

ДЕЙСТВИЕ КАРДАРИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИХ
И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ
МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ У КРЫС

© 2024 г. М. Р. Субханкулов¹, Д. С. Синяк¹, В. А. Гук¹, Т. Ю. Постникова¹,
А. И. Рогинская¹, О. Е. Зубарева^{1,*}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
*E-mail: ZubarevaOE@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2023 г.

После доработки 27.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Эпилепсия – тяжелое нервно-психическое заболевание, сопровождающееся развитием спонтанных рецидивирующих судорог и сопутствующих нарушений поведения, трудно поддающихся лечению. В последние годы активно исследуются нейропротекторные свойства агонистов рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR α , β/δ , γ) – ядерных транскрипционных факторов, участвующих в регуляции липидного и углеводного обмена, а также воспалительных сигнальных путей, вовлеченных в патогенез эпилепсии. Нейропротекторные свойства агонистов PPAR γ неоднократно описаны в моделях эпилепсии, эффекты агонистов PPAR β/δ в этих моделях исследованы недостаточно. Целью работы являлось изучение эффектов введений агониста PPAR β/δ кардарина (GW 501516) на формирование гистопатологических и поведенческих нарушений крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии (TLE). Литий-пилокарпиновая модель – одна из лучших экспериментальных моделей хронической височной эпилепсии. В данной работе эпилепсию индуцировали введением пилокарпина крысам самцам Вистар в возрасте 7 недель через сутки после инъекции LiCl. Кардарин (2.5 мг/кг) вводили ежедневно в течение 7 дней после пилокарпина, первая инъекция – через сутки после введения пилокарпина. Тестирование поведения проводили через 2–3 месяца после индукции модели в тестах: Открытое поле, Чужак-резидент, Обследование новых предметов, спонтанное чередование в Y-образном лабиринте и Водный лабиринт Морриса. Забор мозга для гистологических исследований (оценка гибели нейронов, окраска по Нисслю) производили после окончания поведенческих экспериментов, через 95 дней после индукции TLE. Показано, что у нелеченых крыс с TLE отмечается значительная гибель нейронов в гиппокампе и нарушения поведения: повышенная двигательная активность, тревожность, нарушения памяти, исследовательского и коммуникативного поведения. Кардарин не влиял на выживаемость нейронов гиппокампа, однако уменьшал проявление практически всех названных поведенческих нарушений за исключением гиперактивности. Таким образом, проведенное исследование показало перспективность использования агонистов PPAR β/δ для ослабления развития характерных для эпилепсии нарушений поведения.

Ключевые слова: височная эпилепсия; литий-пилокарпиновая модель; агонисты рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом; кардарин (GW 501516); поведение; память; гибель нейронов в гиппокампе

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия — это хроническое неврологическое заболевание, характеризующееся развитием спонтанных рецидивирующих судорог. На данный момент в мире эпилепсией страдает более 50 млн человек [1]. Одной из наиболее распространенных форм этого заболевания является височная эпилепсия, при которой эпилептогенный очаг располагается в височной доле. Для данной формы эпилепсии характерна перестройка нейронных сетей в лимбических областях мозга, астроглиозис, выраженная дегенерация гиппокампальных нейронов [2], что приводит не только к формированию эпилептиформной активности, но и к развитию сопутствующих когнитивных и психоэмоциональных нарушений [3], негативно влияющих на качество жизни пациентов. В частности, у больных височной эпилепсией часто отмечаются нарушения памяти [4], трудности в социальных взаимодействиях [5], высокий риск тревожных расстройств [6]. При этом некоторые из используемых в клинической практике препаратов не только не предотвращают развитие нервно-психических нарушений, но могут и усугублять их [7]. Это делает актуальным поиск новых методов лечения, способных предотвращать развитие различных связанных с эпилепсией нарушений, включая поведенческие изменения.

В качестве одной из новых стратегий в лечении эпилепсии рассматривается ограничение нейровоспаления, играющего важную роль в эпилептизации мозга и развитии коморбидных нарушений поведения [8]. Противовоспалительным и нейропротекторным действием обладают, в частности, агонисты рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPARs), их возможное использование в лечении различных неврологических заболеваний, включая эпилепсию, активно обсуждается в последние годы [9].

PPARs – это группа ядерных транскрипционных факторов, играющих важнейшую роль в метаболизме глюкозы и липидов [10]. Эти рецепторы обнаружены в различных клетках организма, включая клетки мозга [11], где они вовлечены в процессы окислительного стресса, в регуляцию энергетического гомеостаза, метаболизма жирных кислот в митохондриях, регуляцию нейровоспаления, гомеостаз глутамата [10].

Идентифицировано три типа PPARs: PPAR α , PPAR β/δ и PPAR γ , которые несколько различаются по локализации в тканях, лигандам и функциональным свойствам [10]. Они все присутствуют в мозге [11]. Нейробиология PPAR γ является наиболее изученной. Агонисты этих рецепторов могут контролировать нейровоспаление, подавляя синтез оксида азота, воспалительных цитокинов и хемокинов в микроглии и астроцитах [12, 13]. Их нейропротекторные свойства были выявлены в экспериментальных моделях различных видов нейропатологии [14], включая острые судороги и хроническую эпилепсию [15, 16]. Возможные защитные свойства двух других типов PPARs (PPAR α и PPAR β/δ) при эпилепсии исследованы значительно меньше, несмотря на то, что их агонисты также обладают противовоспалительными и нейропротекторными свойствами [17, 18].

Целью данной работы явилось изучение эффектов введения агониста PPAR β/δ -рецепторов кардарина (GW 501516) на формирование гистопатологических и поведенческих нарушений в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии (TLE). Данная экспериментальная модель хорошо воспроизводит патологические процессы, происходящие при формировании височной эпилепсии человека. После инициирующего события (в модели – введение конвульсанта пилокарпина) сначала имеет место латентный период, когда судороги не проявляются, но в мозге при этом происходит формирование сверхвозбудимых нейронных сетей, гибель нейронов и другие патологические перестройки, которые приводят к постепенному формированию спонтанных рецидивирующих судорог и сопутствующих нарушений поведения (хронический период модели) [19, 20]. Эффекты кардарина в TLE модели ранее не изучались.

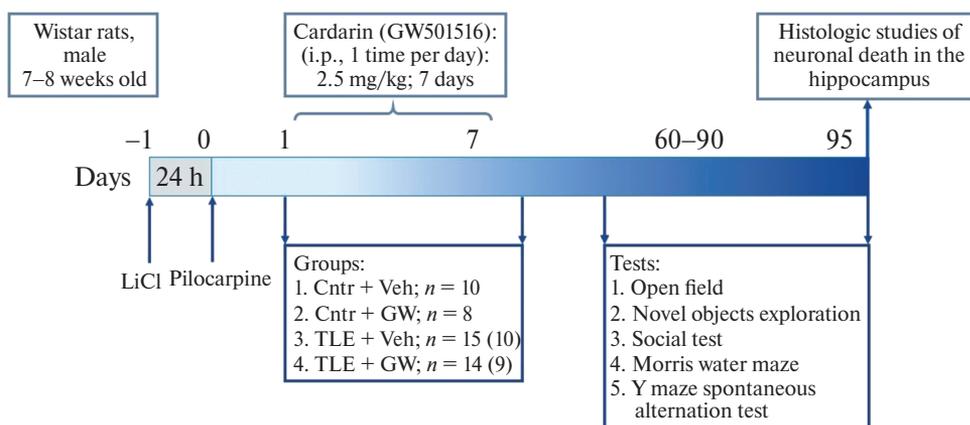


Рис. 1. Схема эксперимента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Животные

Исследования проводились на 7–8-недельных самцах крыс аутбредной линии Wistar, которые содержались в стандартных клетках по 5–6 животных в каждой. У крыс был свободный доступ к пище и воде, соблюдались условия 12-часового цикла дня (день – с 8:00 до 20:00; ночь – с 20:00 до 8:00).

2. Литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии

Для моделирования височной эпилепсии (TLE, рис.1) крысам в/б вводили 127 мг/кг хлорида лития (LiCl) [20]. Спустя сутки делали инъекции агониста мускариновых рецепторов пилокарпина, в/б. Предварительное введение LiCl позволяет существенно уменьшить эффективную дозу пилокарпина и снизить смертность животных [20]. Для предотвращения периферических эффектов пилокарпина за 1 час до его введения производили инъекции (-)-скополамин-метилбромида (1 мг/кг, в/б). Пилокарпин вводили животным в дозе 20–40 мг/кг по 10 мг/кг каждые 30 мин до развития 4-й стадии судорог по шкале Racine [21]. Крысы, у которых после четвертой инъекции (40 мг/кг) не развились судороги, исключались из исследования. Судороги купировали через 75 мин после начала 4-й стадии введением диазепама (10 мг/кг, в/б).

Ранее нами было показано [22], что при использовании такого протокола у большинства экспериментальных крыс в хроническую фазу TLE развиваются спонтанные рецидивирующие судороги.

Всего в эксперименте использовано 47 крыс, разделенных на четыре группы случайным образом. 1) Контрольная группа крыс (Cntr+Veh; $n = 10$) получала LiCl и растворитель (диметилсульфоксид, DMSO) без введения пилокарпина. DMSO использовался в качестве растворителя, т.к. кардарин нерастворим в воде. 2) Вторая группа животных с курсовым введением кардарина (GW 501516; 2.5 мг/кг, в/б), растворенного в DMSO (Cntr+GW; $n = 8$), эта группа также получала LiCl без введения пилокарпина. 3) Экспериментальная группа без лечения – крысы, которым вводили пилокарпин с растворителем (TLE+Veh; $n = 15$, выжило 10). 4) Экспериментальная группа с лечением (TLE+GW; $n = 14$, выжило 9). Препараты вводили курсом в течение недели 1 раз в день в указанной дозе. Первая инъекция проводилась через 24 часа после введения пилокарпина.

3. Выживаемость и динамика массы тела

Выживаемость и динамику массы тела отслеживали ежедневно в течение 7 дней после инициирования TLE. В первые дни животные получали влажный корм, в случае сильной потери массы (более 10%) животным подкожно вводили 5%-ный раствор глюкозы (2–3 мл) для предотвращения истощения.

4. Оценка поведения

Оценка поведения проводилась в батарее тестов в хроническую фазу модели через 2–3 месяца после введения пилокарпина. Эксперименты проводились в период высокой активности животных (с 19 до 23 ч). Последовательность тестов во всех группах была одинаковой (рис. 1). Для оценки двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения проводились тесты Открытое поле и Обследование новых предметов. Для выявления нарушений коммуникативного поведения был использован Социальный тест. Также проводилось тестирование оперативной памяти (Тест на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте), а также кратковременной и долгосрочной пространственной памяти (Водный лабиринт Морриса). Поведенческие эксперименты проводились в период высокой активности крыс (с 18 до 23 ч). Для уменьшения стрессовой нагрузки между тестами были сделаны перерывы в несколько дней. Все тесты записывались на видео и затем анализировались с помощью этологических программ Field4 и Pole_Krest, разработанных в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, Россия). Обработка поведенческих тестов проводилась опытным экспериментатором, не осведомленным о том, к какой группе относились животные (слепой контроль).

4.1. Тест Открытое поле

Тест Открытое поле (ОП), как было сказано ранее, использовался для оценки двигательной и исследовательской активности [23]. Каждое животное помещалось в центр круглой арены диаметром 1 м со стенками высотой 30 см. В арене с освещенностью 8 Лк располагались отверстия диаметром 4 см в полу. Поведение каждой крысы в течение 5 мин записывалось на видеокамеру. Установка тщательно очищалась после каждого животного 30%-ным раствором этанола. При анализе поведения крыс оценивали локомоторную активность (пройденное расстояние, время локомоции), вертикальную активность (время стоек с упором), уровень тревожности (время, проведенное в центре арены, составляющего треть ее диаметра, время груминга и фризинга, вертикальных стоек), исследовательское поведение (время обследования норок).

4.2. Исследование новых предметов

Тест Исследование новых предметов проводился для оценки исследовательского поведения крыс [24]. Установкой являлась квадратная арена с высокими бортами (60 × 60 × 45 см), под полом которой были приклеены 2 магнита, к которым в дальнейшем крепились объекты исследования, магниты располагались по диагонали на расстоянии 20 см от ближайших стенок. Освещение равномерное – 8 люкс. В течение 3 последовательных дней до проведения эксперимента крыс помещали в камеру (без предметов) на 10 мин для угашения ориентировочной реакции на установку. В четвертый (тестовый) день крыса помещалась в центр арены, на полу которой были размещены 2 одинаковых объекта для исследования (детские игрушки – пирамидки), которые крепились на магнитах, расположенных под полом камеры. Тестирование проводилось в течение 5 мин. После каждой крысы установка и объекты тщательно промывались 30%-ным этанолом. При обработке анализировали время и число контактов с новыми предметами.

4.3. Социальный тест

Для оценки социального поведения проводился тест на социальное взаимодействие в условиях защиты животным своей территории [25, 26]. Сначала тестируемую крысу помещали в плексигласовую клетку (60 × 30 см, высота 40 см) на сутки для адаптации. Затем к ней на 5 мин. подсаживали взрослого незнакомого самца, масса тела которого была немного меньше, чем у тестируемой крысы. В ходе их взаимодействия оценивалось время агрессивного и коммуникативного поведения. Последнее включало обнюхивание и груминг тела, генитальной области и хвоста.

4.4. Тест на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте

Данный тест использовался для оценки пространственной рабочей памяти. Y-образный лабиринт состоял из трех рукавов (каждый 50 × 10 см) с непрозрачными стенками высотой 30 см, расположенными под углом 120° друг от друга [27]. Крысу помещали в центр Y-образного лабиринта и давали ей возможность свободно исследовать рукава в течение 8 мин. Последовательность входов в лабиринт оценивалась с помощью коэффициента альтернатив (КА). Параметр КА рассчитывался по формуле: $КА = N \text{ правильных альтернатив} / N \text{ общее количество входов} \times 100\%$. Правильными альтернативами считали три последовательных входа в рукава без повторов (например, 1 – 2 – 3 или 2 – 3 – 1 или 1 – 3 – 2), а N общее количество входов в рукава минус 2. Входом считали положение, при котором все четыре конечности животного находятся в пределах рукава. Для крыс, которые совершали менее 9 входов в различные рукава, КА не рассчитывали. В качестве показателя оперативной пространственной памяти рассматривался КА, а показатель общее количество заходов в рукава позволял судить о двигательной и исследовательской активности животных.

4.5. Водный лабиринт Морриса

Для оценки пространственной памяти и способности к обучению использовался Водный лабиринт Морриса [28]. Установка представляла собой круглый бассейн диаметром 150 см со стенками высотой 70 см. Бассейн заполнялся водой с добавлением молока для снижения прозрачности, температура воды поддерживалась на уровне $23 \pm 1^\circ\text{C}$. На стенках бассейна в позициях север, юг, запад, восток были размещены четыре картинка, служащие пространственными ориентирами (круг, квадрат, треугольник и крест). Крысы должны были найти платформу диаметром 10 см, скрытую под водой (на 1 см ниже поверхности воды), расположенную между двумя картинками на расстоянии 15 см от стенки бассейна. Положение платформы оставалось неизменным на всем протяжении экспериментов. Каждую крысу тренировали в течение четырех экспериментальных дней по четыре попытки в день с перерывом в 5 мин. между попытками. Точка старта для каждой попытки менялась случайным образом (по генератору случайных чисел) между четырьмя позициями (картинками) таким образом, чтобы все четыре позиции были задействованы в течение каждого тренировочного дня. После нахождения платформы крысу оставляли на ней в течение 30 с после чего животное удаляли из бассейна. Попытка считалась неудачной, если крыса не находила платформу за 180 с. В этом случае исследователь помогал крысе найти платформу, направляя животное рукой. На пятый день тестирования платформу убирали, а крысу помещали в бассейн на 120 с. По итогу тестирования оценивалось время, проведенное в целевой области, где ранее находилась платформа (круг диаметром 30 см).

