МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной
научно-квалификационной работы (диссертации)

Вклад провоспалительных цитокинов в механизмы эпилептогенеза в моделях височной эпилепсии у крыс

Дёмина Александра Владимировна

1.5.5. Физиология человека и животных
(Биологические науки)

Научный руководитель
д.б.н. Зайцев Алексей Васильевич

Санкт-Петербург
2023

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, эпилепсия является тяжёлым хроническим неврологическим заболеванием, от которого страдает около 50 миллионов человек во всём мире, при этом около 30% случаев резистентны к существующим методам терапии [1, 2]. Эпилепсия представляет собой комплекс психоневрологических нарушений. С одной стороны, характеризуется склонностью к возникновению у больных спонтанных судорожных припадков, повышением риска получения травм и внезапной смерти. С другой стороны, эпилепсия зачастую сопровождается нарушениями когнитивных и психических функций [3]. В совокупности симптомы эпилепсии значительно ухудшают уровень жизни пациентов, приводя к ограничениям в социальной и трудовой сферах и стигматизации [4]. Дополнительным осложнением при терапии эпилепсии является усугубление части симптомов существующими фармакологическими методами контроля судорог [3]. Таким образом, поиск новых терапевтических решений для лечения эпилепсии остаётся актуальным, и одним из перспективных подходов является превентивная терапия в группах риска развития приобретенной эпилепсии с целью предотвратить эпилептогенез в латентный период болезни [5, 6].

Эпилепсия сопровождается активацией нейровоспалительных процессов в головном мозге, более того, при наличии воспалительных заболеваний у пациента симптомы эпилепсии проявляются в более тяжелой форме [7, 8]. Предполагается также, что нейровоспаление может играть особую роль в процессах эпилептогенеза [9, 10]. Показано, что эпилептический статус способствует транскрипционной активации элементов пути NLRP3, являющегося одним из основных регуляторов высвобождения провоспалительных цитокинов, в частности, активной формы интерлейкина-1β (IL-1β) [11]. В свою очередь, высокий уровень экспрессии IL-1β характерен для людей с резистентными формами эпилепсии и коррелирует с генерацией судорожных приступов у больных эпилепсией [12]. Ряд случаев подтверждает, что применение противовспалительных препаратов может значительно облегчать симптомы эпилепсии [13]. В то же время, остается не разрешенным вопрос, возможно ли предотвратить эпилептогенез или ослабить симптомы эпилепсии с помощью превентивной противовоспалительной терапии в латентный период болезни [14-16].

IL-1β способствует запуску каскада провоспалительных реакций, связываясь с рецептором IL-1R1, являющегося следующим после системы NLRP3 регулятором провоспалительного ответа, опосредуемого IL-1β. Естественным противовоспалительным фактором в данной системе является антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), связывающийся с рецептором IL-1R1 и блокирующий дальнейшую передачу сигнала [17]. Применяемый для терапии в виде рекомбинантного белка (препарат анакинра), имеет низкую токсичность, высокую селективность и противовоспалительную эффективность [18,19]. Однако всесторонний анализ противоэпилептогенного

влияния антагониста рецептора интерлейкина-1 на течение эпилептогенеза и формирование эпилепсии и сопутствующих когнитивных и психических нарушений не проводился.

Таким образом, данное исследование позволит уточнить роль провоспалительного пути, опосредуемого рецептором интерлейкина-1, в процессах эпилептогенеза.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Анализ эффектов ингибирования провоспалительных каскадов, опосредуемых интерлейкином-1β, с помощью системного введения IL-1Ra в период эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели на формирование височной эпилепсии у крыс.

Задачи исследования:

1. Оценить течение эпилептогенеза у крыс на фоне ежедневного введения IL-1Ra
2. Провести анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов и глиальных маркеров в период введения IL-1Ra на 7е сутки после эпилептического статуса
3. Оценить влияние IL-1Ra на формирование спонтанных судорог и нарушений поведения в литий-пилокарпиновой модели

Положения, выносимые на защиту

1. Внутрибрюшинное введение IL-1Ra не влияет на выживаемость крыс и динамику изменения массы тела после индуцированного пилокарпином эпилептического статуса, однако имеет противоэпилептогенный эффект и снижает тяжесть спонтанных судорог в хроническую фазу модели.
2. Через 7 дней после эпилептического статуса в гиппокампе и височной коре головного мозга крыс наблюдается повышение относительной экспрессии генов маркеров нейровоспаления *Nlrp3*, *Il1b* и *Il1rn* и активации астроглии *Gfap* и микроглии *Aif1*, при этом снижается уровень относительной экспрессии гена маркером противовоспалительных фенотипов микроглии *Arg1*. На фоне системного введения IL-1Ra снижается гиперэкспрессия гена *Il1b* и восстанавливается экспрессия гена *Arg1*.
3. В латентную и хроническую фазы литий-пилокарпиновой модели у крыс наблюдается гиперподвижность в открытом поле и снижение социальной и исследовательской активности. Применение IL-1Ra восстанавливает указанные типы поведения в латентную фазу, но не в хроническую. Более того, применение IL-1Ra способствует

восстановлению в хроническую фазу модели нарушения памяти, ассоциированной со страхом, а также ослабляет симптомы депрессивно-подобного поведения.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые показано противоэпилептогенное влияние системного введения IL-1Ra в период эпилептогенеза. Более того, впервые проведён комплексный анализ экспрессии генов маркеров нейровоспаления в дорзальном гиппокампе и височной коре мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели, а именно на 7-е сутки после эпилептического статуса. В отличие от большинства работ, оценивающих противоэпилептогенный потенциал фармакологической модификации эпилептогенеза, в данной работе был проведён анализ широкого спектра поведенческих нарушений в латентную и хроническую фазы литий-пилокарпиновой модели и показано отложенное корректирующее влияние применения IL-1Ra в период эпилептогенеза. В совокупности полученные данные позволили дополнить существующие представления о роли провоспалительных реакций в процессе эпилептогенеза, а также сформулировать возможные противодействующие эпилептогенезу механизмы.

Теоретическое и практическое значение работы

Будучи проведённой в рамках гипотезы о превентивной терапии эпилепсии, данная работа позволяет оценить вклад воспалительных процессов в эпилептогенез. Применение IL-1Ra в период эпилептогенеза сразу после инициирующей его острой стадии позволило снизить тяжесть эпилепсии у крыс в хроническую фазу модели. Исходя из этого можно предполагать, что применение противовоспалительной терапии в группах риска развития приобретённой эпилепсии является перспективным терапевтическим подходом и может предотвратить развитие эпилепсии или снизить тяжесть её симптомов. Данный подход наиболее актуален для приобретенных форм эпилепсии, возникающей в результате острых событий (инфекционные заболевания, травмы, опухоли, тяжёлые отравления, эпилептический статус), инициирующих повреждение нервной ткани головного мозга и запуск каскада провоспалительных реакций.

Также в представленной работе была подобрана оптимальная батарея поведенческих тестов, которая позволяет полноценно охарактеризовать поведенческий фенотип литий-пилокарпиновой модели и большую часть возможных поведенческих отклонений, спровоцированных применением противоэпилептической терапии. Таким образом, данная батарея тестов может быть использована для исследования эффектов других методов терапии

эпилепсии с использованием литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии у крыс.

Апробация результатов исследования

Основные результаты научно-квалификационной работы доложены и обсуждены на VIII международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2019» (Санкт-Петербург, 2019), Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины» (Санкт-Петербург, 2020), 27th International "Stress and Behavior" Neuroscience and Biopsychiatry Conference (Санкт-Петербург, 2020), VII Съезде физиологов СНГ с международным участием (Сочи, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 научных статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Материалы и методы

1. Информация об уходе и содержании животных

В исследование были включены 78 самцов крыс линии Вистар приблизительно 7-недельного возраста, масса тела которых составляла 120-180 г. Разведение животных осуществлялось виварием ИЭФБ РАН.

Период адаптации животных к основному экспериментальному помещению составлял 1 сутки. Крыс размещали по 4-6 особей в стандартные клетки для содержания лабораторных грызунов. На всех этапах эксперимента крысы имели неограниченный доступ к питью и гранулированному сухому корму. Освещение в помещении регулировалось автоматическим переключателем, длительность светового дня составляла 12 часов, свет включался в 8:00 и выключался в 20:00. В помещении установлена система приточно-вытяжной вентиляции. Уборка клеток производилась ежедневно.

После эпилептического статуса в течение первой недели крыс кормили преимущественно влажным и сладким кормом (огурцы, хурма, распаренный геркулес с сахаром и растительным маслом) для облегчения восстановления и набора массы тела после острой стадии модели.

