

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

НЕЙРОВосПАЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ВЛИЯЮТ НА СТРУКТУРНЫЕ
ИЗМЕНЕНИЯ В МИНДАЛИНЕ КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ
МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ

© 2019 г. Д. С. Васильев^{1, *}, Н. Л. Туманова¹, А. А. Коваленко¹, О. Е. Зубарева¹,
С. В. Калеменив¹, Л. Г. Магазаник¹

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

*E-mail: dvasilyev@bk.ru

Поступила в редакцию 29.03.2019 г.

После доработки 18.04.2019 г.

Принята к публикации 18.04.2019 г.

Височная эпилепсия – тяжелое и сложно поддающееся лечению нервно-психическое заболевание, патогенез которого предположительно связан с развитием нейровоспаления, астроглиозисом и гибелью нейронов. Наименее изученными эти процессы остаются в миндалине, отделе мозга, играющем важную роль в эпилептогенезе. В работе проанализированы структурные и биохимические изменения, происходящие в базолатеральной области миндалины в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Эпилептический статус индуцировали у крыс линии Вистар в возрасте 7–8 нед. жизни. Были выделены две подгруппы: с тяжелыми длительными и легкими краткосрочными судорогами. Такое разделение было связано с зависимостью вероятности развития спонтанных рецидивирующих судорог в хроническую фазу модели от тяжести и длительности судорог в период эпилептического статуса. Гистологическое исследование проводили в латентный и хронический период модели (3-и, 7-е сут и 2 мес. после введения пилокарпина) с использованием методов световой и электронной микроскопии, а также иммуногистохимического анализа распределения нейрональных (Fox3) и глиальных (GFAP, Iba1) маркеров в клетках. Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (*Il1b*) и фактора некроза опухоли α (*Tnfa*) проводили методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени на 7-е сутки после эпилептического статуса. В течение первой недели после введения пилокарпина в базолатеральной миндалине крыс с длительными судорогами отмечено снижение количества нейронов и существенное повышение количества астроглиальных и микроглиальных клеток. У крыс с краткосрочными судорогами глиальная реакция отсутствовала, а гибель нейронов была меньше выражена. Изучение ультраструктуры выявило скопление лизосом и другие нейродегенеративные изменения в нейронах миндалины крыс с длительными судорогами. Эти нарушения сопровождалось усилением экспрессии генов *Il1b* и *Tnfa*, что указывает на развитие нейровоспалительных процессов. Изменения, выявленные в клетках миндалины у крыс с тяжелыми длительными судорогами, могут быть одним из ключевых механизмов эпилептогенеза и связанных с ним коморбидных нарушений поведения.

Ключевые слова: миндалина, литий-пилокарпиновая модель, височная эпилепсия, судороги, нейровоспаление, глиальная реакция

DOI: 10.1134/S0869813919060098

Височная эпилепсия – одна из наиболее распространенных и тяжелых форм эпилепсии у людей, существенно влияющая на качество жизни пациентов. Сложность лечения данного заболевания связана с недостаточной изученностью его патогенетических механизмов.

Известно, что развитие спонтанных судорог при эпилепсии связано с гипервозбудимостью нейронов и гиперсинхронизованной активностью нейронных сетей, и большинство используемых в клинике противоэпилептических препаратов направлены на подавление этих нейрональных процессов. Однако до 30% пациентов с височной эпилепсией оказываются нечувствительными к стандартному лечению [1], что делает весьма актуальным поиск новых терапевтических мишеней.

В последние годы активно обсуждается возможная роль астроглиальных и микроглиальных клеток в патогенезе височной эпилепсии. Астроцитарная и микроглиальная активация и пролиферация глиальных клеток неоднократно описаны у пациентов с височной эпилепсией и у животных в экспериментальных моделях данного заболевания [2–5]. При этом астро- и микроглиоз может являться не только следствием, но и причиной нейрональных повреждений, возникающих в процессе судорог. Изменения ионных токов и уровня глутамата, усиление синтеза провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 1β и 6, фактора некроза опухоли α) в глиальных клетках во многом определяются их взаимодействием и могут способствовать нарушению функционирования нейронов, а также вызывать устойчивые воспалительные изменения, способствующие эпилептизации мозга [5].

Изучение нейрон-глиальных взаимодействий в процессе эпилептогенеза, как правило, проводится в гиппокампе и неокортексе. Значительно меньше известно об изменениях, происходящих в миндалине. Между тем, миндалина также склонна к формированию судорожной активности, как и гиппокамп [6]. Самую важную роль в инициации и распространении судорог играет ее базальное и латеральное ядра [7]. Повреждения миндалины практически всегда выявляются у пациентов с височной эпилепсией [7, 8]. Также у больных с височной эпилепсией отмечается изменение продукции в клетках миндалины отдельных субъединиц глутаматных рецепторов NMDA типа [9]. Эти изменения способствуют формированию не только эпилептиформной активности в мозге, но и коморбидных психоэмоциональных нарушений – страха, депрессивных симптомов и других нарушений [10].

