

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АНАКИНРА СПОСОБСТВУЕТ РАЗВИТИЮ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ
РЕАКЦИИ МИКРОГЛИИ В ЛАТЕНТНЫЙ ПЕРИОД ЛИТИЙ-
ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

© 2024 г. М. В. Захарова^{1, &}, А. В. Дёмина^{1, &}, А. А. Коваленко¹, О. Е. Зубарева¹,
А. М. Ищенко², А. В. Зайцев^{1, *}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

[&] – равный вклад авторов

*E-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.2023 г.

После доработки 12.12.2023 г.

Принята к публикации 13.12.2023 г.

Предполагается, что астроциты и микроглия и их поляризация могут влиять на развитие эпилепсии. Одним из процессов, влияющих на поляризацию, является нейровоспаление, играющее важную роль в эпилептогенезе. Однако конкретные механизмы его участия в сдвиге про- и противовоспалительных состояний астро- и микроглии не выяснены. В данном исследовании изучили влияние 7-дневного введения антагониста рецептора интерлейкина-1 (анакинры) на поляризацию глиальных клеток в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели у 7-недельных самцов крыс Вистар. Проанализировали уровень экспрессии мРНК генов: (i) маркеров активации астроглии (*S100b*) и микроглии (*Aif1*), (ii) белков, участвующих в транспорте и метаболизме глутамата (*Slc1a3*, *Glu1*, *Gja1*), (iii) провоспалительного пути интерлейкина-1 β (*Nlrp3*, *Il1b*, *Il1rn*) и трансформирующего фактора роста β 1 (*Tgfb1*), (iv) маркеров поляризации астроглии (*Lcn2*, *S100a10*, *Gbp2*, *Ptx3*) и (v) поляризации микроглии (*Nos2* и *Arg1*) в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии мРНК *S100b* и *Aif1* значимо возрос, и введение анакинры не снизило их гиперэкспрессию. Это свидетельствует об активации астроглии и микроглии независимо от проводимого лечения. В гиппокампе возросла экспрессия генов *Slc1a3*, *Glu1*, *Gja1*, применение анакинры не повлияло на их гиперэкспрессию, но способствовало повышению экспрессии *Gja1* в височной коре. Во всех структурах увеличилась продукция мРНК *Lcn2*, *S100a10*, *Gbp2*, *Ptx3*, *Nlrp3*, *Il1b*, *Il1rn* и *Tgfb1*. Применение анакинры понизило экспрессию гена *Il1b*. Среди маркеров поляризации микроглии выявлено понижение экспрессии *Arg1* в дорзальном гиппокампе и *Nos2* в височной коре. Введение анакинры усилило снижение экспрессии *Nos2* и восстановило уровень экспрессии *Arg1* до контрольных значений. Таким образом, введение анакинры не повлияло на интенсивность активации астроглии и микроглии, но способствовало восстановлению противовоспалительного состояния активированной микроглии.

Ключевые слова: IL-1Ra, поляризация астроцитов, поляризация микроглии, нейровоспаление, эпилептогенез

ВВЕДЕНИЕ

Эпилептогенез – это процесс, приводящий к повышению возбудимости нейронной сети и возникновению спонтанных эпилептических припадков в результате каскада молекулярных и структурных изменений в головном мозге [1]. Точные механизмы эпилептогенеза до конца не определены, однако в последние годы активно изучается участие глиальных клеток в этом процессе [1, 2]. Реактивация астроцитов и микроглии, заключающаяся в морфологическом, молекулярном или функциональном ремоделировании клеток, часто описывается при эпилептогенезе [3, 4]. Глиальные клетки вовлечены как в процессы воспаления, так и в контроль возбудимости нейронов. Однако, несмотря на появление все большего количества данных об их роли в патофизиологии эпилептических припадков, конкретные механизмы участия астро- и микроглии неясны [5].

По аналогии с периферическими макрофагами, для астро- и микроглии условно выделяют два полярных состояния активации при реализации воспалительной реакции, а процесс перехода между этими состояниями называют поляризацией. A1/M1 – нейротоксический, или провоспалительный, сопровождается повышением экспрессии провоспалительных генов (*Il1b*, *Tnfa*, *Il6*) и понижением экспрессии генов белков, участвующих в транспорте и метаболизме глутамата (*Slc1a2*, *Slc1a3*, *Glut*), что может усугублять течение эпилепсии и возможных постсудорожных нервно-психических расстройств. A2/M2 – нейрозащитный, или противовоспалительный – активирует нейротрофические (*Tgfb1*) или противовоспалительные (*Il1rn*) гены, которые способствуют выживанию и росту нейронов и поддерживают репаративные процессы в мозге [6, 7]. Для каждого из полярных состояний существуют специфические маркерные гены, по высокой продукции которых можно говорить о функциональном состоянии клеток. Так, повышенная продукция мРНК *Lcn2* и *Gbp2* считается маркером провоспалительной активации астроцитов, а увеличенная экспрессия генов *S100a10*, *Ptx3* – маркер состояний A2 [7]. Для микроглии гиперэкспрессия гена *Nos2* является маркером провоспалительной активации, а маркером противовоспалительного состояния M2 считается повышенная экспрессия гена *Arg1* [8–10].

Дисфункциональное и патологическое ремоделирование астроцитов может способствовать повышению возбудимости нейронов и развитию эпилепсии после эпилептического статуса [11, 12]. В частности, астроциты участвуют в регуляции активности глутаматергической медиаторной системы, гиперактивность которой лежит в основе многих неврологических заболеваний, в том числе эпилепсии [13, 14]. Астроциты экспрессируют переносчики возбуждающих аминокислот с высокой аффинностью к глутамату EAAT1 и EAAT2, которые осуществляют обратный захват глутамата, высвобождаемого пресинапсом [15, 16]. Поглощаемый астроцитами глутамат может быть перераспределен между соседними астроцитами с помощью щелевых контактов, образованных коннексинами Cx43 и Cx30, соединяясь через которые, астроциты образуют в мозге подобие синцития, что обеспечивает быстрое перераспределение ионов, малых молекул и распространение кальциевых волн [17]. В астроцитах с помощью глутаминсинтетазы (GS) происходит синтез глутамина из глутамата. Глутамат-глутаминовый цикл необходим для нормального функционирования глутаматергического синапса [18]. Нарушение работы каждого из перечисленных звеньев может приводить к патологическим изменениям и развитию эпилепсии. Так, инактивация GS приводит к развитию судорог или нейродегенерации вследствие эксайтотоксичности [18]. Во время судорог разобщение каналов, образованных Cx43, приводит к появлению полуканалов, в связи с чем повышается выделение астроцитами глутамата, АТФ и других соединений, способствующих повышению возбудимости нейронов. В экспериментальных моделях эпилепсии и у пациентов с эпилепсией было обнаружено повышение экспрессии астроцитарных коннексинов, а введение их блокаторов облегчало судорож-

ную активность [19]. В моделях эпилепсии также обнаружено снижение экспрессии EAAT1 и EAAT2 [20]. Ранее в наших исследованиях было показано, что продукция белка EAAT2 снижается через 7 дней после эпилептического статуса, вызванного введением пилокарпина [21]. Все указанные изменения рассматриваются как возможные механизмы эпилептогенеза [22].

Одним из неотъемлемых механизмов эпилептогенеза считается развитие нейровоспаления, способствующего повышению возбудимости нейронов [23]. Центральным механизмом регуляции нейровоспаления является путь IL-1 β , опосредующий мощный воспалительный ответ. В моделях постстатусной эпилепсии этот путь активируется в числе первых в областях мозга, участвующих в генерации и распространении судорог [24]. Показано, что эпилептический статус способствует транскрипционной активации элементов пути NLRP3 – одного из основных регуляторов высвобождения активной формы IL-1 β [25]. В свою очередь, высокий уровень экспрессии IL-1 β характерен для людей с резистентными формами эпилепсии и коррелирует с генерацией судорожных приступов у больных эпилепсией [26]. В работах Vezzani и соавт. показано на экспериментальных моделях, что введение IL-1 β имеет проконвульсантный эффект [27, 28]. IL-1 β запускает каскад провоспалительных реакций, связываясь с рецептором IL-1R1 – следующим после системы NLRP3 регулятором провоспалительного действия IL-1 β . Естественным противовоспалительным фактором на данном этапе является антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), связывающийся с рецептором IL-1R1 и блокирующий дальнейшую передачу сигнала [29]. При развитии воспалительной реакции продукция IL-1 β сопровождается экспрессией многократно большего количества IL-1Ra, однако во время судорог продукция антагониста в мозге значительно запаздывает относительно выброса IL-1 β , что может являться причиной более серьезных последствий [28, 30]. Применяемый для терапии в виде рекомбинантного белка IL-1Ra (препарат анакинра) демонстрирует высокую селективность и противовоспалительную эффективность [31, 32]. В экспериментальных моделях также показано, что введение IL-1Ra ослабляет острые судороги и меняет течение эпилептогенеза, в частности, оказывая нейропротекторный эффект и ослабляя поведенческие нарушения [33, 34].