5. Гистологические исследования

Поскольку ранее в литий-пилокарпиновой модели была показана существенная гибель нейронов в гиппокампе (сопровождающаяся астроглиозисом) [29], мы оцени-

ли данный показатель в нашем исследовании. Гистологические исследования проведены на животных контрольной (Cntr+Veh) и экспериментальных групп (TLE+Veh и TLE+GW) после окончания поведенческих экспериментов, через 95 суток после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса. Крыс анестезировали изофлураном, затем декапитуировали и извлекали мозг. Далее мозг фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 3–7 дней при 4°C, проводили криопротекцию в 30%-ном растворе сахарозы, замораживали при –50°C в изопентане и хранили при температуре –80°C. Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм, содержащие гиппокамп, были получены с одного полушария (правого или левого) от каждого животного с использованием криостата Bright OTF5000 (Bright Instrument Co Ltd., Huntingdon, Великобритания). Срезы прикрепляли к предметным стеклам с адгезивным покрытием Superfrost Plus (J1800AMNZ, Thermo Fisher Scientific, США). Далее срезы окрашивали по Ниссию в 0.05%-ном растворе тионина, как было описано ранее [29]. Анализ срезов проводили на микроскопе Leica AF 7000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия) при увеличении $\times 400$. Для морфологического анализа подсчет нейронов проводили на каждом 8-ом срезе (всего 8–10 срезов из одного гиппокампа крысы). Расстояние между анализируемыми срезами составляло 160 мкм. Количество нейронов на цифровых микрофотографиях подсчитывали в программе ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, США) вручную с помощью Mult-point tool в пересчете на 100 мкм длины клеточного слоя в двух областях гиппокампа: CA1 и CA3.

6. Методы статистического анализа

Статистический анализ был проведен с использованием программ IBM SPSS Statistics 23 (IBM, Armonk, NY, США) и GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, США). Выбросы определялись квартильным методом. Нормальность распределения устанавливалась с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Равенство дисперсий определялось с помощью критерия Ливиния. Эффекты TLE и лечения определялись с помощью 2-факторного дисперсионного анализа (при нормальном распределении и равенстве дисперсий) или непараметрического H-критерия Крускала-Уоллеса (при ненормальном распределении или значимых различиях в дисперсиях). Апостериорные попарные сравнения проводились с помощью теста Шидака либо Данна соответственно. Для оценки динамики массы тела с учетом лечения и модели использовался 3-факторный смешанный (Mixed) дисперсионный анализ. Для оценки динамики обучения в разных группах в водном лабиринте Морриса в связи с ненормальностью распределения данных применяли непараметрический X^2 тест Фридмана. Смертность анализировалась с помощью кривых дожития Каплана-Мейера на основе Logrank статистики. Частота встречаемости агрессивного поведения в группах анализировалась с помощью углового преобразования Фишера (критерий ϕ^*). Различия считались значимыми при $p \leq 0.05$. Данные на графиках представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение при параметрической обработке данных или медианы и межквартильного размаха при использовании непараметрических методов анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика массы тела и выживаемость

Часть экспериментальных животных погибала в первые дни после введения пилокарпина. В нелеченой группе с TLE гибель составила 33%, в леченой с TLE – 36% (рис. 2а). Кардарин значимо не повлиял на выживаемость. (Log Rank test, $X^2 = 0.017$; $p = 0.9$).

После индукции TLE у экспериментальных животных наблюдалась активная потеря массы тела, в первые 3 дня после введения пилокарпина она составляла око-

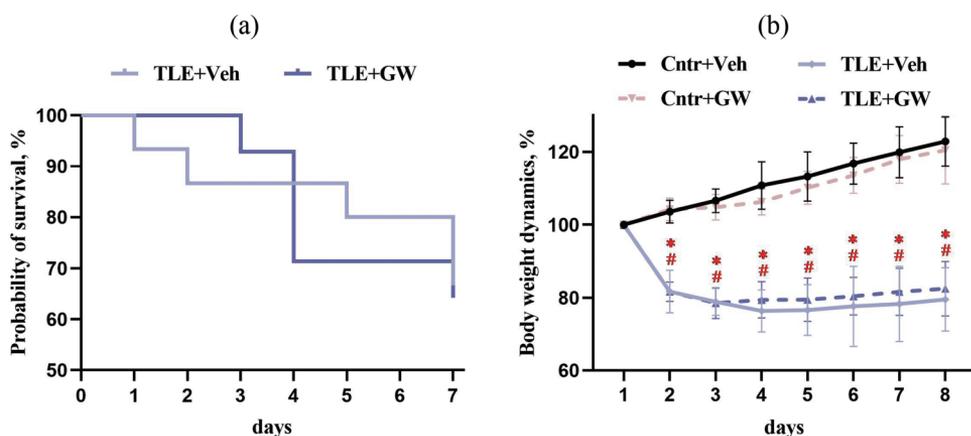


Рис. 2. (a) – Кривые выживаемости Каплана-Мейера. (b) – Динамика массы тела. Cntr+Veh – контрольные крысы без лечения; Cntr+GW – контрольные крысы, получавшие кардарин; TLE+Veh – крысы с височной эпилепсией без лечения; TLE+GW – крысы с височной эпилепсией, получавшие кардарин. * – $p < 0.05$ разница между группами Cntr+Veh и TLE+Veh; # – $p < 0.05$ разница между группами Cntr+GW и TLE+GW, тест Шидака.

ло 20 – 25% массы тела, после 4-го дня начиналось ее медленное восстановление. На динамику массы тела (рис. 2b) повлияли фактор времени (time – $F_{(7;252)} = 23.68$; $p < 0.001$) и взаимодействие факторов времени и модели (time x TLE – $F_{(7;252)} = 78.43$; $p < 0.001$), влияние фактора лечения, взаимодействия факторов TLE и лечения, а также взаимодействие факторов времени, лечения и модели статистически незначимо (GW – $F_{(1;36)} = 0.007$; $p = 0.93$; TLE x GW – $F_{(1;36)} = 2.18$; $p = 0.15$; time x TLE x GW – $F_{(7;252)} = 1.12$; $p = 0.34$). Парные сравнения выявили межгрупповые различия при сравнении нелеченых и леченых контрольных групп с соответствующими TLE группами для дней со 2-го по 8-й ($p < 0.05$). Таким образом, кардарин не влиял на динамику массы тела экспериментальных и контрольных животных.

Гибель нейронов в гиппокампе крыс с височной эпилепсией

TLE приводила к гибели значительного числа нейронов CA1 и CA3 областей гиппокампа (рис. 3а–с соответственно, $F_{(2, 12)} = 49.38$; $p < 0.0001$ и $F_{(2, 12)} = 49.28$; $p < 0.0001$), кардарин не влиял на эти нарушения, достоверные отличия от контроля ($p < 0.0001$) наблюдались как у нелеченых, так и у леченых крыс.

Действие кардарина на формирование нарушений поведения в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии

Тест Открытое поле

Тест Открытое поле проводится для оценки горизонтальной и вертикальной двигательной активности (пройденное расстояние и время стоек с упором), уровня тревожности (время, проведенное в центральной области, время вертикальных стоек, груминга и фризинга) и исследовательского поведения (время исследования норок).

