

# ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТОРМОЗНЫХ И ВОЗБУЖДАЮЩИХ АМИНОКИСЛОТ И ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В СТРУКТУРАХ МОЗГА САМОК КРЫС С КОБАЛЬТОВОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

Филатова Ю.Б.<sup>1</sup>, Воронина Т.А.<sup>1</sup>, Авакян Г.Н.<sup>2</sup>, Неробкова Л.Н.<sup>1</sup>, Ридер Ф.К.<sup>2</sup>, Клодт П.М.<sup>1</sup>, Кудрин В.С.<sup>1</sup>, Авакян Г.Г.<sup>2</sup>, Гайдуков И.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН (Москва)

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздравсоцразвития России (Москва)

*Резюме:* у крыс с кобальтовой эпилепсией в течение эстрального цикла выявлены колебания уровня тормозных (особенно гамма-аминомасляной кислоты, ГАМК), но не возбуждающих аминокислот. Наиболее существенные изменения содержания ГАМК, таурина и глицина в зависимости от стадии эстрального цикла наблюдаются в контрлатеральной коре, в которой сформирован детерминантный вторичный эпилептогенный очаг. При этом наиболее выраженные изменения, характеризующиеся достоверным снижением (по сравнению с контрольной группой) уровней ГАМК и глицина, выявлены в период фазы диэструс-2 (соответствует фазе менструации у женщин). Это свидетельствует о том, что уровень ГАМК и других тормозных аминокислот при эпилепсии детерминирован фазой полового цикла: при высоком уровне эндогенных эстрогенов наблюдается низкий, а при низком – высокий уровень ГАМК. Нейрофизиологические показатели также указывают на повышение эпилептической активности преимущественно в контрлатеральной коре в период фазы диэструс-2. Полученные данные указывают на тесное взаимодействие овариальной гормональной системы и ГАМК-эргической системы в механизмах развития судорожных состояний. Можно предположить, что циклические колебания стероидных гормонов имеют определенное значение в характере течения эпилепсии во время менструального цикла.

*Ключевые слова:* аминокислоты, модель кобальтовой эпилепсии, эстральный цикл, эпилептиформная активность.

## Введение

В настоящее время существенное внимание уделяется проблеме, связанной с изменением частоты

припадков в течение менструального цикла (МЦ) в зависимости от циклических колебаний уровня гормонов [15]. Катамениальными приступами страдают до 50% женщин больных эпилепсией [7,8,20], а частота приступов, связанных с МЦ, достигает 10% от общего числа [4]. В зависимости от колебаний уровня эстрогена и прогестерона в сыворотке выделяют три пика припадков: первый и второй – в начале и во время менструации, третий – в середине МЦ [15, 16].

У женщин с эпилепсией в разные фазы МЦ наблюдается изменение нейрональной возбудимости и судорожной готовности, что связано с колебаниями в секреции гонадотропинов в течение МЦ [1,19]. Известно, что эстрогены блокируют ГАМК-рецепторы, вследствие чего наблюдается снижение судорожного порога; снижают синтез ГАМК, влияя на его скорость; блокируют синтез ГАМК-рецепторов, ингибируя РНК. Прогестерон, напротив, активируя ГАМК-рецепторы, повышает электросудорожный порог; повышает синтез ГАМК, влияя на его скорость; снимает возбуждение, обусловленное глутаматом; повышает синтез ГАМК-рецепторов, активируя РНК [3,13,17,20]. В связи с этим эстрогены можно рассматривать как проконвульсанты, а прогестерон как антиконвульсант. Тормозные нейромедиаторы ГАМК и глицин осуществляют роль модуляторов в секреции гонадотропинов [21] и, следовательно, могут участвовать в регуляции МЦ и нейрональной возбудимости.

О роли центральной нервной системы в регуляции функции репродуктивной системы свидетельствуют данные о нарушениях МЦ при остром и хроническом стрессе, при нервно-психических заболеваниях, в том числе при эпилепсии [14]. Известно, что спектральные и когерентные параметры биоэлектрической активности мозга существенно изменяются в динамике нормального овуляторно-менструального цикла, отражая соответствующие гормональные сдвиги в организме женщины. В период овуляции спектральная

мощность альфа – активности достоверно снижается в центральных и средневисочных отведениях. Показано, что во время менструации наблюдается более интенсивная активация центрально-теменных отделов, чем аналогичная активация в период предменструальной фазы. В менструальную фазу увеличиваются когерентные характеристики электроэнцефалографии (ЭЭГ) в диапазоне альфа-частот в области симметричных затылочных и внутриполушарных теменно-затылочных отведениях [6,10].