В данном исследовании для анализа изменений поляризации глиальных клеток в ходе эпилептогенеза была использована литий-пилокарпиновая модель, считающаяся одной из лучших моделей височной эпилепсии, в которой эпилептогенез индуцируется эпилептическим статусом [35]. В этой модели эпилептический статус развивается после введения хемоконвульсанта пилокарпина, затем следует латентный период, длящийся от 1 до 5 недель, когда спонтанные судороги не наблюдаются. Латентный период заканчивается с появлением первого спонтанного эпилептического припадка. Основной структурой мозга, участвующей в эпилептогенезе и претерпевающей существенные изменения в латентный период, является гиппокамп, однако молекулярные изменения затрагивают также и височную кору [36, 37]. Для модификации эпилептогенеза в латентный период был использован IL-1Ra (препарат анакинра) с целью уточнить роль провоспалительного пути IL-1 β в поляризации глиальных клеток при эпилептогенезе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В эксперименте были использованы самцы крыс Вистар в возрасте 7 недель. Разведение животных осуществлялось виварием Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Крыс размещали по 4–6 особей в стандартные клетки для содержания лабораторных грызунов. На всех этапах эксперимента жи-

вотным предоставлялся неограниченный доступ к воде и гранулированному сухому корму, осуществлялся автоматический контроль освещения с циклом 12-часового светового дня.

Литий-пилокарпиновая модель

За сутки до введения пилокарпина крысам вводили раствор хлорида лития (внутрибрюшинно – в/б, 127 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) [38]. За 30–40 мин до введения пилокарпина крысам вводили скополамин метил бромид (в/б, 1 мг/кг, Sigma-Aldrich) для снижения активации периферических мускариновых рецепторов [35]. Введение пилокарпина (Sigma-Aldrich) производили дозами по 10 мг/кг (в/б) каждые полчаса, максимальная суммарная доза достигала 40 мг/кг. Введение пилокарпина прекращали на той дозе, после которой у крыс развивались судороги 4-й стадии тяжести (rearing) по модифицированной шкале Racine [39]. Если после введения пилокарпина в суммарной дозе 40 мг/кг у крыс не развивался эпилептический статус, их исключали из эксперимента. Эпилептический статус останавливали через 75 мин введением диазепама (в/б, 10 мг/кг, Sigma-Aldrich). Контрольным животным вводили только раствор хлорида лития. В течение первой недели после эпилептического статуса крыс кормили преимущественно влажным и сладким кормом (огурцы, хурма, распаренный геркулес с сахаром и растительным маслом) для облегчения восстановления и улучшения выживаемости.

Схема введения анакинры

После прекращения эпилептического статуса крысы случайным образом были поделены на две группы. Одной группе животных вводили антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra, препарат анакинра, Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Россия), вторая группа получала физиологический раствор. Препарат анакинра представляет собой модифицированный белок IL-1Ra (чистота 99%), к N-концу которого добавлена аминокислота метионин, разведенный в концентрации 100 мг/мл. Первая инъекция (100 мг/кг) осуществлялась через час после введения диазепама. Затем препарат вводили один раз в день по 100 мг/кг первые 5 дней, 50 мг/кг на шестой день и не вводили на седьмой день перед забором образцов мозга для биохимического анализа. Таким образом, было сформировано 3 группы животных: (1) контрольные (Ctrl, $n = 14$); (2) постстатусные без терапии (SE, $n = 9$), (3) постстатусные с терапией анакинрой (SE+A, $n = 10$).

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией

Через 7 дней после эпилептического статуса крыс декапитировали, мозг быстро извлекали и замораживали при температуре -80°C . Дорзальную и вентральную области гиппокампа, а также височную кору выделяли с помощью замораживающего микротомы OTF5000 (Bright Instruments, Великобритания) в соответствии с атласом мозга крыс [40]. Тотальную РНК экстрагировали при помощи реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Затем образцы обрабатывали 1 ед. RQ1 ДНКазы (Promega, США) для удаления возможных остатков геномной ДНК. Концентрацию и чистоту РНК оценивали спектрофотометрически на основе поглощения при 260 нм и коэффициента поглощения 260/280 с использованием спектрофотометра NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, США).

Для синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК, 0,5 мкг олиго-dT праймеров, 0,25 мкг 9-мерных случайных праймеров (ООО «ДНК-Синтез», Москва, Россия) и 100 ед. обратной транскриптазы М-MLV (Евроген, Россия) в общем объеме 20 мкл согласно инструкции производителя. Все образцы были разбавлены в 10 раз перед стадией ПЦР.

ПЦР проводили в общем объеме 6 мкл с использованием 0,8 мкл кДНК, 0,5 ед. TaqM-полимеразы (Алкор Био, Санкт-Петербург, Россия), 3,5 мМ MgCl_2 , специфичес-

ких прямого и обратного праймеров и зондов (TaqMan) (см. табл. 1, все нуклеотиды синтезированы ООО «ДНК-Синтез», Россия). В ходе работы праймеры подбирались с помощью программы Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) к последовательностям кДНК генов *Tgfb1*, *Lcn2*, *S100a10*, *Nlrp3*, *Gbp2*, *Ptx3*, *S100b*, *Gjal*, *Glul*, полученных из базы данных RefSeq Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Для конструирования зондов использовали программу Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Основными параметрами при конструировании праймеров были размер продукта (в пределах 50–140 нуклеотидов), температура отжига (58–63°C) и разница температур отжига (не более 3°C). Зонд конструировался с учетом следующих параметров: длина (18–7 нуклеотидов), содержание GC (20–80%), отсутствие нуклеотида G на 5' конце. Температура плавления зонда превышала температуру плавления праймеров на 5–10°C.

ПЦР проводили в термоциклере C1000 Touch в сочетании с системой обнаружения ПЦР в реальном времени CFX384 Touch™ (BioRad, США) в тетраплексах. Были использованы следующие мультиплексы: *Nlrp3* + *Aif1*, *Lcn2* + *Arg1* + *S100a10*, *S100b* + *Cx43*. Отдельно для данной работы были проведены ПЦР для генов: *S100b* + *Gjal* + *Glul*, *Tgfb1* + *Slc1a3*. Эффективность реакций для генов интереса проверяли методом серийных разведений [54]. Оптимизированные нами ПЦР показали оптимальную эффективность в диапазоне 90–100%. Для генов домашнего хозяйства были использованы ранее описанные мультиплексы: *Actb* + *Gapdh* + *B2m*, *Rpl13a* + *Ppia* + *Sdha*, *Hprt1* + *Pgk1* + *Ywhaz* [42].

Относительная экспрессия генов была рассчитана с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [55]. Данные нормировали по отношению к среднему геометрическому для трех наиболее стабильных референсных генов: *Gapdh*, *Ywhaz*, *Pgk1* для дорзального и вентрального гиппокампа, *Hprt1*, *Gapdh*, *Pgk1* для височной коры. Референсные гены для нормализации были выбраны на основе ранжирования, полученного с помощью онлайн-инструмента RefFinder (<https://bloomer.cn/RefFinder/>).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ был выполнен с помощью SPSS Statistics 23 (IBM, США) и GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Идентификация выбросов в данных производилась с помощью квартильного метода. Критерий Шапиро–Уилка использовался для проверки нормальности распределения. Однородность дисперсии проверялась методом Левиня. Для нормально распределенных данных использовали ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Дисперсионный анализ Уэлча и апостериорный тест Геймса–Хоуэлла использовали при неоднородности дисперсий.

