



ОСОБЕННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ КАСПАЗЫ-3 В ГИППОКАМПЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО ПРИПАДКА

¹Демьяшкин Г.А., ²Шаповалова Е.Ю., ²Григорян М.С., ¹Зорин И.А.

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, ²Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Россия, e-mail: dr.dga@mail.ru

Для цитирования:

Демьяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю., Григорян М.С., Зорин И.А. Особенность экспрессии каспазы-3 в гиппокампе при моделировании острого эпилептического припадка. Морфологические ведомости. 2023;31(2):801. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2023.31\(2\).801](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2023.31(2).801)

Резюме. Эпилепсия является одной из наиболее распространенных неврологических патологий, однако биологический субстрат заболевания до сих пор остается малоизученным. В ряде немногочисленных исследований было показано, что у экспериментальных животных после приступа эпилепсии отмечается повышение уровня некоторых каспаз, но имеющихся данных недостаточно для полного представления о природе каспазного каскада при эпилепсии, и, особенно, его терминальной фазы. Особого интереса заслуживает анализ патоморфологических изменений структур гиппокампа на фоне острого эпилептического припадка в корреляции между нейрональной потерей и терминальной фазой апоптоза или количественная оценка активности каспазы-3. Целью исследования явилась иммуногистохимическая оценка экспрессии каспазы-3 в гиппокампе в экспериментальной модели эпилепсии на лабораторных мышах. Животные были поделены на две группы: животным первой группы (n=28) внутривенно вводили препарат пентилентетразола однократно в дозе 45 мкг/кг для моделирования острого приступа эпилепсии, который оценивался по модифицированной шкале Расина, вторая группа животных была контрольной (n=20). Животных выводили из эксперимента через 3 часа и последовательно на 1, 3 и 5 сутки от начала введения препарата для динамического исследования изменений гиппокампа. Выведение животных из эксперимента осуществляли путем введения высоких доз анестетика. Фрагменты головного мозга животных исследовали с помощью окраски по Ниссию и оценивали количественные показатели экспрессии каспазы-3 при помощи иммуногистохимического метода в субрегионах СА1, СА3 и зубчатой извилины гиппокампа. Через 24 часа после моделирования острого эпилептического припадка обнаружили признаки гиппокампального склероза (глиоз, потерю нейронов) и увеличение количества нейронов, экспрессирующих каспазу-3 в 2,68 раза по сравнению с контрольной группой. В результате эксперимента выявили, что потеря нейронов гиппокампа субрегиона СА3 ассоциирована с увеличением экспрессии каспазы-3 через 24 часа после моделирования острого генерализованного припадка с помощью инъекции пентилентетразола.

Ключевые слова: гиппокамп, эпилепсия, нейроны, каспаза-3, апоптоз

Статья поступила в редакцию 02 февраля 2023

Статья принята к публикации 22 июля 2023

FEATURES OF THE CASPASE-3 EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS AT THE MODELLING OF THE EXPERIMENTAL ACUTE EPILEPTIC FIT

¹Demyashkin GA, ²Shapovalova EY, ²Grigoryan MS, ¹Zorin IA

¹Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; ²Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia, e-mail: dr.dga@mail.ru

For the citation:

Demyashkin GA, Shapovalova EY, Grigoryan MS, Zorin IA. Features of the caspase-3 expression in the hippocampus at the modelling of the experimental acute epileptic fit. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological newsletter. 2023;31(2):801. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2023.31\(2\).801](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2023.31(2).801)