Целью настоящей работы стало изучение особенностей изменения содержания тормозных и возбуждающих аминокислот в структурах головного мозга самок здоровых крыс, в зависимости от фазы эстрального цикла, и самок крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом (КоЭО) на первой стадии развития эпилептической системы. Проанализированы также изменения характера ЭЭГ у самок крыс с КоЭО в зависимости от фазы эстрального цикла. Исследование представляет интерес для понимания нейрофизиологических механизмов интеграции корково-гипоталамо-гипофизарно-овариальной системы при эпилепсии.

### Материалы и методы

Опыты проведены на белых половозрелых беспородных крысах массой тела 250-290 г (питомник РАМН «Лыткино»), содержащихся в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. Опыты выполнены в соответствии с этическими требованиями, предъявляемыми к работе с лабораторными животными.

У крыс путем микроскопического исследования вагинального мазка определялись стадии эстрального цикла: диэструс-1 (Д-1 фаза, соответствует предменструальной фазе у женщин), диэструс-2 (Д-2 фаза, соответствует менструации), проэструс (фаза Про, соответствует предовуляционной фазе) [11]. Затем были сформированы 3 контрольные и 3 опытные группы крыс по 10 животных в каждой, с соответствующими стадиями эстрального цикла.

Эпилептогенный очаг создавался путем аппликации на поверхность двигательной области коры левого полушария мозга крыс порошка металлического кобальта с помощью стеклянной канюли через трепанационное отверстие [2]. На четвертые сутки после операции у крыс формируется детерминантный кобальтовый эпилептический очаг в контралатеральном правом полушарии сенсомоторной области коры (первая стадия развития эпилептической системы). В этой стадии наблюдается отчетливая эпилептиформная активность, которая характеризуется единичными спайками, комплексами «спайк-волна» и пачками синхронизированных острых волн с максимальными показателями в электрограммах контралатеральной коры и гиппокампа [5,12]. В качестве контроля использовали ложнопериоперированных жи-

вотных, которым тем же способом производили трепанационное отверстие в той же области, но без аппликации порошка кобальта.

Для выяснения роли различных структур головного мозга в развитии эпилептической активности проводилось изучение изменений электрической активности мозга у крыс с хроническим КоЭО. С этой целью животным вживлялись долгосрочные электроды в двигательную зону коры правого полушария, дорзальный отдел гиппокампа и латеральные ядра гипоталамуса. В субкортикальные структуры электроды вживлялись с помощью стереотаксического прибора. Координаты подкорковых структур рассчитывались по атласу мозга крыс (Bures J. с соавт., 1960). Индифферентный электрод помещался в носовую кость черепа. Запись электрограмм производилась монополярным способом.

Для нейрхимических исследований животных декапитировали и на льду извлекали структуры мозга (правую и левую теменную кору, гипоталамус, правый и левый гиппокамп), которые замораживали в жидком азоте [9,18]. Выделенные структуры размельчали в гомогенизаторе (тефлон-стекло) в 20 объемах 0,1 н HClO<sub>4</sub>. Пробы центрифугировали при 10 000 г в течение 10 мин. Содержание тормозных (глицин, таурин, ГАМК) и возбуждающих (аспартат, глутамат) аминокислот определяли ОРА-сульфатным методом на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, Inc., США) с аналитической колонкой «Hypersil (Phenomenex, США) – 5 мкм C18 (ODS) 250x4,6 мм» с использованием флуоресцентного детектора – при длине волны возбуждения 230 нм и длине волны испускания 392 нм.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными статистическими методами, с помощью t-критерия Стьюдента, с использованием компьютерной программы Excel 7.0 (Microsoft, США).

### Результаты исследования

Изучение динамики изменения уровней медиаторных аминокислот в течение эстрального цикла в мозге самок крыс с КоЭО показало, что в правой контралатеральной моторной коре максимальные показатели уровня ГАМК выявлены в фазе Про, как и у контрольных ложнопериоперированных животных (см. рис. 1).