2. Моделирование височной эпилепсии (литий-пилокарпиновая модель) и фармакотерапия в период эпилептогенеза

Литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии на сегодняшний день считается наиболее удачной для воспроизведения стадий формирования приобретенных форм эпилепсии человека и характеризуется этапом индукции эпилептогенеза (острая стадия), латентной фазой и хронической фазой [20]. Индукция эпилептогенеза происходит в результате эпилептического статуса,

начинающегося после введения пилокарпина. Затем следует латентная фаза, во время которой у крыс нет выраженных симптомов эпилепсии, однако идут процессы эпилептизации мозга – эпилептогенез. В хроническую фазу модели, которая в среднем начинается через 2 недели после эпилептического статуса, у крыс появляются спонтанные моторные судорожные припадки. Всё это делает выбор данной модели оптимальным для оценки эффектов применения фармакологических агентов в период эпилептогенеза на формирование эпилепсии.

2.1. Эпилептический статус в литий-пилокарпиновой модели

За сутки до введения пилокарпина крысам вводили раствор хлорида лития (внутрибрюшинно – в/б, 127 мг/кг), что позволяет увеличить чувствительность нервной системы крыс к пилокарпину и существенно снизить вводимую дозу [20]. Введение пилокарпина производилось в/б ступенчато, дозами по 10 мг/кг каждые полчаса, максимальная суммарная доза составляла 40 мг/кг. Тяжесть развивающихся в результате введения пилокарпина судорог оценивали с помощью шкалы Racine [21]. Введение пилокарпина прекращали на той дозе, после которой у крыс развивались судороги 4-й стадии тяжести (rearing) по шкале Racine, так как начиная с этой стадии у крыс запускается устойчивый эпилептический статус. Если после 40 мг/кг у крыс не развивался эпилептический статус, их не брали в дальнейший эксперимент. Эпилептический статус останавливали через 75 минут введением диазепама (в/б, 3-5 мг/кг).

Контрольным животным вводили только раствор хлорида лития.

2.2. Введение антагониста рецептора интерлейкина-1

После остановки эпилептического статуса крысы случайным образом были поделены на две группы, первой вводили антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra, препарат анакинра, НИИ ОЧБ, Россия), второй физиологический раствор. С целью перекрыть период эпилептогенеза проводилось в/б введение IL-1Ra в течение 10 дней после индукции эпилептического статуса (1 инъекция 100 мг/кг через час после остановки эпилептического статуса, затем 5 дней вводили 100 мг/кг, следующие 5 дней 50 мг/кг, подбор доз осуществлялся на основе анализа литературы).

2.3. Экспериментальные группы

Таким образом, было сформировано 3 группы животных:

1. контрольные (Контр, получали только хлорид лития),
2. пост-статусные без терапии (ЭС),
3. пост-статусные с терапией (ЭС+IL-1Ra, после эпилептического статуса вводили IL-1Ra).

3. Анализ эффектов введения антагониста рецептора интерлейкина-1 на формирование височной эпилепсии у крыс

3.1. Характеристики течения латентной фазы модели

В качестве основных показателей, определяющих динамику восстановления крыс после литий-пилокарпиновых судорог, использовали изменение массы тела и выживаемость крыс в первые две недели после эпилептического статуса. Ежедневно крыс взвешивали перед введением инъекций, а также отмечали в протоколе день смерти крыс. Характеристики массы тела крыс, погибших в течение 7 дней после индукции судорог, не учитывали в итоговом анализе динамики массы тела животных.

3.2. Оценка формирования спонтанных судорог

После латентной фазы следует хроническая фаза модели, в которой у большинства животных, перенесших эпилептический статус, наблюдаются спонтанные рецидивирующие судорожные припадки, что свидетельствует о развитии эпилепсии у крыс. Для оценки влияния введения антагониста рецептора интерлейкина-1 проводили видеорегистрацию свободного поведения животных в течение 48 часов с дальнейшим анализом количества и длительности двигательных спонтанных судорог.

3.3. Анализ экспрессии генов маркеров нейровоспаления

По 8 крыс из каждой группы декапитировали через 7 дней после эпилептического статуса для анализа изменения экспрессии генов маркеров нейровоспаления в период эпилептогенеза.

Мозг быстро извлекали и замораживали при -80°C. Выделение дорзального гиппокампа и височной коры производилось с помощью криостатического микротома OTF5000 (Bright Instruments, Великобритания) в соответствии с атласом мозга крыс [22]. Суммарную РНК выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Образцы РНК обрабатывали 1 единицей ДНКазы RQ1 (Promega, США) в течение 15 минут с последующим осаждением 8 M LiCl (3 объема LiCl на 1 объем раствора РНК) и промывкой 75% этанолом. 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).

Обратную транскрипцию для синтеза кДНК производили из 1 мкг тотальной РНК с использованием олиго-dT (0,5 мкг на 1 мкг РНК) и 9-мерных случайных (0,25 мкг на 1 мкг РНК) праймеров (ООО «ДНК-Синтез», Москва, Россия) с помощью М-обратной транскриптазы MLV (100 ЕД на 1 мкг РНК; Евроген, Москва, 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 Mg^{2+}, специфических прямых праймеров, обратных праймеров и гидролиза

(TaqMan). Реакции ПЦР для генов *Nlrp3, Tnfa, Il1b, Il1rn, Gfap, Slc1a2, Aif1, Arg1* проводили в мультиплексах. В качестве референсных генов анализировали экспрессию *Actb, Gapdh, B2m, Rpl13a, Ppia, Sdha, Hprt1, Pgk1* и *Ywhaz* [23]. Реакции ПЦР были тетраплицированы и проведены в термоциклере C1000 Touch в сочетании с системой обнаружения ПЦР в реальном времени CFX384 Touch™ (BioRad, США) одновременно без матрицы и без контрольных образцов обратной транскрипции. Референсные гены для нормализации были выбраны на основе всестороннего ранжирования, полученного с помощью онлайн-инструмента RefFinder (https://blooge.cn/RefFinder/), включенный в алгоритмы GeNorm [24], NormFinder [25], BestKeeper [26] и сравнительный deltaCT [27].

Относительная экспрессия генов была рассчитана с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [28], нормализованного по отношению к среднему геометрическому для трех наиболее стабильных эталонных генов: *Gapdh, Ywhaz, Pgk1* для дорзального гиппокампа и *Hprt1, Ywhaz, Pgk1* для височной коры. На графиках данные представлены в логарифмической шкале.

4. Анализ нарушений поведения у крыс с височной эпилепсией

4.1. Открытое поле

Тестирование в открытом поле использовали для оценки двигательной активности, тревожности и исследовательской активности в латентную и хроническую фазs модели [29]. Тестирование проводилось дважды, в разных установках, на седьмой день и через семь недель после эпилептического статуса соответственно. В обеих установках арена открытого поля была круглой, имела диаметр 1 м, высоту стен 30 см и дно с норками диаметром 5 см. Освещенность в центре поля составляла 8 Лк.

Для тестирования свободного поведения крыс в открытом поле, каждую крысу помещали в центр арены и вели видеозапись в течение 3 минут. Записи анализировали после проведения экспериментов с помощью программного обеспечения Round and Cross и Field4W (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия). Для определения локомоторной активности рассчитывали общее расстояние, время локомоции и скорость. Для оценки исследовательской активности, оценивали суммарное время обнюхивания норок и стоек с упором.

4.2. Свободное социальное взаимодействие

Для оценки активности крыс во время социальных контактов использовался тест социального взаимодействия. Тестирование проводили в плексигласовых боксах (60 × 30 см, высотой 40 см), дно которых было застелено небольшим количеством опилок. Корма и поилок в клетке не было. Предварительно экспериментальную крысу сажали в бокс на 30 мин до начала теста для снижения тревожного и исследовательского поведения относительно новой среды [30]. Затем подсаживали на 5 мин незнакомого взрослого интактного самца крысы Вистар. Анализ производился по

видеозаписи после тестирования с помощью программного обеспечения Field4W. Для анализа социального поведения экспериментальной крысы измеряли следующие паттерны: общение (обнюхивание и груминг тела, обнюхивание хвоста и гениталий), агрессия, защита, сексуально-подобное поведение (садки и облизывание гениталий после садок) и некоммуникативное поведение (автогруминг).

Тестирование проводилось дважды: в латентную фазу модели (на восьмой день после эпилептического статуса) и в хроническую фазу модели (через семь недель после эпилептического статуса).

4.3. Распознание новых объектов

Парадигмы взаимодействия с новыми объектами [31] и распознавания новых объектов [32] использовались для оценки исследовательского поведения и нарушений кратковременной памяти. Тестирование проводили в плексигласовом боксе (60×30 см, высотой 40 см). В качестве новых объектов крысам предоставляли две пары игрушек: пластмассовые конфеты и деревянные пирамидки. Подбор игрушек производился в предварительных экспериментах, чтобы проверить, что у крыс нет изначального предпочтения к одному из вариантов игрушки.

За день крыс на сутки переселяли в боксы без игрушек для снижения уровня стресса и исследовательской активности в экспериментальной установке. В день эксперимента крыс снова поместили обратно в домашнюю клетку и сажали в экспериментальную установку с новыми объектами по одной.