Для всех тестов групповые различия считались статистически значимыми на уровне $p < 0.05$. На графиках данные представлены в логарифмической шкале в виде индивидуальных значений с минимальным и максимальным значениями (усы ошибок), медианой выборки (горизонтальная линия), первым и третьим квартилями.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Литий-пилокarpинoвый эпилептический статус приводит к увеличению экспрессии генов маркеров активации астроцитов и микроглиальных клеток

Вначале для анализа активации глиальных клеток после длительных судорог мы провели оценку относительного уровня продукции мРНК наиболее широко используемых маркеров глиальных клеток: *Aif1* для микроглии и *S100b* для астроглии [56, 57]. Во всех исследованных структурах было выявлено достоверное увеличение экспрессии двух генов вне зависимости от применения анакинры (рис. 1). Это указывает на реактивацию астроцитов и микроглиальных клеток. Для ответа на вопрос

Таблица 1. Использованные последовательности праймеров и зондов

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'	Финальные концентрации, нМ	Ссылка
<i>Actb</i> NM_031144	TGTCACCAACTGGGACGATA GGGGTGTGAAGGTCTCAAA FAM-CGTGTGGCCCTGAGGAGCAS-BHQ1	200 200	[41] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Gapdh</i> NM_017008	TGCACCAACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTTCC R6G-ATCACGCCACAGCTTCCAGAGGG-BHQ2	200 100	[43]
<i>B2m</i> NM_012512	TGCCATTCAGAAAACTCCCC GAGGAAGTTGGGCTTCCCAAT ROX-ATTCAAAGTACTCTCGCCATCCACCG-BHQ1	200 100	[44]
<i>Rpl13a</i> NM_173340	GGATCCCTCCACCCCTATGACA CTGGTACTTCCACCCGACCTC FAM-CTGCCCTCAAAGGTGTGCGGGCT-BHQ1	200 100	[45] (праймеры) [42] (зонд)
<i>SdhA</i> NM_130428	AGACGTTTGGACAGGGGAATG TCATCAATCCGCACTTGTA R6G-ACCTGGTGGAGACCGTGGAGCT-BHQ2	200 100	[46] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Ppia</i> NM_017101	AGGATTCATGTGCCAGGGTG CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA ROX-CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA-BHQ1	200 100	[47]
<i>Hprt1</i> NM_012583	TCCTCAGACCGCTTTCCTCCG TCATCATCACTAATCACGACGCTGG FAM-CCGACCCGGTCTGTCAATGTCGACCCCT-BHQ1	200 100	[48] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Pgk1</i> NM_053291	ATGCAAAAGACTGGCCAAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTC R6G-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGGA-BHQ2	200 100	[49] (праймеры) [42] (зонд)

Продолжение табл. 1

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'	Финальные концентрации, нМ	Ссылка
<i>Ywhaz</i> NM_013011	GATGAAGCCATTGCTGAACTTG GTCCTCTGGGTATCCGATGTC ROX-TGAAAGAGTCGTACAAAGACAGCAGCAGC-BHQ1	200 100	[49] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Illb</i> NM_031512	CACCTCTCAAAGCAGAGCACAG GGGTCCATGTTGAAAGTCAAC FAM-TGTCCCGACCAATTGTTTCCCTAG-BHQ1	400 200	[50]
<i>Atf1</i> NM_017196.3	CAACACACTGCAGCCTCATC AAGCTTTTCTCCCTGCAAA Cy5-CCCCAACCTAAAGCCACCAGCGTCTGA-BHQ3	200 100	[51]
<i>Ilrn</i> NM_022194.2	GGGGACCTTACAGTCACTAAT GGTTAGTATCCCAAGATTCTGAAAG ROX-AGTCAACTGGCCACCCCTGCTGGGA-BHQ2	400 100	[51]
<i>Nlrp3</i> NM_001191642	CAGACCCCTCATGTTGCCCTGT AGACCTCGGCAGAAAGTAGA FAM-CCAGACTGGTGAACCTGCTGCCCTCA-BHQ1	200 100	Эта статья
<i>Len2</i> NM_130741.1	AGCTACGATGTGCAAGTGGC CCCCCTGGTTCTCCGTACA FAM-CGACACTGACTACGACCCAGTTTGCCA-BHQ1	200 150	Эта статья
<i>Arg1</i> NM_017134.3	AGCTGGGAATTGGCAAAAGTG AACTCAGGTGAATGGGCTT HEX-TGGAAAGAGACCTTCAAGTACTGCTGC-BHQ2	300 100	[52] (праймеры) Эта статья (зонд)
<i>S100a10</i> NM_031114.1	CATTTCACAGGTTTGCAGGGG GCACTGGTCCAGGTCTTCA Cy5-AGGACCCCTCTGGCTGTGGACA-BHQ3	200 250	Эта статья

Окончание табл. 1

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'	Финальные концентрации, нМ	Ссылка
<i>Tgfb1</i> NM_021578.2	CTGCTGACCCSCACTGATAC AGCCCTGTATCCGTCCTCT FAM-TGTCGGCAGTGGCTGAACCA-BHQ1	200 100	Эта статья
<i>Ptx3</i> NM_001109536.2	AAACTTCGCCTCTCCAGCAA CATGGTGTGGGTCCTCG HEX-TGCTCTCTGGTCTGCAGTGTGGC-BHQ2	400 200	Эта статья
<i>Gbp2</i> NM_133624.2	AGTCAATGGGCCACGCTTAA AGTGGGTGATGGCCTTTTGT HEX-AGCAGTGGTCTCTCCCTGCA-BHQ2	200 100	Эта статья
<i>Nos2</i> NM_012611.3	CAGAAAGCAGAATGTGACCATCAT CGGAGGGACCAAGCCAAATC ROX-CCACCAACACAGCCTCAGATCCTT-BHQ2	400 200	[53]
<i>Gjal</i> NM_012567.2	CAGCCTCCAAAGGAGTCCAC GTCCAGAAAGTTCCTCCCAAGG FAM-ACTTTGGCGCGCGGCTTCAС-BHQ1	200 100	Эта статья
<i>S100b</i> NM_013191.2	AAGTCCACACCCAGTCCTCT AGGCTCCTGGTCACCTTTTG HEX-ACACCGAAGCCAGAGGACTCCGG-BHQ2	200 100	Эта статья
<i>Sic1a3</i> NM_019225.2	GGCTGTCAATGTGGGTACA CAGAAGCTCCCCAGGAAAAGG Cy5-CCTTGGATTGGCCTCCGACCCGT-BHQ3	200 100	Эта статья
<i>Gtlul</i> NM_017073.4	CCTTTCGGCTGGCCTTCTAA GCTCCCAACCCGCAATAA ROX-TGGCTTCCCTGGACCCCAAGGACC-BHQ2	200 150	Эта статья

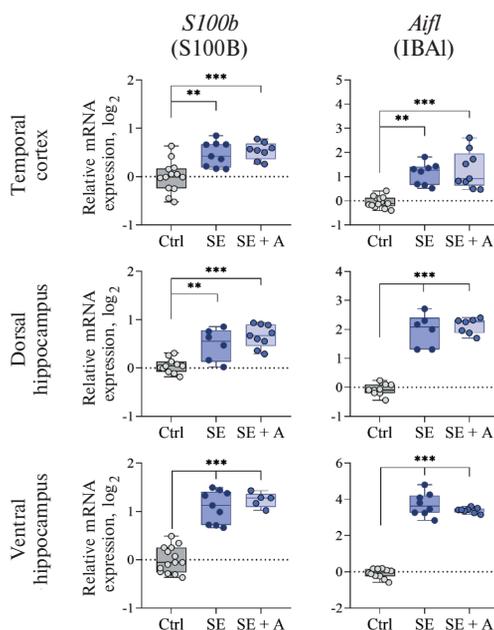


Рис. 1. Относительная экспрессия генов маркеров активации астроцитов (*S100b*) и микроглиальных клеток (*Aifl*) в височной коре (ТС), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *S100b*: TC: $F_{(2,27)} = 12.5, p = 0.002$; DH: $F_{(2,23)} = 18.9, p < 0.001$; VH: $F_{(2,25)} = 60.3, p < 0.001$; *Aifl*: TC: $F_{(2,11.9)} = 31.3, p < 0.001$; DH: $F_{(2,9.6)} = 168.6, p < 0.001$; VH: $F_{(2,13.4)} = 697.7, p < 0.001$.

о функциональном состоянии реактивных глиальных клеток мы провели анализ экспрессии соответствующих генов.

На седьмые сутки после эпилептического статуса в гиппокампе крыс повышается экспрессия генов белков, вовлеченных в транспорт и метаболизм глутамата

Для оценки функционального состояния астроцитов в первую очередь мы сосредоточились на анализе звеньев, участвующих в транспорте и метаболизме глутамата. Глутамат является основной возбуждающей аминокислотой, повышение внеклеточной концентрации которой показано в гиппокампе после судорог, вызванных пилокарпином [58]. Астроциты экспрессируют переносчики возбуждающих аминокислот с высокой аффинностью к глутамату (EAAT), принадлежащие семейству генов *Slc1* [15]. В данной работе мы провели анализ экспрессии гена *Slc1a3*, кодирующего EAAT1, и выявили повышение его относительной экспрессии в дорзальном и вентральном гиппокампе. Применение анакинры не оказало значимого влияния на выявленную гиперэкспрессию (рис. 2). В связи с этим увеличение экспрессии гена *Slc1a3* может свидетельствовать о развитии компенсаторных механизмов, направленных на уменьшение концентрации глутамата во внеклеточном веществе.