Различия между показателями уровня ГАМК в фазе Про и теми же в стадии Д-2 были достоверны для коры правого и левого полушарий. Кроме того, в правой контралатеральной коре в фазе Про наблюдалось достоверно более высокое, чем в стадию Д-2, содержание глицина и таурина (см. рис. 1).

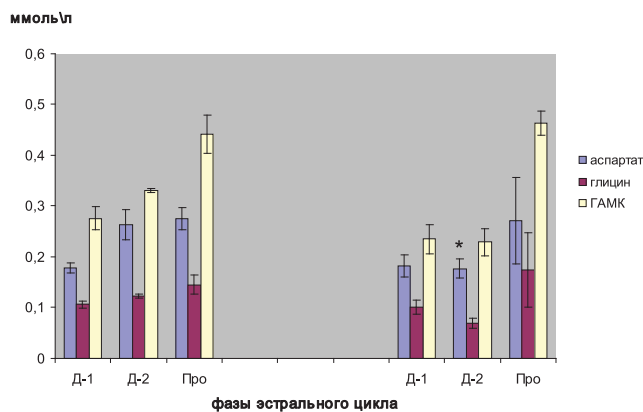
В гипоталамусе, левом и правом гиппокампе, в левой моторной коре достоверных колебаний содержания ГАМК и таурина у крыс с КоЭО в течение эстрального цикла не обнаружено (см. табл. 1-4). Только в гипоталамусе наблюдалось достоверное уменьшение уровня глицина в стадии Д-2, по сравнению со стадией Д-1 (см. табл. 4).

Концентрация глутамата в коре левого и правого полушария, гипоталамусе и гиппокампе головного мозга крыс с КоЭО, также как и у контрольных животных, на протяжении эстрального цикла существенно не изменялась (см. табл. 1-4).

Сравнение показателей уровня аминокислот в структурах мозга контрольных (ложнооперированных) крыс и животных с КоЭО в одинаковые фазы эстрального цикла выявило целый ряд достоверных различий. Установлено, что у крыс с КоЭО показатели уровней содержания тормозных нейромедиаторов ГАМК и глицина, а также возбуждающего нейромедиатора аспартата, в правой контрлатеральной коре достоверно ниже тех же показателей у контрольной группы в фазе Д-2 (см. рис. 1), а уровень ГАМК – в гипоталамусе в фазе Д-1 (см. табл. 4).

Наряду с этим, достоверные изменения по сравнению с контрольной группой выявлены в показателях уровня аспартата в стадии Д-1 и уровня таурина в стадиях Д-2 и Про в правом гиппокампе (см. табл. 2).

Динамика эпилептической активности (ЭПА) у са-



**Рисунок 1.** Содержание нейромедиаторов в контрлатеральной (правой) коре головного мозга у самок крыс с кобальтовым эпилептическим очагом (КоЭО) и ложнооперированных животных (контрольная группа) в зависимости от фаз эстрального цикла. *Примечания:* \* – достоверные изменения по сравнению с контрольной группой при  $p < 0,05$ . Д-1 – диэструс 1; Д-2 – диэструс 2; Про – проэструс.

Фаза цикла	Содержание аминокислот				
	Аспартат	Глутамин	Глицин	Таурин	ГАМК
Д-1	0,207 ± 0,030	1,873 ± 0,199	0,110 ± 0,011	3,644 ± 0,411	0,263 ± 0,035
Д-2	0,190 ± 0,019	1,942 ± 0,130	0,077 ± 0,014~	3,993 ± 0,122	0,219 ± 0,042
Про	0,184 ± 0,017	1,977 ± 0,147	0,118 ± 0,007	4,091 ± 0,206	0,250 ± 0,015

**Таблица 1.** Содержание аминокислот в мозге крыс с кобальтовым очагом в зоне левой моторной коры, (мкмоль/г). *Примечание:* ~ – достоверно при  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в фазе Про.

