

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.821.6

**ХРОНИЧЕСКОЕ ИНТРАЦЕРЕБРОВЕНТРИКУЛЯРНОЕ ВВЕДЕНИЕ
2-ДЕЗОКСИ-D-ГЛЮКОЗЫ ВЫЗЫВАЕТ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ
НАРУШЕНИЯ ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА
ПО РОСТРОКАУДАЛЬНОМУ НАПРАВЛЕНИЮ**

© 2020 г. Е. И. Самохина^{1,*}, А. Е. Мальков¹, А. Н. Самохин², И. Ю. Попова¹

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

² Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

*e-mail: evgeniia.sam@gmail.com

Поступила в редакцию 30.09.2019 г.

После доработки 03.12.2019 г.

Принята к публикации 16.12.2019 г.

В экспериментах *in vivo* было показано, что хроническое (на протяжении 4 недель) частичное ингибирование гликолиза в мозге экспериментальных животных инициирует процесс эпилептогенеза на электрофизиологическом и поведенческом уровне [Samokhina et al., 2017]. Оставалось неясным, вызывает ли длительный гипометаболизм глюкозы в мозге структурные нарушения в гиппокампе. Для ответа на этот вопрос в данной работе было проведено гистологическое исследование ростральной и каудальной частей дорсального гиппокампа экспериментальных животных с моделью хронического частичного ингибирования гликолиза в мозге. Эта модель создавалась путем ежедневного введения в желудочки мозга конкурентного аналога глюкозы 2-дезоксид-глюкозы (2ДГ) в дозе, вызывающей ингибирование гликолиза не более 14%, общая продолжительность введения составляла четыре недели. Такая концентрация 2-ДГ при его однократном введении не вызывала развитие судорожной активности, а на электрофизиологическом уровне приводила к незначительному снижению амплитуды локальной полевой активности гиппокампа. Контрольной группе интрацеребровентрикулярно вводили физиологический раствор. На протяжении всего эксперимента производили контроль массы тела экспериментальных животных, поскольку введение в желудочки мозга препаратов, влияющих на метаболизм глюкозы, может оказывать прямое влияние на гипоталамус и влиять на пищевое поведение и массу тела. Было показано, что изменения массы тела в группе 2-ДГ достоверно не отличались от таковых в контрольной группе. Через три недели после начала эксперимента была проведена видеорегистрация поведения, которая выявила появление спонтанных судорог у части животных. Гистологический анализ показал, что хроническое введение 2-ДГ приводило к снижению плотности нейронов в поле СА1 дорсального гиппокампа на 17% в ростральной ($p = 0.03$) и на 23% в каудальной ($p = 0.003$) частях. При этом длительные травмирующие воздействия на мозг, связанные с экспериментальными процедурами, в экспериментальной группе не вызвали изменений площади ипсилатерального бокового желудочка по сравнению с таковой в контрольной группе. В целом полученные результаты показали, что хронический гипометаболизм глюкозы в мозге вызывает морфологические перестройки в ткани дорсального гиппокампа и приводит к развитию спонтанных поведенческих судорог у части животных. Эти факты подтверждают гипотезу о триггерной роли церебрального энергодифицита при развитии эпилепсии.

Ключевые слова: эпилептогенез, дорсальный гиппокамп, метаболизм глюкозы, 2-дезоксид-глюкоза, спонтанные судороги

DOI: 10.31857/S0044467720030119

Гиппокамп – структура переднего мозга, играющая решающую роль в организации внимания, пространственного обучения и памяти [Vinogradova, 2001; Moser et al., 2008; Lisman et al., 2017]. Выполнение таких сложных функций обеспечивается высокой пла-

стичностью гиппокампа. Однако именно эта пластичность делает гиппокамп одной из наиболее уязвимых структур мозга [Vinogradova, 2001]. Специфические дисфункции гиппокампа описаны в связи, по крайней мере, с 15 типами патологий головного мозга различной этиологии: травматической, генетической и инфекционной. Гиппокампазависимые дефекты были наиболее полно исследованы у пациентов с височной эпилепсией со склеротизацией гиппокампа [Thom, 2014; Кичигина, 2019].

В течение долгого времени было принято рассматривать эпилепсию как дисбаланс между возбуждающими и тормозными нейромедиаторными системами, и поэтому исследования эпилепсии были сосредоточены на изменении синаптической передачи. Однако благодаря выдающемуся прогрессу в области диагностических методов визуализации и их широкого использования как в клинической, так и в экспериментальной эпилептологии, стало ясно, что эпилепсию следует рассматривать как гораздо более сложное нарушение, чем неисправные синаптические функции. Например, развитие эпилепсии сопровождается изменениями в клеточном метаболизме, сосудистой реорганизацией, нарушением функций гематоэнцефалического барьера, воспалительными реакциями, включая трансформацию астроцитов, и другими несинаптическими изменениями. Кроме того, некоторые из этих изменений, как было показано, являются не только следствием судорог, но и могут предшествовать им и способствовать вовлечению нейрональной сети в судорожную активность. Интересно, что большинство функциональных изменений, связанных с развитием эпилепсии, связаны с ухудшением энергетического метаболизма. Действительно, метаболические дисфункции являются характерной чертой различных типов эпилепсии у людей и, более того, используются для локализации судорожного очага у пациентов [Pan, 2000]. Гипометаболические области мозга определяются при помощи позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), демонстрирующей снижение утилизации глюкозы в зоне судорожного очага [Goffin et al., 2008]. Также используется метод магнитно-резонансной спектроскопии для оценки падения уровня N-ацетиласпартата, который сильно коррелирует с окислительным метаболизмом [Pan et al., 2000]. Исследования, проведенные на животных с эксперимен-

тальными моделями эпилепсии, показали, что после эпилептического статуса на ранней фазе эпилептогенеза до появления спонтанных судорог происходит выраженное снижение метаболизма глюкозы в лимбических структурах мозга, которое остается пониженным более месяца [Curia et al., 2008; Lee et al., 2012; Jupp et al., 2012]. Эти и многие другие метаболические нарушения, обнаруженные в эпилептической ткани [Othahal et al., 2014], однозначно показывают наличие гипометаболизма в областях мозга, пострадавших от эпилепсии. Метаболическая дисфункция, возникающая в результате эпилептического статуса или спонтанных судорог, может стать ключевым патофизиологическим аспектом при эпилепсии, поскольку судороги представляют собой чрезвычайную метаболическую нагрузку, и энергетический метаболизм может быть доведен до своего предельного состояния.