В данной работе проведен анализ морфологических нарушений и изменений экспрессии генов провоспалительных цитокинов – интерлейкина- 1β (*Il1b*) и фактора некроза опухоли α (TNF α), происходящих в клетках миндалины у крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Особенностью этой модели является то, что патологические процессы развиваются, в основном, в три этапа. Введение пилокарпина приводит сначала к острым судорогам. Затем следует латентный период, в течение которого формируются необратимые изменения в коре и лимбических структурах, в результате этого в дальнейшем (в хроническую фазу модели) у животных развиваются спонтанные рецидивирующие судороги. По многим электрофизиологическим, гистологическим и биохимическим параметрам изменения, наблюдаемые в этой модели, подобны патологическим процессам, происходящим в мозге людей с височной эпилепсией [11].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии

Все опыты проводились в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals). Экспери-

менты проводились на 7–8-недельных самцах крыс линии Вистар. Была использована литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии [11]. За сут до внутрибрюшинного введения пилокарпина (ПК, Sigma-Aldrich, 30 мг/кг) крысам вводили LiCl (Sigma-Aldrich, 127 мг/кг). Кроме того, для предотвращения чрезмерной активации периферических мускариновых рецепторов за 1 ч до введения пилокарпина крысам вводили метилсополамин (Sigma-Aldrich, 1 мг/кг). Контрольным животным, в те же сроки и в тех же объемах, вводили апирогенный физиологический раствор. После введения пилокарпина крыс рассаживали в индивидуальные экспериментальные камеры и проводили видеорегистрацию судорог в течение 3-х ч. После введения пилокарпина эпилептический статус наблюдался у всех экспериментальных животных, однако тяжесть и длительность судорог у разных крыс была различной. После анализа видеозаписей из группы животных, которым вводили пилокарпин, были выделены две подгруппы: 1) крысы с краткосрочными (длительностью менее 90 мин) и легкими (до 4-х баллов по шкале [6]) судорогами и 2) животные с длительными (более 180 мин) и тяжелыми (4 и более баллов) судорогами. Выделение этих подгрупп было обусловлено тем, что в отдельно проведенном эксперименте нами было выявлено, что в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели выраженные спонтанные рецидивирующие судороги развиваются преимущественно у крыс, имевших после введения пилокарпина длительные и тяжелые судороги. Крысы, имевшие краткосрочные судороги выступали в данном исследовании в качестве группы активного контроля, получавшей препараты по той же схеме, как и основная экспериментальная группа, но имевшей низкий риск развития хронических эпилептических процессов.

Определение экспрессии генов провоспалительных цитокинов методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени

Поскольку данное исследование было сосредоточено на изучении изменений, происходящих на ранних этапах эпилептогенеза, забор образцов мозга (контроль $n = 5$, длительные судороги $n = 9$, краткосрочные судороги $n = 7$), был произведен через 7 сут после введения пилокарпина, в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели, когда спонтанные судороги, как правило, отсутствуют. Ни у одного из экспериментальных животных спонтанные судороги не отмечались. Животных декапитировали, мозг выделяли целиком, немедленно замораживали и хранили до выделения структур при температуре -70°C не более двух месяцев. Базолатеральную область миндалины выделяли на срезах, производимых на микротоме-криостате OTF5000 (Bright, Великобритания). Тотальную РНК из клеток мозга выделяли с помощью реагента Extract RNA (ЗАО Евроген, Россия) в соответствии с рекомендуемым протоколом. Обратную транскрипцию проводили с использованием олиго dT-праймеров (ДНК-Синтез, Россия) и MMLV-обратной транскриптазы (Promega, США).

Определение мРНК интерлейкина- 1β (*Il1b*), фактора некроза опухоли α (*Tnfa*), а также гена домашнего хозяйства пептидилпролил изомеразы (*Ppia*) проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Ген *Ppia* был выбран для нормализации, так как ранее было показано, что он стабилен в экспериментальной модели эпилепсии [12]. Праймеры (табл. 1) были синтезированы ООО “Медиген” (Россия). Для определения *Ppia* была использована технология TaqMan, для исследования *Il1b* и *Tnfa* – технология SYBR Green. Соответственно при проведении ПЦР использовали TaqM-полимеразу (ООО “Алкор Био”, Россия), либо готовую смесь для ПЦР qPCRMix-HS SYBR (ЗАО Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler с детектирующей системой CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Hercules, США). Анализ каждой пробы проводили в параллелях. Для контроля реакции ис-

Таблица 1. Последовательности праймеров для полимеразной цепной реакции

Ген и его номер в генетическом банке данных (GeneBank)	Праймеры	Ссылки
<i>Ppia</i> NM_017101	Прямой праймер AGGATTCATGTGCCAGGGTG Обратный праймер CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA Зонд CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA	Malkin et al. 2016
<i>Il1b</i> NM_031512	Прямой праймер CACCTCTCAAGCAGAGCACAG Обратный праймер GGGTCCATGGTGAAGTCAAC	Rioja et al. 2004
<i>Tnfa</i> NM_012675	Прямой праймер CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA Обратный праймер CTCTGGTATGAAATGGCAAATC	Rioja et al. 2004

пользовали образцы РНК, к которым при проведении обратной транскрипции не добавляли ревертазу, а также пробы, содержащие ПЦР-реакционную смесь без добавления матрицы. При проведении ПЦР с использованием SYBR Green дополнительно анализировали кривые плавления. Относительную продукцию мРНК рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [13].

Светооптическое и иммуногистохимическое исследование ткани базолатеральной области миндалины

Исследования срезов больших полушарий мозга проводились на 3-и и 7-е сутки после введения пилокарпина. На каждом сроке использовано по 8 интактных крыс и животных, имевшие тяжелые либо легкие судороги.

Световая микроскопия.

Мозг животных фиксировали методом транскардиальной перфузии 4%-ным раствором параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) с последующей дофиксацией в том же растворе в течение недели, затем на сутки помещали в 20%-ный раствор сахарозы. Фронтальные срезы толщиной 20 мкм изготавливали на криостате Leica CM 1510S и окрашивали по методу Ниссля. На микроскопе AF7000 (Leica, Германия) исследовали базолатеральную область миндалины на уровне –4.5 мм от Bregma ([14], см. рис. 2А), изображение оцифровывали при помощи камеры DFC495 (Leica).