Фаза цикла	Содержание аминокислот				
	Аспартат	Глутамин	Глицин	Таурин	ГАМК
Д-1	0,577 ± 0,015* (Контроль 0,474 ± 0,022)	2,221 ± 0,098	0,187 ± 0,013	6,114 ± 0,468	0,204 ± 0,010
Д-2	0,530 ± 0,015	2,052 ± 0,080	0,136 ± 0,025	5,048 ± 0,309* (Контроль 6,208 ± 0,295)	0,205 ± 0,007
Про	0,498 ± 0,029	2,042 ± 0,092	0,170 ± 0,007	5,084 ± 0,155* (Контроль 5,793 ± 0,094)	0,179 ± 0,009

**Таблица 2.** Содержание аминокислот в мозге крыс с кобальтовым очагом в правом гиппокампе, (мкмоль/г). *Примечание:* \* – достоверно при  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

Фаза цикла	Содержание аминокислот				
	Аспартат	Глутамин	Глицин	Таурин	ГАМК
Д-1	0,477 ± 0,009	1,931 ± 0,047	0,159 ± 0,006	4,285 ± 0,176	0,177 ± 0,005
Д-2	0,541 ± 0,042	1,923 ± 0,065	0,176 ± 0,016	4,716 ± 0,197	0,222 ± 0,028
Про	0,471 ± 0,046	1,953 ± 0,052	0,157 ± 0,010	4,938 ± 0,279	0,188 ± 0,017

**Таблица 3.** Содержание аминокислот в мозге крыс с кобальтовым очагом в левом гиппокампе, (мкмоль/г).

Фаза цикла/ аминокислота	Содержание аминокислот				
	Аспартат	Глутамин	Глицин	Таурин	ГАМК
Д-1	0,667 ± 0,041	1,419 ± 0,065	0,263 ± 0,029 <sup>^</sup>	5,152 ± 0,507	0,351 ± 0,035* (Контроль 0,475 ±0,019)
Д-2	1,652 ± 1,021	1,449 ± 0,106	0,180 ± 0,020	4,312 ± 0,335	0,364 ± 0,038
Про	0,629 ± 0,040	1,577 ± 0,082	0,215 ± 0,010	5,030 ± 0,423	0,435 ± 0,028

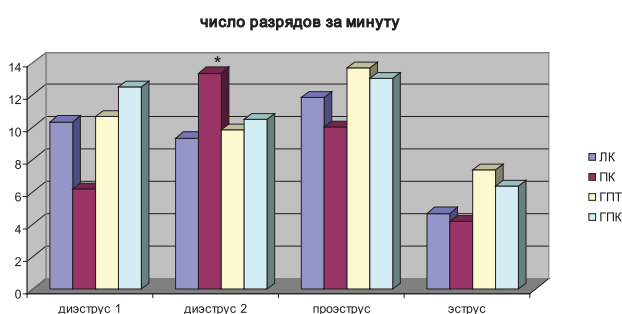
**Таблица 4.** Содержание аминокислот в мозге крыс с кобальтовым очагом в гипоталамусе, (мкмоль/г).

Примечание: \* – достоверно при  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, ^ – достоверно при  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в фазе Д-2.

мок крыс с КоЭО изучалась на первой стадии развития эпилептического статуса (ЭС), когда у животных формируется детерминантный эпилептический очаг в контралатеральном правом полушарии сенсомоторной области коры. Анализ биоэлектрической активности различных структур мозга проводился отдельно для каждой фазы эстрального цикла.

Установлено, что образование очагов ЭпА у крыс с кобальтовой эпилепсией характеризуется, прежде всего, возникновением на ЭЭГ единичных острых высокоамплитудных волн, пиков, а также синхронно возникающих пароксизмальных разрядов в ипсилатеральной левой и контралатеральной правой коре. Кроме того, большое число острых волн и пиков наблюдается в области отведений латерального гипоталамуса и дорзального гиппокампа, что свидетельствует об иррадиации пароксизмальной активности в эти образования мозга из первичного очага.

Анализ биоэлектрической активности различных структур мозга в зависимости от фаз эстрального цикла показал, что в период фазы Д-1 наибольшее число и длительность разрядов наблюдается в электрограммах дорзального гиппокампа, латерального гипоталамуса и ипсилатеральной левой коры, тогда



**Рисунок 2.** Динамика показателей фоновой эпилептической активности (ЭпА) у самок крыс во время первой стадии развития эписистемы.

Примечание: ЛК – левая ипсилатеральная кора, ПК – правая контралатеральная кора, ГПТ – латеральный гипоталамус, ГПК – дорзальный гиппокамп.