Оставался открытым вопрос о причинно-следственных связях между эпилептогенезом и дефицитом энергометаболизма. При выяснении этого вопроса на модели посттравматической эпилепсии на экспериментальных животных с помощью метода позитронно-эмиссионной томографии было продемонстрировано, что только у тех крыс, у которых в дальнейшем развивалась посттравматическая эпилепсия, наблюдался гипометаболизм в гиппокампе [Shultz et al., 2013]. Эти данные указывают на то, что эпилептогенез может быть вторичен по отношению к нарушению в энергометаболизме.

Для подтверждения этого предположения была разработана модель *in vivo* хронического частичного ингибирования гликолиза мозга (примерно на 14%) у экспериментальных животных с помощью конкурентного аналога глюкозы 2-дезоксид-глюкозы (2ДГ) [Samokhina et al., 2017]. Концентрация 2-ДГ была подобрана таким образом, чтобы на электрофизиологическом уровне однократное введение не вызывало судорожной активности и приводило только к незначительному снижению амплитуды локальной полевой активности. Было показано: значимый и достоверный сдвиг мембранного потенциала в сторону деполяризации методом патч-кламп *in vitro*; появление высокоамплитудных спайков, высокочастотной активности (ripples) и существенное увеличение амплитуды суммарной полевой активности гиппокампа методом регистрации локальных полевых потенциалов у

животных в свободном поведении; повышение возбудимости нервной ткани в условиях хронического энергодефицита как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*; спонтанные судороги у части животных как на электрофизиологическом, так и на поведенческом уровне, и др. Таким образом, было подтверждено, что хронический гипометаболизм глюкозы в мозге может индуцировать эпилептиформную активность в гиппокампе у здоровых самцов крыс.

Тем не менее развитие пароксизмальной активности в результате частичного хронического дефицита энергии оставляло открытым вопрос о том, какие изменения происходят в нервной ткани — функциональные/обратимые или структурные/необратимые, создающие основу для эпилептогенеза. Для ответа на этот вопрос в данной работе было проведено гистологическое исследование роstralной и каудальной частей дорсального гиппокампа экспериментальных животных спустя месяц ежедневных интрацеребровентрикулярных введений 2-ДГ. Для выявления поведенческих судорог проводилась видеорегистрация поведения у животных.

МЕТОДИКА

Эксперименты с животными выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 и приказа Минздрава России от 19.06.2003 № 267 в области защиты и использования животных в экспериментальных исследованиях. Работа выполнена на 28 самцах крыс линии Wistar из питомника Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино, Россия) массой 270–330 г. В группу крыс с интрацеребровентрикулярным введением 2-ДГ (“2-ДГ”) вошло 13 животных, в группу с интрацеребровентрикулярным введением физиологического раствора (“0.9%NaCl”) — 15 животных.

Порядок проведения эксперимента представлен на схеме (рис. 1 (а)). В течение первой недели проводили стереотаксические операции. Со второй недели ежедневно на протяжении месяца проводили взвешивание животных и осуществляли микроинъекции препаратов. На протяжении третьей недели проводили видеорегистрацию поведения в стандартных условиях. После пяти недель с начала эксперимента крыс наркотизировали,

проводили интракардиальную перфузию раствором параформальдегида и мозг извлекали для проведения гистологического анализа.

Стереотаксические операции. За неделю до начала интрацеребровентрикулярных введений на животных проводилась стереотаксическая операция по имплантации направляющей канюли для микроинъекций препаратов. Операция проводилась под общим комбинированным наркозом с использованием тилетамина-золазепама (“Золетил”, 18 мг/кг, в.м.), как основного анестетика, и ксилазина (12 мг/кг, в.м.) в качестве миорелаксанта. Во время операции поддерживалась постоянная температура тела животных, кардиореспираторное состояние контролировалось при помощи пульсоксиметра (Oxy9Vet Plus, Bionet, Южная Корея). После наступления глубокой стадии седации животных закрепляли в стереотаксическом аппарате, направляющая канюля (0.8 мм, нержавеющей сталь) для микроинъекций устанавливалась над правым боковым желудочком (AP = – 0.8 мм; L = 1.5 мм; H = 3.0 мм) [Paxinos et al., 2007].

Микроинъекции препаратов. 2-ДГ (Sigma Aldrich, США) растворяли в физиологическом растворе (0.9% NaCl) до конечной концентрации 20 мМ. Осмолярность вводимых растворов составляла 295 ± 1 мосм/л для 0.9%NaCl и 326 ± 1 мосм/л для 2-ДГ. Раствор 2-ДГ и 0.9% NaCl хранили при –20°C в аликвотах по 10 мкл. Введение раствора 2-ДГ опытной группе и 0.9% NaCl контрольной группе проводилось ежедневно на протяжении 4 нед (рис. 1 (а)). Все препараты вводились интрацеребровентрикулярно бодрствующим иммобилизованным крысам, которые были заранее приучены к иммобилизации и не проявляли признаков беспокойства при введении. Препараты вводили с помощью микрошприца Гамильтона (тип 75N) в объеме 2.5 мкл через вживленную направляющую канюлю, скорость введения составляла 1 мкл/мин. Для предотвращения вытекания веществ иглу шприца медленно извлекали из направляющей канюли через 2 мин после окончания введения.

