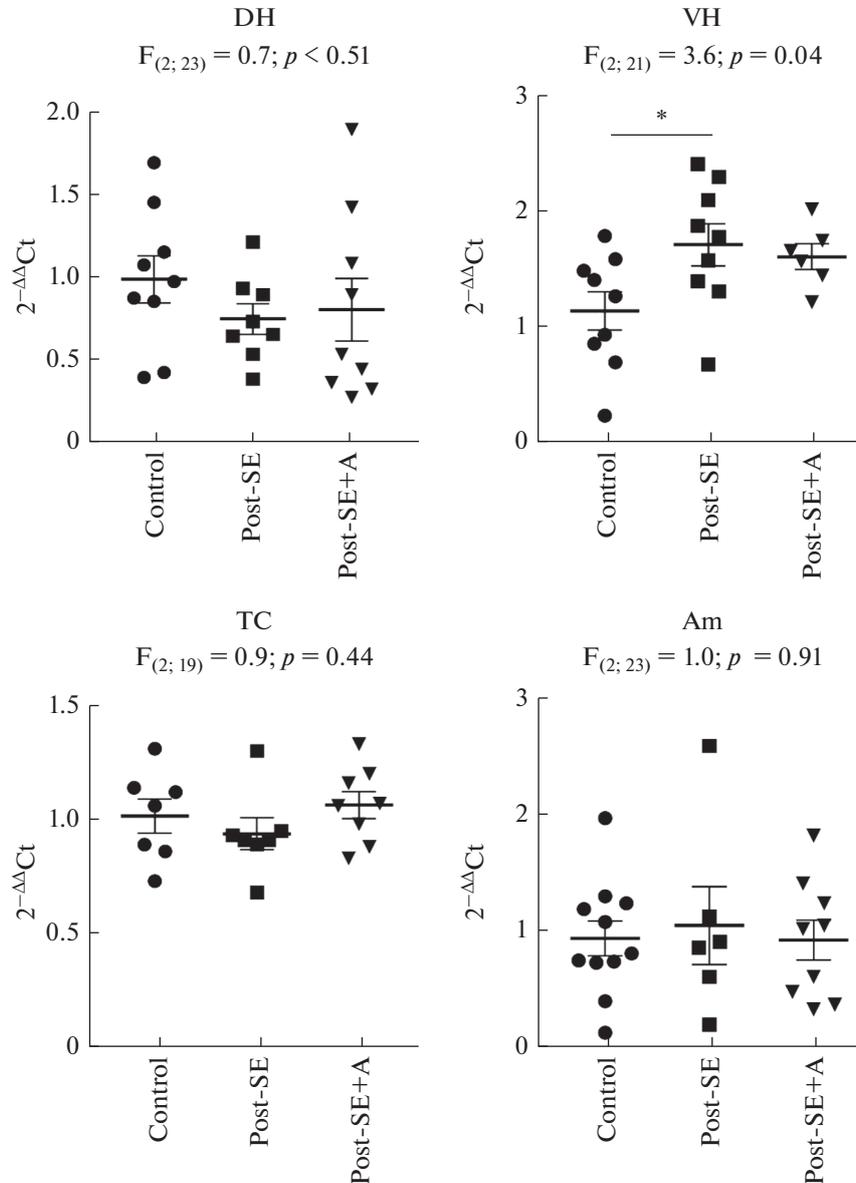


Рис. 4. Экспрессия гена *Pparg* в структурах мозга контрольных крыс (Control) и через 7 дней после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса, в течение которых вводили физиологический раствор (Post-SE) либо анакинру (Post-SE + A). DH – дорзальный гиппокамп, VH – вентральный гиппокамп, TC – височная кора, Am – миндалина. F – критерий Фишера, однофакторный дисперсионный анализ. * – $p < 0.05$, апостериорные сравнения с помощью критерия Тьюки.