Далее мы проанализировали изменение экспрессии гена *Glul*, кодирующего глутаминсинтетазу (GS), являющуюся ключевым ферментом глутамат-глутаминового цикла, необходимого для нормального функционирования глутаматергического синапса [18]. Было выявлено увеличение экспрессии *Glul* в дорзальном и вентральном отделах гиппокампа. Аналогичные изменения отмечались и в группе SE+A (рис. 2). Это, в свою

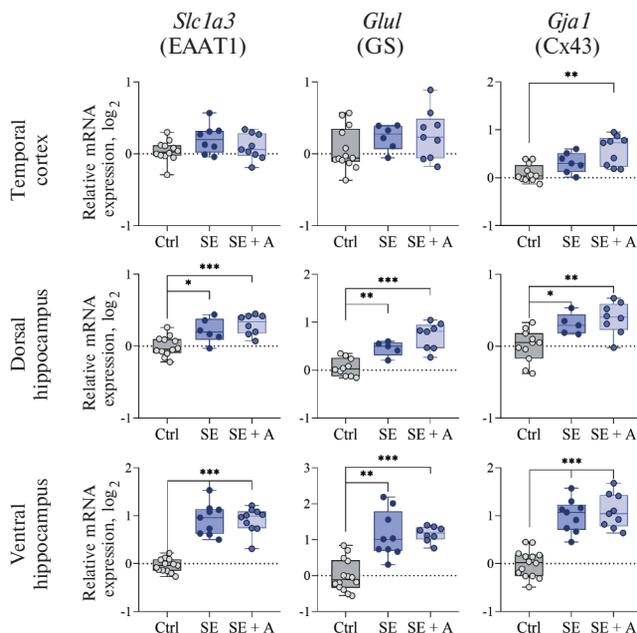


Рис. 2. Относительная экспрессия генов транспортера глутамата EAAT1 (*Slc1a3*), глутаминсинтазы (*Glul*) и белка семейства щелевых контактов коннексина 43 (*Gjal*) в височной коре (ТС), дорзальном (ДН) и вентральном (ВН) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *Slc1a3*: ТС: $F_{(2,26)} = 2.3, p = 0.12$; ДН: $F_{(2,23)} = 11.3, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,14,34)} = 73.06, p < 0.001$; *Glul*: ТС: $F_{(2,25)} = 1.36, p = 0.27$; ДН: $F_{(2,20)} = 20.8, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,16,25)} = 33.56, p < 0.001$; *Gjal*: ТС: $F_{(2,12,65)} = 9.47, p < 0.01$; ДН: $F_{(2,21)} = 8.54, p < 0.01$; ВН: $F_{(2,29)} = 41.8, p < 0.001$.

очередь, также может указывать на компенсаторный механизм, направленный на преобразование глутамата в неактивную форму.

Кроме того, был проведен анализ экспрессии гена коннексина Cx43, участвующего в перераспределении глутамата между астроцитами [17]. Мы выявили повышение экспрессии гена *Gjal* в дорзальной и вентральной областях гиппокампа через 7 дней после эпилептического статуса (рис. 2). В височной коре увеличение продукции мРНК гена *Gjal* было обнаружено только в группе SE+A по сравнению с контрольными животными, но достоверной разницы между группами SE и SE+A выявлено не было. Полученные данные могут свидетельствовать о функциональной реорганизации астроцитарного синцития.

*Применение анакинры способствовало снижению гиперэкспрессии гена провоспалительного цитокина *Il1b**

Анализ интенсивности нейровоспаления был проведен с помощью оценки относительной экспрессии генов цитокинов (*Il1b*, *Il1rn* и *Tgfb1*) и *Nlrp3*. Во всех исследованных структурах мозга было обнаружено повышение относительной продукции мРНК трех генов: *Nlrp3* – гена инфламмосомного белка NLRP3, активация которого запускает каскад реакций, приводящий к высвобождению активной формы IL-1 β ; *Il1rn* – гена противовоспалительного цитокина IL-1Ra, который конкурирует за связывание с рецептором IL-1R1 и блокирует передачу воспалительного сигнала; *Tgfb1* – гена плейотропного цитокина TGF- β 1 с разнообразным действием в ЦНС,

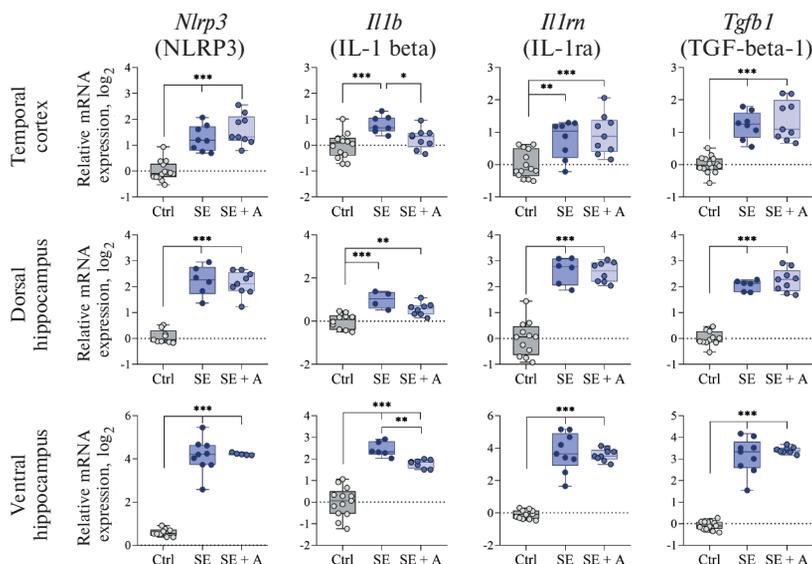


Рис. 3. Относительная экспрессия генов основного белка инфламасом *Nlrp3*, провоспалительного цитокина *Il1b*, противовоспалительного цитокина *Il1rn* и плейотропного цитокина *Tgfb1* в височной коре (ТС), дорзальном (ДН) и вентральном (ВН) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *Nlrp3*: ТС: $F_{(2,28)} = 36.7, p < 0.001$; ДН: $F_{(2,21)} = 66.1, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,12.2)} = 152.9, p < 0.001$; *Il1b*: ТС: $F_{(2,27)} = 8.4, p < 0.01$; ДН: $F_{(2,19)} = 13.85, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,12.5)} = 51.67, p < 0.001$; *Il1rn*: ТС: $F_{(2,28)} = 10.46, p < 0.001$; ДН: $F_{(2,23)} = 67.58, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,13.97)} = 326.4, p < 0.001$.

включая участие в воспалительной реакции. Применение анакинры не повлияло на экспрессию перечисленных генов (рис. 3). После эпилептического статуса в мозге крыс во всех исследованных структурах также было выявлено повышение экспрессии гена *Il1b*, кодирующего провоспалительный цитокин IL-1 β (рис. 3). Однако в случае данного цитокина применение анакинры значительно снижало выявленную гиперэкспрессию, особенно в височной коре и вентральном гиппокампе.

Применение анакинры не повлияло на экспрессию генов маркеров поляризации астроцитов

Для оценки состояния активации астроглиальных клеток в конце первой недели эпилептогенеза мы проанализировали относительную продукцию мРНК маркеров поляризации состояний A1 (*Lcn2*, *Gbp2*) и A2 (*S100a10*, *Ptx3*). Было выявлено увеличение экспрессии всех исследованных генов в трех структурах, при этом применение анакинры не повлияло на продукцию генов поляризации астроцитов (рис. 4). Таким образом, можно сделать вывод, что через 7 дней после литий-пилокарпинового SE происходит активация обоих типов состояний астроглиальных клеток, а баланс этих состояний не зависит от активации пути IL-1 β .