Summary. Epilepsy is one of the most common neurological pathologies, but the biological substrate of the disease is still poorly understood. A few studies have shown that in experimental animals after an epileptic fit there is an increase in the level of some caspases, but the available data are not enough to fully understand the nature of the caspase cascade in epilepsy, and especially its terminal phase. Of particular interest is the analysis of morphological changes in the structures of the hippocampus on the background of an acute epileptic fit in the correlation between neuronal loss and the terminal phase of apoptosis or the quantitative assessment of caspase-3 activity. The aim of the study was the immunohistochemical evaluation of caspase-3 expression in the hippocampus in an experimental model of epilepsy in laboratory mice. The animals were divided into two groups, the animals of the first group (n=28) were intraperitoneally injected with pentilinetetrazole once at a dose of 45 µg/kg to simulate an acute epileptic fit, which was assessed by the modified Racine scale, the second group of animals was the control (n=20). Animals were taken out of the experiment after 3 hours and consecutively on days 1, 3, and 5 from the start of the drug administration for a dynamic study of changes in the hippocampus. Animals were withdrawn from the experiment by introducing high doses of anaesthetic. Animal brain fragments were examined by Nissl staining and caspase-3 expression was quantified by immunohistochemistry in the subregions CA1, CA3 and the dentate gyrus of the hippocampus. 24 hours after the modelling of an acute epileptic fit, the preparations showed signs of hippocampal sclerosis (gliosis, loss of neurons) and an increase in the number of neurons expressing caspase-3 by 2.68 times compared to the number of neurons in the preparations of animals in the control group. As a result of the experiment, it was revealed that the loss of neurons in the hippocampus of the CA3 subregion is associated with an increase in the expression of caspase-3 24 hours after the simulation of an acute generalized seizure using an injection of pentilinetetrazole.

Key words: hippocampus, epilepsy, neurons, caspase-3, apoptosis

Article received 02 February 2023

Article accepted 22 July 2023

Введение. Эпилепсия является одной из наиболее распространенных неврологических патологий. Несмотря на длительное изучение эпилепсии и эпилептических припадков нейробиологический субстрат заболевания до сих пор остается малоизученным [1–4]. В настоящее время согласно протоколу Международной лиги по борьбе с эпилепсией (ILAE) склероз гиппокампа (мезиальный височный склероз) характеризуется потерей нейронов и глиозом и в котором выделяют 3 формы: типичная (I тип) и атипичная (II–III типы) [5]. Тем не менее, на сегодня остается неясным, является ли склероз гиппокампа причиной или следствием эпилепсии и эпилептических припадков [1, 6]. Для изучения эпилептогенеза и нейробиологического субстрата широко применяется экспериментальный метод моделирования эпилептических припадков. В большинстве работ отмечалось, что в эксперименте у животных обнаруживаются признаки повреждения гиппокампа, характерные для пациентов с эпилепсией [7–10]. Однако вопрос о механизмах нейронального повреждения до сих пор остается открытым. В ряде немногочисленных исследований было показано, что у экспериментальных животных после приступа эпилепсии отмечается повышение уровня некоторых каспаз в нейронах [11–12]. Такие данные позволяют предположить, что нарушение местного гомеостаза запускает апоптотический каскад, который приводит к гибели нейронов. Известно, что в головном мозге инициация апоптоза происходит через каспазы-8, -9, -10, которые активируют терминальные каспазы -3, -6, -7 [13–14]. Имеющихся данных недостаточно для полного представления о природе каспазного каскада при эпилепсии, и, особенно, его терминальной фазы. Особого интереса заслуживает анализ патоморфологических изменений структур гиппокампа на фоне острого эпилептического припадка в корреляции между нейрональной потерей и терминальной фазой апоптоза и количественная оценка активности каспазы-3 в связи с этим.

Цель исследования - иммуногистохимическая оценка экспрессии каспазы-3 в гиппокампе в экспериментальной

модели эпилепсии на лабораторных мышах.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное морфологическое исследование проводили в лабораториях Медицинской академии имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского (Симферополь) и Института трансляционной медицины и биотехнологии Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Москва). В качестве животных моделей использовали самцов половозрелых мышей популяции СВА (весом 30–35 грамм, 12-ти недель жизни, $n=30$). Все манипуляции осуществляли согласно международным рекомендациям и руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS) и Правилам лабораторной практики и приказа Министерства здравоохранения РФ № 199-н от 01.04.2016 «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные были поделены на группы: I-я ($n=28$) – моделирование острого приступа эпилепсии, который оценивался по модифицированной шкале Расина [10]; II-я группа ($n=20$) – контрольная. Для моделирования острого генерализованного приступа эпилепсии животным вводили эпилептогенный препарат пентилентетразол интраперитонеально, однократно, в дозе 45 мкг/кг. Животных I-й и II-й группы выводили из эксперимента через 3 часа и последовательно на 1, 3 и 5 сутки от начала введения препарата для динамического исследования изменений в гиппокампе. Выведение животных из эксперимента осуществляли путем введения высоких доз анестетика. Для оценки морфологического субстрата эпилепсии при исследовании гиппокампа экспериментальных животных изучали субрегионы CA1, CA3 и область зубчатой извилины. Фрагменты головного мозга фиксировали в 10% нейтральном формалине, забуференном по Лилли при pH 7,2–7,4, затем заливали в парафин. После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов их окрашивали по Ниссию. Иммуногистохимическое исследование проводили