пина [42]. Активация PPAR γ опосредует нейропротекцию, помогает уменьшить гибель нейронов при различных видах нервной патологии. В частности, агонисты PPAR γ показали большой нейропротекторный потенциал в экспериментальных моделях болезней Паркинсона [43] и Альцгеймера [44], они стимулируют нейрогенез в модели нейродегенеративной патологии, вызванной введением бактериаль-

ного эндотоксина [45]. Агонист PPAR γ росиглитазон предотвращает гибель нейронов в височной коре и гиппокампе [46], а также уменьшает активацию астроцитов и ослабляет когнитивный дефицит [47], развивающиеся после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса. Нейропротекторные свойства агонистов PPAR γ реализуются за счет регуляции разных сигнальных путей [48]: благодаря активации Wnt-пути, связанного с клеточной дифференцировкой и регенерацией [49]; активации Nrf2-пути, ответственного за защиту клеток от оксидативного стресса [50], подавления каскадов, опосредованных NF- κ B [51], также связанных с оксидативным стрессом и воспалением. Вовлеченность PPAR γ в регуляцию воспалительных процессов показана во многих работах (обзор [52]). В частности, выявлено, что агонист этих рецепторов пиоглитазон уменьшает активацию эндотоксин-стимулированных микроглиальных клеток, подавляя продукцию индуцибельной NO-синтазы и провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α и IL-1 β [53].

В отличие от PPAR α и PPAR γ возможная роль PPAR β/δ в эпилептогенезе остается малоизученной. При этом их нейропротекторные свойства показаны на мышцах, нокаутных по гену *Ppard*, при ишемии, вызванной окклюзией средней мозговой артерии [54]. Применение агониста PPAR β/δ GW0742 снижало продукцию IL-1 β и TNF- α в мозге мышей в модели индуцированного коллагеназой внутри-мозгового кровоизлияния [55]. Эти данные свидетельствуют, что активация PPAR β/δ , так же как и активация PPAR γ и PPAR α , способствует подавлению нейровоспаления. Поэтому активацию экспрессии *Ppard*, выявленную нами в вентральном гиппокампе, можно рассматривать как защитную реакцию, направленную на уменьшение воспалительных процессов.

При достаточно большом количестве данных о влиянии агонистов PPARs на воспалительные процессы, в частности на продукцию IL-1 β в клетках различных тканей, обратный процесс – эффекты активации рецепторов IL-1 на экспрессию генов *Ppara*, *Ppard* и *Pparg* исследованы недостаточно. Нам известна лишь работа Мгасек с соавт. [24], показавших, что стимуляция клеток бурой жировой ткани интерлейкином-1 β подавляет в них экспрессию гена *Pparg*. В данной работе нами показано, что активация рецепторов ИЛ-1 может играть определенную роль в усилении экспрессии гена *Pparg*, вызванной пилокарпин-индуцированным эпилептическим статусом. В отличие от *Pparg*, экспрессия *Ppard* не менялась после введения антагониста рецепторов ИЛ-1. Возможно, данный факт свидетельствует о разной роли, которую могут играть эти рецепторы в патогенезе эпилепсии.

Уменьшение экспрессии гена *Ppara*, выявленное у нелеченых, перенесших судороги крыс, не только не блокировалось введением анакинры, но даже было более выраженным. Можно предположить, что это связано с различной экспрессией PPAR α в нейронах и микроглии исследованных областей мозга. Известно, что изменение нейроглиального соотношения является одним из ключевых признаков нейродеструкции в литий-пилокарпиновой модели: количество нейронов в ходе этого процесса уменьшается, в то время как пролиферация и функциональная активность микроглии увеличивается [56]. Исходя из этого, обнаруженный нами эффект уменьшения экспрессии гена *Ppara* после перенесенных судорог можно объяснить в том числе гибелью нейронов. Это уменьшение может частично компенсироваться повышенной экспрессией PPAR α в активированной микроглии. Вместе с тем, в случае применения анакинры, которая может подавлять нейровоспаление за счет антагонизма к рецептору IL-1, экспрессия рецептора на клетках микроглии выражена в меньшей степени, что сказывается на еще большем снижении экспрессии гена *Ppara*. Это предположение, тем не менее, требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что в ходе первой недели после эпилептического статуса в литий-пилокарпиновой модели