Иммуногистохимическое исследование нейрональных и глиальных маркеров

Нейрональный маркер Fox3 (NeuN), экспрессирующийся только в живых, нормально функционирующих нейронах, определяли при помощи непрямого иммунофлуоресцентного анализа. Использовали выработанные в кролике первичные антитела: к нейрональному маркеру NeuN (Fox3, ab104225, Abcam, разведение 1 : 200), маркеру астроцитарной глии глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP ab7260, Abcam, разведение 1 : 200) и маркеру микроглии Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule; ab178846, Abcam, разведение 1 : 100). Визуализацию первичных антител к Fox3 или GFAP проводили FITC-конъюгированными вторичными антителами к IgG кролика (ab97050, Abcam, 1 : 200), Iba1 – фикоэритрин-конъюги-

рованными вторичными антителами к IgG кролика (ab7007, Abcam, 1 : 200). Иммунофлуоресцентное исследование выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуорохромов проводили He/Ar лазером при длине волн 488 нм. Флуоресцентный сигнал FITC наблюдали в диапазоне длин волн 496–537 нм, фикоэритрин – при 652–690 нм. Иммунопозитивными считались клетки, отличающиеся по яркости от фона более, чем в 3 раза.

Морфометрический анализ

При проведении анализа клеточного состава ткани базолатеральной области миндалины использовали программу “Видеотест Мастер-Морфология” (ВидеоТест, Россия). На квадратном участке ткани со сторонами 500 мкм подсчитывали количество NeuN-позитивных, GFAP-позитивных и Iba1-позитивных клеток. Для каждого животного вычисляли средние величины по 10 исследованным срезам и использовали их в статистическом анализе.

Электронная микроскопия

После введения пилокарпина проводили ультраструктурное исследование ткани базолатеральной области миндалины, проводили только у крыс с длительными судорогами на 7-е сутки ($n = 2$) и через 2 месяца ($n = 2$) после введения пилокарпина. Материал фиксировали методом транскардиальной перфузии смесью 1%-ного глутарового альдегида и 1%-ного формальдегида на 0.1 М PBS, pH 7.4; дофиксировали 1%-ным OsO₄; контрастировали уранилацетатом; обезвоживали и заливали в аралдид по стандартному протоколу [15]. На ультратоме LKB-III (LKB, Швеция) изготавливали ультратонкие срезы толщиной 500 Å, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, США).

Статистическую обработку производили в программе SPSS Statistic 22. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, критерий Ливиня использовали для проверки равенства дисперсий.

Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (критерий Фишера, либо критерий Уэлча для групп с разными дисперсиями). Апостериорные сравнения проводили соответственно с помощью критерия Тьюки или Геймса–Ховела. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$. Данные на графиках представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия генов провоспалительных цитокинов

Анализ продукции мРНК в клетках базолатеральной области миндалины показал, что через 7 суток после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса у животных, имевших длительные, но не краткосрочные судороги, усиливалась продукция провоспалительных цитокинов (рис. 1). В связи с достоверной разницей в дисперсиях между группами, для статистической обработки результатов ОТ-ПЦР был использован критерий Уэлча с последующими апостериорными сравнениями с помощью критерия Геймса–Ховела. Различия были более выражены в отношении гена *I1b* ($F_{2,11} = 7.8$; $p < 0.01$). Уровень мРНК *I1b* был достоверно выше в группе крыс с длительными судорогами по сравнению с контролем ($p = 0.01$) и животными с краткосрочными судорогами ($p < 0.05$). Продукция мРНК *Tnfa* также изменялась ($F_{2,9} = 5.1$; $p = 0.04$), однако для данного гена достоверные различия выявлены только между группами экспериментальных крыс, имевших длительные и краткосрочные судороги ($p = 0.02$).

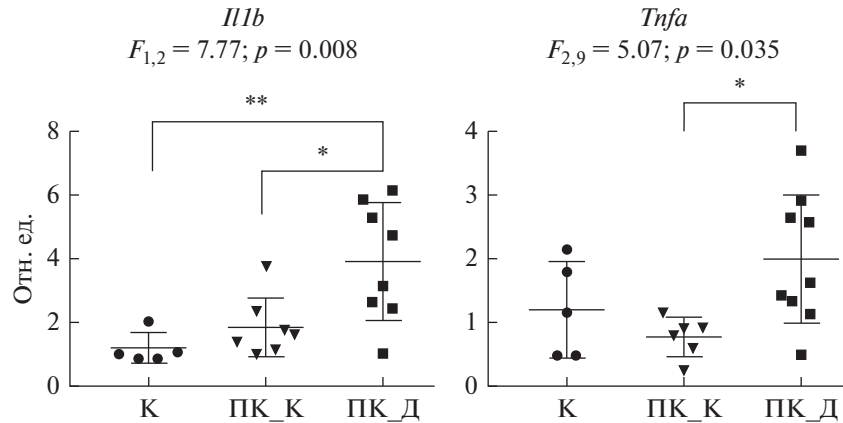


Рис. 1. Относительная продукция мРНК *Il1b* и *Tnfa* в клетках базолатеральной области миндалины крыс, имевших разную тяжесть судорог после введения пилокарпина. К – контроль, ПК_К – краткосрочные судороги, ПК_Д – длительные судороги. F – значения критерия Уэлча. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, достоверные различия между группами по критерию Геймса–Ховела.

Световая микроскопия. Краткосрочные судороги. На препаратах миндалины крыс с краткосрочными судорогами, окрашенных по методу Ниссля, через 3-е сут после введения пилокарпина появляются признаки дегенерации нервных клеток: набухание клеточных тел и их отростков, появление неокрашенных областей в цитоплазме (рис. 2Д, Е). Перечисленные признаки деструкции характерны для клеток в состоянии хроматолиза. Такое состояние клетки обусловлено нарушением тургора, образованием вакуолей, лизисом органоидов, и может приводить к ее гибели. В норме такие изменения клеток отмечаются крайне редко. На 7-е сут после введения пилокарпина в базолатеральной области миндалины нейроны с неокрашенными областями в цитоплазме встречаются чаще (рис. 2Ж).