Концентрация 2-ДГ была предварительно подобрана таким образом, чтобы (а) на электрофизиологическом уровне однократное введение вызывало незначительное снижение амплитуды локальной полевой активности, (б) она не вызывала судорожную актив-

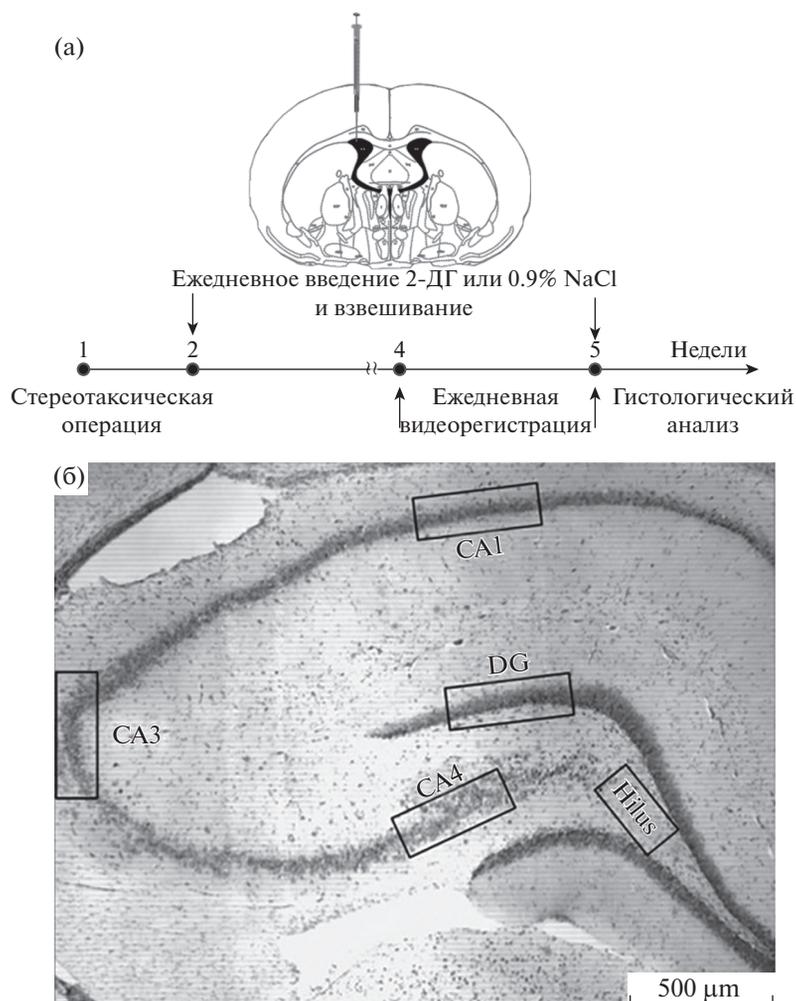


Рис. 1. (а) Схема эксперимента. (б) Изображение фронтального среза дорсального гиппокампа, окрашенного по Ниссля с выделенными областями для подсчета плотности нейронов. Выделены поля гиппокампа CA1, CA3, CA4, хилус зубчатой фасции (Hilus) и зубчатая фасция гиппокампа (DG, dentate gyrus).

Fig. 1. (a) Experimental design. (b) Depiction of areas for neuronal density quantification shown in the Nissl-stained frontal slice of dorsal hippocampus. Squares mark the counting frames in the CA1, CA3, CA4, hilus and dentate gyrus.

ность. Предполагается, что при объеме цереброспинальной жидкости, равном 90 мкл [Григорчук и др., 2013], концентрация 2-ДГ в ней будет составлять порядка 0.5 мМ.

Регистрация массы тела. На протяжении всего эксперимента все животные получали сбалансированный гранулированный корм и питьевую воду *ad libitum*. Перед введением препаратов крыс взвешивали. Процедуру осуществляли на протяжении 3 нед с момента начала интрацеребровентрикулярных введений.

Видеорегистрация. На протяжении четвертой недели с момента начала эксперимента проводился видеомониторинг поведения ча-

сти животных обеих экспериментальных групп, содержащихся в стандартных условиях. Для видеорегистрации использовалась CCD камера Hamamatsu Photonics. Видеозапись поведения каждого животного проводили в течение пяти дней по 12 ч в сутки (с 8 до 20 ч). Далее проводили визуальный анализ видеозаписей.

Гистологические исследования. Спустя четыре недели с момента начала интрацеребровентрикулярных введений животным вводилась летальная доза наркоза (нембутал, 80 мг/кг). Затем проводили интракардиальную перфузию 4% раствором параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) для последующего окрашивания по Ниссля.

Перфузию буфером проводили в течение 20 мин (15 мл/мин), а затем холодным 4% параформальдегидом также в течение 20 мин. После этого мозг извлекали и оставляли на ночь при 4°C в 4% параформальдегиде для постфиксации, а затем в 10% и 20% сахарозе (по 24 ч, при 4°C) для криопротекции. Далее мозг замораживали в парах жидкого азота и хранили при -80°C (Premium U410, New Brunswick, США). Мозг резали фронтально, ориентировочно с AP = +1.5 мм по AP = -5.5 мм согласно атласу мозга [Paxinos et al., 2007], на замораживающем криостате при -19°C (Thermo Shandon Cryotome E, Thermo Scientific, США). Для анализа брали каждый пятый срез, толщина срезов составляла 20 мкм.

На уровне AP = -0.8 мм (уровень направляющей канюли) проводили оценку изменения размеров боковых желудочков в двуполушарных образцах, для каждого животного анализировали 3–5 срезов. На каждом анализируемом срезе при увеличении в 40 раз площади боковых желудочков рассчитывали вручную по огибающей с использованием фоторедактора “Gimp” по методике, описанной в [Ishihara et al., 2010].