по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max (Leica, Германия). Использовались первичные мышинные моноклональные антитела к Caspase 3 (3CSP03; 0,1 мл) и вторичные – универсальные антитела (HiDef Detection™ HRP Polymer system, Cell Marque, США). Количество иммунопозитивных клеток подсчитывали в 10 полях зрения препарата гиппокампа при увеличении $\times 400$. Для проверки выборки полученных данных на нормальность распределения использовали Критерий Шапиро-Уилка. Для проверки различий значений использовали t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. У всех животных I группы отмечали генерализованный эпилептический припадок, который, согласно модифицированной шкале Расина, соответствовал 4 ($n=14$), 5 ($n=11$) и 3 ($n=3$) баллам. Среднее время приступа составило $5,19 \pm 0,7$ минут. В контрольной группе после интраперитонеальной инъекции физиологического раствора у животных не обнаружили судорожной активности, их поведение оценили на –1 балл по шкале Расина. После развития эпилептического приступа у всех животных не наблюдали признаков нарушения гемодинамики и расстройства поведенческих реакций. При гистологическом исследовании микропрепаратов гиппокампа опытной группы, окрашенных по Нисслю, через 3 часа после интраперитонеальной инъекции пентилентетразола нарушения его гистоархитектоники не обнаружили. Через 24 часа у животных опытной группы визу-

ализировали дезинтеграцию темных нейронов с признаками пикноза и трудно различимыми границами между цитоплазмой и ядром (рис. 1). В динамике на 3 и 5 сутки отмечали тенденцию к уменьшению количества патологических нейронов.

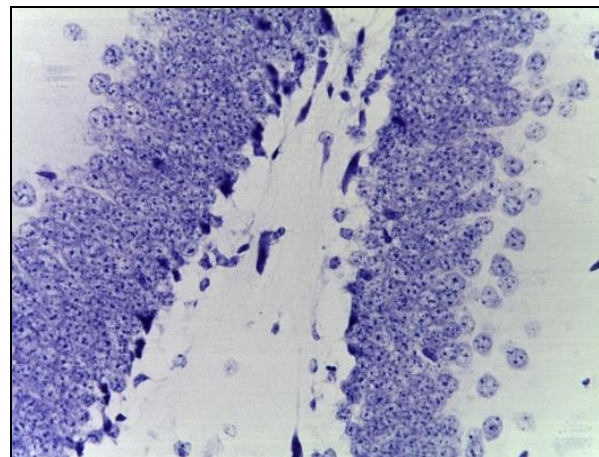


Рис. 1. Микрофото гистологического препарата головного мозга мыши экспериментальной группы. Окр.: по Нисслю. Ув.: $\times 200$

В контрольной группе наблюдали нормальное гистологическое строение вещества головного мозга и зоны гиппокампа. При исследовании уровня каспазы-3 в субрегионе СА3 через 24 часа после моделирования острого эпилептического припадка также наблюдали увеличение положительно окрашенных пирамидальных нейронов гиппокампа в 2,68 раза (рис. 2) по сравнению с контрольной группой (таблица 1). В других временных точках количество иммунопозитивных клеток статистически значимо не отличалось от контрольных значений.

Таблица 1

Относительное количество нейронов в % экспрессирующих каспазу-3 в субрегионе СА3 гиппокампа мыши при моделировании эпилептического припадка ($M \pm \sigma$)

Маркер	Срок	Группа I	Группа II	p-значение
Каспаза-3	3 часа	$7,71 \pm 1,12$	$6,80 \pm 0,84$	0,5
Каспаза-3	1 сутки	$21,95 \pm 3,03$	$6,60 \pm 1,96$	$< 0,01$
Каспаза-3	3 сутки	$10,43 \pm 1,72$	$7,80 \pm 0,92$	0,2
Каспаза-3	5 сутки	$8,20 \pm 2,10$	$7,40 \pm 1,14$	0,39