Длительные судороги. Уже на 3-е сут после введения пилокарпина отмечена гибель нейронов. Появляется большое количество глиальных элементов и глиальных узелков (рис. 2З). На 7-е сут после введения пилокарпина отмечена массовая гибель нейронов. Глиальные узелки обнаруживаются, однако по сравнению с 3-ми сутками они встречаются реже (рис. 2И). Во всем объеме миндалины преобладают глиальные клетки, при этом границы ядер миндалины становятся неразличимы (рис. 2Б–Г). Через 2 мес. после введения пилокарпина на препаратах ткани миндалины, окрашенных по методу Ниссля, были выявлены те же нейродегенеративные признаки (глиальная реакция, дегенерирующие нейроны), что и в первую неделю после введения конвульсанта (рис. 4Г).

Количественные характеристики изменения клеточного состава базолатеральной миндалины зависели от длительности и тяжести эпилептического статуса (рис. 3).

Краткосрочные судороги. Через трое суток после введения пилокарпина статистически значимых изменений в количестве NeuN-позитивных нейронов GFAP- и Iba1-позитивных глиальных элементов не выявлено.

К концу первой недели после введения пилокарпина отмечено снижение (апостериорный тест Тьюки, $p = 0.04$) числа жизнеспособных нейронов, экспрессирующих белок NeuN: оно составляло 81.7% от уровня интактного контроля (рис. 3Г). При этом статистически значимых различий в количестве глиальных клеток не обнаружено (рис. 3Д, Е).

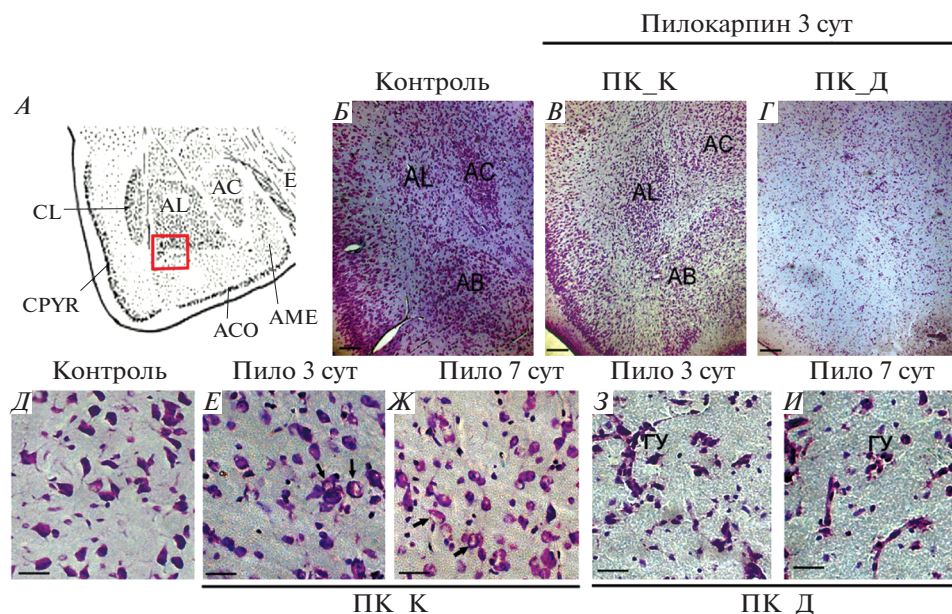


Рис. 2. Влияние литий-пилокарпиновых судорог на нервную ткань базолатеральной области миндалины крысы. Окрашивание по методу Ниссля. *А* – схема миндалины контрольных крыс. Обозначения: латеральное (AL), центральное (AC), базальное (AB) и медиальное (AME) ядра миндалины. Красной рамкой отмечена область базолатеральной миндалины на которой проводили морфометрический анализ. *Б* – участок ткани базолатеральной области миндалины контрольной крысы. Видно расположение ядер миндалины (обозначены так же, как на *А*). *Б'* – участок ткани базолатеральной области миндалины крысы с краткосрочными судорогами (ПК_К), через 3-е сут после введения пилокарпина. Видно расположение ядер миндалины. *Г* – участок ткани базолатеральной области миндалины крысы с длительными судорогами (ПК_Д) через 3-е сут после введения пилокарпина. Массовая гибель нейронов не позволяет выявить границы ядер миндалины. *Д* – участок ткани базолатеральной области миндалины крысы при большем увеличении. *Е–И* – нейродегенеративные изменения в базолатеральной области миндалины крыс через 3-е (*Е, З*) или 7 сут (*Ж, И*) после действия пилокарпина. У животных с краткосрочными судорогами (*Е, Ж*) отмечены нейродегенеративные изменения нейронов (отмечены стрелками) и незначительное повышение количества глиальных элементов. У животных с длительными судорогами (*З, И*) отмечено замещение нейронов глиальными элементами, в ткани заметны глиальные узелки (ГУ), свидетельствующие об активации глии при нейровоспалительном процессе. Масштаб: (*Д–И*) 20 мкм, (*Б–Г*) 100 мкм.

Длительные судороги. В первую неделю после введения пилокарпина у таких животных также наблюдалась гибель нервных клеток миндалины (рис. 3Г). Уже через трое суток после введения пилокарпина количество пирамидных нейронов в базолатеральной области миндалины составляла не более 45.0% от контрольного уровня (апостериорный тест Тьюки, $p = 0.03$). Количество нейронов у крыс с длительными судорогами было ниже, чем у крыс с краткосрочными судорогами (апостериорный тест Тьюки, $p = 0.04$). Также, у всех животных с длительными судорогами наблюдалась сильная глиальная реакция (рис. 3Б, В). В базолатеральной области количество глиальных клеток увеличивалось относительно контроля: астроцитарной глии – в 3.4 раза относительно контроля (апостериорный тест Тьюки, $p < 0.01$; рис. 3Д); микроглии – в 4.6 раз (апостериорный тест Тьюки, $p < 0.01$; рис. 3Е).