Тест состоял из двух этапов по 5 минут с промежутком между ними 40 минут. На первом этапе одну из пар одинаковых игрушек помещали в установку. Каждую крысу помещали в центр клетки носом к одной из стенок и записывали поведение в течение 5 мин. Этот этап использовался для анализа исследовательской активности в парадигме взаимодействия с новыми объектами. На втором этапе одну игрушку заменяли новой. Все игрушки и установку очищали водным раствором смеси спирта и перекиси (0,3% перекиси и 30% этанола).

Поведение крыс анализировали по видеозаписи с помощью программного обеспечения Field4W, отмечая время взаимодействия с каждым объектом: обнюхивание, ощупывание, покусывания игрушки. Если общее время взаимодействия было менее 15 с, крысу исключали из анализа. Для парадигмы взаимодействия с новыми объектами было проанализировано общее время взаимодействия с обеими игрушками на первом этапе. Для теста распознания новых объектов измеряли время взаимодействия с каждой игрушкой. Затем была рассчитана разница во времени взаимодействия с новым и знакомым объектом и индекс дискриминации как отношение разницы и суммы времени взаимодействия с новой и знакомой игрушками [32].

Тестирование проводили однократно, в хроническую фазу модели (через восемь недель после эпилептического статуса).

4.4. Условно-рефлекторное замирание

Формирование условно-рефлекторного замирания в ответ на звуковой сигнал, ассоциированный с аверсивным стимулом, позволяет оценить функциональность кратковременной и долговременной памяти, зависящей от сохранности гиппокампа и миндалевидного тела [33].

Тестирование выполняли в течение трех дней. Первый день (День 0) был днем приучения к клетке для выработки условного рефлекса (Клетка А), для чего крысу помещали в клетку на 3 минуты. Клетка А (45 × 30 см, высота 20 см) имела электропроводящий пол из металлических прутьев, закреплённых в плексигласовом корпусе. На следующий день (День 1) проводили выработку условного рефлекса по следующей схеме: 120 с привыкания, 20 с звукового сигнала (звук 80 дБ), за которым следовал 1.5 с легкий (0.6 мА) удар током по электропроводящему полу, затем следовал перерыв 120 с, после которого повторяли звуковую и токовую стимуляцию и заканчивали обучение 60-секундным отдыхом.

Через сутки (День 2) тестировали формирование условного рефлекса в условиях контекста и звуковой стимуляции. Для проверки контекстной памяти крысу помещали в Клетку А на 180 секунд, не подавая при этом звуковых и болевых сигналов. Для оценки условно-рефлекторной реакции на звуковой стимул крысу помещали в другую клетку (Клетка Б). Клетка Б была больше (60 × 30 см, высота 40 см), с ровным полом без прутьев, с изображениями геометрических фигур на стенах и каплей раствора ванилина на полу. После 180-секундного привыкания подавали уже известный крысе звуковой сигнал длительностью 180 секунд и заканчивали тестирование 60 секундным отдыхом.

На каждом этапе измеряли общее время замирания. Тестирование проводили однократно, в хроническую фазу модели (через девять недель после эпилептического статуса).

4.5. Тест предпочтения раствора сахарозы

Данный тест позволяет обнаружить депрессивно-подобное поведение у крыс [34]. Согласно парадигме эксперимента, в норме крыса предпочитает слегка сладкую воду обычной питьевой воде, при этом отсутствие предпочтения говорит о депрессивно-подобных нарушениях, выражающихся в ангедонии.

Для проведения теста крыс рассаживали по одиночке в плексигласовые боксы (60 × 30 см, высотой 40 см) со свободным доступом к корму и двумя внешне одинаковыми поилками, в одной из которых находилась обычная питьевая вода, в другой 1%-ый раствор сахарозы. Перед установлением в клетку поилки взвешивали, и затем производили повторное взвешивание через 23 часа. Разницу в весе использовали для оценки количества потребленной жидкости.

Тест проводили в два дня. Первый день рассматривается как адаптационный к условиям эксперимента. Второй день рассматривается как тестовый.

Тестирование проводили однократно, в хроническую фазу модели (через восемь недель после эпилептического статуса).

5. Статистическая обработка результатов исследования

Статистический анализ был выполнен с помощью SPSS Statistics 23 (IBM, США), GraphPad Prism (GraphPad Software, США) и StatSoft Statistica 8 (TIBCO, США). Для анализа выживаемости была использована процедуру Каплана-Мейера с критерием Бреслоу для проверки равенства распределения. Тест Иглевича и Хоаглина для множественных выбросов использовался для идентификации выбросов. Критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка использовались для проверки нормальности распределения. Для нормально распределенных данных использовали ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Дисперсионный анализ Уэлча и апостериорный тест Геймса-Хауэлла использовали при неоднородности дисперсий. Для всех тестов групповые различия считались статистически значимыми на уровне $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

1. Динамика выживаемости и массы тела крыс после эпилептического статуса

Для оценки течения эпилептогенеза у крыс на фоне ежедневного введения IL-1Ra была проанализирована динамика изменения массы тела крыс в течение 10 дней после эпилептического статуса, а также выживаемость крыс в латентную фазу модели. Было обнаружено, что системное применение IL-1Ra не повлияло на данные показатели (рис. 1). Мы обнаружили одинаковую смертность в обеих группах пост-статусных крыс, при этом большинство крыс погибло в первые трое суток (рис. 1А). Без учета крыс, погибших в течение латентной фазы модели, у пост-статусных крыс в обеих группах была сходная динамика массы тела после эпилептического статуса: масса тела снижалась в первые два дня после эпилептического статуса, затем начиналось восстановление (рис. 1Б). В контрольной группе масса тела животных увеличивалась в течение всего периода наблюдения. В совокупности данные результаты позволяют предположить, что применение антагониста рецептора интерлейкина-1 в латентную фазу модели не оказало значимого влияния на интегральные показатели течения болезни. Однако для более точных выводов необходимо провести анализ поведенческих реакций.

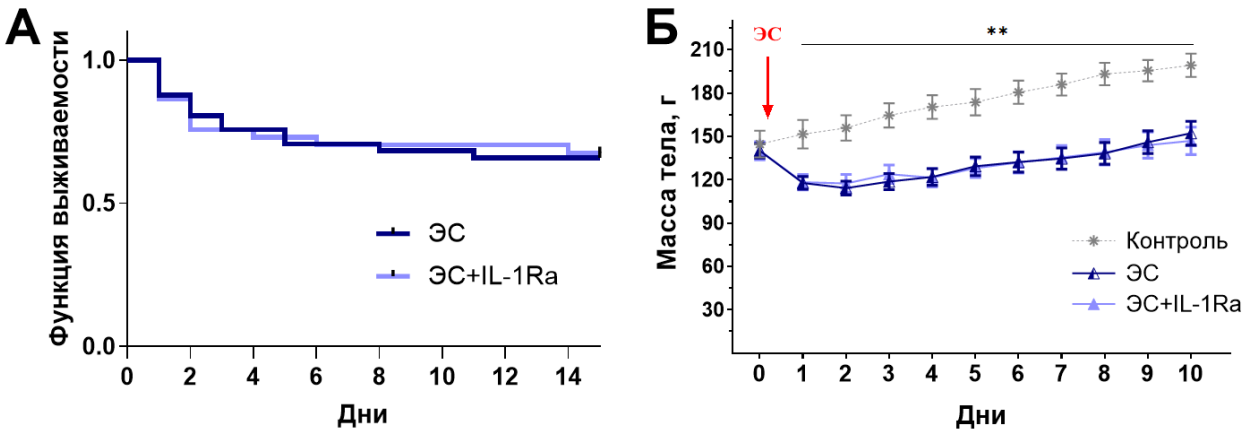

Рисунок 1. Влияние введения IL-1Ra на течение латентной фазы модели. А. Динамика выживаемости, кривые дожития Каплана-Мейера. ЭС: n = 37, ЭС+IL-1Ra n = 41. Б. Динамика массы тела после индуцированного пилокарпином эпилептического статуса (ЭС). Красная стрелка обозначает день эпилептического статуса. Контроль n = 10, ЭС: n = 25, ЭС+IL-1Ra n = 21 ANOVA для повторных измерений, $F_{(20,58)} = 2.33$, $p < 0.007$. ** $p < 0.01$ между контрольной и обеими пост-статусными группами (апостериорный критерий Тьюки (HSD)).

2. Частота и продолжительность спонтанных судорог в хроническую фазу модели

Видеозапись свободного поведения крыс в течение двух суток позволила обнаружить спонтанные моторные судороги у 50% крыс ЭС через 6 недель после эпилептического статуса, при этом в группе крыс, получавших IL-1Ra, только у 20% животных были выявлены спонтанные припадки (рис. 2). Для анализа частоты судорог, мы разделили данные на три группы: крысы без судорог, крысы с редкими судорогами (1-2 эпизода за период наблюдения) и крысы с частыми судорогами (3 и более припадка за период наблюдения). Оказалось, что в группе крыс, получавших IL-1Ra, частота судорог была значительно ниже, чем в контрольной группе ЭС ($\chi^2 = 6.24$, $p = 0.04$), более того, среди крыс ЭС+IL-1Ra не было животных с частыми припадками.