Окрашивание по Нисслю проводили для анализа морфологического состояния дорсального гиппокампа уровня AP = -3.5–4.5 [Paxinos et al., 2007]. После помещения на предметные стекла срезы высушивали (1 день), помещали в бидистиллят с ацетатным буфером (5 мин) и проводили окрашивание в 0.1% свежеприготовленном водном растворе крезиллового фиолетового до появления насыщенной фиолетовой окраски (5–8 мин). После проведения окрашивания для дегидратации и обезжиривания препараты проводили по спиртам (70%, 2–3 мин; 1-й 96%, 5 мин; 2-й 96%, 5 мин) и ксилолу (1-й, 5 мин; 2-й, 5 мин), после чего накрывали покровными стеклами с использованием быстрозатвердевающей заливочной среды на основе акриловых смол, разведенных в ксилоле (Eukitt, Fluka, Германия).

После проведения окрашивания с помощью микроскопа Nikon E200 (Япония) и камеры Sony Alpha5000 (Япония) делали цифровые микрофотографии размером изображения 3264 × 2448 пикселей. Определение rostroкаудального уровня полученных срезов проводилось путем сопоставления окрашенных срезов с микрофотографиями срезов мозга из атласа мозга.

Подсчет плотности нейронов в гиппокампе проводили как минимум в трех срезах, взятых от каждого животного, на двух уровнях rostroкаудальной оси: AP = -3.5 мм и AP = -4.5. На каждом анализируемом срезе при увеличении в 400 раз подсчитывали количество нейронов в полях CA1, CA3, CA4 гиппокампа, зубчатой фасции и хилусе зубчатой фасции. Схематическое расположение данных областей для подсчета количества клеток представлено на рис. 1. Количественное определение плотности клеток было выполнено вручную с использованием плагина “Cell counter” программного обеспечения ImageJ (1.50i, США) с последующим пересчетом на 1 мм².

Статистический анализ. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. После проверки гипотезы о нормальности распределения для сравнения количественных показателей был использован непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Для исключения ошибок второго рода при оценке статистической значимости различий проводили вычисление мощности используемого критерия. Анализ производили в программе GraphPad Prism (версия 7, GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сохранение динамики набора массы тела. Препараты, введенные в желудочки мозга, могут оказывать прямое влияние на гипоталамус. Косвенным показателем такого воздействия может являться изменение пищевого поведения и массы тела экспериментальных животных. В связи с этим на протяжении всего эксперимента производилось взвешивание животных. Средние значения масс тел крыс двух экспериментальных групп животных представлены на рис. 2. Крысы группы “0.9% NaCl” и “2-ДГ” имели наибольший вес на 21-й день после начала микроинъекций. Средний вес обеих групп статистически не различался ни в одном из регистрируемых периодов. В целом за экспериментальный месяц средний набор веса составил 20.4 ± 4.8 г и 20.3 ± 10.3 г в группах “0.9% NaCl” и “2-ДГ” соответственно.

Развитие спонтанных поведенческих судорог. Ранее на электрофизиологическом уровне было показано, что ежедневные i.c.v. инъекции 2-ДГ в течение месяца приводили к

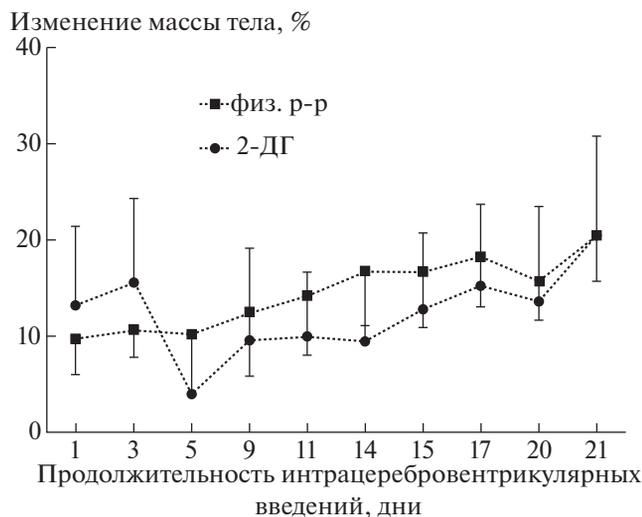


Рис. 2. Динамика изменения относительной массы тела у животных на протяжении трех недель ежедневных инъекций физиологического раствора и 2-ДГ. Относительная масса тела рассчитывалась по формуле: $(\text{Масса тела}_{0n} - \text{Масса тела}_{00}) / \text{Масса тела}_{00} \times 100\%$; где индекс 00 – масса тела до начала эксперимента, индекс 0n – масса тела в n день с начала введений. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Fig. 2. Dynamics of changes in the relative body weight in animals during 3 weeks of daily injections with 2-DG or physiological saline. The relative body weight was defined as $(\text{Body Weight}_{0n} - \text{Body Weight}_{00}) / \text{Body Weight}_{00} \times 100\%$ (index 00, body weight prior to the beginning of the treatment; index 0n, body weight on n day of treatment). There is no statistically significant difference between the data of the two groups at any of time periods.

появлению эпилептиформной электрической активности в гиппокампе у всех экспериментальных животных, а у части животных судорожная активность была зарегистрирована на поведенческом уровне [Samokhina et al., 2017]. В связи с этим в настоящей работе проводили видеорегистрацию поведения у части животных из каждой эксперименталь-

ной группы для выявления поведенческих судорог. Видеорегистрация животных группы “0.9%NaCl” ($n = 7$) и “2-ДГ” ($n = 5$) позволила выявить появление спонтанных поведенческих судорог у части животных в группе “2-ДГ” (рис. 3). У двух из пяти регистрируемых животных были зарегистрированы судороги, характеризующиеся клонусом и потерей позы. У животных из группы “0.9% NaCl” не было выявлено развития спонтанных поведенческих судорожных приступов.