Через 7 сут после введения пилокарпина среднее количество нейронов составляло 42.2% от уровня контроля, это сопоставимо с тем, что наблюдалось на 3-и сутки (апостериорный тест Тьюки, $p = 0.02$; рис. 3Г). Различие между группами крыс с

длительными и краткосрочными судорогами сохранялось (апостериорный тест Тьюки, $p = 0.03$; рис. 3Г). Количество клеток у животных с длительными судорогами астроцитарной глии оставалось повышенным относительно контроля (в 3.7 раз; апостериорный тест Тьюки, $p < 0.01$) и животных с краткосрочными судорогами (апостериорный тест Тьюки, $p < 0.01$; рис. 3Д). Аналогичные различия в количестве клеток микроглии также сохранялись (285% от уровня контроля; апостериорный тест Тьюки, $p < 0.01$; рис. 3Е). Следует отметить, что у 25% животных, характеризующихся длительными судорогами, отмечалась гибель подавляющего числа нейронов как в центральной, так и в базолатеральной области миндалины. Оставались лишь одиночные нейроны (рис. 2Г), составлявшие не более 0.5% от первоначального количества (от уровня контроля), а вокруг кровеносных сосудов образовывались глиальные узелки (рис. 2З, И).

Таким образом, у животных с длительными судорогами наблюдалось значительное снижение количества нейронов в миндалине и сильная глиальная реакция, в то время как у животных с краткосрочными судорогами гибель нейронов была выражена слабо, а глиальная реакция отсутствовала.

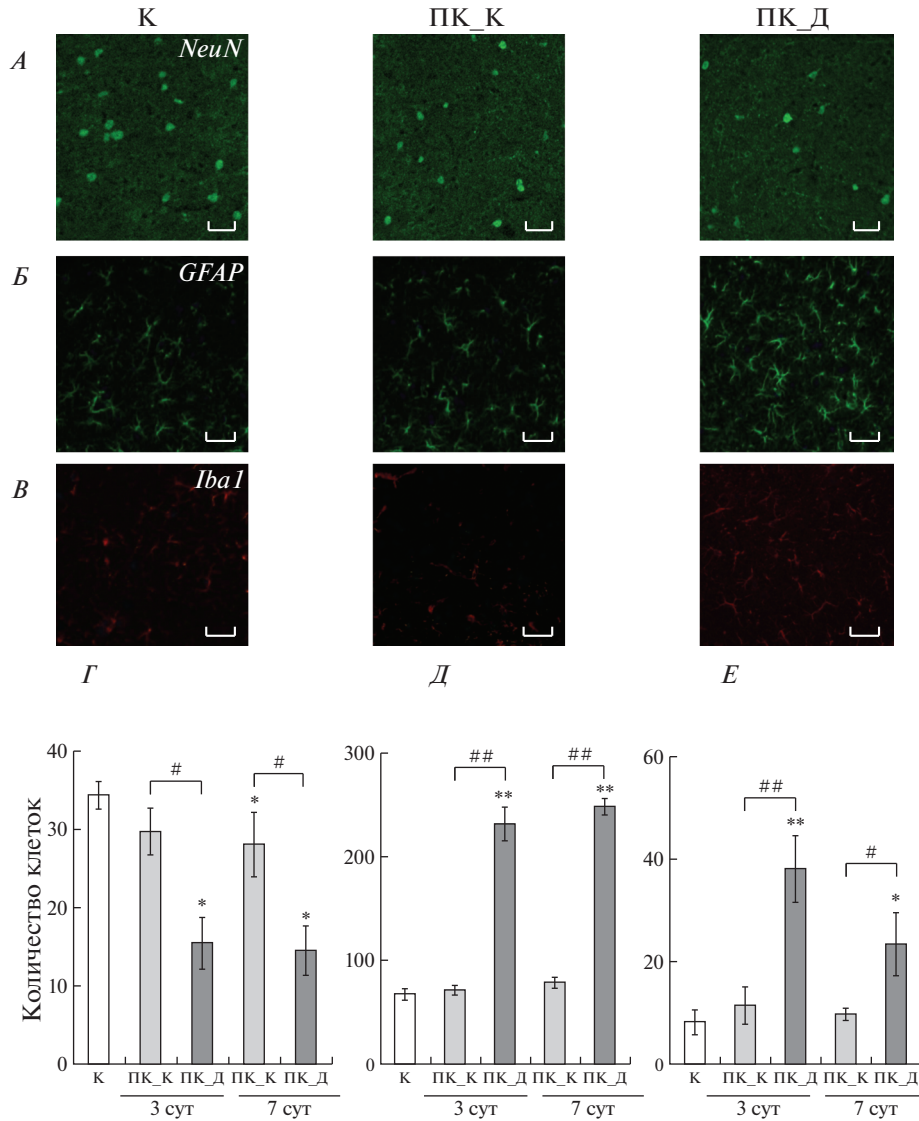
Исследование ультраструктуры миндалины животных с длительными судорогами