\* – достоверно при  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в ипсилатеральной левой коре, латеральном гипоталамусе и дорзальном гиппокампе.

как в электрокортикограммах контралатеральной коры эпилептиформная активность значительно менее выражена (см. рис. 2).

В период фазы проэструса наибольшее число и длительность разрядов ЭпА наблюдается в электрограммах дорзального гиппокампа, латерального гипоталамуса, электрокортикограммах ипсилатеральной полушария и, в наименьшей степени, в контралатеральной коре (см. рис. 2).

На стадии эструса число разрядов во всех структурах мозга значительно меньше, чем на других стадиях эстрального цикла, но их наибольшее число, также как и в Про фазе. Это явно выражено в электрограммах подкорковых структур – латерального гипоталамуса, дорзального гиппокампа и менее выражено в корковых структурах (см. рис. 2).

В период фазы Д-2 в электрокортикограммах контралатеральной коры отмечается наибольшее число разрядов и их возрастающая продолжительность. В меньшей, но одинаковой степени эти показатели выражены в области латерального гипоталамуса, дорзального гиппокампа и ипсилатеральной коры (см. рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у крыс с кобальтовой эпилепсией на первой стадии развития ЭС, когда у животных формируется детерминантный эпилептический очаг в контралатеральной коре, паттерны ЭпА и ведущие структуры, вовлекаемые в генерацию ЭпА, существенно зависят от фаз эстрального цикла. Результаты исследований свидетельствуют о том, что паттерны ЭпА в периоды фаз проэструса и эструса имеют сходный характер. Это связано с тем, что в течение этих фаз наблюдается существенное преобладание ЭпА в подкорковых структурах: латеральном гипоталамусе и дорзальном гиппокампе, – чего не происходит в ипсилатеральной и, особенно, в контралатеральной коре.

В период фазы Д-1, ЭпА в наибольшей степени является в дорзальном гиппокампе. В меньшей степени, но без статистической достоверности в сравнении с ЭпА в дорзальном гиппокампе. В контралатеральной коре частота выявления ЭпА (изменение имеет характер тенденции). В противоположность другим стадиям эстрального цикла, в период фазы

Д-2, ведущей структурой генерации ЭПА является контралатеральная кора, хотя ЭПА в этой стадии наблюдается на высоком уровне в подкорковых структурах и ипсилатеральной коре.

Анализируя полученные нейрохимические и электрофизиологические данные, можно сделать заключение: у интактных животных и у крыс с КоЭО, в зависимости от фазы эстрального цикла, выявляется изменение уровня тормозных аминокислот, (особенно ГАМК), но не возбуждающих аминокислот. Установлено, что при высоком уровне эндогенных эстрогенов наблюдается низкий уровень ГАМК, а при низком уровне эндогенных эстрогенов – высокий уровень ГАМК. Это свидетельствует о том, что уровень ГАМК детерминирован фазой полового цикла. В сравнении с ложнопериоперированными крысами, у животных с КоЭО

колебания уровня тормозных аминокислот в зависимости от фаз эстрального цикла более выражены. Это касается не только ГАМК, но также глицина и аспартата, и наблюдается не только в коре, но и в гипоталамусе. Особенно явные различия в уровне ГАМК у интактных животных и у крыс с КоЭО выявляются в период фазы диэструса. Нейрофизиологические показатели также указывают на повышение ЭПА в период фазы Д-2, преимущественно в корковых структурах.

Полученные данные указывают на тесную взаимосвязь между овариальной гормональной системой и ГАМК-эргической системой в механизмах развития судорожных состояний. Можно предположить, что циклические колебания стероидных гормонов имеют существенное значение в характере течения эпилепсии во время менструального цикла.