Применение анакинры восстановило экспрессию гена маркера противовоспалительного состояния микроглиальных клеток

Эффективными маркерами полярных состояний активации микроглии являются ферменты, использующие аргинин в качестве субстрата, в частности, индуцибельная NO-синтаза (iNOS) и аргиназа-1 [9]. Для M1 характерно повышение продукции гена

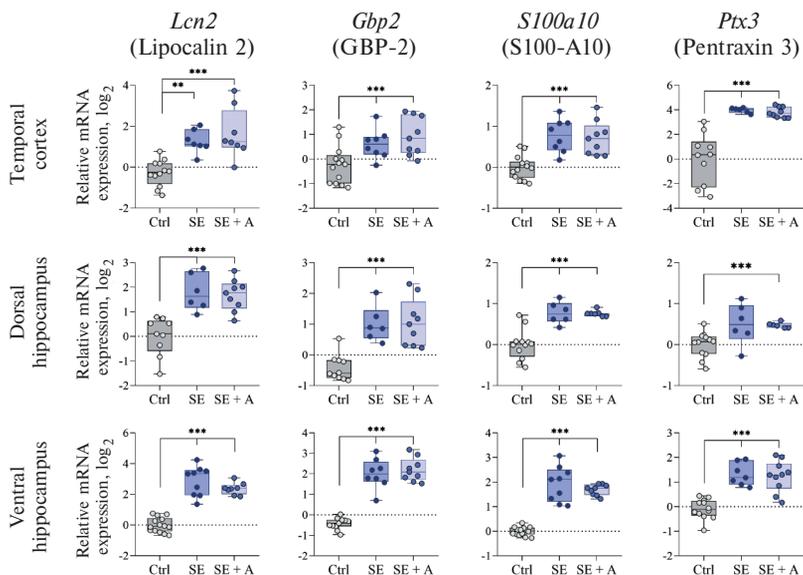


Рис. 4. Относительная экспрессия генов маркеров поляризации астроцитов: маркеры состояний A1 (*Lcn2*, *Gbp2*) и A2 (*S100a10*, *Ptx3*) в височной коре (ТС), дорзальном (ДН) и вентральном (ВН) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *Lcn2*: ТС: $F_{(2, 24)} = 14.82$, $p < 0.001$; ДН: $F_{(2, 21)} = 16.0$, $p < 0.001$; ВН: $F_{(2, 15.45)} = 89.87$, $p < 0.001$; *Gbp2*: ТС: $F_{(2, 27)} = 7.58$, $p < 0.01$; ДН: $F_{(2, 22)} = 17.37$, $p < 0.001$; ВН: $F_{(2, 12.38)} = 101.2$, $p < 0.001$; *S100a10*: ТС: $F_{(2, 28)} = 16.65$, $p < 0.001$; ДН: $F_{(2, 10.25)} = 22.68$, $p < 0.001$; ВН: $F_{(2, 14.02)} = 199.9$, $p < 0.001$; *Ptx3*: ТС: $F_{(2, 13.88)} = 17.65$, $p < 0.001$; ДН: $F_{(2, 9.8)} = 12.21$, $p < 0.01$; ВН: $F_{(2, 26)} = 25.74$, $p < 0.001$.

iNOS, синтезирующей NO, участвующий в реакциях окислительного стресса и нейровоспаления, имеющих место при эпилептогенезе [8, 9]. Мы оценили относительную экспрессию гена *Nos2*, кодирующего iNOS, и обнаружили снижение его продукции в височной коре, при этом применение анакинры способствовало более выраженному уменьшению экспрессии данного гена (рис. 5). Маркером состояния M2 является аргиназа-1, которая эффективно конкурирует с iNOS и превращает аргинин в орнотиновом цикле в орнитин и мочевину, что ведет к иммуносупрессии в связи с истощением содержания аргинина [10]. При анализе относительной экспрессии гена *Arg1*, кодирующего аргиназу-1, было выявлено снижение его экспрессии в дорзальном гиппокампе. Применение анакинры восстанавливало экспрессию данного гена до контрольных значений, что может указывать на смещение состояния активации микроглиальных клеток в сторону противовоспалительного фенотипа M2 (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе был проведен анализ экспрессии генов различных астро- и микроглиальных белков в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели на седьмые сутки после эпилептического статуса. Для выяснения роли сигнального пути IL-1 β в поляризации глиальных клеток при эпилептогенезе производилось введение анакинры (IL-1Ra) в течение всего периода после эпилептического статуса и до дня анализа экспрессии генов. Для анализа были выбраны гены-маркеры активации астроглии (*S100b*) и микроглии (*Aif1*), гены белков, участвующих в транспорте и метаболизме глутамата

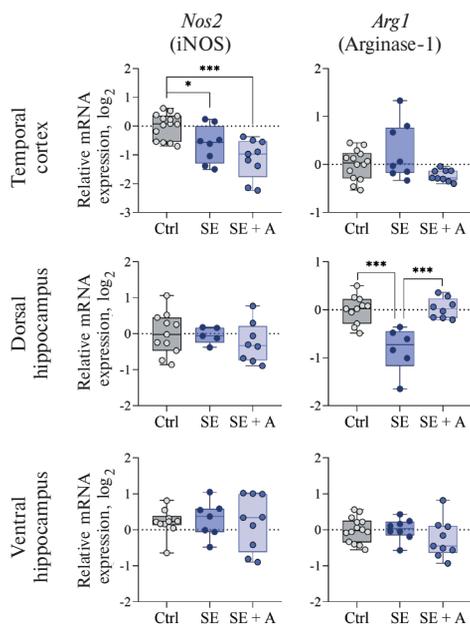


Рис. 5. Относительная экспрессия генов маркеров поляризации микроглиальных клеток: маркеры состояний M1 (*Nos2*) и M2 (*Arg1*) в височной коре (ТС), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *Nos2*: ТС: $F_{(2,28)} = 11.07, p < 0.001$; DH: $F_{(2,21)} = 0.53, p = 0.596$; VH: $F_{(2,23)} = 0.063, p = 0.94$; *Arg1*: ТС: $F_{(2,13.96)} = 5.183, p < 0.05$; DH: $F_{(2,22)} = 15.59, p < 0.001$; VH: $F_{(2,28)} = 1.322, p = 0.283$.

(*Slc1a3, Glul, Gjal*), гены пути IL-1 β (*Nlrp3, Il1b, Il1rn*) и *Tgfb1*, гены-маркеры поляризации астроглии (*Lcn2, Gbp2, S100a10, Ptx3*) и микроглии (*Arg1, Nos2*).

Уровень экспрессии мРНК *S100b* и *Aif1* значимо возрос во всех исследованных структурах, и введение анакинры не снизило их гиперэкспрессию. В наших предыдущих исследованиях также было выявлено повышение экспрессии *Gfap*, являющегося классическим маркером активации астроглии [59]. В совокупности данные об экспрессии маркеров глиальных клеток позволяют сделать вывод о том, что на седьмые сутки после индуцированного пилокарпином эпилептического статуса наблюдается активация астроглиальных и микроглиальных клеток, что согласуется с литературными данными о нейровоспалении в период эпилептогенеза [60].

Предполагается, что вызванная эпилептическим статусом реактивация и дисфункциональное ремоделирование астроцитов может являться одной из причин эпилептогенных нарушений [5]. В качестве ее основного механизма рассматривается нарушение регуляции работы глутаматергического синапса вследствие снижения поглощения синаптического глутамата астроцитами, а также нарушения глутамат-глутаминового цикла [14]. Транспортёры глутамата EAAT1 и EAAT2, характерные для астроцитов, имеют разную локализацию на мембране клетки. EAAT1 располагается на соме астроцитов и по длине их отростков, а EAAT2 закреплен каркасными белками на перисинаптической части астроцитарного отростка, непосредственно контактирующей с глутаматергическим синапсом, и осуществляет обратный захват глутамата, высвобождаемого пресинапсом [16]. Ранее в наших работах было показано снижение продукции белка EAAT2 в дорзальном гиппокампе крыс на седьмые сутки после эпилептического статуса при отсутствии значимых изменений экспрессии гена *Slc1a2* [21],

что может свидетельствовать об ухудшении синаптической функции астроцитов [61]. В настоящем исследовании мы провели анализ экспрессии гена *Slc1a3*, кодирующего белок EAAT1, который располагается в основном на отростках и соме астроцитов, и гена глутаминсинтетазы (*Glul*), осуществляющей превращение глутамата в глутамин и локализованной преимущественно в астроцитах. В дорзальном и вентральном гиппокампе была выявлена повышенная экспрессия генов *Slc1a3* и *Glul*, что может свидетельствовать о развитии общего компенсаторного механизма поглощения и превращения глутамата астроцитами. Ранее было показано, что продукция белков EAAT1 и EAAT2 снижается в гиппокампе пациентов с эпилепсией [62, 63]. И хотя в наших предыдущих работах введение анакинры приводило к изменению экспрессии *Slc1a2* в вентральном гиппокампе и височной коре, что, как мы предположили, являлось одним из механизмов нейропротекции, в настоящем исследовании введение анакинры не оказало значимого влияния на продукцию *Slc1a3* и *Glul*. Это означает, что увеличение экспрессии данных генов в латентной фазе литий-пилокарпиновой модели не определяется активацией пути IL-1 β . В то же время IL-1 β способствовал снижению экспрессии генов глутамат-глутаминового цикла в модели рассеянного склероза [64]. Это может указывать на присутствие в эпилептогенезе других механизмов, вклад которых в изменение экспрессии *Glul* оказывается более существенным.