Поскольку наиболее выраженные патологические изменения были выявлены у крыс с тяжелыми длительными судорогами, у этих животных было проведено ультраструктурное исследование состояния нервной ткани миндалины. На 7-е сут после введения пилокарпина в большинстве нейронов и в крупных дендритных отростках миндалины появляются скопления лизосом, окаймленных мембраной, содержащих зернистый плотный материал (рис. 4А), что может указывать на лизис клеточных органоидов и косвенно свидетельствовать в пользу активации воспалительных процессов. Также были выявлены дегенеративные изменения в телах нейронов и их отростках. У части нейронов происходило сморщивание клеточных тел, у других набухание клеточных тел и отростков (хроматолиз) с появлением вакуолей, разрушением митохондрий, лизисом других органоидов в цитоплазме (рис. 4Б, В). Нейроны имели лопастные ядра и были окружены набухшими и разросшимися глиальными отростками. Через 2 мес. после введения пилокарпина в миелинизированных волокнах наблюдалось расслоение миелина, сужение аксоплазмы, образование многочисленных вакуолей (рис. 4Д, Е), что указывает на дегенеративные изменения таких волокон.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В литературе имеется немало свидетельств о роли, которую играет миндалина в процессе эпилептизации мозга [9, 16, 17]. В частности, имеются данные о разрушении нервной ткани миндалины при формировании височной эпилепсии [18, 19] и о влиянии ингибирования нейронов миндалины на формирование эпилептической активности [20]. При этом в большинстве работ гибель нейронов связывали с эксайтотоксическими механизмами, тогда как роль нейровоспалительных механизмов в данном отделе была практически не изучена. В настоящей работе проведено комплексное исследование структурных и нейрохимических изменений, что позволило получить данные, напрямую указывающие на важную роль нейровоспалительных механизмов в развитии спонтанных рецидивирующих судорог и нейродегенеративных процессов в миндалине.

Литий-пилокарпиновые судороги приводят к существенным изменениям в состоянии клеток и цитоархитектонике базолатеральной области миндалины через 3-е и 7 сут. Полученные данные указывают на гибель нейронов и развитие глиальной реакции. Наиболее выраженные обширные изменения в миндалине наблюдались



после длительных судорог. Было показано резкое снижение количества нейронов, причем у части животных гибель нейронов была массовой, оставалось не более 0.5% от изначального их числа. Количество глиальных элементов сильно возросло у всех крыс с длительными судорогами в отличие от животных с краткосрочными судорогами. Наличие связи между длительностью эпизодов судорог в первые часы после введения пилокарпина с тяжестью последующих структурных изменений ранее было описано в литературе, например, в гиппокампе мышей [21]. Эти авторы показали, что эпилептический статус продолжительностью 60 мин приводит к проращению мшистых волокон, но не к гибели нейронов гиппокампа. Более длительные судороги (более 4-х ч) индуцируют гибель нейронов.

Рис. 3. Влияние литий-пилокарпиновых судорог на количество нейронов и глиальных элементов. *A–B* – микрофотографии базолатеральной области миндалины интактного контроля (К) и крыс, подвергшихся действию пилокарпина, через 7 сут после его однократного введения: с краткосрочными (ПК_К) и длительными (ПК_Д) судорогами. Иммуногистохимическое окрашивание нейронального маркерного белка NeuN (*A*), маркера астроцитарной глии GFAP (*B*) или микроглиального маркера Iba1 (*B*). Масштаб: 50 мкм. У крыс с длительными судорогами, подвергшихся действию конвульсанта, наблюдается снижение количества NeuN+ нейронов и увеличение количества глиальных элементов по сравнению с контролем, что может указывать на нейровоспалительные процессы.

Г–E – среднее количество NeuN-позитивных нейронов (*Г*; однофакторный дисперсионный анализ; $F_{2,39} = 7.32; p = 0.04$), GFAP-позитивных (*Д*; однофакторный дисперсионный анализ; $F_{2,39} = 17.25; p < 0.001$) и Iba1-позитивных (*Е*; однофакторный дисперсионный анализ; $F_{2,39} = 9.10; p = 0.004$) глиальных клеток в участке ткани базолатеральной области миндалины контрольных животных (К, $n = 8$) и крыс подвергшихся действию пилокарпина через 3 ($n = 16$) и 7 ($n = 16$) суток после эпилептического статуса (отдельно представлены данные для животных с краткосрочными судорогами (ПК_К, $n = 8$), и длительными судорогами (ПК_Д, $n = 8$)). Звездочками обозначены статистически значимое (апостериорный тест Тьюки) отличие от интактного контроля (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$), # обозначены различия между группами ПК_К и ПК_Д (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$).

В миндалине схожие с выявленными нами пилокарпин-индуцированные гистологические изменения (гибель нейронов, активация глии и замещение погибших нейронов глиальными клетками) были описаны К. Borges с соавт. [22]. Однако основное внимание данных исследователей было направлено на отставленные во времени изменения, происходящие в период появления у животных спонтанных

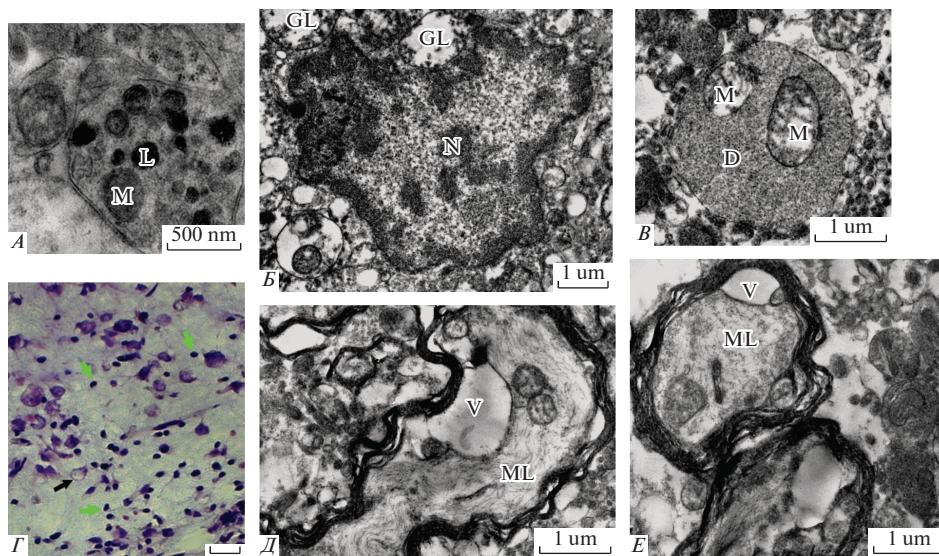


Рис. 4. Нейродегенеративные изменения, связанные с нейровоспалением в нервной ткани базолатеральной области миндалины крысы через 7 сут (*A*) и 2 мес. (*B–E*) после введения пилокарпина.

