



Стероидная регуляция нейронной возбудимости в переднем кортикальном ядре миндалевидного комплекса мозга у крыс линии *WAG/Rij*

И.И. Садртдинова, З.Р. Хисматуллина

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Контактная информация: Садртдинова Индира Илдаровна, indira-asp@yandex.ru

Работа посвящена изучению динамики судорожной активности при различных концентрациях половых стероидов с помощью электроэнцефалографического метода. Впервые в экспериментальном исследовании на животных – самках крыс линии *WAG/Rij*, представляющих генетическую модель генерализованной абсансной эпилепсии у человека, показано влияние женских половых гормонов в норме, при их дефиците и после проведения заместительной гормональной терапии препаратами 17 β -эстрадиол и прогестерон на количественные и качественные характеристики пик-волновых разрядов. Экспериментально установлено, что эстроген и прогестерон принимают участие в механизмах формирования пик-волновых разрядов, которые сопровождаются абсансными судорогами у самок крыс линии *WAG/Rij*.

Ключевые слова: абсансная эпилепсия, крысы линии *WAG/Rij*, электроэнцефалограмма, 17 β -эстрадиол, прогестерон, пик-волновые разряды.

Абсансная эпилепсия – генерализованная неконвульсивная форма эпилепсии. Основным ее диагностический признак – генерализованные билатерально симметричные и синхронные разряды пик-волна (3-4 Гц) на электроэнцефалограмме, регистрируемые в обоих полушариях мозга и длящиеся от 2-5 до 15-30 с (в среднем, 12 с) [14, 20, 21].

Спайковые потенциалы возникают в момент достижения мембраной нейрона некоторого критического уровня деполяризации, при котором наступает электрический «пробой» мембраны и начинается самоподдерживающийся

процесс распространения возбуждения в нервном волокне [4].

Характерными особенностями пик-волновых разрядов (*spike-wave discharges, SWD*) являются их высокая амплитуда, спонтанность, генерализованность, небольшая длительность. В экспериментах с животными было показано, что *SWD* возникают в кортико-таламо-кортикальной сети [4, 17, 20]. Главным же условием появления пик-волновых разрядов является повышенная возбудимость коры головного мозга [17].

В многолетних электрофизиологических и фармакологических исследова-

ниях показано, что пик-волновые разряды у крыс линии *WAG/Rij* состоят из элементов, характерных для *SWD* человека. Это свидетельствует об аналогичных проявлениях судорожной активности у данной генетической модели и у пациентов с абсанс-эпилепсией [14].

Крысы линии *WAG/Rij* – инбредная линия с генетически детерминированной абсансной эпилепсией, выведенная в результате скрещивания крыс линии *Wistar* (*Wistar Albino Glaxo*, Великобритания). Они являются уникальной и признанной моделью генерализованной абсансной эпилепсии [19].

В настоящее время актуальным и недостаточно исследованным является влияние половых гормонов на возникновение абсансных приступов. Получено значительное число данных, свидетельствующих о наличии у клеток головного мозга рецепторов к стероидным гормонам, в связи с чем мозг рассматривается как их орган-мишень [3, 9]. Стероидные гормоны имеют нейроактивные свойства, которые модулируют нейронную возбудимость путем нарушения ионной проницаемости мембран нейронов с последующим изменением их биоэлектрической активности, а также с помощью изменения внутриклеточного нейронального метаболизма [15, 23] и участвуют в механизмах формирования *SWD* у крыс линии *WAG/Rij* [10].

Среди структур, реагирующих на изменение гормонального фона, выделяют две наиболее важные, потенциально эпилептогенные области — миндалевидный комплекс мозга и гиппокамп [1].

В ранее проведенных нами исследованиях на крысах линии *Wistar* с помощью морфологических и электрофизиологических методов впервые были

выявлены стероидзависимые зоны миндалевидного комплекса мозга, включающиеся в деятельность нейроэндокринной регуляции репродуктивных процессов. В миндалевидном комплексе мозга одной из основных структур относящейся к числу элементов нейроэндокринной системы является переднее кортикальное ядро (*COa*). Нейросекреторные нейроны *COa* имеют рецепторы к половым стероидам. Их электронномикроскопические характеристики изменяются в ответ на колебания в крови уровней этих гормонов, которые происходят в эстральном цикле. Нейроны реагируют изменением своих кариоволюметрических показателей на гонадэктомию и в динамике эстрального цикла [2], что хорошо объяснимо на основании данных о наличии у нейронов *COa* рецепторов к половым стероидам [24].

На основании этого, большой научный интерес представляет исследование роли *COa* в регуляции пик-волновой активности в норме и при экспериментально вызванном дефиците половых гормонов, а также после заместительной гормональной терапии у самок крыс линии *WAG/Rij* с генетической абсансной эпилепсией.