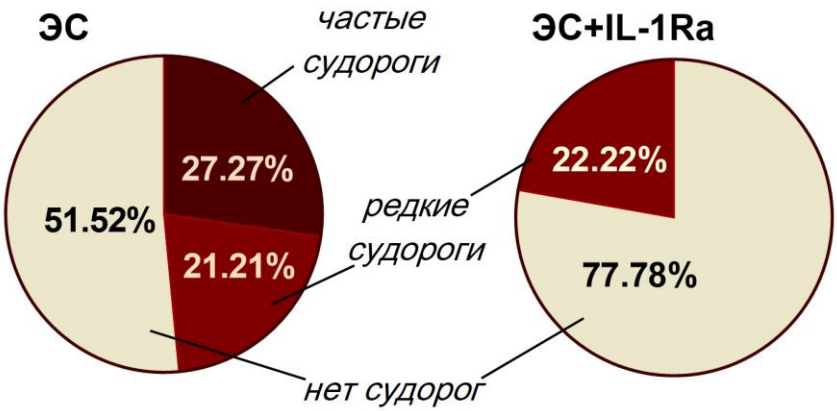

Рисунок 2. Характеристики спонтанных рецидивирующих припадков в хронической фазе модели. Диаграммы иллюстрируют процент крыс со спонтанными судорогами. Редкие судороги: 1–2 эпизода за время регистрации; частые: 3 и более эпизодов. ЭС: n = 33, ЭС+IL-1Ra n = 18

Таким образом, можно сделать вывод о том, что применение IL-1Ra в период эпилептогенеза позволило снизить вероятность развития спонтанных судорог в хронической фазе модели, а также тяжесть развившейся эпилепсии. Следовательно, системного применения IL-1Ra в латентной фазе оказалось достаточно для достижения заметного противоэпилептогенного эффекта. Эти результаты хорошо дополняют ранее полученные данные в экспериментах, направленных на изучение противоэпилептогенного потенциала противовоспалительной терапии [35]. Ряд ранее проведённых исследований показывает, что применение IL-1Ra в комбинации с другими блокаторами, направленными на подавление активности воспалительных процессов или глутаматергической системы, не имело противоэпилептогенного эффекта [16]. Возможно, применение IL-1Ra в качестве монотерапии имеет более высокий терапевтический потенциал в контексте эпилепсии, однако механизмы данных эффектов остаются слабо изученными.

3. Изменения относительной экспрессии генов маркеров нейровоспаления

Относительную экспрессию генов цитокинов (*Il1b, Tnfa и Il1rn*), компонента инфламмосом белка NLRP3 (*Nlrp3*) и маркерных генов астроглии (*Gfap, Slc1a2*) и микроглии (*Aif1, Arg1*) оценивали в дорзальном гиппокампе и височной коре через семь дней после эпилептического статуса, на фоне системного применения IL-1Ra (с момента последней инъекции проходило менее 18 часов). Было выявлено повышение экспрессии мРНК *Il1b* в мозге крыс после эпилептического статуса, как в дорзальном гиппокампе, так и в височной коре (рис. 3). Применение IL-1Ra значительно снижало выявленную гиперэкспрессию. При анализе экспрессии гена *Tnfa* не было выявлено значимых отличий между группами для дорзального гиппокампа, однако в височной коре крыс, получавших IL-1Ra, экспрессия данного гена была выше, чем в контрольной группе (рис. 3). В результате анализа экспрессии гена инфламмосомного белка NLRP3, активация которого запускает каскад реакций, приводящий к высвобождению активной формы IL-1β, выявлено повышение относительной экспрессии мРНК *Nlrp3* после эпилептического статуса в обеих исследованных структурах мозга, при этом применение IL-1Ra не повлияло на экспрессию данного гена (рис. 3).

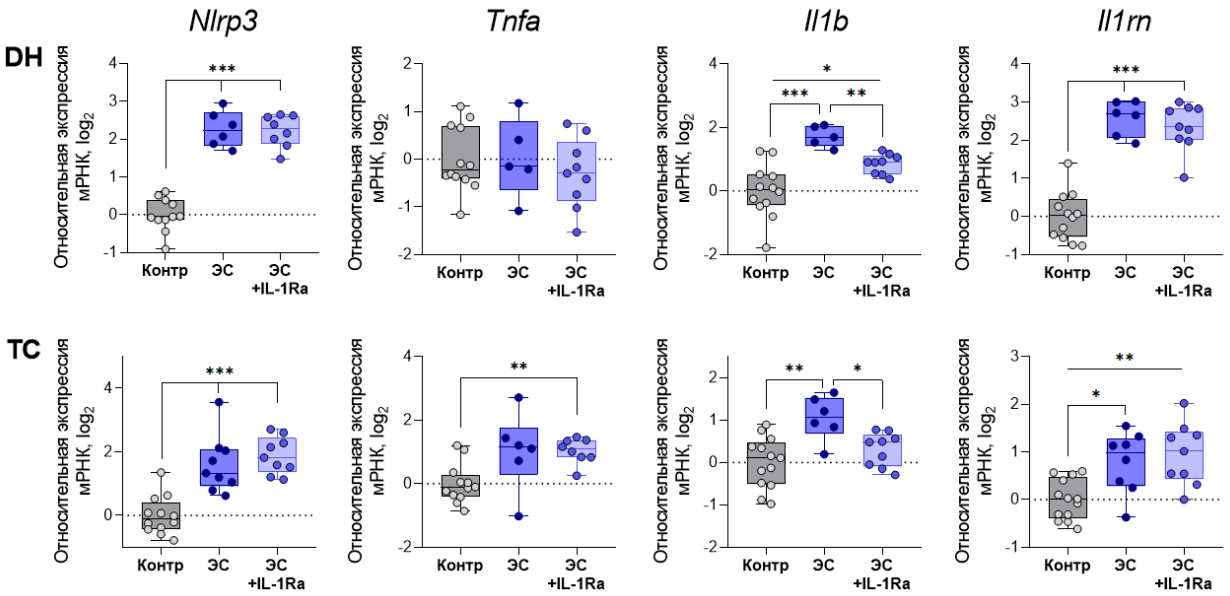

Рисунок 3. Относительная экспрессия генов *Nlrp3*, провоспалительных цитокинов *Il1b* и *Tnfa* и противовоспалительного цитокина *Il1rn* в дорзальном гиппокампе (DH) и височной коре (TC) головного мозга крыс через 7 дней после индуцированного пилокарпином эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймс-Хоуэла. *Nlrp3*: DH: $F_{(2, 22)} = 78.6$, $p < 0.001$; TC: $F_{(2, 27)} = 23.05$, $p < 0.001$; *Tnfa*: TC: $F_{(2, 11)} = 10.07$, $p = 0.003$; *Il1b*: DH: $F_{(2, 12.23)} = 20.15$, $p < 0.001$; TC: $F_{(2, 25)} = 8.2$, $p = 0.002$; *Il1rn*: DH: $F_{(2, 24)} = 55.8$, $p < 0.001$; TC: $F_{(2, 27)} = 9.2$, $p < 0.001$.

Таким образом, на фоне применения IL-1Ra наблюдалось снижение гиперэкспрессии гена интерлейкина-1β. Так как экспрессия гена *Nlrp3* не изменилась, можно предположить, что снижение экспрессии *Il1b* связано с последующими механизмами регуляции экспрессии. В частности, изменение соотношения IL-1β (запуск провоспалительного каскада при связывании с рецептором IL-1R1) и IL-1Ra (ингибирование развития противовоспалительного каскада) в пользу второго может провоцировать запуск комплекса противовоспалительных реакций посредством связывания с рецептором IL-1R1. Следует заметить, что в мозге крыс после эпилептического статуса наряду с повышением экспрессии *Il1b* происходит и повышение экспрессии мРНК *Il1rn* (рис. 3), что может отражать работу собственных механизмов регуляции интенсивности нейровоспаления. При этом системное введение IL-1Ra не оказало значимого влияния на повышенную экспрессию *Il1rn*.

При анализе относительной экспрессии генов маркеров астроглии *Gfap*, *Slc1a2* (рис. 4) был выявлен повышенный уровень мРНК *Gfap* у пост-статусных крыс в обеих исследованных областях мозга. При этом применение IL-1Ra не повлияло на эти изменения. Уровень относительной экспрессии *Slc1a2* не отличался между группами (рис. 4). Относительная экспрессия гена маркера микроглии *Aif1* также была повышена после эпилептического статуса, и применение IL-1Ra не снижало уровень экспрессии (рис. 4). Однако экспрессия гена *Arg1*, являющегося маркером противовоспалительного фенотипа микроглии, была снижена в дорзальном гиппокампе после

эпилептического статуса, при этом у крыс в группе ЭС+IL-1Ra экспрессия данного гена полностью восстанавливалась (рис. 4).