происходит разнонаправленное изменение экспрессии генов *Ppars* в гиппокампе: экспрессия *Ppara* уменьшается в дорсальной области гиппокампа, тогда как экспрессия *Ppard* и *Pparg* увеличивается в его вентральной области. Применение анакинры усиливает отмеченный эффект в случае *Ppara*, при этом он проявляется также в других отделах мозга. В случае *Pparg* анакинра, напротив, нивелирует увеличение экспрессии гена в вентральном гиппокампе. Наконец, в случае *Ppard* применение анакинры не влияет на продукцию его мРНК. Отличия во влиянии анакинры на экспрессию различных подтипов PPARs в использованной модели височной эпилепсии позволяют предполагать разную роль, которую они могут играть в регуляции процессов эпилептогенеза.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Поддержано РФФИ, грант № 20-515-00020 и БРФФИ, грант № М20Р-328.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.Е.З., Т. Б.М.-К.), написание и редактирование манускрипта (А.И.Р., О.Е.З., Т. Б.М.-К., А.А.К.), сбор и обработка данных (А.В.Д., А.А.К., М.В.З., А.П.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N* (2017) Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology* 88: 296–303. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>
2. *Fattorusso A, Matricardi S, Mencaroni E, Dell'Isola GB, Di Cara G, Striano P, Verrotti A* (2021) The Pharmacoresistant Epilepsy: An Overview on Existant and New Emerging Therapies. *Front Neurol* 12: 674483. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.674483>
3. *Sears SM, Hewett SJ* (2021) Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Exp Biol Med* 246: 1069–1083. <https://doi.org/10.1177/1535370221989263>
4. *Pracucci E, Pillai V, Lamers D, Parra R, Landi S* (2021) Neuroinflammation: A Signature or a Cause of Epilepsy? *Int J Mol Sci* 22: 6981. <https://doi.org/10.3390/ijms22136981>
5. *Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA* (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 36: 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>
6. *Vezzani A, Balosso S, Ravizza T* (2008) The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun* 22: 797–803. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.03.009>
7. *Dyomina A V, Zubareva OE, Smolensky I V, Vasilev DS, Zakharova M V, Kovalenko AA, Schwarz AP, Ischenko AM, Zaitsev A V* (2020) Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy. *Pharmaceuticals* 13: 340. <https://doi.org/10.3390/ph13110340>
8. *Mazarati AM, Pineda E, Shin D, Tio D, Taylor AN, Sankar R* (2010) Comorbidity between epilepsy and depression: Role of hippocampal interleukin-1 β . *Neurobiol Dis* 37: 61–467. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.001>
9. *Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, Batra A, Carlton E, Najm J, Granata T, Janigro D* (2009) Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol Dis* 33: 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.002>