Длина пути, пройденного в Открытом поле (рис. 4а, б), значительно зависела от фактора модели (TLE – $F_{(1,32)} = 27.72$; $p < 0.001$), влияние факторов лечения и взаимодействие факторов было статистически незначимо (соответственно, GW – $F_{(1, 32)} = 1.91$; $p = 0.18$; TLE x GW – $F_{(1, 32)} = 1.49$; $p = 0.23$). Аналогичные нарушения выявлены для времени локомоции (рис. 4с): TLE – $F_{(1,32)} = 18.75$; $p < 0.001$; GW – $F_{(1,32)} = 0.35$;

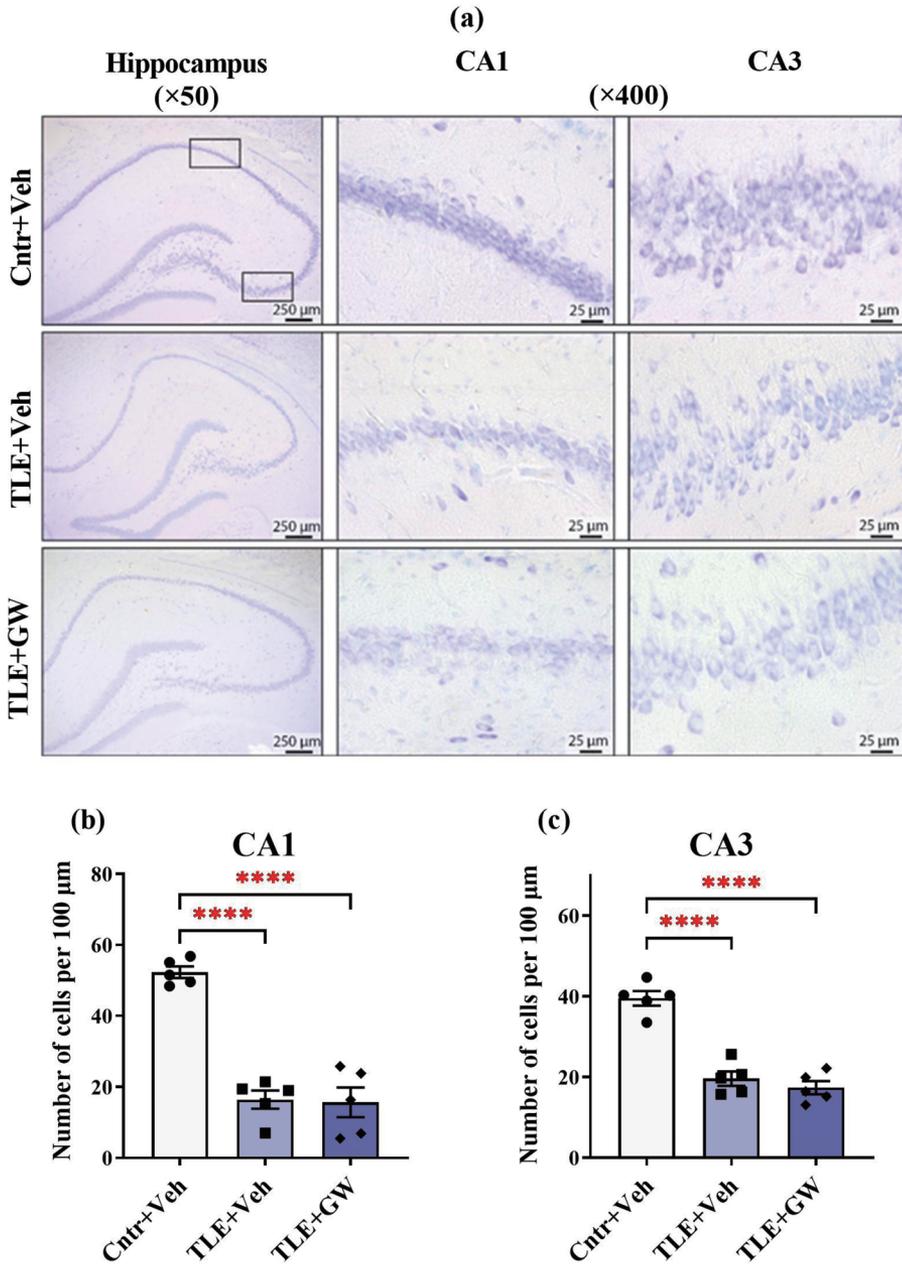


Рис. 3. Гибель нейронов в гиппокампе животных с височной эпилепсией. (a) – Примеры окрашенных по Ниссию срезов гиппокампа от контрольных (Cntr+Veh), нелеченых (TLE+Veh) и леченых (TLE+GW) крыс. (b–c) – Количество нейронов на 100 мкм длины клеточного слоя в гиппокампаальных областях CA1 и CA3 у контрольных (Cntr+Veh), нелеченых (TLE+Veh) и леченых (TLE+GW) крыс. **** – $p < 0.0001$, тест Шидак. Каждая точка соответствует показателю отдельного животного.

$p = 0.56$; $TLE \times GW - F_{(1,32)} = 0.23$; $p = 0.64$). Парные сравнения показали, что у нелеченых и леченых крыс с височной эпилепсией показатели горизонтальной двигательной активности (длины пройденного пути и времени локомоции) выше по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0.01$ и $p < 0.001$). Кардарин не влиял на эти изменения.

Вертикальная двигательная активность (количество стоек с упором, рис. 4d) также увеличивалась у крыс с височной эпилепсией ($N = 8.2$; $p = 0.04$), однако межгрупповые сравнения не выявили значимых различий, при этом различия между TLE и контрольными нелечеными животными были близки к достоверности (тест Данна, $p = 0.08$).

Экспериментальные и контрольные животные не различались по уровню тревожности, определяемому по времени, проведенному крысами в центральной области Открытого поля (рис. 4e; $N = 2.73$; $p = 0.44$). Однако по другому показателю тревожности, времени груминга (рис. 4f), между группами выявлены значимые различия ($N = 8.93$; $p = 0.03$). Парные сравнения групп выявили достоверное увеличение времени груминга у нелеченых TLE крыс по сравнению с контролем ($p < 0.05$), что свидетельствует об увеличении их уровня тревожности. В группах леченых животных таких различий не выявлено ($p > 0.05$). Это означает, что кардарин ослаблял формирование повышенной тревожности, характерной для височной эпилепсии. Показатели вертикальных стоек и фризинга значимо не изменялись.

Время обследования норок в Открытом поле (рис. 4g) зависело от TLE и фактора лечения (соответственно $TLE - F_{(1,33)} = 5.01$; $p = 0.03$; $GW - F_{(1,33)} = 4.36$; $p = 0.045$), при этом взаимодействие факторов было статистически незначимо ($TLE \times GW - F_{(1,33)} = 0.49$; $p = 0.49$). Достоверное влияние фактора лечения было связано с тем, что как контрольные, так и TLE крысы, которым вводили кардарин, имели повышенное значение времени обследования норок, однако парные сравнения групп не выявили статистически значимых различий.

Тест Обследование новых предметов

Оценку исследовательского поведения также проводили в тесте Обследование новых предметов. Общее время обследования предметов (рис. 4h) значимо зависело от фактора модели ($TLE - F_{(1,33)} = 7.539$; $p = 0.010$), влияния фактора лечения и взаимодействия факторов не выявлено (соответственно $GW - F_{(1,33)} < 0.001$, $p = 0.986$ и $TLE \times GW - F_{(1,33)} = 0.905$, $p = 0.348$). Парные сравнения выявили, что у нелеченых TLE крыс по сравнению с контролем исследовательское поведение уменьшается ($p < 0.05$), в то же время у леченых контрольных и модельных животных значимых различий не выявлено. По показателю числа подходов к новым предметам (рис. 4i) выявлено достоверное взаимодействие факторов $TLE \times GW - F_{(1,29)} = 7.32$, $p = 0.01$). Парное сравнение групп показывает, что этот показатель был значимо ниже у нелеченых TLE крыс по сравнению с контролем ($p < 0.05$) и значимо выше у леченых TLE крыс по сравнению с нелечеными ($p < 0.05$). Таким образом, кардарин ослаблял нарушения исследовательского поведения в тесте Обследования новых предметов.

Социальный тест

Социальный тест (рис. 5) проводился для оценки коммуникативного поведения (куда входило обнюхивание и груминг тела чужака, его генитальной области и хвоста), уровня агрессии (время агрессивного поведения, процент животных, имевших агрессивные проявления) и времени защитных реакций.