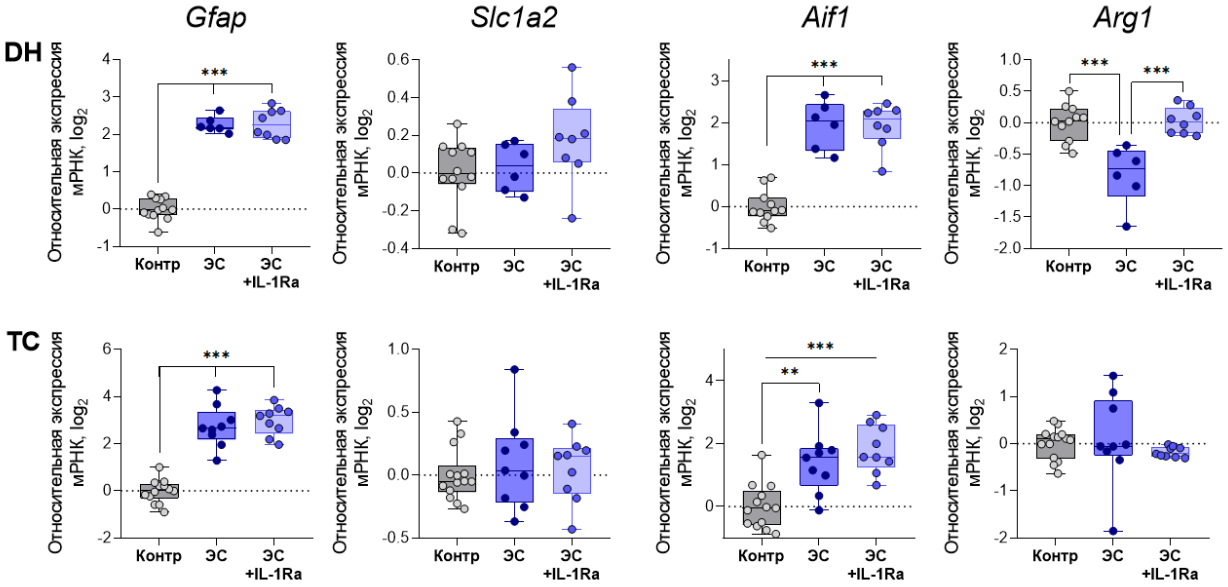

Рисунок 4. Относительная экспрессия маркерных генов астроглии *Gfap* и *Slc1a2* и микроглии *Aif1* и *Arg1* в дорсальном гиппокампе (DH) и височной коре (TC) головного мозга крыс через 7 дней после индуцированного пилокарпином эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймс-Хоуэла. *Gfap*: DH: $F_{(2, 23)} = 174.1$, $p < 0.001$; TC: $F_{(2, 29)} = 76.1$, $p < 0.001$; *Aif1*: DH: $F_{(2, 22)} = 50.3$, $p < 0.001$; TC: $F_{(2, 28)} = 15.6$, $p < 0.001$; *Arg1*: DH: $F_{(2, 22)} = 15.6$, $p < 0.001$.

В совокупности данные об экспрессии маркеров глиальных клеток позволяют сделать вывод о том, что после индуцированного пилокарпином эпилептического статуса наблюдается активация астроглиальных и микроглиальных клеток, что согласуется с литературными данными, отмечающими активацию нейровоспаилтельных процессов в период эпилептогенеза [10]. И хотя системное введение IL-1Ra не повлияло на интенсивность активации глии, оно позволило сдвинуть баланс между про- и противовоспалительными процессами в сторону противовоспалительных реакций, если брать во внимание восстановление экспрессии *Arg1* и снижение гиперэкспрессии *Il1b*. Известно, что активация противовоспалительного фенотипа микроглии лежит в основе благоприятного исхода нейровоспаления, предотвращения гибели клеток и репарации ткани [36], что, в свою очередь, может являться потенциальным механизмом противоэпилептогенного эффекта системного введения IL-1Ra в период эпилептогенеза.

Следует, однако, заметить, что невзирая на высокий уровень экспрессии мРНК *Gfap*, не произошло статистически значимых изменений экспрессии гена *Slc1a2*, кодирующего характерный для астроцитов транспортер возбуждающих аминокислот типа 2 (EAAT2), осуществляющего основной трафик глутамата из синаптической щели в астроциты, что в свою очередь так же могло бы оказаться одним из противоэпилептогенных механизмов [37].

Следовательно, через 7 дней после эпилептического статуса в исследованных структурах головного мозга крыс данный механизм активен не более, чем у здоровых животных, и вряд ли вносит особый вклад в процессы эпилептогенеза.

4. Поведенческие нарушения в литий-пилокарпиновой модели

Поведение животных в литий-пилокарпиновой модели существенно нарушено как в латентную, так и хроническую фазу [38]. Поэтому мы провели подробный анализ влияния применения IL-1Ra на поведение крыс в обе фазы модели. Это позволило выявить ряд отличий в поведении пост-статусных крыс, получавших и не получавших IL-1Ra.

4.1. Двигательная активность в открытом поле

Тестирование крыс в открытом поле позволило охарактеризовать общую двигательную активность крыс. Пост-статусные крысы были более подвижны и большую часть времени теста активно перемещались по полю как в латентную фазу модели ($F_{(2,18.2)} = 7.17$, $p = 0.005$), так и в хроническую ($F_{(2,29)} = 8.83$, $p = 0.001$), при этом в хроническую фазу модели двигались значительно быстрее, чем контрольные крысы ($F_{(2,27)} = 9.3$, $p = 0.001$, рис. 5). Применение IL-1Ra нормализовало данные показатели в период применения в латентную фазу модели, однако в хроническую фазу модели данный эффект не сохранился.

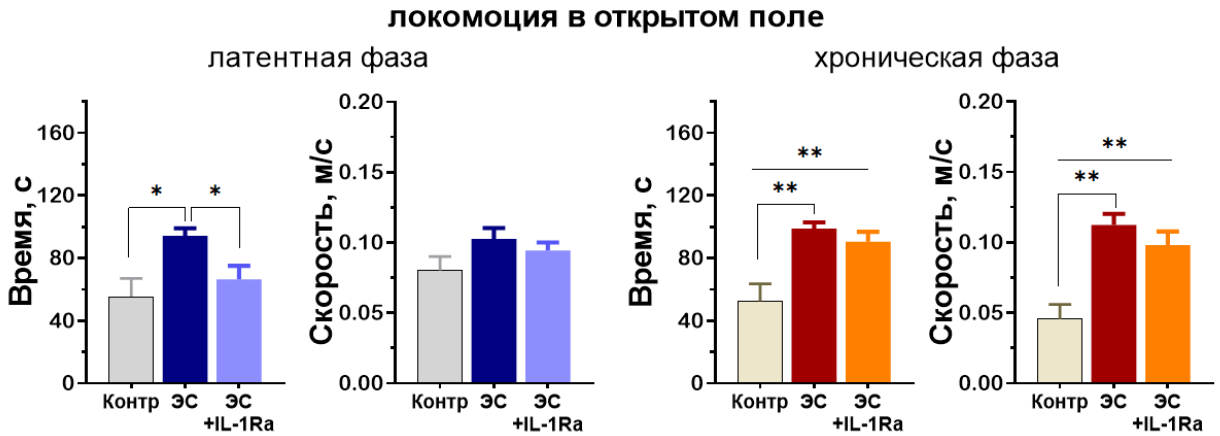

Рисунок 5. Двигательная активность в открытом поле. На графиках для времени указано общее время, затраченное крысой на перемещение по арене. На графиках для скорости указана средняя скорость движения крыс по арене. ANOVA с апостериорным критерием Тьюки * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Контроль $n = 15$, ЭС: $n = 22$, ЭС+IL-1Ra $n = 14$.

Таким образом, в латентную фазу модели применение IL-1Ra способствовало нормализации двигательной активности пост-статусных крыс. Видимо, данные изменения отражают общий противовоспалительный эффект, наблюдаемый на фоне применения IL-1Ra.

4.2. Социальное взаимодействие

В тесте социального взаимодействия было обнаружено снижение времени активного социальное взаимодействие у пост-статусных крыс как в латентную, так и в хроническую фазы модели. Применения IL-1Ra значительно улучшило коммуникативное поведение на обоих этапах модели (рис. 6).