A, B, B, Д, E – электронные микрофотографии.

A – скопление лизосом в дендритном отростке нейрона; *B* – сморщенный нейрон с лопастным ядром, окружен глиальными отростками; *B* – разрушение митохондрий в дендритном отростке; *Г* – окрашивание по Нисслю, масштаб: 30 мкм. Черной стрелкой показан дегенерирующий нейрон, зелеными – глиальные клетки. *Д–E* – сужение аксоплазмы и образование вакуолей, карманов в миелинизированных волокнах; расслоение миелина. Обозначения : (N) – дегенерирующий нейрон, (D) – дендрит, (M) – митохондрия, (ML) – миелинизированное волокно, (V) – вакуоли, (L) – лизосомы, (GL) – отростки глиальных клеток.

рецидивирующих судорог (через 2–4 нед. после введения пилокарпина). Более ранние изменения, происходящие в первую неделю после эпилептического статуса, остаются малоизученными. Полученные нами результаты дополняют имеющиеся в литературе данные и позволяют уточнить временную динамику гибели нейронов базолатеральной миндалины. Они свидетельствуют в пользу достаточно раннего запуска нейровоспалительных процессов, поскольку уже через 3-е сут после тяжелого длительного эпилептического статуса в ткани базолатеральной миндалины животных наблюдается массовая гибель нейронов и значительное повышение количества глиальных клеток. Согласно мнению ряда авторов [3, 4] подобные перестройки могут быть связаны с формированием эпилептиформной активности.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о повышении уровня экспрессии генов *Tnfa* и *Il1b* в базолатеральной области миндалины крыс через 7 сут после тяжелого пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса. Наблюдаемые нами изменения в экспрессии провоспалительных цитокинов согласуются с наблюдениями других исследователей [23]. Сочетание анализа экспрессии провоспалительных цитокинов и гистологического исследования ткани миндалины в рамках настоящего исследования дополняют литературные данные и позволяют с большей определенностью говорить о вовлеченности нейровоспалительных процессов.

Изменения, происходящие в миндалине при височной эпилепсии, не только способствуют генерации и распространению эпилептиформной активности, но и играют важную роль в возникновении коморбидных нарушений поведения – тревожности, депрессии, эмоциональной памяти и других психиатрических симптомов, характерных, в том числе, для фармакорезистентных случаев заболевания [10, 24, 25]. Влияние интерлейкина-1 бета на регуляцию этих форм поведения была доказана при исследовании трансгенных мышей, дефектных по гену рецепторов данного цитокина [26], а также в фармакологических исследованиях с его внутримозговым введением [27, 28].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-00-00408 (молекулярно-биологическая часть), программы Президиума РАН № 42 (оптическая микроскопия и иммуногистохимическая часть работы) и госзадания ИЭФБ РАН (рег. № АААА-А18-118012290373-7; электронно-микроскопическая часть работы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pierzchala K.* [Pharmacoresistant epilepsy – epidemiology and current studies] [Article in Polish]. *Neurol. Neurochir. Pol.* 44 (3): 285–90. 2010.
2. *Wetherington J., Serrano G., Dingledine R.* Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron.* 58: 168–178. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.002>
3. *Seifert G. I., Carmignoto G., Steinhäuser C.* Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev.* 63(1–2): 212–21. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.10.004>
4. *Robel S., Buckingham S. C., Boni J. L., Campbell S. L., Danbolt N. C., Riedemann T., Sutor B., Sontheimer H.* Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. *J. Neurosci.* 35(8): 3330–45. 2015. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1574-14.2015>
5. *Devinsky O., Vezzani A., Najjar S., De Lanerolle N. C., Rogawski M. A.* Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 36(3): 174–84. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>
6. *Racine R. J.* Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography Clin. Neurophysiol.* 32(3): 281–294. 1972.
7. *Aroniadou-Anderjaska V., Fritsch B., Qashu F., Braga M. F.* Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res.* 78(2–3): 102–16. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.11.011>