10. *Korbecki J, Bobiński R, Dutka M* (2019) Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflamm Res* 68: 443–458.
<https://doi.org/10.1007/s00011-019-01231-1>
11. *Zolezzi JM, Santos MJ, Bastías-Candia S, Pinto C, Godoy JA, Inestrosa NC* (2017) PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biol Rev* 92: 2046–2069.
<https://doi.org/10.1111/brv.12320>
12. *Hong F, Pan S, Guo Y, Xu P, Zhai Y* (2019) PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules* 24: 2545.
<https://doi.org/10.3390/molecules24142545>
13. *Fidaleo M, Fanelli F, Ceru M, Moreno S* (2014) Neuroprotective Properties of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPAR α) and its Lipid Ligands. *Curr Med Chem* 21: 2803–2821.
<https://doi.org/10.2174/0929867321666140303143455>
14. *Heneka M, Landreth G* (2007) PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol Lipids* 1771: 1031–1045.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.04.016>
15. *Grygiel-Górniak B* (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr J* 13: 17.
<https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
16. *Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C* (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 267–273.
[https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00214-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00214-0)
17. *Strosznajder AK, Wójtowicz S, Jeżyna MJ, Sun GY, Strosznajder JB* (2021) Recent Insights on the Role of PPAR- β/δ in Neuroinflammation and Neurodegeneration, and Its Potential Target for Therapy. *NeuroMolecular Med* 23: 86–98.
<https://doi.org/10.1007/s12017-020-08629-9>
18. *Hong S, Xin Y, HaiQin W, GuiLian Z, Ru Z, ShuQin Z, HuQing W, Li Y, Ning B, YongNan L* (2013) The PPAR γ agonist rosiglitazone prevents neuronal loss and attenuates development of spontaneous recurrent seizures through BDNF/TrkB signaling following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurochem Int* 63: 405–412.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.07.010>
19. *Sun H, Huang Y, Yu X, Li Y, Yang J, Li R, Deng Y, Zhao G* (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, rosiglitazone, suppresses CD40 expression and attenuates inflammatory responses after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Int J Dev Neurosci* 26: 505–515.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.01.009>
20. *Porta N, Vallée L, Lecoointe C, Bouchaert E, Staels B, Bordet R, Auvin S* (2009) Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, exerts anticonvulsive properties. *Epilepsia* 50(4): 943–948.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01901.x>
21. *Wong S-B, Cheng S-J, Hung W-C, Lee W-T, Min M-Y* (2015) Rosiglitazone Suppresses In Vitro Seizures in Hippocampal Slice by Inhibiting Presynaptic Glutamate Release in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS One* 10: e0144806.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144806>
22. *O’Léime CS, Cryan JF, Nolan YM* (2017) Nuclear deterrents: Intrinsic regulators of IL-1 β -induced effects on hippocampal neurogenesis. *Brain Behav Immun* 66: 394–412.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.07.153>
23. *Stienstra R, Mandard S, Tan NS, Wahli W, Trautwein C, Richardson TA, Lichtenauer-Kaligis E, Kersten S, Müller M* (2007) The Interleukin-1 receptor antagonist is a direct target gene of PPAR α in liver. *J Hepatol* 46: 869–877.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.11.019>
24. *Mráček T, Cannon B, Houšťek J* (2004) IL-1 and LPS but not IL-6 inhibit differentiation and downregulate PPAR gamma in brown adipocytes. *Cytokine* 26: 9–15.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2003.12.001>
25. *Ahmed Juvalé II, Che Has AT* (2020) The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon* 6: e04557.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04557>
26. *Phelan KD, Shwe UT, Williams DK, Greenfield LJ, Zheng F* (2015) Pilocarpine-induced status epilepticus in mice: A comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale. *Epilepsy Res* 117: 90–96.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.09.008>
27. *Paxinos G, Watson C* (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.
28. *Cernecka H, Doka G, Srankova J, Pivackova L, Malikova E, Galkova K, Kyselovic J, Krenek P, Klimas J* (2016) Ramipril restores PPAR β/δ and PPAR γ expressions and reduces cardiac