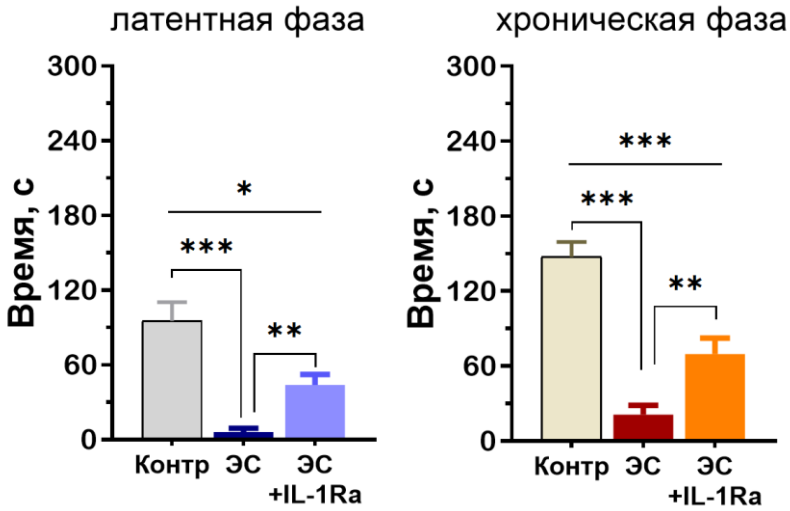

Рисунок 6. Общее время, потраченное на взаимодействия экспериментальной крысы с интактной крысой в тесте социального взаимодействия. ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса-Хауэлла: латентная фаза модели: F (2,30) = 12,7, $p < 0{,}001$, и хроническая фаза: F (2,29) = 27,0, $p < 0{,}001$). Контроль $n = 15$, ЭС: $n = 22$, ЭС+IL-1Ra $n = 14$.

Расстройства аутистического спектра нередко сопутствуют эпилепсии и, в том числе, характерны для литий-пилокарпиновой модели [39], что в проведенном исследовании было подтверждено с помощью теста свободного социального взаимодействия. Важно отметить, что применение IL-1Ra значительно восстановило социальное поведение у крыс, исходя из чего можно предполагать, что в основе нарушений социального поведения при эпилепсии могут лежать нейровоспалительные процессы [40].

4.3. Исследовательское поведение

Для оценки исследовательской активности крыс были проанализированы паттерны исследовательского поведения в открытом поле в латентную и хроническую фазы, а также общее время изучения игрушек в парадигме взаимодействия с новыми объектами в хроническую фазу.

В латентную фазу в открытом поле у пост-статусных крыс было выявлено снижение времени исследования норок ($F_{(2,46)} = 4.17$, $p = 0.022$, рис. 6А). При этом в группе крыс ЭС+IL-1Ra данные показатели не отличались от контрольной группы. Это может говорить о том, что снижение исследовательского поведения в период эпилептогенеза может быть связано с активными нейровоспалительными процессами и повышенным уровнем

провоспалительных цитокинов, в частности IL-1β [41], так как применение IL-1Ra восстановило исследовательское поведение.

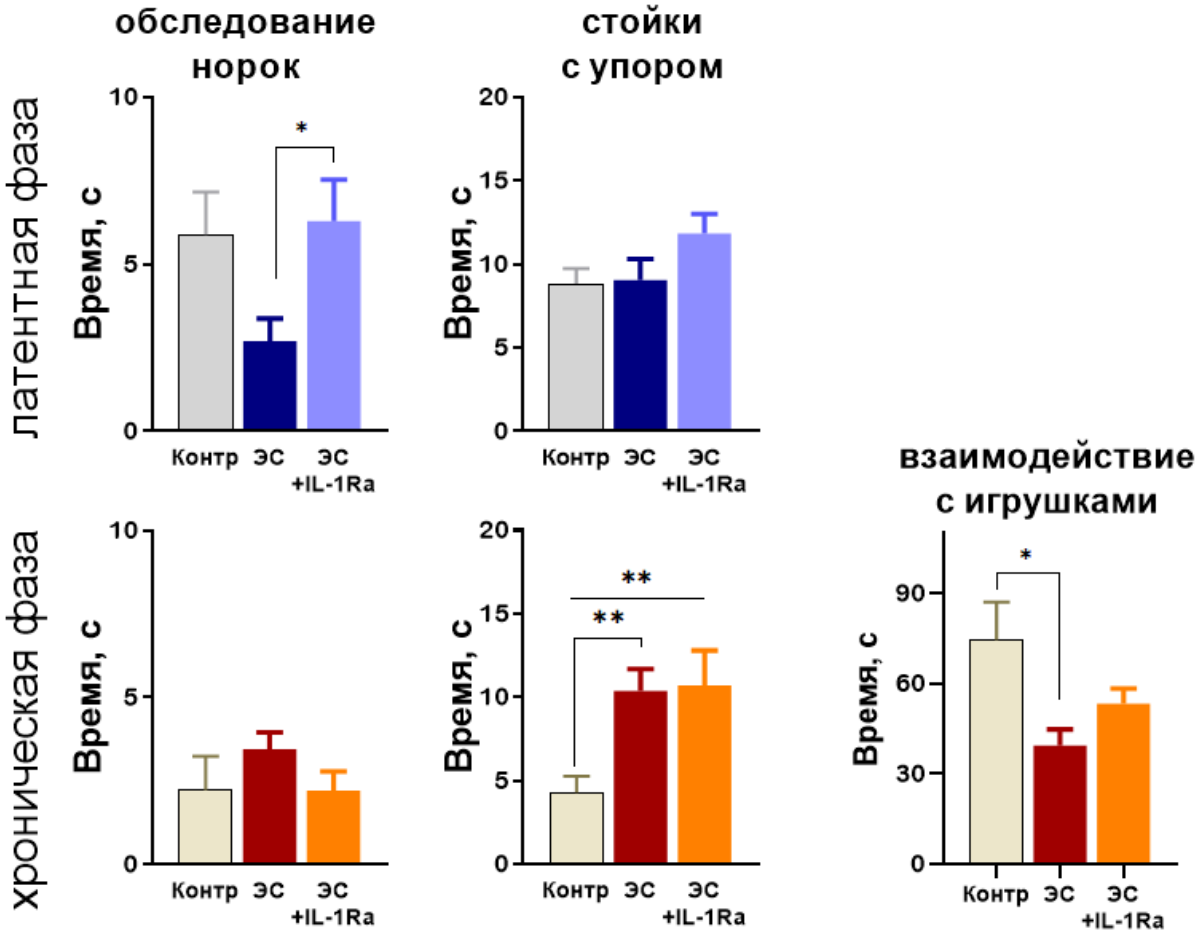

Рисунок 7. Характеристики исследовательской активности у крыс после ЭС. Латентная фаза модели: 7 дней после ЭС; хроническая фаза: 7 недель после ЭС. ANOVA с апостериорным критерием Тьюки * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Контроль $n = 15$, ЭС: $n = 22$, ЭС+IL-1Ra $n = 14$.

В хроническую фазу модели в открытом поле не наблюдалось отличий по времени, затраченному крысами на исследование норок, однако в обеих пост-статусных группах наблюдалось увеличение времени стоек с упором ($F_{(2,37)} = 5.04$, $p = 0.012$, рис. 7). Также при взаимодействии с новыми объектами в знакомой клетке пост-статусные крысы показали меньшую заинтересованность игрушками, чем контрольные крысы (рис. 7), а IL-1Ra не оказал значимого влияния на наблюдаемое поведение.

4.4. Когнитивные функции и память

Функции кратковременной памяти оценивали в тесте распознания новых объектов, где через 40 минут после ознакомления крысы с парой одинаковых игрушек предъявляли пару разных игрушек, одну из которых крыса видела впервые. Согласно парадигме, крыса должна предпочитать незнакомый объект знакомому. Расчёт индекса дискриминации показал, что

данное поведение не имело значимых нарушений в обеих группах пост-статусных крыс (рис. 8А).

Функцию памяти, ассоциированной со страхом, оценивали с помощью теста условно-рефлекторного замирания, основанного на рефлекторном замирании крыс в случае опасности. Основным показателем научения в данном тесте является продолжительное замирание в случае ожидания болевого стимула (удар током по лапкам).

В тестовый день проводилось исследование как контекстной памяти (замирание в тех же условиях, в которых крыса столкнулась с болевой стимуляцией), так и памяти, ассоциированной с условным сигналом (в новой клетке Б, но с условным звуковым сигналом). В условиях ассоциированного с болевой стимуляцией контекста (та же клетка А, но без звука) пост-статусные крысы практически не демонстрировали реакцию замирания, в отличие от контрольных крыс (рис. 8Б). Применение IL-1Ra полностью восстановило показатели данной реакции. В новой клетке Б в ответ на условный звуковой сигнал крысы контрольной группы проводили в состоянии замирания почти всё врем подачи звука, в то время как пост-статусные крысы демонстрировали данную реакцию намного слабее (рис. 8В). Применение IL-1Ra практически полностью восстановило реакцию пост-статусных крыс на условный сигнал.