Время коммуникативного поведения (рис. 5a) в группах значимо различалось ($N = 23.23$; $p < 0.001$). TLE подавляла коммуникативное поведение, снижение было достоверным у нелеченых крыс ($p < 0.001$), у леченых была схожая тенденция, однако различия не достигали статистической значимости ($p > 0.05$). Кроме того, височ-

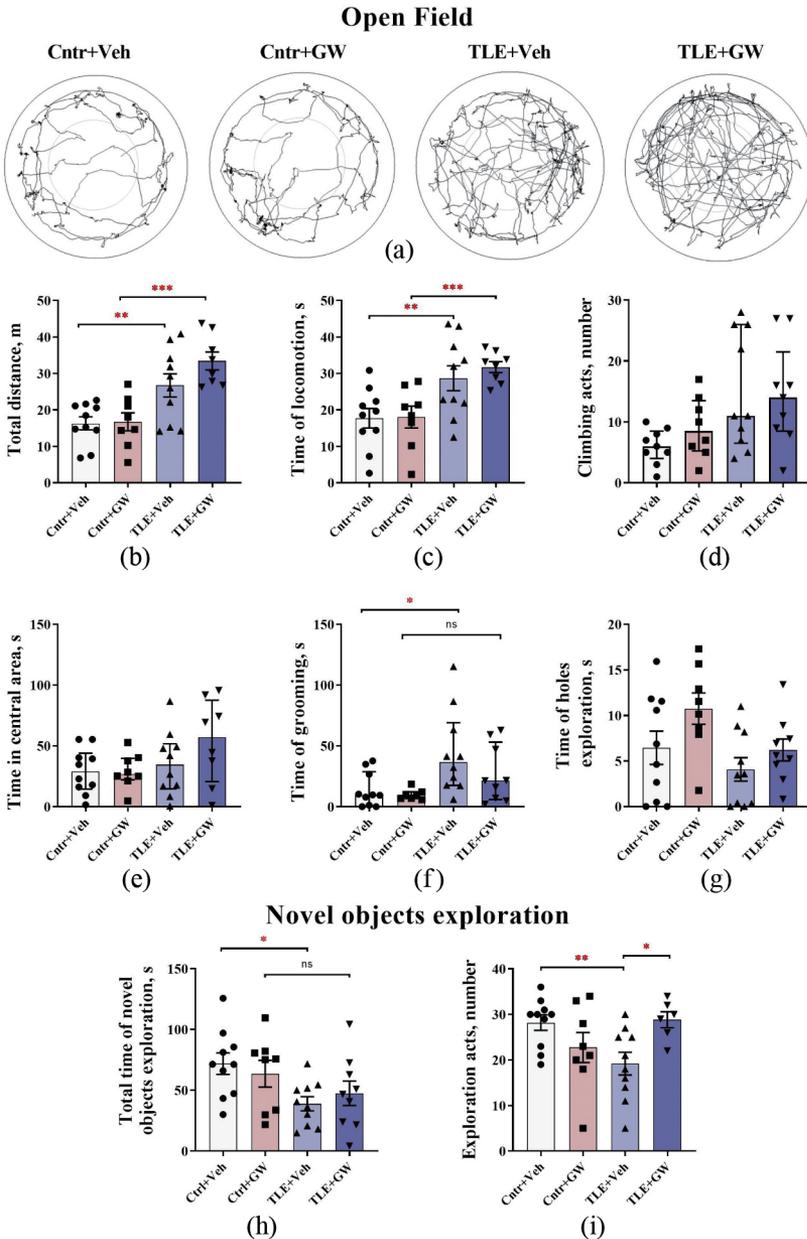


Рис. 4. Поведение контрольных и опытных крыс в тесте Открытое поле (а–г) и тесте Обследование новых объектов (h, i). (а) – Примеры треков в Открытом поле; (b) – Общее расстояние, пройденное в Открытом поле; (c) – Время локомоции; (d) – Стойки с упором, количество актов; (e) – Время в центральной зоне открытого поля; (f) – Время груминга; (g) – Время исследования норок; (h) – Время обследования новых объектов; (i) – Количество контактов с новыми объектами. Cntr+Veh – контрольные крысы без лечения; Cntr+GW – контрольные крысы, получавшие кардарин; TLE+Veh – крысы с височной эпилепсией без лечения; TLE+GW – крысы с височной эпилепсией, получавшие кардарин. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, ns – $p > 0.05$, тест множественных сравнений Шидака или Данна. Каждая точка соответствует показателю отдельного животного.

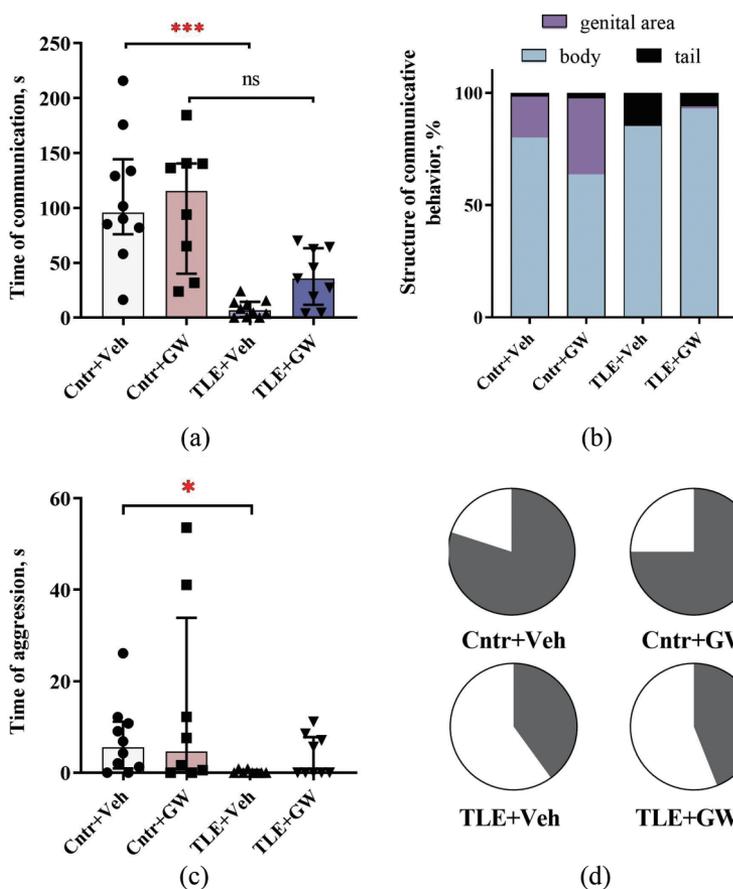


Рис. 5. Поведение контрольных и опытных крыс в социальном тесте. (а) – Время общения; (б) – Структура коммуникативного поведения; (с) – Время агрессии; (д) – % крыс с агрессивным поведением (темный сектор). Cntr+Veh – контрольные крысы без лечения; Cntr+GW – контрольные крысы, получавшие кардарин; TLE+Veh – крысы с височной эпилепсией без лечения; TLE+GW – крысы с височной эпилепсией, получавшие кардарин. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, ns – $p > 0.05$, тест множественных сравнений Шидака или Данна. Каждая точка соответствует показателю отдельного животного.

ная эпилепсия вызвала изменение структуры коммуникативного поведения (рис. 5b): у крыс TLE групп (как леченых, так и нелеченых) практически полностью отсутствовало обнюхивание генитальной области (доминантное поведение). По показателям защитного поведения различий не было.

У TLE крыс по сравнению с контрольными снижалось время агрессивного поведения (рис. 5c; $N=8.63$; $p = 0.03$). Эти изменения были статистически значимыми только у нелеченых животных ($p < 0.05$). Доля крыс, имевших агрессивные проявления (рис. 5d), также достоверно снижалась в нелеченой TLE группе по сравнению с контролем (Cntr+Veh – 80%; TLE+Veh – 40%, $\phi^* = 1.89$; $p < 0.05$), однако в группе, получавшей лечение, этот показатель значимо не изменялся (Cntr+GW – 75%; TLE+GW – 44%, $\phi^* = 1.31$; $p > 0.05$).

Таким образом, височная эпилепсия приводила к подавлению коммуникативного и агрессивного поведения – нелеченые крысы были малообщительными и слабо защищали свою территорию, кардарин ослаблял эти нарушения.

Тест на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте

Тест на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте был использован для выявления оперативной памяти (коэффициент альтернаций) и двигательной активности (общее число посещенных рукавов).

Коэффициент альтернаций (рис. 6а) значимо зависел от TLE ($F_{(1,26)} = 8.81; p = 0.006$) и от фактора лечения (GW – F височная эпилепсия $(1, 26) = 4.63; p = 0.04$), при этом взаимодействие факторов было статистически незначимым (TLE x GW – F $(1, 26) = 0.17; p = 0.69$). Парные сравнения групп выявили, что показатели рабочей памяти были ниже у нелеченых TLE крыс по сравнению с контрольными животными ($p < 0.05$), в группах леченых TLE и контрольных крыс достоверных различий не наблюдалось ($p > 0.05$). Таким образом, кардарин нивелировал негативное влияние височной эпилепсии на рабочую память.