- NADPH oxidase but fails to restore cardiac function and accompanied myosin heavy chain ratio shift in severe anthracycline-induced cardiomyopathy in rat. *Eur J Pharmacol* 791: 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.08.040>
29. *Chistyakov D V, Aleshin SE, Astakhova AA, Sergeeva MG, Reiser G* (2015) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α and γ of rat brain astrocytes in the course of activation by cell-like receptor agonists. *J Neurochem* 134: 113–124. <https://doi.org/10.1111/JNC.13101>
 30. *Lin W, Burks CA, Hansen DR, Kinnamon SC, Gilbertson TA* (2004) Lin. *J Neurophysiol* 92: 2909–2919. <https://doi.org/10.1152/jn.01198.2003>
 31. *Swijsen A, Nelissen K, Janssen D, Rigo J-M, Hoogland G* (2012) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res Notes* 5: 685. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-685>
 32. *Schwarz AP, Malygina DA, Kovalenko AA, Trofimov AN, Zaitsev A V* (2020) Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol Cell Probes* 53: 101611. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101611>
 33. *Malkin SL, Amakhin D V, Veniaminova EA, Kim KK, Zubareva OE, Magazanik LG, Zaitsev A V* (2016) Changes of AMPA receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuroscience* 327: 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.024>
 34. *Cook NL, Vink R, Donkin JJ, van den Heuvel C* (2009) Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 87: 34–41. <https://doi.org/10.1002/jnr.21846>
 35. *Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G* (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol* 9: 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-53>
 36. *Adabi Mohazab R, Javadi-Paydar M, Delfan B, Dehpour AR* (2012) Possible involvement of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway in the anticonvulsant effect of acute pioglitazone on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* 101: 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.02.015>
 37. *Saha L, Bhandari S, Bhatia A, Banerjee D, Chakrabarti A* (2014) Anti-kindling Effect of Bezafibrate, a Peroxisome Proliferator-activated Receptors Alpha Agonist, in Pentylenetetrazole Induced Kindling Seizure Model. *J Epilepsy Res* 4: 45–54. <https://doi.org/10.14581/jer.14011>
 38. *Wójtowicz S, Strosznajder AK, Jeżyna M, Strosznajder JB* (2020) The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res* 45: 972–988. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02993-5>
 39. *Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez de Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D* (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature* 425: 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature01921>
 40. *Sihag J, Jones PJH* (2018) Oleylethanolamide: The role of a bioactive lipid amide in modulating eating behaviour. *Obes Rev* 19: 178–197. <https://doi.org/10.1111/obr.12630>
 41. *Pan W, Liu C, Zhang J, Gao X, Yu S, Tan H, Yu J, Qian D, Li J, Bian S, Yang J, Zhang C, Huang L, Jin J* (2019) Association Between Single Nucleotide Polymorphisms in PPARA and EPAS1 Genes and High-Altitude Appetite Loss in Chinese Young Men. *Front Physiol* 10: 59. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00059>
 42. *Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M* (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172: 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>
 43. *Carta AR* (2013) PPAR γ : Therapeutic Prospects in Parkinson's Disease. *Curr Drug Targets* 14: 743–751. <https://doi.org/10.2174/1389450111314070004>
 44. *Chang KL, Wong LR, Pee HN, Yang S, Ho PC-L* (2019) Reverting Metabolic Dysfunction in Cortex and Cerebellum of APP/PS1 Mice, a Model for Alzheimer's Disease by Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) Agonist. *Mol Neurobiol* 56: 7267–7283. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1586-2>
 45. *Ormerod BK, Hanft SJ, Asokan A, Haditsch U, Lee SW, Palmer TD* (2013) PPAR γ activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain Behav Immun* 29: 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.10.017>