8. Capizzano A.A., Kawasaki H., Sainju R.K., Kirby P., Kim J., Moritani T. Amygdala enlargement in mesial temporal lobe epilepsy: an alternative imaging presentation of limbic epilepsy. *Neuroradiology*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00234-018-2109-y>
9. Moura J.C., Tirapelli D.P., Neder L., Saggiaro F.P., Sakamoto A.C., Velasco T.R., Panepucci R.A., Leite J.P., Assirati Júnior J.A., Colli B.O., Carlotti Júnior C.G. Amygdala gene expression of NMDA and GABA(A) receptors in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 22(1): 92–97. 2012. <https://doi.org/10.1002/hipo.20863>
10. Yilmazer-Hanke D., O'Loughlin E., McDermott K. Contribution of amygdala pathology to comorbid emotional disturbances in temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Res.* 94(6): 486–503. 2016. <https://doi.org/10.1002/jnr.23689>
11. Curia G.I., Longo D., Biagini G., Jones R.S., Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Methods*. 172(2): 143–57. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>
12. Swijssen A., Nelissen K., Janssen D., Rigo J.M., Hoogland G. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res. Notes*. 5: 685. 2012. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-685>
13. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25 (4): 402–408. 2001.
14. Paxinos G., Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fourth Edition. San- Diego. Acad. Press. 1998.
15. Vasilev D.S., Tumanova N.L., Kim K.Kh., Lavrentyeva V.V., Lukomskaya N.Y., Zhuravin I.A., Magazanik L.G., Zaitsev A.V. Transient morphological alterations in the hippocampus after pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Neurochem. Res.* 43(8): 1671–1682. 2018. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00126>
16. Graebenitz S., Lesting J., Sosulina L., Seidenbecher T., Pape H. C. Alteration of NMDA receptor-mediated synaptic interactions in the lateral amygdala associated with seizure activity in a mouse model of chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 51(9): 1754–1762. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02561.x>
17. Qashu F., Figueiredo T.H., Aroniadou-Anderjaska V., Aplan J.P., Braga M.F. Diazepam administration after prolonged status epilepticus reduces neurodegeneration in the amygdala but not in the hippocampus during epileptogenesis. *Amino Acids*. 38(1): 189–197. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0227-2>
18. Piikänen A., Tuunanen J., Kälviäinen R., Partanen K., Salmenperä T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 32: 233–253. 1998.
19. van Elst L.T., Groffmann M., Ebert D., Schulze-Bonhage A. Amygdala volume loss in patients with dysphoric disorder of epilepsy. *Epilepsy Behav.* 16: 105–112. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.06.009>
20. Benini R., Avoli M. Altered inhibition in lateral amygdala networks in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurophysiol.* 95: 2143–254. 2006.
21. Chen Ling-Lin, Feng Hang-Feng, Mao Xue-Xia, Ye Qing, Zeng Ling-Hui One hour of pilocarpine-induced status epilepticus is sufficient to develop chronic epilepsy in mice, and is associated with mossy fiber sprouting but not neuronal death *Neurosci Bull.* 29(3): 295–302. 2013. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1310-6>
22. Borges K., Gearing M., McDermott D.L., Smith A.B., Almonte A.G., Wainer B.H., Dingledine R. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp. Neurol.* 182 (1): 21–34. 2003.
23. Turrin N.P., Rivest S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 16 (2): 321–334. 2004.
24. Spanhel K., Wagner K., Geiger M.J., Ofer I., Schulze-Bonhage A., Metternich B. Flashbulb memories: Is the amygdala central? An investigation of patients with amygdalar damage. *Neuropsychologia*. 111: 163–171. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2018.01.004>
25. Usui K., Terada K., Usui N., Matsuda K., Kondo A., Tottori T., Shinozaki J., Nagamine T., Inoue Y. Working memory deficit in drug-resistant epilepsy with an amygdala lesion. *Epilepsy Behav Case Rep.* 10: 86–91. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ebcr.2018.07.003>
26. Koo J.W., Duman R.S. Interleukin-1 receptor null mutant mice show decreased anxiety-like behavior and enhanced fear memory. *Neurosci Lett.* 456(1): 39–43. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.068>
27. Castanon N., Bluthé R.M., Dantzer R. Chronic treatment with the atypical antidepressant tianeptine attenuates sickness behavior induced by peripheral but not central lipopolysaccharide and interleukin-1beta in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 154(1): 50–60. 2001.

28. Song C., Horrobin D.F., Leonard B.E. The comparison of changes in behavior, neurochemistry, endocrine, and immune functions after different routes, doses and durations of administrations of IL-1beta in rats. *Pharmacopsychiatry*. 39(3): 88–99. 2006.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-941557>

Neuroinflammation Affects the Structural Abnormalities in Amygdala in the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy in Rats

D. S. Vasilev^{a, *}, N. L. Tumanova^a, A. A. Kovalenko^a, O. E. Zubareva^a,
S. V. Kalemenev^a, L. G. Magazanik^a

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

*e-mail: dvasilyev@bk.ru

Abstract—Temporal lobe epilepsy is a severe neurological disease known to be difficult to treat. It is associated with the development of neuroinflammation, astrogliosis and neuron death. Amygdala is known to play an important role in epileptogenesis. However, the exact mechanisms remain poorly studied. In this study, the structural and biochemical changes in the basolateral region of the rat amygdala were analyzed using the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Status epilepticus was induced in 7–8-week-old male Wistar rats. Two subgroups of rats were studied: (1) with prolonged (>3 h) and short (<1.5 h) seizures. This division into two groups was motivated by the dependence of the development of spontaneous seizures in the chronic phase of the model on the severity and duration of seizures during the status epilepticus. The investigation was performed in the latent and chronic period of the model (3 and 7 days and 2 months after the pilocarpine administration) using light and electron microscopy, as well as immunohistochemical analysis of the distribution of the neuronal (Fox3) and glial (GFAP, Iba1) markers in the amygdala. Analysis of the *Il1b* and *Tnfa* gene expression producing pro-inflammatory cytokines was performed by the method of rtPCR on day 7 after status epilepticus. During the first week after pilocarpine treatment, a decrease in the number of neurons and a significant increase in the number of astroglial and microglial cells were shown in the basolateral amygdala of rats with prolonged seizures. In rats with short-term seizures, the gliosis was absent, and the death of neurons was less pronounced. The study of the ultrastructure revealed the clusters of lysosomes and other neurodegenerative changes in the neurons of the amygdala of rats with prolonged convulsions. These structural abnormalities were accompanied by increased expression of the genes *Il1b* and *Tnfa*, which indicates the development of neuroinflammatory processes. Changes detected in the amygdala cells in rats with prolonged seizures may be involved in the mechanisms of epileptogenesis and associated behavioral disorders.

Keywords: amygdala, lithium-pilocarpine model of epilepsy, temporal lobe epilepsy, seizure, neuroinflammation, gliosis

ЦИТИРОВАТЬ:

Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Коваленко А.А., Зубарева О.Е., Калемев С.В., Магазаник Л.Г. Нейровоспалительные процессы влияют на структурные изменения в миндале крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 105(6): 694–706.

DOI: 10.1134/S0869813919060098

TO CITE THIS ARTICLE:

Vasilev D.S., Tumanova N.L., Kovalenko A.A., Zubareva O.E., Kalemenev S.V., Magazanik L.G. Neuroinflammation Affects the Structural Abnormalities in Amygdala in the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy in Rats. *Russian Journal of Physiology*. 105(6): 694–706.

DOI: 10.1134/S0869813919060098