Сохранение отношения площадей боковых желудочков. Для того чтобы оценить тождественность степени воздействия ежедневных инъекций в обеих экспериментальных группах, рассчитывали соотношение площадей контралатерального и ипсилатерального боковых желудочков в окрашенных по Нисслию срезах. Соотношение площадей в группе “0.9% NaCl” ($n = 6$) составило 1.20 ± 0.62 по сравнению с 1.48 ± 1.10 в группе “2-ДГ” ($n = 8$) (рис. 4). Таким образом, хроническое введение 2-ДГ не вызывает статистически достоверного изменения площади боковых желудочков мозга по сравнению с таковой после введения физиологического раствора.

Нейрональная гибель в гиппокампе. Оценку плотности нейронов в ростральной и каудальной частях дорсального гиппокампа проводили в окрашенных по Нисслию срезах. Количественное определение плотности нейронов проводили в слое зубчатой извилины, полях гиппокампа: CA1, CA3, CA4 (счетная рамка 7.225 μm^2) и хилусе зубчатой фасции (счетная рамка 14.450 μm^2) (рис. 1 (б)).

Спустя четыре недели ежедневных введений 2-ДГ с помощью световой микроскопии, было выявлено снижение нейрональной плотности в поле CA1 гиппокампа как в ростральной, так и в каудальной частях (рис. 5, 6). Для ростральной части поля CA1 гиппокампа снижение нейрональной плотности состави-

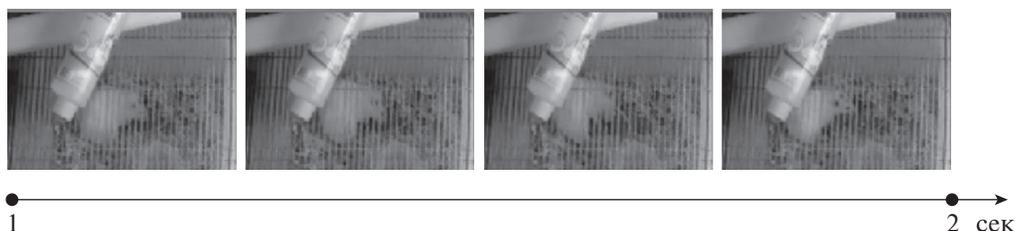


Рис. 3. Спонтанный судорожный эпизод с потерей позу у крысы из группы “2-ДГ”.
Fig. 3. Spontaneous behavioral seizure with loss of postural posture in the rat from the “2-DG” group.

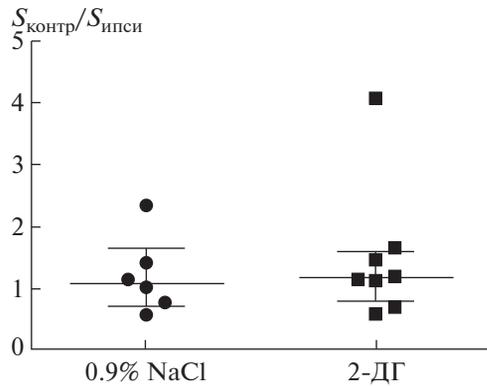


Рис. 4. Изменение отношения площади контра-латерального бокового желудочка ($S_{\text{контр}}$) к площади ипсилатерального бокового желудочка ($S_{\text{ипси}}$) у животных спустя 4 недели ежедневных инъекций физиологического раствора и 2-ДГ. Данные представлены как медиана \pm межквартильный размах.

Fig. 4. Changes in the ratio of the contralateral lateral ventricle area to the ipsilateral lateral ventricle area in animals after 4 weeks of daily injections with physiological saline or 2-DG. Data are presented as median \pm interquartile range.

ло 17% по сравнению со значениями в контрольной группе с введением физиологического раствора. Так, плотность нейронов (в 1 мм²) в ростральной части в группе “0.9% NaCl” ($n = 15$) составила 3453 ± 776 по сравнению с 2863 ± 568 в группе “2-ДГ” ($n = 13$, $p = 0.03$). В то же время в каудальной части поля СА1 гиппокампа нейрональная гибель достигла 23%: плотность нейронов (в 1 мм²) в группе “0.9% NaCl” ($n = 15$) составила 3273 ± 807 по сравнению с 2509 ± 571 в группе “2-ДГ” ($n = 13$, $p = 0.003$).

Важно отметить, что в других отделах гиппокампа плотность нейронов в группе “2-ДГ” не отличалась от плотности нейронов в группе “0.9% NaCl”.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проведено морфологическое исследование дорсального гиппокампа спустя четыре недели ежедневных введений в боковой желудочек мозга физиологического раствора (контрольная группа) и 2-дезоксиглюкозы, растворенной в физиологическом растворе (опытная группа). Было обнаружено, что при хроническом интрацеребровентрикулярном введении 2-ДГ происходит гибель нейронов в поле СА1 гиппокампа. Также было показано, что наиболее выра-

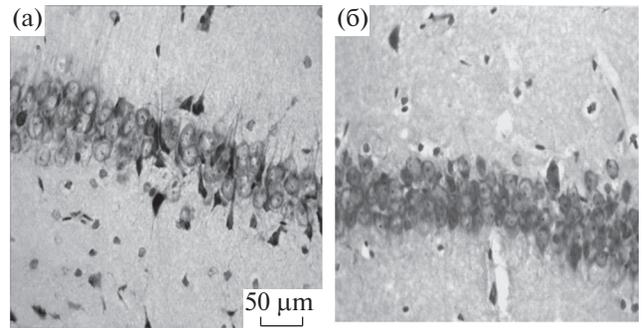


Рис. 5. Изображения окрашенных по Нислю полей дорсального гиппокампа. Спустя четыре недели ежедневных введений 2-ДГ плотность нейронов снижается в поле СА1 гиппокампа (а) по сравнению с данными в группе “0.9% NaCl” (б).