Настоящее исследование посвящено изучению молекулярных механизмов

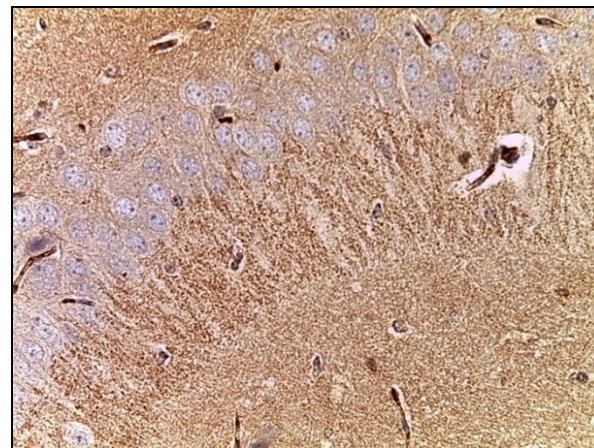
клеточной гибели нейронов гиппокампа при остром генерализованном приступе

эпилепсии, вызванного пентилентетразолом у мышей линии СВА. Для оценки эффекта острого эпилептического припадка (появление мезиального склероза) мы использовали окраску по Нислю, позволяющую обнаружить темные нейроны,

роль которых в настоящее время до конца не изучена. Раньше предполагалось, что их количество прямо пропорционально степени повреждения головного мозга, однако, на сегодня такая корреляция подвергается сомнению [15–17].



А



Б

Рис. 2. Микрофото гистологических препаратов головного мозга мыши экспериментальной (А) и контрольной (Б) групп СА3 региона гиппокампа через 24 часа после инъекции. Окр.: иммуногистохимическая с антителами к каспазе-3, докрасивание гематоксилином. Ув.: x400

Иммуногистохимическое исследование уровня активированной каспазы-3 показало, что через 24 часа после введения препарата пентилентетразола наблюдается наибольшее количество нейронов, экспрессирующих каспазу-3. Как известно, каспаза-3 является терминальной сигнальной молекулой в каспазном каскаде, инициирующем апоптоз. Принято считать, что при эпилептических припадках активация каспазы-3 происходит в ответ на повреждение и фрагментацию молекул ДНК в пирамидных нейронах, преимущественно СА1-СА3 региона гиппокампа [18–19]. Более того, существуют исследования, в которых ингибирование каспазы-3 приводило к увеличению количества выживших клеток после генерации эпилептического припадка [20]. Результаты настоящего исследования согласуются с устоявшимися представлениями о роли каспазы-3 в регуляции апоптоза, так как наибольшая экспрессия каспазы-3 ассоциируется с максимальной клеточной гибелью [21]. Особо стоит отметить, что уже на 5-е сутки гистоархитектоника гиппокампа соответствует норме. Та-

кое быстрое восстановление не исключает того явления, что каспаза-3 в гиппокампе может регулировать не только терминальную стадию апоптоза, но и участвовать в ремоделировании синапсов и цитоскелета, клеточной дифференцировке и реинтеграции нейритов, необходимых для нейропластичности, как было показано в единичных исследованиях [22].

Заключение. Таким образом, суммируя полученные данные, можно отметить, что однократная инъекция пентилентетразола вызывает генерализованный эпилептический припадок, ассоциированный с увеличением экспрессии каспазы-3 при нейрональной гибели. В дальнейшем необходимо продолжить изучение роли каспазы-3 в этом явлении, так как, возможно, она не ограничивается лишь апоптотическим действием. Потеря нейронов гиппокампа субрегиона СА3 ассоциирована с увеличением экспрессии каспазы-3 через 24 часа после моделирования острого генерализованного припадка с помощью инъекции пентилентетразола.