Изменения двигательной активности в тесте на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте были аналогичны нарушениям, выявленным в тесте Открытое поле. TLE увеличивала число посещенных рукавов (рис. 6б, TLE – F $(1, 28) = 21.05; p < 0.001$), влияние фактора лечения и взаимодействия факторов было недостоверным (соответственно GW – F $(1, 28) = 2.36; p = 0.14$; TLE x GW – F $(1, 28) = 0.06; p = 0.81$). Парные сравнения показали, что число посещенных рукавов было выше как у нелеченых, так и леченых крыс с TLE по сравнению с контролем ($p < 0.05$), кардарин не блокировал эти нарушения.

Водный лабиринт Морриса

Данный тест был использован для оценки способности к обучению и пространственной памяти экспериментальных и контрольных крыс (рис. 6с–д). Поскольку изученные показатели (дистанция, пройденная до нахождения скрытой под водой платформы в тренировочных попытках, и время нахождения в целевой области, где раньше находилась платформа) не имели нормального распределения, для обработки результатов данного теста были использованы методы непараметрической статистики. X^2 тест Фридмана был использован для оценки эффективности обучения в экспериментальных и контрольных группах в четырех днях тренировки (на рис. 6с представлены суммарные данные по четырем попыткам, совершенным в каждый экспериментальный день). Дистанция, пройденная до нахождения платформы, достоверно снижалась в процессе обучения во всех группах (Cntr+Veh – $X^2 = 17.93; p < 0.001$; Cntr+GW – $X^2 = 15.51; p = 0.001$; TLE+Veh – $X^2 = 130; p = 0.005$; TLE+GW – $18.73; p < 0.001$), это говорит о том, что животные всех групп были способны обучаться в водном лабиринте. Однако эффективность обучения в группах различалась (день 1 – $N = 18.31; p < 0.001$; день 2 – $N = 13.07; p = 0.004$; день 3 – $N = 20.57; p < 0.001$; день 4 – $N = 13.84; p = 0.003$ с худшим обучением в TLE группах). В пятый тестовый день TLE крысы проводили меньше времени в целевой зоне, где раньше находилась платформа, что говорит о нарушении у них пространственной памяти (рис. 6д, е; $N = 11.48; p = 0.009$). Парное сравнение групп выявило достоверные различия в нелеченых группах, у леченых животных тенденция была аналогичной, но различия не достигали статистической значимости.

Таким образом, проведенные исследования показали, что у нелеченых крыс с TLE отмечаются существенные нарушения поведения: повышенная двигательная активность, тревожность, нарушения памяти, исследовательского и коммуникативного поведения. Введение кардарина на начальных этапах эпилептогенеза ослабляет, но не блокирует полностью формирование некоторых из этих нарушений (высокий уровень тревожности, нарушение социального поведения и памяти).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование выявило, что введение агониста PPAR β/δ -рецепторов кардарина (GW 501516) в латентный период литий-пилокарпиновой модели эпилеп-

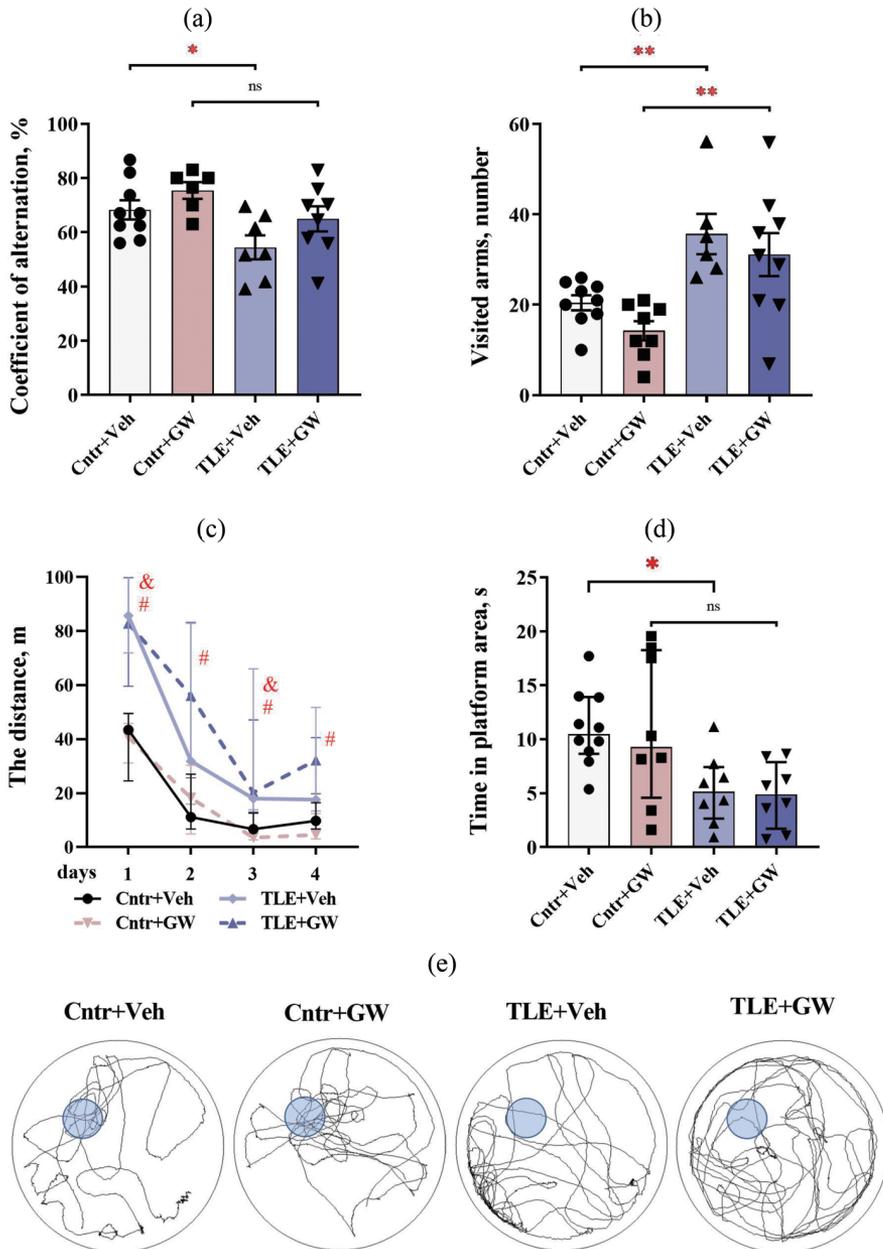


Рис. 6. Поведение контрольных и опытных крыс в тесте на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте (a, b) и водном лабиринте Морриса (c–e). (a) – Коэффициент альтернаций. (b) – Количество посещенных рукавов. (c) – Обучение в водном лабиринте Морриса (расстояние, пройденное до нахождения платформы в течение четырех тренировочных дней). (d) – Тест на пятый день, время нахождения в целевой зоне, где ранее находилась платформа. (e) – Примеры треков на пятый день тестирования. Cntr+Veh – контрольные крысы без лечения; Cntr+GW – контрольные крысы, получавшие кардарин; TLE+Veh – крысы с височной эпилепсией без лечения; TLE+GW – крысы с височной эпилепсией, получавшие кардарин. *, #, & $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns – $p > 0.05$, тест Шидака (a, b) или тест Данна (c, d). (c): # – разница между группами Cntr+Veh и TLE+Veh; & – между группами Cntr+GW и TLE+GW. Каждая точка представляет собой значение для контрольного животного.

сии не блокирует характерную для эпилепсии гибель нейронов в гиппокампе, однако ослабляет развитие коморбидных нарушений поведения в хронической фазе модели. Развитие собственно судорог мы не анализировали, так как исследование было сосредоточено на поведенческих эффектах кардарина.

PPARs (α , γ и β/δ) представляют собой лиганд-индуцируемые факторы транскрипции, относящиеся к суперсемейству ядерных гормональных рецепторов [30]. Все три типа PPARs экспрессируются в различных тканях организма, включая мозг [30, 31], они присутствуют как в нейронах, так и в глии [32], при этом имеется региональная специфичность: высокий уровень экспрессии PPAR β/δ отмечается повсеместно, в то время как уровень экспрессии PPAR α и особенно PPAR γ выражен слабее в височной коре, полях CA1 и CA3 гиппокампа, некоторых ядрах таламуса и гипоталамуса [31].