Данные о роли щелевых соединений и коннексинов в эпилептогенезе противоречивы [19]. Функциональные щелевые контакты между астроцитами образованы полуканалами каждого из двух контактирующих астроцитов. Считается, что в случае тяжелого реактивного астроглиоза щелевые контакты распадаются, становясь полуканалами, что затрудняет быстрое перераспределение ионов и малых молекул и способствует их утечке из астроцитов, что может приводить к повышению возбудимости нейронов [65]. Ингибирование Sx43-содержащих щелевых контактов предотвращало эпилептиформную активность в срезах или снижало ее интенсивность за счет снижения астроцитарной синхронизации [66]. При эпилепсии реактивный астроглиоз сопровождается ростом экспрессии генов коннексинов Sx43 [19, 22, 67]. В нашей работе также было отмечено повышение продукции мРНК *Gjal* на седьмые сутки после литий-пилокарпинового эпилептического статуса, что может свидетельствовать о функциональной реорганизации астроцитарного синцития. При этом введение анакинры не повлияло на гиперэкспрессию *Gjal* в гиппокампе, но способствовало повышению экспрессии *Gjal* в височной коре крыс после эпилептического статуса. Можно предположить, что активация пути IL-1 β оказывает влияние на функционирование Sx43. Подобная связь была обнаружена при моделировании болезни Альцгеймера, где обработка IL-1 β культуры первичных астроцитов способствовала увеличению уровня дефосфорилированного Sx43 [68]. Однако по уровню мРНК в ткани можно сделать лишь ограниченные выводы о функциональном состоянии щелевых контактов и их вкладе в развитие эпилепсии, так как решающую роль при эпилептогенезе играет структурная организация белковых молекул. Совместно с анализом экспрессии *Gjal* и *Slc1a2/Slc1a3* уместно в будущих исследованиях оценить относительную экспрессию генов калиевых каналов Kir4.1 и аквапоринов AQP4, так как перечисленные каналы являются звеньями одной системы, участвующей в клиренсе глутамата и K⁺ и поддержании внеклеточного гомеостаза [19].

Для анализа активации провоспалительного пути IL-1 β в условиях введения анакинры мы оценили экспрессию генов основных участников данного пути и обнаружили увеличение экспрессии *Nlrp3*, *Il1b* и *Il1rn* во всех исследованных структурах на седьмые сутки после эпилептического статуса. В результате применения анакинры наблюдалось подавление гиперэкспрессии только гена *Il1b* в височной коре и вентральном гиппокампе. Экспрессия гена *Nlrp3* не изменилась в результате системного введения анакинры, следовательно, снижение экспрессии гена *Il1b* связано с последующими механизмами регуляции провоспалительного ответа, в частности,

рецептора IL-1R1. Согласно литературным данным, изменение соотношения IL-1 β (запуск провоспалительного каскада при связывании с рецептором IL-1R1) и IL-1Ra (ингибирование развития противоспалительного каскада) в пользу второго может способствовать снижению интенсивности воспаления и развитию комплекса противовоспалительных реакций [69]. Следует заметить, что в мозге крыс после эпилептического статуса наряду с повышением экспрессии *Il1b* было выявлено и повышение экспрессии *Il1rn*, что отражает работу собственных механизмов регуляции интенсивности нейровоспаления, которые, по-видимому, оказываются недостаточными после литий-пилокарпинового эпилептического статуса для снижения интенсивности воспалительных процессов.

Мы также выявили повышение экспрессии гена *Tgfb1* в гиппокампе и височной коре крыс через 7 дней после эпилептического статуса. Функции TGF- β 1 неоднозначны [70], с одной стороны, он рассматривается как плеiotропный цитокин, продуцируемый микроглией и являющийся маркером состояния M2, с другой стороны, как ростовой фактор. Гиперэкспрессия *Tgfb1* может быть звеном компенсаторного механизма для снижения интенсивности нейровоспалительных реакций, ранее было показано, что TGF- β 1 регулирует степень пролиферации астроцитов и микроглии [71]. С другой стороны, при нарушении целостности гематоэнцефалического барьера TGF- β 1 опосредует индуцируемое альбумином патологическое ремоделирование матрикса и повышение возбудимости нейронов [72]. Таким образом, выводы о функциональном значении гиперэкспрессии *Tgfb1* можно делать только на основании комплексных морфологических и молекулярных данных.

На основе анализа генов-маркеров A1/A2 поляризации астроцитов (*Lcn2*, *Gbp2* и *S100a10*, *Ptx3* соответственно) мы делаем вывод, что на седьмые сутки после SE имеет место активация обоих полярных состояний астроцитов. Более того, поскольку введение анакинры не оказало влияния на гиперэкспрессию изучаемых генов, мы предполагаем, что баланс этих состояний зависит не от активации пути IL-1 β , а определяется другими механизмами.

Активированная микроглия представлена спектром переходящих состояний, где M1/M2 являются обозначениями крайних полярных состояний активации, но редко встречаются в чистом виде *in vivo* [73, 74]. Считается, что на начальных этапах развития нейровоспаления преобладает провоспалительный или нейротоксический фенотип M1, направленный на удаление продуктов клеточной гибели, а также инфекционных агентов. На завершающих этапах воспалительных реакций, направленных на пролиферацию клеток и репарацию тканей, происходит переключение на M2 – так называемый альтернативный или противоспалительный фенотип. Однако когда противоспалительный ответ не дает результата, постоянное присутствие и продолжающаяся продукция провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода может привести к гибели клеток и дальнейшему повреждению тканей [6]. По данным экспрессии маркерных генов полярных фенотипов мы можем говорить о равновесии про- и противоспалительных процессов в целом. В нашем исследовании было обнаружено снижение экспрессии гена *Nos2* в височной коре, что может свидетельствовать об уменьшении провоспалительной активации микроглии на седьмые сутки после эпилептического статуса. При этом введение анакинры способствовало более выраженному подавлению экспрессии данного гена в височной коре. Напротив, в дорзальном гиппокампе – одной из основных структур эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели – было выявлено снижение экспрессии гена *Arg1*, что может указывать на ослабление противовоспалительных процессов, реализуемых микроглией, это способствует эпилептогенезу, поскольку ингибирование активности или экспрессии аргиназы приводит к увеличению продукции NO [8, 9]. Восстановление продукции *Arg1* при применении анакинры может отражать один из механизмов противоэпилептогенного эффекта IL-1Ra, показанного ранее [59]. Можно предположить, что в совокупности сохранение повышен-

ной экспрессии противовоспалительных факторов IL-1Ra и TGF- β 1, восстановление экспрессии гена *Arg1* и снижение гиперэкспрессии *Il1b* могут значимо смещать баланс реакций активного нейровоспаления в сторону нейропротекции и репарации нервной ткани. Известно, что активация противовоспалительного фенотипа микроглии лежит в основе благоприятного исхода болезней, в патогенезе которых ключевую роль играет нейровоспаление [6].

Таким образом, системное введение анакринры не повлияло на интенсивность активации астроглии и микроглии, но позволило сдвинуть баланс между про- и противовоспалительными процессами в сторону противовоспалительных реакций в активированной микроглии. Это позволяет предположить, что поляризация микроглии зависит от активации пути IL-1 β , а влияние на этот путь может быть перспективным подходом к модификации epileptogenesis и терапии эпилепсии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