Fig. 5. Nissl-stained sections of the cell density of the dorsal hippocampus. Four weeks after daily 2-DG administration, neuronal loss is found in the hippocampal field CA1 (a) vs. “0.9% NaCl” group (b).

женными эти изменения были в каудальной части дорсального гиппокампа (23%). Следует отметить, что степень влияния самих травмирующих манипуляций на боковой желудочек мозга достоверно не различалась у двух групп экспериментальных животных. Этот факт подтверждает, что именно гипометаболизм глюкозы является причиной структурных перестроек гиппокампа у животных с введением 2-ДГ.

Одним из эффектов хронического i.c.v. введения 2-ДГ может быть изменение пищевого поведения и, как следствие, массы тела экспериментальных животных, поскольку препараты, введенные в желудочки мозга, могут оказывать прямое влияние на гипоталамус. Ранее в острых экспериментах было показано, что при системном подкожном введении 2-ДГ (15, 200 и 250 мг/кг) резко возрастает потребление пищи в течение 30 мин после инъекции [Jewett et al., 1995]. В другой работе с ежедневным добавлением 2-ДГ в корм животных было показано, что изменения в массе тела начинают проявляться только спустя 6 нед [Yao et al., 2011]. Однако в литературе отсутствуют данные о том, как влияет центральное введение 2-ДГ на вес животных. Нами было показано, что хроническое интрацеребровентрикулярное введение 2-ДГ на протяжении четырех недель аналогично системному введению не приводит к изменению динамического показателя массы тела.

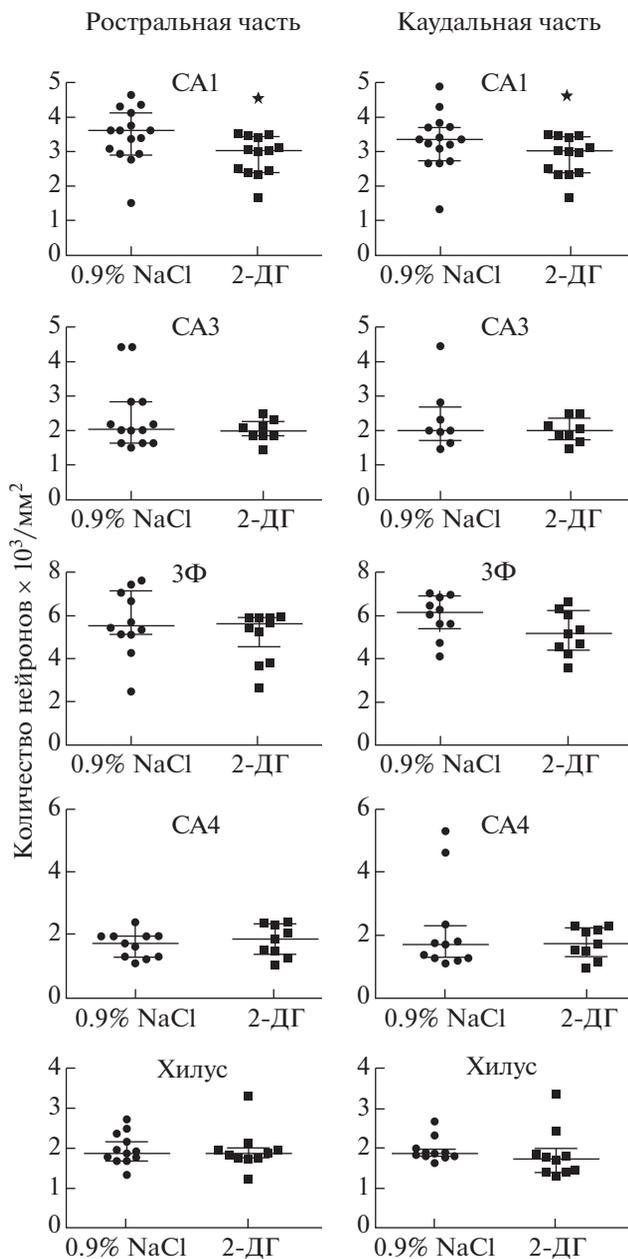


Рис. 6. Изменение количества клеток в ростральной и каудальной частях дорсального гиппокампа через 4 нед ежедневных введений 0.9% NaCl и 2-ДГ. Данные представлены как медиана \pm межквартильный размах. Достоверность различий между группами обозначена над диаграммами знаком *.

Fig. 6. Changes of neuronal density in the rostral and caudal parts of dorsal hippocampus after 4 weeks of daily saline/2-DG treatment. Data represented as median \pm interquartile range. Significance of difference between the groups signed by * above diagrams.

В данной работе впервые проведена видеорегистрация поведения с моделью хронического церебрального гипометаболизма глю-

козы и у части экспериментальных животных показано развитие спонтанной судорожной активности, характеризующейся потерей поструральной позы. Следует отметить, что даже в классических моделях эпилепсии, спустя 4 нед после статуса, сложно зарегистрировать спонтанные судороги. Например, в каинатной модели спонтанные поведенческие судороги начинают регистрироваться примерно через 30 дней после инъекции каиновой кислоты и в этот период они возникают один или два раза в неделю [Tanaka et al., 1985; Lévesque et al., 2013]. В нашей же модели, при отсутствии эпилептического статуса, наличие даже у части животных спонтанных судорог является значимым доказательством эпилептогенеза. Кроме того, данные по числу животных со спонтанными судорогами соответствуют таковому в предыдущей работе [Samokhina et al., 2017], где у каждого животного регистрировались локальные полевые потенциалы в гиппокампе и анализировался метаболический профиль мозга методом ЯМР. Данные этой работы совместно с полученными в предыдущем исследовании подтверждают способность 2-ДГ при его хроническом i.c.v. введении запускать процесс эпилептогенеза с последующим появлением спонтанных судорог у экспериментальных животных.