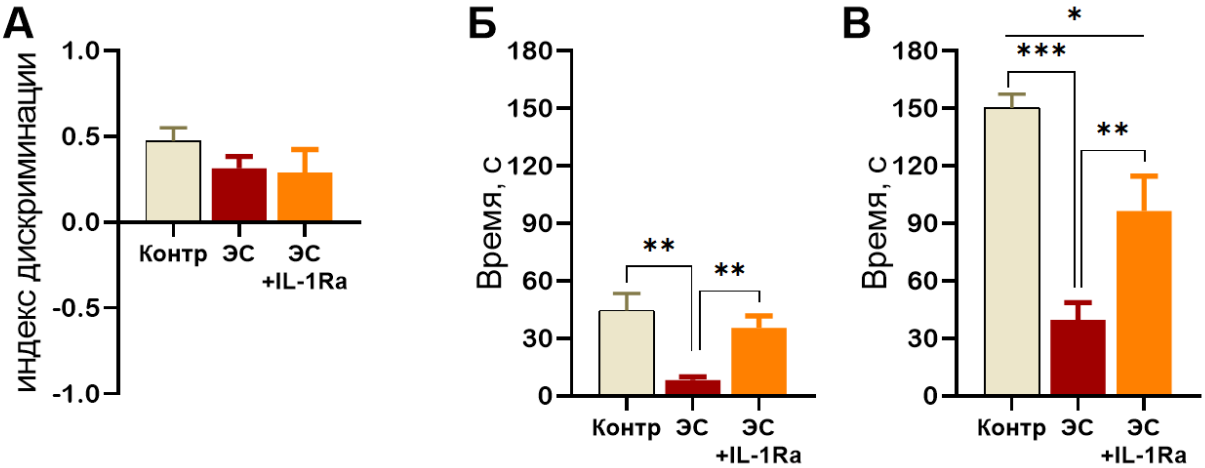

Рисунок 8. А. Индекс дискриминации при взаимодействии с новым объектом, в данной шкале -1 соответствует стопроцентному предпочтению старого объекта, а +1 стопроцентному предпочтению нового. ANOVA $F_{(2, 23)} = 1.16$, $p = 0.3$. Б, В. Время замирания крыс в тестовый день теста условно-рефлекторного замирания. Б. Клетка А, в которой проводилось обучение, но в данном испытании не подавался ни звук, ни ток. ANOVA с поправкой Уэлча $F_{(2, 13.13)} = 14.9$, $p < 0.001$. В. Клетка Б, новая клетка, в которой подавался звук, являвшийся условным сигналом в день обучения. ANOVA с поправкой Уэлча $F_{(2, 15.46)} = 44.3$, $p < 0.001$. Апостериорный критерий Геймс-Хоуэла: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Контроль $n = 11$, ЭС: $n = 18$, ЭС+IL-1Ra $n = 12$.

Эти результаты позволяют сделать вывод, что оба типа памяти, ассоциированной с аверсивной стимуляцией, значительно нарушены у крыс с эпилепсией, однако применение антагониста рецептора интерлейкина-1 способствовало сохранению данных функций памяти.

4.5. Проявление ангедонии в тесте предпочтения раствора сахарозы

В тесте предпочтения раствора сахарозы в день приучения (День 1) у крыс группы ЭС наблюдалась выраженная ангедония (рис. 9). Учитывая, что в этот день крысам впервые предоставлялся доступ к сладкой воде, часть животных могла испугаться нового вкуса жидкости. Тем не менее, крысы группы ЭС+IL-1Ra в первый же день показали ярко выраженное предпочтение раствора сахарозы обычной воде, сохранившееся и на второй день теста. Таким образом, можно говорить о частичной коррекции гедонистического поведения, зачастую нарушенного в моделях хронической эпилепсии в связи с нейровоспалительными процессами [39].

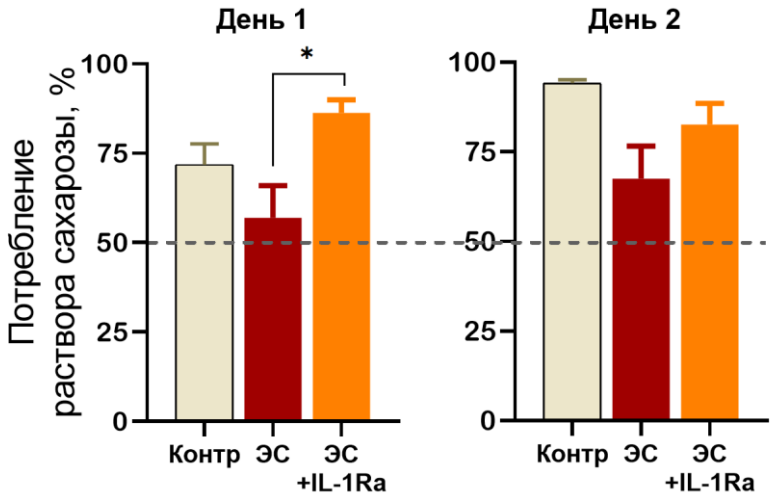

Рисунок 9. Процент потребления раствора сахарозы от общего объёма потреблённой жидкости. ANOVA с поправкой Уэлча $F_{(2, 19.69)} = 5.6$, $p = 0.012$, апостериорный критерий Геймс-Хоуэла * $p < 0.05$. Контроль $n = 11$, ЭС: $n = 18$, ЭС+IL-1Ra $n = 12$.

Таким образом, всесторонний анализ поведения крыс позволяет сделать вывод о том, что противоэпилептогенный эффект IL-1Ra сопровождается значительной коррекцией сопутствующих эпилепсии нарушений когнитивных и эмоциональных функций. При этом не было выявлено каких-либо негативных побочных эффектов применения IL-1Ra в период эпилептогенеза.

Выводы

1) Системное введение IL-1Ra внутрибрюшинно в течение латентного периода литий-пилокарпиновой модели не повлияло на выживаемость крыс и динамику изменения массы тела после эпилептического статуса, однако оказало значимое влияние на поведение и экспрессию генов маркеров нейровоспаления в гиппокампе и височной коре головного мозга крыс в латентный период.
2) В латентную фазу модели применение IL-1Ra возвращало к контрольным показателям характерные для модели гиперподвижность в открытом поле и низкую социальную активность в тесте социального взаимодействия.

3) Применение антагониста рецептора интерлейкина-1 способствовало снижению гиперэкспрессии гена провоспалительного цитокина IL-1β в латентную фазу модели, при этом не повлияло на экспрессию гена вышележащего участника каскада активации провоспалительного пути белка инфламмосом NLRP3. Таким образом, применение антагониста рецептора интерлейкина-1 позволяет контролировать процессы нейровоспаления только на уровне рецептора интерлейкина-1.
4) Повышение экспрессии маркеров астроглии (*Gfap*) и микроглии (*Aif1*) через 7 дней после эпилептического статуса свидетельствует об интенсивной активации глии, применение IL-1Ra не повлияло на экспрессию данных маркеров, однако способствовало восстановлению экспрессии маркерного гена (*Arg1*) альтернативного профиля активации микроглии.
5) Данные процессы могут лежать в основе противоэпилептогенного эффекта применения IL-1Ra в период эпилептогенеза, проявлявшегося в снижении количества крыс с судорогами и частоты судорог в группе крыс ЭС+IL-1Ra, а также частичной коррекцией нарушений поведения.
6) Применение IL-1Ra в период эпилептогенеза способствует восстановлению ряда когнитивных и эмоциональных функций хроническую фазу модели у крыс, в частности, когнитивных функций в тесте условно-рефлекторного замирания и социальной активности в тесте социального взаимодействия, а также частичной коррекции депрессивно-подобного поведения в тесте предпочтения раствора сахарозы.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Smolensky I. V., Zubareva, O. E., Kalemenev, S. V., Lavrentyeva, V. V., Dyomina, A. V., Karepanov, A. A., & Zaitsev, A. V. Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy //Behavioural Brain Research. – 2019. – Т. 372. – С. 112044.
2. Dyomina A. V. et al. Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy //Pharmaceuticals. – 2020. – Т. 13. – №. 11. – С. 340.
3. Рогинская А. И., Дёмина А. В., Коваленко А. А., Захарова М. В., Шварц А. П., Мелик-Касумов Т. Б., & Зубарева О. Е. Действие анакинры на экспрессию генов рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором в мозге крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии //Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2022. – Т. 108. – №. 4. – С. 490–504.
4. Шварц А. П., Дёмина А. В., Захарова М. В., Коваленко А. А., Грязнова М. О., Ищенко А. М., & Зайцев А. В. Оценка стабильности референсных генов в мозге крыс при проведении антиоксидантной и противовоспалительной терапии в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии //Российский

физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2022. – Т. 108. – №. 6. – С. 781–792.