SE – status epilepticus, эпилептический статус

EAAT1 и EAAT2 – Excitatory Amino Acid Transporter 1 и 2

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и разработка дизайна исследования (М. В. З., О. Е. З., А. В. З.), проведение экспериментальной работы (М. В. З., А. А. К., А. В. Д., А. М. И.), анализ и интерпретация данных (М. В. З., А. А. К., А. В. Д.), статистическая обработка данных (М. В. З., А. А. К.), написание и редактирование рукописи (А. В. Д., М. В. З., А. А. К., О. Е. З., А. В. З.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда, номер проекта 23-25-00242. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований и в соответствии с Руководством по обращению с лабораторными животными, действующим в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (номер этического разрешения: 13-к-а от 15 февраля 2018 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ (2015) Epileptogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med 5: a022822.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022822>
2. Singh S, Singh TG, Rehni AK (2021) An Insight into Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches in Epileptogenesis. CNS Neurol Disord – Drug Targets 19: 750–779.
<https://doi.org/10.2174/1871527319666200910153827>
3. Yu C, Deng XJ, Xu D (2023) Microglia in epilepsy. Neurobiol Dis 185: 106249.
<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2023.106249>
4. Verkhratsky A, Ho MS, Vardjan N, Zorec R, Parpura V (2019) General Pathophysiology of Astroglia. Adv Exp Med Biol 1175: 1149.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_7
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. *Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK* (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammat* 11: 1–15.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>
7. *Ding Z-B, Song L-J, Wang Q, Kumar G, Yan Y-Q, Ma C-G* (2021) Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 16: 1702.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.360664>
8. *Sharma S, Puttachary S, Thippeswamy T* (2019) Glial source of nitric oxide in epileptogenesis: A target for disease modification in epilepsy. *J Neurosci Res* 97: 1363–1377.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24205>
9. *Morris SM* (2007) Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge. *J Nutr* 137: 1602S–1609S.
<https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1602S>
10. *Munder M* (2009) Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 158: 638–651.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>
11. *Vezzani A, Ravizza T, Bedner P, Aronica E, Steinhäuser C, Boison D* (2022) Astrocytes in the initiation and progression of epilepsy. *Nat Rev Neurol* 18: 707–722.
<https://doi.org/10.1038/s41582-022-00727-5>
12. *Gibbons MB, Smeal RM, Takahashi DK, Vargas JR, Wilcox KS* (2013) Contributions of astrocytes to epileptogenesis following status epilepticus: Opportunities for preventive therapy? *Neurochem Int* 63: 660–669.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.008>
13. *Chen T-S, Huang T-H, Lai M-C, Huang C-W* (2023) The Role of Glutamate Receptors in Epilepsy. *Biomedicines* 11: 783.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11030783>
14. *Boison D, Steinhäuser C* (2018) Epilepsy and astrocyte energy metabolism. *Glia* 66: 1235–1243.
<https://doi.org/10.1002/glia.23247>
15. *Torres GE, Amara SG* (2007) Glutamate and monoamine transporters: new visions of form and function. *Curr Opin Neurobiol* 17: 304–312.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.05.002>
16. *Murphy-Royal C, Dupuis JP, Varela JA, Panatier A, Pinson B, Baufretton J, Groc L, Oliet SHR* (2015) Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat Neurosci* 18: 219–226.
<https://doi.org/10.1038/nn.3901>
17. *Verhoog QP, Holtman L, Aronica E, van Vliet EA* (2020) Astrocytes as Guardians of Neuronal Excitability: Mechanisms Underlying Epileptogenesis. *Front Neurol* 11.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2020.591690>
18. *Andersen JV, Markussen KH, Jakobsen E, Schousboe A, Waagepetersen HS, Rosenberg PA, Aldana BI* (2021) Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology* 196: 108719.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>
19. *Yang T-T, Qian F, Liu L, Peng X-C, Huang J-R, Ren B-X, Tang F-R* (2021) Astroglial connexins in epileptogenesis. *Seizure* 84: 122–128.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.11.022>
20. *Barker-Haliski M, White HS* (2015) Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5: a022863.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022863>
21. *Dyomina AV, Kovalenko AA, Zakharova MV, Postnikova TY, Griflyuk AV, Smolensky IV, Antonova IV, Zaitsev AV* (2022) MTEP, a selective mGluR5 antagonist, had a neuroprotective effect but did not prevent the development of spontaneous recurrent seizures and behavioral comorbidities in the rat lithium–pilocarpine model of epilepsy. *Int J Mol Sci* 23.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010497>
22. *Shen W, Pristov J, Nobili P, Nikolić L* (2023) Can glial cells save neurons in epilepsy? *Neural Regen Res* 18: 1417.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.360281>
23. *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>
24. *Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A* (2008) Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 29: 142–160.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.08.012>

25. *Pohlentz MS, Müller P, Cases-Cunillera S, Opitz T, Surges R, Hamed M, Vatter H, Schoch S, Becker AJ, Pitsch J* (2022) Characterisation of NLRP3 pathway-related neuroinflammation in temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 17: 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271995>
26. *Wu C, Zhang G, Chen L, Kim S, Yu J, Hu G, Chen J, Huang Y, Zheng G, Huang S* (2020) The Role of NLRP3 and IL-1 β in Refractory Epilepsy Brain Injury. *Front Neurol* 10: 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01418>
27. *Dubé C, Vezzani A, Behrens M, Bartfai T, Baram TZ* (2005) Interleukin-1 β contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol* 57: 152–155.
<https://doi.org/10.1002/ana.20358>
28. *Vezzani A, Baram TZ* (2007) New Roles for Interleukin-1 Beta in the Mechanisms of Epilepsy. *Epilepsy Curr* 7: 45–50.
<https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2007.00165.x>
29. *Weber A, Wasiliew P, Kracht M* (2010) Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci Signal* 3: 1–7.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1>
30. *De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De Luigi A, Garattini S, Vezzani A* (2000) Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 12: 2623–2633.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00140.x>
31. *Waugh J, Perry CM* (2005) Anakinra. *BioDrugs* 19: 189–202.
<https://doi.org/10.2165/00063030-200519030-00005>
32. *Cavalli G, Dinarello CA* (2018) Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Front Pharmacol* 9: 1–21.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01157>
33. *Ravizza T, Lucas S, Balosso S, Bernardino L, Ku G, Noé F, Malva J, Randle JCR, Allan S, Vezzani A* (2006) Inactivation of Caspase-1 in Rodent Brain: A Novel Anticonvulsive Strategy. *Epilepsia* 47: 1160–1168.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00590.x>
34. *Noe FM, Polascheck N, Frigerio F, Bankstahl M, Ravizza T, Marchini S, Beltrame L, Banderó CR, Löscher W, Vezzani A* (2013) Pharmacological blockade of IL-1 β /IL-1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 59: 183–193.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.07.015>
35. *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>
36. *André V, Dubé C, François J, Leroy C, Rigoulot M, Roch C, Namer IJ, Nehlig A* (2007) Pathogenesis and Pharmacology of Epilepsy in the Lithium-pilocarpine Model. *Epilepsia* 48: 41–47.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01288.x>
37. *Коваленко АА, Калемев СВ, Шварц АП, Дёмкина АВ, Зубарева ОЕ* (2019) Региональная специфика изменений продукции мРНК провоспалительных цитокинов в литий-пilocарпиновой модели височной эпилепсии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105: 716–723. [*Kovalenko AA, Kalemenev SV, Schwartz AP, Demina AV, Zubareva OE* (2019) Regional specificity of changes in the production of mRNA of proinflammatory cytokines in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Russ J Physiol* 105: 716–723. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919060037>
38. *De Bruin VMS, Marinho MMF, De Sousa FCF, Viana GSB* (2000) Behavioral and neurochemical alterations after lithium-pilocarpine administration in young and adult rats: A comparative study. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 547–551.
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00247-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00247-6)
39. *Furtado MA, Castro OW, Del Vecchio F, de Oliveira JAC, Garcia-Cairasco N* (2011) Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy Behav* 20: 257–266.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.11.024>
40. *Paxinos G, Watson C* (2006) The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier.
41. *Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G* (2008) Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse* 62: 302–309.
<https://doi.org/10.1002/syn.20496>
42. *Schwarz AP, Malygina DA, Kovalenko AA, Trofimov AN, Zaitsev AV* (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>

43. *Lin W, Burks CA, Hansen DR, Kinnamon SC, Gilbertson TA* (2004) Taste Receptor Cells Express pH-Sensitive Leak K⁺ Channels. *J Neurophysiol* 92: 2909–2919.
<https://doi.org/10.1152/jn.01198.2003>
44. *Yamaguchi M, Yamauchi A, Nishimura M, Ueda N, Naito S* (2005) Soybean Oil Fat Emulsion Prevents Cytochrome P450 mRNA Down-Regulation Induced by Fat-Free Overdose Total Parenteral Nutrition in Infant Rats. *Biol Pharm Bull* 28: 143–147.
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.143>
45. *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>
46. *Pohjanvirta R, Niittynen M, Lindén J, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB* (2006) Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chem Biol Interact* 160: 134–149.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.01.001>
47. *Malkin SL, Amakhin DV, Veniaminova EA, Kim KK, Zubareva OE, Magazanik LG, Zaitsev AV* (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>
48. *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>
49. *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>
50. *Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF* (2004) Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol* 137: 65–73.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02499.x>
51. *Zubareva OE, Dyomina AV, Kovalenko AA, Roginskaya AI, Melik-Kasumov TB, Korneeva MA, Chuprina AV, Zhabinskaya AA, Kolyhan SA, Zakharova 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>
52. *Su J, Zhang Y, Cheng C, Zhu Y, Ye Y, Sun Y, Xiang S, Wang Y, Liu Z, Zhang X* (2021) Hydrogen regulates the M1/M2 polarization of alveolar macrophages in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res* 47: 301–310.
<https://doi.org/10.1080/01902148.2021.1919788>
53. *Sang N, Yun Y, Li H, Hou L, Han M, Li G* (2010) SO₂ Inhalation Contributes to the Development and Progression of Ischemic Stroke in the Brain. *Toxicol Sci* 114: 226–236.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq010>
54. *Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M* (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif* 3: 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
55. *Livak KJ, Schmittgen TD* (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* 25: 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
56. *Langeh U, Singh S* (2020) Targeting S100B Protein as a Surrogate Biomarker and its Role in Various Neurological Disorders. *Curr Neuropharmacol* 19: 265–277.
<https://doi.org/10.2174/1570159X18666200729100427>
57. *Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, Steinhäuser C, Volterra A, Carmignoto G, Agarwal A, Allen NJ, Araque A, Barbeito L, Barzilai A, Bergles DE, Bonvento G, Butt AM, Chen WT, Cohen-Salmon M, Cunningham C, Deneen B, De Strooper B, Diaz-Castro B, Farina C, Freeman M, Gallo V, Goldman JE, Goldman SA, Götz M, Gutiérrez A, Haydon PG, Heiland DH, Hol EM, Holt MG, Iino M, Kastanenka KV, Kettenmann H, Khakh BS, Koizumi S, Lee CJ, Liddelow SA, MacVicar BA, Magistretti P, Messing A, Mishra A, Molofsky AV, Murai KK, Norris CM, Okada S, Oliet SHR, Oliveira JF, Panatier A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Pellerin L, Perea G, Pérez-Nievas BG, Pfrieger FW, Poskanzer KE, Quintana FJ, Ransohoff RM, Riquelme-Perez M, Robel S, Rose CR, Rothstein JD, Rouach N, Rowitch DH, Semyanov A, Sirko S, Sontheimer H, Swanson RA, Vitorica J, Wanner IB, Wood LB, Wu J, Zheng B, Zimmer ER,*