Традиционно все PPARs рассматриваются как ключевые звенья регуляции липидного и углеводного обмена [33–35], хотя имеется некоторая специфичность по их лигандам и функциям [36]. PPAR α регулируют энергетический гомеостаз, опосредуя расщепление жирных кислот и холестерина, а также стимулируя глюконеогенез и снижение уровня триглицеридов в сыворотке крови. Лигандами PPAR γ являются жирные кислоты и эйкозаноиды и другие природные липидные лиганды. Они регулируют накопление жирных кислот и метаболизм глюкозы. PPAR β/δ – это ядерные рецепторы гормонов, они реагируют на жирные кислоты и их производные, включая эйкозаноиды и простагландины, благодаря чему эти рецепторы вовлечены в регуляцию множества биологических процессов [30, 36].

В последние годы появились данные еще об одной важной функции PPARs – их участии в регуляции процессов воспаления в целом и, в частности, нейровоспаления [17, 37]. Сейчас доказано, что процессы нейровоспаления играют важную роль в патогенезе ряда нейропсихических заболеваний, включая эпилепсию [38, 39]. Так, показано, что эпилептические припадки связаны с повышением продукции в глиальных клетках провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 β (IL-1 β), IL-6 и фактора некроза опухоли- α (TNF- α), запускающих каскад процессов, связанных с повышением возбуждения нейронов, индукцией эксайтотоксичности и гибели нейронов, усиливающих и пролонгирующих эпилептогенез [8]. Кроме того, провоспалительные цитокины способствуют развитию характерных для эпилепсии нарушений поведения [22, 40].

Противовоспалительные и нейропротекторные свойства характерны для агонистов PPARs всех типов [37], включая PPAR β/δ [17]. Так, в модели глобальной церебральной ишемии показано, что агонист PPAR- β/δ GW0742 ослабляет гибель нейронов, уменьшает экспрессию генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α и усиливает экспрессию гена противовоспалительного цитокина IL-10, а также нивелирует связанные с нейровоспалением нарушения памяти [41]. Аналогичные эффекты выявлены для GW0742 в модели мозговой травмы [42].

В моделях судорог и хронической эпилепсии наибольшее количество работ было посвящено изучению эффектов агонистов PPAR γ [43]. В частности, обнаружено, что в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии агонисты PPAR γ ослабляют пилокарпин-индуцированные судороги и гибель нейронов в гиппокампе [44], усиливают экспрессию нейропротекторного противовоспалительного гена аргиназы-1 (Arg-1) [45], предотвращают активацию астроглиальных клеток и когнитивные нарушения, характерные для литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии [46]. Эффекты агонистов других типов PPARs исследованы хуже, свойства агонистов PPAR β/δ в моделях острых судорог и хронической эпилепсии ранее не изучались.

В данной работе мы провели исследование нейропротекторных и поведенческих эффектов агониста PPAR β/δ кардарина (GW501516) в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Кардарин является мощным агонистом PPAR β/δ , он примерно в 1200 раз более селективен в отношении PPAR- β/δ по сравнению с другими типами PPARs [47].

Нами показано, что у TLE крыс имеет место гибель нейронов в гиппокампе. Это нарушение является характерной особенностью как литий-пилокарпиновой модели [29], так и височной эпилепсии у людей [48]. Кардарин не предотвращал эти нарушения.

Также нами обнаружено, что развитие эпилепсии у экспериментальных крыс сопровождается формированием комплекса поведенческих нарушений, включающего гиперактивность, повышение уровня тревожности, подавление исследовательского поведения и коммуникативной активности, ухудшение различных видов памяти. Эти изменения соответствуют изменениям поведения, описанным ранее в литий-пилокарпиновой модели нами [22, 49, 50] и другими авторами [51]. Кардарин не отменял полностью, но ослаблял практически все из выявленных нарушений поведения, за исключением гиперактивности.

Таким образом, проведенное исследование показало перспективность использования агонистов PPAR β/δ для ослабления развития характерных для эпилепсии нарушений поведения.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (номер разрешения: 13-к-а, от 15 февраля 2018 г.). Это руководство соответствует Директиве ЕС 2010/63/ЕС об экспериментах на животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет Российского научного фонда (проект № 23-25-00480). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.Е.З.), сбор данных (С.М.Р., С.Д.С., Г.В.А.), обработка данных (С.М.Р., С.Д.С., Г.В.А., П.Т.Ю., Р.А.И., З.О.Е.), написание и редактирование манускрипта (С.М.Р., С.Д.С., П.Т.Ю., З.О.Е.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beghi E* (2020) The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology* 54: 185–191. <https://doi.org/10.1159/000503831>
2. *Kahane P, Barba C, Rheims S, Job-Chapron AS, Minotti L, Ryvlin P* (2015) The concept of temporal ‘plus’ epilepsy. *Rev Neurol (Paris)* 171: 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.01.562>
3. *Tellez-Zenteno JF, Dhar R, Hernandez-Ronquillo L, Wiebe S* (2007) Long-term outcomes in epilepsy surgery: antiepileptic drugs, mortality, cognitive and psychosocial aspects. *Brain* 130: 334–345. <https://doi.org/10.1093/brain/awl316>
5. *Willment KC, Golby A* (2013) Hemispheric Lateralization Interrupted: Material-Specific Memory Deficits in Temporal Lobe Epilepsy. *Front Hum Neurosci* 7. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00546>
5. *Bonora A, Benuzzi F, Monti G, Mirandola L, Pugnaghi M, Nichelli P, Meletti S* (2011) Recognition of emotions from faces and voices in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 20: 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.01.027>
6. *Swinkels WAM, Kuyk J, Dyck R van, Spinhoven Ph* (2005) Psychiatric comorbidity in epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 7: 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2005.04.012>

7. *Chen B, Choi H, Hirsch LJ, Katz A, Legge A, Buchsbaum R, Detyniecki K* (2017) Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 76: 24–31.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.08.039>
8. *Soltani Khaboushan A, Yazdanpanah N, Rezaei N* (2022) Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. *Mol Neurobiol* 59: 1724–1743.
<https://doi.org/10.1007/s12035-022-02725-6>
9. *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>
10. *Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H* (2019) Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem* 166: 502–513.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067>
11. *Warden A, Truitt J, Merriman M, Ponomareva O, Jameson K, Ferguson LB, Mayfield RD, Harris RA* (2016) Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Sci Rep* 6.
<https://doi.org/10.1038/srep27618>
12. *Bernardo A, Minghetti L* (2006) PPAR γ -agonists as Regulators of Microglial Activation and Brain Inflammation. *Curr Pharm Des* 12: 93–109.
<https://doi.org/10.2174/138161206780574579>
13. *Storer PD, Xu J, Chavis J, Drew PD* (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: Implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 161: 113–122.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.12.015>
14. *Zhao Y, Patzer A, Gohlke P, Herdegen T, Culman J* (2005) The intracerebral application of the PPAR γ -ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain. *Eur J Neurosci* 22: 278–282.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04200.x>
15. *Adabi Mohazab R, Javadi-Paydar M, Delfan B, Dehpour AR* (2012) Possible involvement of PPAR- γ 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.epilepsyres.2012.02.015>
16. *Yu X, Shao X-G, Sun H, Li Y-N, Yang J, Deng Y-C, Huang Y-G* (2008) Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors γ exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 1200: 146–158.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.047>
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. *Neuromol Med* 23: 86–98.
<https://doi.org/10.1007/s12017-020-08629-9>
18. *Esmaili MA, Yadav S, Gupta RK, Waggoner GR, Deloach A, Calingasan NY, Beal MF, Kiaei M* (2016) Preferential PPAR- α activation reduces neuroinflammation, and blocks neurodegeneration *in vivo*. *Hum Mol Genet* 25: 317–327. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv477>
19. *Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA* (2002) New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* 50: 93–103.
[https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00072-4](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00072-4)
20. *Juvale IIA, Che Has ATC* (2020) The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon* 6: e04557.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04557>
21. *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.epilepsyres.2015.09.008>
22. *Dyomina AV, Zubareva OE, Smolensky IV, Vasilev DS, Zakharova MV, Kovalenko AA, Schwarz AP, Ischenko AM, Zaitsev AV* (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>
23. *Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE* (2009) The Open Field Test. *Neuromethods* (42): 1-20.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
24. *Steinbach JM, Garza ET, Ryan BC* (2016) Novel Object Exploration as a Potential Assay for Higher Order Repetitive Behaviors in Mice. *J Vis Exp* 20(114): 54324.
<https://doi.org/10.3791/54324>