Тезисы

1. Дёмина А. В., Смоленский И. В. Влияние курсового введения рецепторного антагониста интерлейкина-1 (ралейкин) на тяжесть неврологических и поведенческих нарушений у крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии // VIII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019». 2019 – С. 329.
2. Дёмина А. В., Смоленский И. В., Калеменев С. В., Зубарева О. Е., Зайцев А. В. Применение рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL-1ra) для уменьшения тяжести неврологических и поведенческих нарушений у крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии // Сборник материалов конференции "Неделя науки СПбПУ". 2019.– С. 81-83.
3. Дёмина А. В., Смоленский И. В., Карепанов А. А. Терапия антагонистом рецептора интерлейкина-1 снижает тяжесть психоневрологических нарушений у крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2020: Сборник тезисов LXXXI научно-практической конференции с международным участием. 2020. – С. 197.
4. Dyomina A. V., Zubareva O. E., Smolensky I. V., Karepanov A. A., Ishchenko A. M., Zaitsev A. V. IL-1Ra therapy partially prevented epileptogenesis and behavioral dysfunction in rats in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy // Stress, Brain and Behavior. 2020. – V. 10. – P. 35.
5. Дёмина А. В., Смоленский И. В., Карепанов А. А. Терапия мемантином и антагонистом рецептора интерлейкина-1 раздельно, но не в комбинации, позволила нивелировать психоневрологические нарушения у крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии // Фундаментальная наука и клиническая медицина. 2020.– Т. 23. – С. 253-254.
6. Дёмина А. В., Смоленский И. В., Карепанов А. А. Рецепторный антагонист интерлейкина-1 снижает тяжесть неврологических и коморбидных нарушений у крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии // Актуальные проблемы биомедицины – 2020. Сборник тезисов. 2020. – С. 61-63.
7. Шварц А. П., Дёмина А. В., Грязнова М. И., Зайцев А. В. Сочетание антиоксидантной и противовоспалительной терапии в экспериментальной модели височной эпилепсии. //Интегративная физиология – 2021. Сборник тезисов. 2021. – С. 89-90.
8. Дёмина А. В., Шварц А. П., Грязнова М. О., Ищенко А. М., Зайцев А. В. Применение антиоксидантной и противовоспалительной терапии для коррекции нарушений поведения крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. //VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ с международным участием. 2022. – С. 28.
9. Дёмина А. В., Зубарева О. Е., Ищенко А. М., Зайцев А. В. Применение анакинры и мемантина в период эпилептогенеза раздельно, но не в

комбинации, снизило выраженность психоневрологических нарушений у крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. //VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ с международным участием. 2022. – С. 29.

10. Зубарева О. Е., Дёмина А. В., Захарова М. В., Коваленко А. А., Харисова А. Р., Зайцев А. В. Роль нейровоспаления в развитии эпилептических процессов в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии у крыс. //ПАТОГЕНЕЗ. 2022. – Т. 20(3). – С. 89-90.

Список цитируемой литературы

1. Banerjee P.N., Filippi D., Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy—A review // Epilepsy Res. 2009. Vol. 85, № 1. P. 31–45.
2. Laxer K.D. et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment // Epilepsy Behav. 2014. Vol. 37. P. 59–70.
3. Josephson C.B., Jetté N. Psychiatric comorbidities in epilepsy // Int. Rev. Psychiatry. Taylor & Francis, 2017. Vol. 29, № 5. P. 409–424.
4. Парфенова Е.В. et al. Эпилепсия как социальная проблема // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. Общество с ограниченной ответственностью Издательство Медиа Сфера, 2018. Vol. 118, № 9. P. 77–85.
5. Löscher W. The holy grail of epilepsy prevention: Preclinical approaches to antiepileptogenic treatments // Neuropharmacology. 2020. Vol. 167. P. 107605.
6. Koepp M.J. et al. Neuroinflammation imaging markers for epileptogenesis // Epilepsia. 2017. Vol. 58. P. 11–19.
7. Hiscott P.S. et al. The role of inflammation in the development of epilepsy // Curr. Eye Res. Journal of Neuroinflammation, 1988. Vol. 7, № 9. P. 877–892.
8. Vezzani A., Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability // Neuropharmacology. 2015. Vol. 96. P. 70–82.
9. Soltani Khaboushan A., Yazdanpanah N., Rezaei N. Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis // Mol. Neurobiol. 2022. Vol. 59, № 3. P. 1724–1743.
10. Choi J., Koh S. Role of brain inflammation in epileptogenesis // Yonsei Med. J. 2008. Vol. 49, № 1. P. 1–18.
11. Pohlentz M.S. et al. Characterisation of NLRP3 pathway-related neuroinflammation in temporal lobe epilepsy // PLoS One. 2022. Vol. 17, № 8 August. P. 1–20.
12. Wu C. et al. The Role of NLRP3 and IL-1β in Refractory Epilepsy Brain Injury // Front. Neurol. 2020. Vol. 10, № February. P. 1–8.
13. Jyonouchi H., Geng L. Intractable Epilepsy (IE) and Responses to Anakinra, a Human Recombinant IL-1 Receptor Agonist (IL-1ra): Case Reports // J. Clin. Cell. Immunol. 2016. Vol. 7, № 5.

14. Gibbons M.B. et al. Contributions of astrocytes to epileptogenesis following status epilepticus: Opportunities for preventive therapy? // Neurochem. Int. 2013. Vol. 63, № 7. P. 660–669.

15. Maroso M. et al. Interleukin-1β Biosynthesis Inhibition Reduces Acute Seizures and Drug Resistant Chronic Epileptic Activity in Mice // Neurotherapeutics. 2011. Vol. 8, № 2. P. 304–315.

16. Noe F.M. et al. Pharmacological blockade of IL-1β/IL-1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy // Neurobiol. Dis. 2013. Vol. 59. P. 183–193.

17. Weber A., Wasiliew P., Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. 2010. Vol. 3, № 105. P. 1–7.

18. Waugh J., Perry C.M. Anakinra // BioDrugs. 2005. Vol. 19, № 3. P. 189–202.

19. Cavalli G., Dinarello C.A. Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases // Front. Pharmacol. 2018. Vol. 9, № NOV. P. 1–21.

20. Curia G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy // J. Neurosci. Methods. 2008. Vol. 172, № 2. P. 143–157.

21. Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: Cortical areas // Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 1975. Vol. 38, № 1. P. 1–12.

22. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier, 2006.

23. Schwarz A.P. et al. Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples // Mol. Cell. Probes. Elsevier, 2020. Vol. 53. P. 101611.

24. Vandesompele J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // Genome Biol. 2002. Vol. 3, № 7. P. research0034.1.

25. Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // Cancer Res. AACR, 2004. Vol. 64, № 15. P. 5245–5250.

26. Pfaffl M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations // Biotechnol. Lett. Springer, 2004. Vol. 26. P. 509–515.

27. Silver N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR // BMC Mol. Biol. BioMed Central, 2006. Vol. 7, № 1. P. 1–9.

28. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // methods. Elsevier, 2001. Vol. 25, № 4. P. 402–408.

29. Walsh R.N., Cummins R.A. The open-field test: a critical review. // Psychol. Bull. American Psychological Association, 1976. Vol. 83, № 3. P. 482.

30. File S.E., Hyde J.R. Can social interaction be used to measure anxiety? // Br. J. Pharmacol. Wiley-Blackwell, 1978. Vol. 62, № 1. P. 19.

31. Wilkinson J.L. et al. Rats' novel object interaction as a measure of environmental familiarity // Learn. Motiv. Elsevier, 2006. Vol. 37, № 2. P. 131–148.

32. Antunes M., Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications // Cogn. Process. Springer, 2012. Vol. 13. P. 93–110.

33. Goosens K.A., Maren S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats // Learn. Mem. 2001. Vol. 8, № 3. P. 148–155.

34. Willner P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant // Psychopharmacology (Berl). Springer, 1987. Vol. 93. P. 358–364.

35. French J.A. et al. Clinical studies and anti-inflammatory mechanisms of treatments // Epilepsia. 2017. Vol. 58. P. 69–82.

36. Cherry J.D., Olschowka J.A., O'Banion M.K. Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed // J. Neuroinflammation. 2014. Vol. 11. P. 1–15.

37. Kim K. et al. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics // J. Cell. Physiol. Wiley Online Library, 2011. Vol. 226, № 10. P. 2484–2493.

38. Smolensky I. V. et al. Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy // Behav. Brain Res. Elsevier, 2019. Vol. 372, № March. P. 112044.

39. Mazarati A.M., Lewis M.L., Pittman Q.J. Neurobehavioral comorbidities of epilepsy: Role of inflammation // Epilepsia. 2017. Vol. 58. P. 48–56.

40. Propes M.J., Johnson R.W. Role of corticosterone in the behavioral effects of central interleukin-1β // Physiol. Behav. 1997. Vol. 61, № 1. P. 7–13.

41. Dunn A.J., Antoon M., Chapman Y. Reduction of exploratory behavior by intraperitoneal injection of interleukin-1 involves brain corticotropin-releasing factor // Brain Res. Bull. 1991. Vol. 26, № 4. P. 539–542.