Выявленная в данной работе избирательная потеря нейронов в поле CA1 была ярко выраженной, тогда в других полях гиппокампа снижение плотности обнаружено не было. Полученные нами данные указывают на разную чувствительность отделов гиппокампа к уровню доступной глюкозы. Аналогично, избирательное снижение клеточной плотности в поле CA1 гиппокампа было показано в модели эпилепсии с использованием химического киндинга [Franke, Kittner, 2001; Yardimoglu et al., 2007], т.е. модели эпилептогенеза с зарегистрированным градуальным снижением уровня утилизации глюкозы разными отделами мозга [Bascuñana et al., 2016].

С другой стороны, полученные нами данные могут свидетельствовать о возможной роли гипометаболизма глюкозы в формировании повышенной чувствительности клеток поля CA1 гиппокампа при ишемическом и реперфузионном повреждении [Shcherbak et al., 2012; Kirino, 1982].

В нашей работе был проведен гистологический анализ дорсального гиппокампа в rostroкаудальном направлении. В настоящее

время имеется огромное количество данных о различиях между вентральным и дорсальным гиппокампом [Gulyaeva, 2019; Онуфриев, 2018]. Показано, что восприимчивость гиппокампа к судорогам меняется вдоль его продольной оси: на начальных стадиях эпилептогенеза нейроны вентрального гиппокампа более подвержены повреждению, чем нейроны дорсального гиппокампа [Isaeva et al., 2015]. Существует ли такой градиент чувствительности к повреждающим воздействиям внутри дорсального гиппокампа, не было известно. Результаты данной работы продемонстрировали наличие более выраженной нейрональной гибели в каудальной части дорсального гиппокампа по сравнению с ростральной. Таким образом, показано, что дорсальный гиппокамп неоднороден по своей чувствительности к хроническому воздействию 2-ДГ.

Полученные нами данные показали, что хроническое введение 2-ДГ приводит к появлению нейродегенеративных нарушений в гиппокампе, что может обуславливать развитие показанных ранее эпилептиформных нарушений. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что хронический гипометаболизм глюкозы в мозге оказывает проэпилептический эффект и может являться одной из ключевых движущих сил эпилептогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами было показано, что хроническое внутримозговое подавление гликолиза при помощи 2-ДГ приводит к необратимым структурным изменениям в ткани гиппокампа у всех экспериментальных животных и развитию спонтанных непровоцируемых судорожных приступов у части животных. Полученные результаты важны как для понимания общих механизмов формирования патологической активности в головном мозге, так и для разработки терапевтических подходов, направленных на устранение причины, а не симптомов неврологических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-315-00225). Видеомониторинг развития спонтанной судорожной активности осуществлен при поддержке Российского научного фонда (грант номер 17-75-20245).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Григорчук О.С., Глебова К.В., Вейко Н.Н., Умрюхин П.Е. Внеклеточная ДНК в ликворе крыс при стрессорной нагрузке. *Фундаментальные исследования*. 2013. 9 (4): 621–626.
- Кичигина В.Ф. Нарушения тета- и гамма-осцилляций в мозге с патологиями, характерными для болезни Альцгеймера и височной эпилепсии. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова*. 2019. 69 (4): 395–412.
- Онуфриев М.В., Узиков Ш.С., Фрейман С.В., Степанчиков М.Ю., Мусеева Ю.В., Лазарева Н.А., Маркевич В.А., Гуляева Н.В. Дорсальный и вентральный гиппокамп различаются по реактивности на провоспалительный стресс: уровни кортикостерона, экспрессия цитокинов и синаптическая пластичность. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова*. 2018. 67 (3): 349–358.
- Bascuñana P., Javela J., Delgado M., Fernández de la Rosa R., Shiha A.A., García-García L., Pozo M.A. [(18)F]FDG PET Neuroimaging Predicts Pentylenetetrazole (PTZ) Kindling Outcome in Rats. *Mol. Imaging Biol.* 2016. 18 (5): 733–740.
- Curia G., Longo D., Biagini G., Jones R.S.G., Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*. 2008. 172: 143–157.
- Franke H., Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001. 70 (2–3): 291–303.
- Goffin K., Van Paesschen W., Dupont P., Van Laere K. Longitudinal microPET imaging of brain glucose metabolism in rat lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Exp. Neurol.* 2009. 217: 205–209.
- Gulyaeva N.V. Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage. *Neurochem. Res.* 2019. 44 (6): 1306–1322.
- Isaeva E., Romanov A., Holmes G.L., Isaev D. Status epilepticus results in region-specific alterations in seizure susceptibility along the hippocampal longitudinal axis. *Epilepsy Res.* 2015. 110: 166–170.
- Ishihara K., Amano K., Takaki E., Shimohata A., Sago H., Epstein C.J., Yamakawa K. Enlarged Brain Ventricles and Impaired Neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje Mouse Models of Down Syndrome. *Cerebral Cortex*. 2010. 20 (5): 1131–1143.
- Jewett D.C., Cleary J., Levine A.S., Schaal D.W., Thompson T. Effects of neuropeptide Y, insulin, 2-deoxyglucose, and food deprivation on food-motivated behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995. 120 (3): 267–271.
- Jupp B., Williams J., Binns D., Hicks R.J., Cardamone L., Jones N., Rees S., O'Brien T.J. Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recur-