Литература References

1. Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(5):520-543. DOI: 10.1111/nan.12150
2. Chatzikonstantinou A. Epilepsy and the hippocampus. *Front Neurol Neurosci.* 2014;34:121-142. DOI: 10.1159/000356435
3. Wolinski P, Ksiazek-Winiarek D, Glabinski A. Cytokines and Neurodegeneration in Epileptogenesis. *Brain Sci.* 2022;12(3):380. DOI: 10.3390/brainsci12030380
4. Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. *NED.* 2020;54(2):185-191. DOI: 10.1159/000503831
5. Blümcke I, Thom M, Aronica E et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia.* 2013;54(7):1315-1329. DOI: 10.1111/epi.12220
6. Walker MC. Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. *Semin Neurol.* 2015;35(3):193-200. DOI: 10.1055/s-0035-1552618
7. Kandravicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014;10:1693-1705. DOI: 10.2147/NDT.S50371
8. Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res.* 2017;42(7):1873-1888. DOI: 10.1007/s11064-017-2222-z
9. Shimada T, Yamagata K. Pentylenetetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *J Vis Exp.* 2018;(136):56573. DOI: 10.3791/56573
10. Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy & Behavior.* 2019;95:51-55. DOI: 10.1016/j.yebeh.2019.02.029
11. Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2009;1(2):97-115. PMID: 21383882
12. Sun J, Xie C, Liu W et al. The effects of simvastatin on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following kainate-induced seizures in rats. *International Journal of Molecular Medicine.* 2012;30(4):739-746. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1076
13. Nguyen TTM, Gillet G, Popgeorgiev N. Caspases in the Developing Central Nervous System: Apoptosis and Beyond. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2021;9. Accessed January 8, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.702404>
14. Sharangpani A, Takanohashi A, Bell MJ. Caspase Activation in Fetal Rat Brain Following Experimental Intrauterine Inflammation. *Brain Res.* 2008;1200:138-145. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.01.045
15. Zimatkin SM, Bon' El. Dark Neurons of the Brain. *Neurosci Behav Physiol.* 2018;48(8):908-912. DOI: 10.1007/s11055-018-0648-7
16. Ahmadpour S, Behrad A, Vega IF. Dark Neurons: A protective mechanism or a mode of death. *Journal of Medical Histology.* 2019;3(2):125-131. DOI: 10.21608/jmh.2020.40221.1081
17. Oigawa H, Nawashiro H, Fukui S et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol.* 2006;112(4):471-481. DOI: 10.1007/s00401-006-0108-2
18. Liu JP, Chang LR, Gao XL, Wu Y. Different expression of caspase-3 in rat hippocampal subregions during postnatal development. *Microsc Res Tech.* 2008;71(9):633-638. DOI: 10.1002/jemt.20600
19. Basaranlar G, Derin N, Kencebay Manas C et al. The effects of sulfite on cPLA2, caspase-3, oxidative stress and locomotor activity in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2019;123:453-458. DOI: 10.1016/j.fct.2018.11.021
20. Narkilahti S, Nissinen J, Pitkänen A. Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacology.* 2003;44(8):1068-1088. DOI: 10.1016/s0028-3908(03)00115-1
21. Baculis BC, Weiss AC, Pang W et al. Prolonged seizure activity causes caspase dependent cleavage and dysfunction of G-protein activated inwardly rectifying potassium channels. *Sci Rep.* 2017;7(1):12313. DOI: 10.1038/s41598-017-12508-y
22. Tzeng TT, Tsay HJ, Chang L et al. Caspase 3 involves in neuroplasticity, microglial activation and neurogenesis in the mice hippocampus after intracerebral injection of kainic acid. *J Biomed Sci.* 2013;20(1):90. DOI: 10.1186/1423-0127-20-90

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Демьяшкин Григорий Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией гистологии и иммуногистохимии, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия; **e-mail: dr.dga@mail.ru**

Grigory A. Demyashkin, Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Histology and Immunohistochemistry of the Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; **e-mail: dr.dga@mail.ru**

Шаповалова Елена Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии, Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия; **e-mail: shapovalova_l@mail.ru**

Elena Y. Shapovalova, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Histology of the Vernadsky Crimean Federal University; Simferopol, Russia; **e-mail: shapovalova_l@mail.ru**

Григорян Мигран Самвелович, аспирант, Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия; **e-mail: eisk-bolnica@rambler.ru**

Migran S. Grigoryan, Aspirant of the Vernadsky Crimean Federal University; Simferopol, Russia; **e-mail: eisk-bolnica@rambler.ru**

Зорин Илья Алексеевич, студент, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия; **e-mail: ilyazorin99@yandex.ru**

Ilya A. Zorin, Student of the Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; **e-mail: ilyazorin99@yandex.ru**