25. *File SE, Hyde JRG* (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 62: 19–24.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1978.tb07001.x>
26. *Blanchard RJ, Caroline Blanchard D* (1977) Aggressive behavior in the rat. *Behav Biol* 21: 197–224.
[https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(77\)90308-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(77)90308-X)
27. *Kim J, Kang H, Lee Y-B, Lee B, Lee D* (2023) A quantitative analysis of spontaneous alternation behaviors on a Y-maze reveals adverse effects of acute social isolation on spatial working memory. *Sci Rep* 13: 14722.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-41996-4>
28. *Wolfer DP, Stagljjar-Bozicevic M, Errington ML, Lipp H-P* (1998) Spatial Memory and Learning in Transgenic Mice: Fact or Artifact? *Physiology* 13: 118–123.
<https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1998.13.3.118>
29. *Postnikova TY, Diespirov GP, Amakhin DV, Vylekzhanina EN, Soboleva EB, Zaitsev AV* (2021) Impairments of Long-Term Synaptic Plasticity in the Hippocampus of Young Rats during the Latent Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Int J Mol Sci* 22: 13355.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413355>
30. *Heneka M, Landreth G* (2007) PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol and Cell Biol of Lipids* 1771: 1031–1045.
<https://doi.org/10.1016/j.bbali.2007.04.016>
31. *Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP* (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.064>
32. *Basu-Modak S, Braissant O, Escher P, Desvergne B, Honegger P, Wahli W* (1999) Peroxisome Proliferator-activated Receptor β Regulates Acyl-CoA Synthetase 2 in Reaggregated Rat Brain Cell Cultures. *J Biol Chem* 274: 35881–35888.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35881>
33. *Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N* (2020) PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *Int J Mol Sci* 21: 2061.
<https://doi.org/10.3390/ijms21062061>
34. *Han L, Shen W-J, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S* (2017) PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiol* 13: 279–296.
<https://doi.org/10.2217/fca-2017-0019>
35. *Han L, Shen W-J, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S* (2017) PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Future Cardiol* 13: 259–278.
<https://doi.org/10.2217/fca-2016-0059>
36. *Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA* (2021) The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism* 114: 154338.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154338>
37. *Zolezzi JM, Santos MJ, Bastias-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>
38. *Thakur S, Dhapola R, Sarma P, Medhi B, Reddy DH* (2023) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics. *Inflammation* 46: 1–17.
<https://doi.org/10.1007/s10753-022-01721-1>
39. *Chen Y, Nagib MM, Yasmen N, Sluter MN, Littlejohn TL, Yu Y, Jiang J* (2023) Neuroinflammatory mediators in acquired epilepsy: an update. *Inflammat Res* 72: 683–701.
<https://doi.org/10.1007/s00011-023-01700-8>
40. *Suleymanova EM* (2021) Behavioral comorbidities of epilepsy and neuroinflammation: Evidence from experimental and clinical studies. *Epilepsy & Behavior* 117: 107869. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.107869>
41. *Kuang G, He Q, Zhang Y, Zhuang R, Xiang A, Jiang Q, Luo Y, Yang J* (2012) Modulation of Preactivation of PPAR- β on Memory and Learning Dysfunction and Inflammatory Response in the Hippocampus in Rats Exposed to Global Cerebral Ischemia/Reperfusion. *PPAR Res* 2012: 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2012/209794>
42. *Chehaibi K, le Maire L, Bradoni S, Escola JC, Blanco-Vaca F, Slimane MN* (2017) Effect of PPAR- β/δ agonist GW0742 treatment in the acute phase response and blood–brain barrier permeability following brain injury. *Translat Res* 182: 27–48.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.10.004>
43. *Senn L, Costa A-M, Avallone R, Socala K, Wlaż P, Biagini G* (2023) Is the peroxisome proliferator-activated receptor gamma a putative target for epilepsy treatment? Current evidence and future perspectives. *Pharmacol Ther* 241: 108316.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108316>

44. Hung T-Y, Chu F-L, Wu DC, Wu S-N, Huang C-W (2019) The Protective Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma in Seizure and Neuronal Excitotoxicity. *Mol Neurobiol* 56: 5497–5506.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1457-2>
45. 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>
46. 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>
47. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5306–5311.
<https://doi.org/10.1073/pnas.091021198>
48. Schmeiser B, Li J, Brandt A, Zentner J, Doostkam S, Freiman TM (2017) Different mossy fiber sprouting patterns in ILAE hippocampal sclerosis types. *Epilepsy Res* 136: 115–122.
<https://doi.org/10.1016/j.eplesyres.2017.08.002>
49. Zubareva OE, Dyomina AV, Kovalenko AA, Roginskaya AI, Melik-Kasumov TB, Korneeva MA, Chuprina AV, Zhabinskaya AA, Kolyhan SA, Zakhharova MV, Gryaznova MO, Zaitsev AV (2023) Beneficial Effects of Probiotic Bifidobacterium longum in a Lithium–Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats. *Int J Mol Sci* 24: 8451.
<https://doi.org/10.3390/ijms24098451>
50. Smolensky IV, Zubareva OE, Kalemenev SV, Lavrentyeva VV, Dyomina AV, Karepanov AA, Zaitsev AV (2019) Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Behav Brain Res* 372.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112044>
51. Müller CJ, Gröticke I, Bankstahl M, Löscher W (2009) Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. *Exp Neurol* 219: 284–297.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.035>

Cardarin effect on the formation of histopathological and behavioral abnormalities in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rats

M. R. Subkhankulov^a, D. S. Sinyak^a, V. A. Guk^a, T. Yu. Postnikova^a, A. I. Roginskaya^a, and O. E. Zubareva^{a,*}

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

^{*}*e-mail: ZubarevaOE@mail.ru*

Epilepsy is a severe neuropsychological disease accompanied by the development of spontaneous recurrent seizures (SRS) and associated behavioral disorders that are difficult to treat. In recent years, the neuroprotective properties of agonists of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α , β/δ , γ), nuclear transcription factors involved in the regulation of lipid and carbohydrate metabolism, as well as inflammatory signaling pathways involved in the pathogenesis of epilepsy, have been actively investigated. The neuroprotective properties of PPAR γ agonists have been repeatedly described in models of epilepsy; the effects of PPAR β/δ agonists in these models have not been sufficiently investigated. The aim of this work was to study the effects of administering the PPAR β/δ agonist cardarin on the formation of histopathological and behavioral abnormalities in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (TLE). The lithium-pilocarpine model is one of the best experimental models of chronic temporal lobe epilepsy. In this study, epilepsy was induced by administration of pilocarpine to male Wistar rats at the age of 7 weeks one day after LiCl injection. Cardarin (2.5 mg/kg) was administered daily for 7 days

after pilocarpine, with the first injection one day after pilocarpine injection. Behavioral testing was performed 2–3 months after induction of the model in the following tests: Open Field, Resident Stranger, New Object Exploration, Y Maze Spontaneous Alternation and Morris Water Maze. Brain sampling for histological studies (assessment of neuronal death, Nissl staining) was performed after the end of behavioral experiments, 95 days after TLE induction. It was shown that untreated rats with TLE exhibited significant hippocampal neuron death and behavioral disorders: increased motor activity, anxiety, memory disorders, research and communicative behavior. Caradrin did not affect the survival rate of hippocampal neurons, but reduced the manifestation of almost all the above-mentioned behavioral disorders, except for hyperactivity. Thus, this study demonstrated the promising use of PPAR β/δ agonists to attenuate the development of behavioral disorders characteristic of epilepsy.

Keywords: Temporal lobe epilepsy; lithium-pilocarpine model; peroxisome proliferator-activated receptor agonists; cardarin (GW 501516); behavior; memory; neuronal death in the hippocampus