- Zorec R, Sofroniew MV, Verkhratsky A (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 24: 312.
<https://doi.org/10.1038/S41593-020-00783-4>
58. Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol* 121: 1171–1179.
<https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0701231>
59. 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: 1–25.
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
60. Choi J, Koh S (2008) Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J* 49: 1–18.
<https://doi.org/10.3349/ymj.2008.49.1.1>
61. Kim K, Lee S, Kegelman TP, Su Z, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellicchia M, Sarkar D, Fisher PB (2011) Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol* 226: 2484–2493.
<https://doi.org/10.1002/jcp.22609>
62. Proper EA, Hoogland G, Kappen SM, Jansen GH, Rensen MGA, Schrama LH, van Veelen CWM, van Rijen PC, van Nieuwenhuizen O, Gispen WH, de Graan PNE (2002) Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 125: 32–43.
<https://doi.org/10.1093/brain/awf001>
63. Sarac S, Afzal S, Broholm H, Madsen FF, Ploug T, Laursen H (2009) Excitatory amino acid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy. *APMIS* 117: 291–301.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02443.x>
64. Zeis T, Allaman I, Gentner M, Schroder K, Tschopp J, Magistretti PJ, Schaeren-Wiemers N (2015) Metabolic gene expression changes in astrocytes in Multiple Sclerosis cerebral cortex are indicative of immune-mediated signaling. *Brain Behav Immun* 48: 313–325.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.013>
65. Bedner P, Steinhäuser C (2013) Altered Kir and gap junction channels in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int* 63: 682–687.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.01.011>
66. Kékési O, Joja E, Szabó Z, Kardos J, Héja L (2015) Recurrent seizure-like events are associated with coupled astroglial synchronization. *Front Cell Neurosci* 9.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00215>
67. Bedner P, Dupper A, Hüttmann K, Müller J, Herde MK, Dublin P, Deshpande T, Schramm J, Häussler U, Haas CA, Henneberger C, Theis M, Steinhäuser C (2015) Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138: 1208–1222.
<https://doi.org/10.1093/brain/awv067>
68. Pleiss MM, Furman JL, Abdul HM, Norris CM (2014) P3-069: A NOVEL REAGENT MODULATES CN/CX43 INTERACTIONS DURING THE PROGRESSION OF ALZHEIMER'S DISEASE. *Alzheimer's Dement* 10.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.05.1157>
69. Plata-Salaman CR (2002) Brain cytokines and disease. *Acta Neuropsychiatr* 14: 262–278.
<https://doi.org/10.1034/j.1601-5215.2002.140602.x>
70. Smith AM, Dragunow M (2014) The human side of microglia. *Trends Neurosci* 37: 125–135.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.001>
71. Lindholm D, Castrén É, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H (1992) Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 117: 395–400.
<https://doi.org/10.1083/jcb.117.2.395>
72. Kim SY, Senatorov VV, Morrissey CS, Lippmann K, Vazquez O, Milikovskiy DZ, Gu F, Parada I, Prince DA, Becker AJ, Heinemann U, Friedman A, Kaufner D (2017) TGFβ signaling is associated with changes in inflammatory gene expression and perineuronal net degradation around inhibitory neurons following various neurological insults. *Sci Rep* 7: 7711.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07394-3>
73. Chen Z, Trapp BD (2016) Microglia and neuroprotection. *J Neurochem* 136: 10–17.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13062>
74. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay M-E, Aguzzi A, Ajami B, Amit I, Audinat E, Bechmann I, Bennett M, Bennett F, Bessis A, Biber K, Bilbo S, Blurton-Jones M, Boddeke E,

Brites D, Brône B, Brown GC, Butovsky O, Carson MJ, Castellano B, Colonna M, Cowley SA, Cunningham C, Davalos D, De Jager PL, de Strooper B, Denes A, Eggen BJL, Eyo U, Galea E, Garel S, Ginhoux F, Glass CK, Gokce O, Gomez-Nicola D, González B, Gordon S, Graeber MB, Greenhalgh AD, Gressens P, Greter M, Gutmann DH, Haass C, Heneka MT, Heppner FL, Hong S, Hume DA, Jung S, Kettenmann H, Kipnis J, Koyama R, Lemke G, Lynch M, Majewska A, Malcangio M, Malm T, Mancuso R, Masuda T, Matteoli M, McColl BW, Miron VE, Molofsky AV, Monje M, Mracsko E, Nadjar A, Neher JJ, Neniskyte U, Neumann H, Noda M, Peng B, Peri F, Perry VH, Popovich PG, Pridans C, Priller J, Prinz M, Ragozzino D, Ransohoff RM, Salter MW, Schaefer A, Schafer DP, Schwartz M, Simons M, Smith CJ, Streit WJ, Tay TL, Tsai L-H, Verkhratsky A, von Bernhardi R, Wake H, Wittamer V, Wolf SA, Wu L-J, Wyss-Coray T (2022) Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 110: 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>

Anakinra Promotes M2 Microglia Activation during the Latent Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy

**M. V. Zakharova^{a,*}, A. V. Dyomina^{a,*}, A. A. Kovalenko^a, O. E. Zubareva^a,
A. M. Ischenko^b, and A. V. Zaitsev^{a,*}**

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

^b*Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia*

^{*}*equal contribution of the authors*

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

Astrocytes and microglia and their polarization are thought to contribute to the progression of epilepsy. One of the processes affecting polarization is neuroinflammation, which plays an important role in epileptogenesis. However, the specific mechanisms of its involvement in shifting the pro- and anti-inflammatory reactivation of astro- and microglia have not been clarified. In this study, we examined the effect of 7-day interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) administration on glial cell polarization during the latent phase of the lithium-pilocarpine model in 7-week-old male Wistar rats. In temporal cortex, dorsal and ventral hippocampus the mRNA expression levels of the following genes were analyzed: (i) markers of astroglia (*S100b*) and microglia (*Aif1*) activation, (ii) astrocytic proteins involved in glutamate transport and metabolism (*Slc1a3*, *Glul*, *Gjal*), (iii) pro-inflammatory pathway interleukin-1 β (*Nlrp3*, *Il1b*, *Il1rn*) and transforming growth factor β 1 (*Tgfb1*), (iv) markers of astroglia polarization (*Lcn2*, *S100a10*, *Gbp2*, *Ptx3*), and (v) microglia polarization (*Nos2* and *Arg1*). The mRNA expression levels of *S100b* and *Aif1* were significantly increased, and anakinra administration did not reduce their overexpression. This indicates reactivation of astroglia and microglia regardless of the anakinra administered. The expression of *Slc1a3*, *Glul*, and *Gjal* genes increased in the hippocampus; anakinra administration did not affect their hyperexpression, but promoted increased expression of *Gjal* in the temporal cortex. The mRNA production of *Lcn2*, *S100a10*, *Gbp2*, *Ptx3*, *Nlrp3*, *Il1b*, *Il1rn* and *Tgfb1* increased in all structures. Administration of anakinra reduced the gene expression of *Il1b*. Among the markers of microglia polarization, downregulation of *Arg1* expression in the dorsal hippocampus and *Nos2* expression in the temporal cortex was detected. Anakinra administration enhanced the decrease in *Nos2* expression and restored the level of *Arg1* expression to control values. Thus, anakinra administration did not affect the intensity of glial cell reactivation, but improved M2 reactivation of microglia.

Keywords: IL-1Ra, epileptogenesis, neuroinflammation, microglia polarization, astroglia polarization, TLE