Материалы и методы

Опыты проведены на половозрелых самках инбредной линии крыс *WAG/Rij*, признанные генетической моделью абсансной эпилепсии, массой 200-220 г, n=48, в возрасте 6 мес., выращенных в группе по 5 особей в стандартных пластиковых клетках в условиях вивария кафедры физиологии человека и зоологии Башкирского государственного университета, характеризующихся постоянством комнатной температуры

(20–22 °C) и уровнем влажности. Еду и питье крысы получали *ad libitum*. Эксперименты выполнены в соответствии с этическими требованиями, предъявляемыми к работе с лабораторными животными.

В течение месяца ежедневно проводили исследование влагалищных мазков, которые брали строго в определенное время (12:00), и по их цитологической картине определяли стадии эстрального цикла [5]. Продолжительность цикла у самок крыс, содержащихся изолированно от самцов, в среднем, равна 4–5 дням. Так как после овариоэктомии животные находятся в хроническом диэструсе, запись ЭЭГ для контрольной группы осуществляли на стадии диэструса.

С целью регистрации суммарной электрической активности мозга крыс было произведено стереотаксическое вживление хронических электродов в переднее кортикальное ядро переднего отдела миндалевидного комплекса (в стерильных условиях). В качестве наркоза использовали хлоралгидрат (400 мг/кг внутривентриально). В качестве местно-анестезирующего средства применяли новокаин 2% раствор для инъекций, подкожно. После скальпирования вживляли электроды из изолированной нихромовой проволоки с поперечным сечением 0,1 мм. Активный электрод устанавливали по стереотаксическим координатам атласа мозга крысы Паксиноса-Уотсона [22] в *COa* (AP = -1,6; LM = 3,5; H = 9,5), референтный электрод имплантировали в затылочную кость черепа над мозжечком. Для фиксации электродов использовали протакрил-М.

После периода заживления, который составлял 7–8 дней, регистрировали фо-

новую ЭЭГ в условиях свободного поведения.

Далее самки с вживленными в мозг электродами были подвергнуты двухсторонней гонадэктомии [5]. Спустя 1 мес. повторно проводили записи ЭЭГ. Заместительная терапия гонадэктомизированным самкам включала в себя инъекции 17 β -эстрадиола (в дозе 10 мкг/100 г массы) один раз в сутки в течение двух дней, а затем (на третьи сутки) введение 17 β -эстрадиола с прогестероном (доза 5 мг/100 г массы). Запись ЭЭГ проводилась после двух инъекций 17 β -эстрадиола (на второй день, через 3 ч после инъекции), на третий день, через 3 ч после введения 17 β -эстрадиола с прогестероном и через пять дней.

Все записи тщательно анализировали, участки ЭЭГ, содержащие артефактные эпохи, были исключены из дальнейшего анализа. Далее проводился визуальный анализ по следующим параметрам: количество пик-волновых разрядов в единицу времени, общая длительность пик-волновых разрядов, средняя продолжительность одного *SWD*, пик-волновой индекс, выраженный в %.

Продолжительность одного *SWD* (с) – это длительность разряда от первой пик-волны до последней.

Пик-волновой индекс – это процент времени, занятый разрядами. Для расчета индекса находили сумму длительности всех пик-волновых разрядов на протяжении всего файла, за 100% принимали продолжительность файла (50 эпох по 10 с).

Количество *SWD* определяли в каждом анализируемом файле.

По окончании всех опытов до анализа ЭЭГ производили морфологический

контроль с целью проверки локализации кончика электрода в мозге крысы.

Все полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с помощью программы *Statistica 5.5*. Достоверность определяли с помощью параметрического критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты визуального анализа ЭЭГ показали, что на всех анализируемых ЭЭГ крыс линии *WAG/Rij* присутствовали спонтанные пик-волновые разряды (рис. 1).

Полученные результаты по количеству пик-волновых разрядов, продолжительности каждого комплекса и общей продолжительности по ходу всей записи (500 сек) представлены на графиках, отображающих динамику изменения пик-волновой активности на ЭЭГ.

Приведенные данные на рис. 2 показывают, что в контрольной группе среднее количество пик-волновых разрядов в *COa* составило $3,44 \pm 0,17$. После проведения операции овариоэктомии происходит их снижение – $2,00 \pm 0,15$ ($p < 0,05$).

Анализ средней продолжительности пик-волновых разрядов по ходу эксперимента показал, что продолжитель-

ность *SWD* у самок контрольной группы равняется $2,57 \pm 0,49$, у гонадэктомированных самок достоверно снижается до $1,84 \pm 0,06$ (рис. 3).