### Литература:

1. Авакян Г. Н., Денисова С. В., Олейникова О. М., Курбанова С. А. Невролог. и психиат. 2007; 107(9): 85-92.
2. Бадалян О.Л., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Авакян Г.Н., Маркина Н.В. Эксп. и клин. фарм. 2002; 2: 7-10
3. Булак М. Эпилепсия, ионные каналы и гены. Невролог. и психиат. 2005; 105:12: 59-61.
4. Власов П.Н. Особенности противозлептической терапии у женщин. Фарматека. 2001; 1: 39-41.
5. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва. 2005; 277-295.
6. Васильева В.В. Спектральные и когерентные характеристики ЭЭГ у женщин в разные фазы менструального цикла. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005; 140(10): 374-376.
7. Железнова Е.В. Нейроэндокринный аспект эпилепсии у женщин в работах последних двух десятилетий. Невролог. и психиат. 2005; 2: 59-64.
8. Карлов В.А. Эпилепсия. М: Медицина 1990; 336 с.
9. Лебедев С.В., Володин Н.Н., Блинов Д.В., Лазаренко И.П., Рогаткин С.О., Чехонин В.П. Динамика неврологического дефицита и нарушений высшей нервной деятельности при моделировании перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС у крыс. Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 2003; 136(9): 277-281.
10. Старцева Л.Ф. Распределение постоянных потенциалов головного мозга в различные фазы овариально-менструального цикла у студенток северного вуза. Автореферат дисс. канд. мед. наук, Архангельск. 2007.
11. Becker et al. Endocrinology. 2005; V. 146(4): 1650-1673.
12. Dow R.S., Fernandez-Guardiola A., Manni E. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 1962; 14: 383-198.
13. Herzog AG, Friedman MN, Freund S, Pascual-Leone A. Epilepsy Behav. 2001; 2:367-369.
14. Herzog A.G., Coleman A.E., Jacobs A.R., Klein P., Friedman M.N., Drislane F.W., Ransil B.J., Schomer D.L. Interictal EEG discharges, reproductive hormones, and menstrual disorders in epilepsy. Ann Neurol. 2003; Nov;54(5):625-37
15. Herzog A.G. Disorders of reproduction in patients with epilepsy: primary neurological mechanisms. Seizure. 2008; 17:2:101-110
16. Isojärvi J. Disorders of reproduction in patients with epilepsy: antiepileptic drug related mechanisms. Seizure. 2008; 17:2:111-119.
17. Jette N., Morrell M.J. Am J. Electroneurodiagnostic Technol. 2005; V. 45(1):36-48.
18. Loscher, W., Honack D. and Gramer M. J. Neurochem. 1989; 53:1737-1750.
19. Morrell M.J., Sarto G.E., Shafer P.O. et al. J. Womens Health Gend Based Med. 2000; V. 9(9): 959-965.
20. Morrell M.J. Epilepsy in women. Am Fam Phys 2002;66.(8):1489-1494.
21. Vijayan E. J.Biosci. 1985; V. 7: 207-213.

### CHANGES IN THE LEVELS OF INHIBITORY AND EXCITATORY AMINO ACIDS AND NEUROPHYSIOLOGY CHARACTERISTICS IN THE BRAIN STRUCTURES OF FEMALE RATS WITH COBALT EPILEPTOGENIC FOCUS DURING DIFFERENT PHASES OF THE ESTROUS CYCLE

Filatova Yu.B.<sup>1</sup>, Voronina T.A.<sup>1</sup>, Avakyan G.N.<sup>2</sup>, Nerobkova L.N.<sup>1</sup>, Rider F.K.<sup>2</sup>, Klodt P.M.<sup>1</sup>, Kudrin V.S.<sup>1</sup>, Avakyan G.G.<sup>2</sup>, Gaydukov I.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Zakusov Institute of Pharmacology RAMS, (Moscow)

<sup>2</sup>SBEI HPE «RNSMU named after N.I. Pirogov» Ministry of Healthcare and Social Development of Russia (Moscow)

Abstract: Rats with cobalt epilepsy in the estrous cycle revealed fluctuation of the levels of inhibitory neurotransmitters (especially GABA), but not of excitatory.

The most significant changes were found out in the contralateral cortex, where the levels of GABA and glycine considerably decreased during the diestrus-2 phase (corresponding to menstruation).

Neurophysiology characteristics indicate the increasing of epileptic activity mainly in the contralateral cortex during the diestrus-2 phase.

These data indicate a close interaction between the ovarian hormonal system and the GABA-ergic system in the mechanisms of seizures states.

Cyclical fluctuations of steroid hormones are of essential meaning for the course of epilepsy during the menstrual cycle.

*Key words: amino acids, cobalt epilepsy model, estrous cycle, epileptiform activity*