- rent seizures in a rat model of TLE. *Epilepsia*. 2012. 53: 1233–1244.
- Kirino T.* Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982. 239: 57–69.
- Lee E.M., Park G.Y., Im K.C., Kim S.T., Woo C.W., Chung J.H., Kim K.S., Kim J.S., Shon Y.M., Kim Y.I., Kang J.K.* Changes in glucose metabolism and metabolites during the epileptogenic process in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia*. 2012. 53: 860–869.
- Lévesque M., Avoli M.* The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2013. 37: 2887–2899.
- Lisman J., Buzsáki G., Eichenbaum H., Nadel L., Ranganath C., Redish A.D.* Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat. Neurosci.* 2017. 20 (11): 1434–1447.
- Moser E.I., Kropff E., Moser M.B.* Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2008. 31: 69–89.
- Otáhal J., Folbergrová J., Kovacs R., Kunz W.S., Maggio N.* Epileptic focus and alteration of metabolism. *Int. Rev. Neurobiol.* 2014. 114: 209–243.
- Pan J.W., Williamson A., Cavus I., Hetherington H.P., Zaveri H., Petroff O.A., Spencer D.D.* Neurometabolism in human epilepsy. *Epilepsia*. 2008. 49: 31–41.
- Paxinos G., Watson C.* The Rat Brain in stereotaxic coordinates, 6th. Academic Press, San Diego. 2006.
- Samokhina E., Popova I., Malkov A., Ivanov A.I., Papadia D., Osypov A., Molchanov M., Paskevich S., Fisahn A., Zilberter M., Zilberter Y.* Chronic inhibition of brain glycolysis initiates epileptogenesis. *J. Neurosci. Res.* 2017. 95: 2195–2206.
- Shcherbak N.S., Galagudza M.M., Kuzmenkov A.N., Ovchinnikov D.A., Mitrofanova L.B., Barantsevich E.R., Shlyakhto E.V.* A new rat model of reversible global cerebral ischemia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. 152: 656–658.
- Shultz S.R., Cardamone L., Liu Y.R., Hogan R.E., Maccotta L., Wright D.K., Zheng P., Koe A., Gregoire M.C., Williams J.P., Hicks R.J., Jones N.C., Myers D.E., O'Brien T.J., Bouillere V.* Can structural or functional changes following traumatic brain injury in the rat predict epileptic outcome? *Epilepsia*. 2013. 54: 1240–1250.
- Tanaka T., Kajima M., Yonemasu Y., Cepeda C.* Spontaneous secondarily generalized seizures induced by a single microinjection of kainic acid into unilateral amygdala in cats. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1985. 61 (5): 422–429.
- Thom M.* Review: hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl. Neurobiol.* 2014. 40: 520–543.
- Vinogradova O.S.* Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog. Neurobiol.* 1995. 45 (6): 523–583.
- Yao J., Chen S., Mao Z., Cadenas E., Brinton R.D.* 2-Deoxy-D-glucose treatment induces ketogenesis, sustains mitochondrial function, and reduces pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2011. 6 (7): e21788.
- Yardimoglu M., Ilbay G., Kokturk S., Onar F.D., Sahin D., Alkan F., Dalcik H.* Light and electron microscopic examinations in the hippocampus of the rat brain following PTZ-induced epileptic seizures. *J. Appl. Biol. Sci.* 2007. 1: 97–106.

CHRONIC INTRACEREBROVENTRICULAR ADMINISTRATION OF 2-DEOXY-D-GLUCOSE CAUSES MORPHOLOGICAL DISTURBANCES OF THE DORSAL HIPPOCAMPUS IN ROSTRO-CAUDAL DIRECTION

E. I. Samokhina^{a, #}, A. E. Malkov^a, A. N. Samokhin^b, and I. Y. Popova^a

^a Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

^b Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

[#]e-mail: evgeniia.sam@gmail.com

In vivo experiments have shown that chronic (within 4 weeks) mild inhibition of glycolysis in the brain of experimental animals initiates the process of epileptogenesis at the electrophysiological and behavioral level [Samokhina et al., 2017]. However, it was unclear whether prolonged glucose hypometabolism in the brain can cause structural abnormalities in the hippocampus. To answer this question, a histological study of the rostral and caudal parts of the dorsal hippocampus of experimental animals with a model of chronic mild inhibition of glycolysis in the brain was performed in this work. This model was created by daily injection of competitive glucose analog 2-deoxy-D-glucose (2DG) into the ventricles of the brain at a dose causing glycolysis inhibition of not more than 14%; the total duration of administration was 4 weeks. Such 2-DG concentration, when administered once, does not cause the development of seizure activity and only leads to a slight decrease in the amplitude of the local field activity in hippocampus. The control group was injected with saline.

The body weight was monitored throughout the experiment to avoid the direct effect of the drug, which affects glucose metabolism, on the hypothalamus that controls alimentary behavior and thus the body weight. It was shown that the body weight changes in the 2-DG group did not significantly differ from the control. Three weeks after the start of the experiment, a video recording of behavior was carried out, which revealed the appearance of spontaneous seizures in some animals. Histological analysis showed that chronic administration of 2-DG causes a neuronal density decrease in the CA1 field of the dorsal hippocampus (by 17% in the rostral ($p = 0.03$) and 23% in the caudal ($p = 0.003$) parts), as well as a 5% decrease in the caudal part of the hillus of dorsal hippocampus ($p = 0.03$). Prolonged traumatic impact, associated with the experimental procedures, on the brain in the experimental group did not cause changes in the relative area of the ipsilateral ventricle compared to the control group. In general, the results showed that chronic glucose hypometabolism in the brain causes morphological changes in the dorsal hippocampus and leads to the development of spontaneous behavioral seizures in some animals. These facts confirm the hypothesis of the trigger role of cerebral energy deficiency in the development of epilepsy. In general, the results indicate that chronic glucose hypometabolism in the brain causes morphological changes in tissues and leads to the development of spontaneous behavioral seizures in some animals. These facts confirm the hypothesis of the trigger role of cerebral energy deficiency in the epilepsy development.

Keywords: epileptogenesis, dorsal hippocampus, glucose metabolism, 2-deoxy-D-glucose, spontaneous seizures