46. Peng J, Wang K, Xiang W, Li Y, Hao Y, Guan Y (2019) Rosiglitazone polarizes microglia and protects against pilocarpine-induced status epilepticus. *CNS Neurosci Ther* 25: 1363–1372. <https://doi.org/10.1111/cns.13265>
47. Hong S, Xin Y, HaiQin W, GuiLian Z, Ru Z, ShuQin Z, HuQing W, Li Y, Yun D (2012) The PPAR γ agonist rosiglitazone prevents cognitive impairment by inhibiting astrocyte activation and oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurol Sci* 33: 559–566. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0774-2>
48. Prashantha Kumar BR, Kumar AP, Jose JA, Prabitha P, Yuvaraj S, Chipurupalli S, Jeyarani V, Manisha C, Banerjee S, Jeyabalan JB, Mohankumar SK, Dhanabal SP, Justin A (2020) Minutes of PPAR- γ agonism and neuroprotection. *Neurochem Int* 140: 104814. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104814>
49. Inestrosa N, Godoy J, Quintanilla R, Koenig C, Bronfman M (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor γ is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents β -amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling. *Exp Cell Res* 304: 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.09.032>
50. Cai W, Yang T, Liu H, Han L, Zhang K, Hu X, Zhang X, Yin K-J, Gao Y, Bennett MVL, Leak RK, Chen J (2018) Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): A master gatekeeper in CNS injury and repair. *Prog Neurobiol* 163–164: 27–58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.002>
51. Wu J-S, Tsai H-D, Cheung W-M, Hsu CY, Lin T-N (2016) PPAR- γ Ameliorates Neuronal Apoptosis and Ischemic Brain Injury via Suppressing NF- κ B-Driven p22phox Transcription. *Mol Neurobiol* 53: 3626–3645. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9294-z>
52. Bernardo A, Minghetti L (2006) PPAR-gamma agonists as Regulators of Microglial Activation and Brain Inflammation. *Curr Pharm Des* 12: 93–109. <https://doi.org/10.2174/138161206780574579>
53. Ji H, Wang H, Zhang F, Li X, Xiang L, Aiguo S (2010) PPAR γ agonist pioglitazone inhibits microglia inflammation by blocking p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Inflamm Res* 59: 921–929. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0203-7>
54. Arsenijevic D, de Bilbao F, Plamondon J, Paradis E, Vallet P, Richard D, Langhans W, Giannakopoulos P (2006) Increased Infarct Size and Lack of Hyperphagic Response after Focal Cerebral Ischemia in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β -Deficient Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 433–445. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600200>
55. Tang X, Yan K, Wang Y, Wang Y, Chen H, Xu J, Lu Y, Wang X, Liang J, Zhang X (2020) Activation of PPAR- β/δ Attenuates Brain Injury by Suppressing Inflammation and Apoptosis in a Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage Mouse Model. *Neurochem Res* 45: 837–850. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02956-w>
56. Borges K (2003) Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol* 182: 21–34. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00086-4)

Effect of Anakinra on the Gene Expression of Receptors Activated by the Peroxisome Proliferator in the Rat Brain in the Lithium Pilocarpine Model of Epilepsy

A. I. Roginskaya^a, A. V. Dyomina^a, A. A. Kovalenko^a, M. V. Zakharova^a, A. P. Schwarz^a, T. B. Melik-Kasumov^b, and O. E. Zubareva^{a, *}

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

^b*Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

**e-mail: ZubarevaOE@mail.ru*

In recent years, the role of neuroinflammation in the mechanisms of epileptogenesis has been widely discussed. One of the factors influencing inflammatory processes in the brain may be a change in the expression of nuclear transcription factors, in particular, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). Agonists of these receptors have a pronounced neuroprotective effect in models of epilepsy. Studies conducted on cells from various tissues of the body reveal a close functional relationship that exists between the genes of PPARs, the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β), and the anti-inflammatory cytokine – interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra). This work aimed to study the features of *Ppars* gene expression in rat brain areas in a lithium-pilocarpine

model of epilepsy and to assess the possible effect of IL-1ra (anakinra drug) on these parameters. Pilocarpine was administered to Wistar rats at the age of 7–8 weeks, one day after LiCl injections. Anakinra was administered within a week after pilocarpine (the first injection of 100 µg/kg one hour after seizures, then 5 days at 100 µg/kg and 2 days at 50 µg/kg), after which brain samples were taken for biochemical analysis. The expression of the *Ppara*, *Ppard*, and *Pparg* genes was assessed by reverse transcription followed by a real-time polymerase chain reaction in the dorsal and ventral hippocampus, temporal cortex, and amygdala. It has been shown that pilocarpine-induced seizures lead to an increase in the expression of the *Ppard* and *Pparg* genes in the ventral hippocampus and a decrease in the expression of the *Ppara* gene in all brain regions examined. Anakinra enhances the decrease in the expression of the *Ppara* gene, does not affect the production of *Ppard* mRNA, and levels out the increase in the expression of the *Pparg* gene. Thus, the expression of the *Ppara* genes in the brain changes during epileptogenesis; anakinra regulates the production of *Ppara* and *Pparg* mRNAs in different directions but does not affect the *Ppard* gene expression.

Keywords: lithium-pilocarpine model of epilepsy, receptors activated by peroxisome proliferator, interleukin 1 receptor antagonist, anakinra