Таким, образом, после овариоэктомии происходит снижение количества *SWD* и одновременное сокращение их средней продолжительности.

Следующим этапом эксперимента было исследование воздействия эндогенных нейростероидов на пик-волновые разряды. После введения гонадэктомированным самкам эстрадиола нами не выявлено достоверных различий. Вероятно, он не оказывает влияния на количественные и качественные характеристики *SWD*, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [12, 13]. Далее мы исследовали влияние комплексного введения прогестерона с 17β -эстрадиолом на уровень пик-волновой активности. На ЭЭГ, зарегистрированных через 3 ч после инъекции, было выявлено нарастание количества и средней продолжительности пик-волновых разрядов: $4,00 \pm 0,71$ и $3,47 \pm 0,47$ соответственно. Мы предполагаем, что это связано с эффектом эндогенных нейростероидов, которые вырабатываются в ответ на стресс инъектирования. На пятый день после проведения заместительной гор-



Рис. 1. Характерные для абсансной эпилепсии пик-волновые комплексы (указаны стрелкой) из *COa* на фоновой ЭЭГ крыс. Калибровка 1с, 500 мкВ.

мональной терапии наблюдалось снижение судорожной чувствительности мозга: количество *SWD* сократилось до $1,33 \pm 0,03$ ($p < 0,05$), длительность одного комплекса в среднем составила $2,4 \pm 0,14$ (рис. 2-3). В данном случае прогестерон следует рассматривать как антиконвульсант, т.е. благоприятно воздействует на течение судорожных состояний.

После анализа полученных результатов на всех этапах эксперимента (количества пик-волновых разрядов и их средней продолжительности) представлялось интересным выяснить, сколько же времени занимают пик-волновые комплексы по ходу всей записи ЭЭГ, т.е. за 500 сек (рис. 3). Общая продолжительность пик-волновых разрядов в контрольной группе составила $9,29 \pm 0,53$. После оперативного вмешательства мы наблюдали сокращение

общей их продолжительности в записях электроэнцефалограммы, и она составила $4,52 \pm 0,69$ (при $p < 0,05$). Как уже было выше сказано, в нашем эксперименте 17β -эстрадиол был неэффективным. Инъекции 17β -эстрадиола в комбинации с прогестероном увеличивали общую продолжительность пик-волновых комплексов до $13,79 \pm 0,48$, а на пятые сутки отмечали их снижение до $3,46 \pm 0,07$ ($p < 0,05$).

Одним из основных показателей в оценке эпилептиформной активности на ЭЭГ является пик-волновой индекс: после гонадэктомии он достоверно снижался, после проведения заместительной терапии эстрадиолом достоверных различий не наблюдали. После инъекции 17β -эстрадиола с прогестероном через 3 ч он достоверно повышался, а на пятые сутки вновь понижался (результаты представлены на рис. 4).

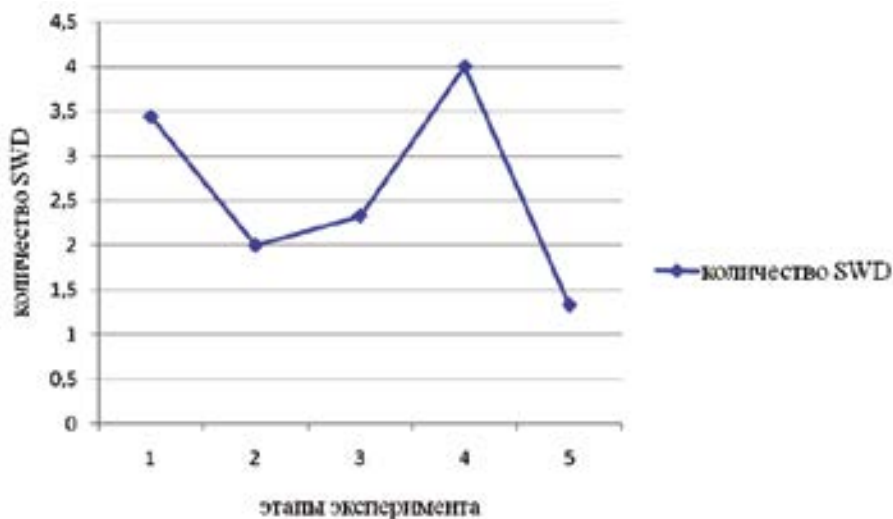


Рис. 2. Количественные характеристики *SWD* у самок крыс линии *WAG/Rij* на разных этапах эксперимента. Обозначения: 1 — контроль; 2 — гонадэктомия; 3 — 17β -эстрадиол; 4 — 17β -эстрадиол и прогестерон (эффект через 3 ч после инъекции); 5 — 17β -эстрадиол и прогестерон (эффект на пятые сутки после инъекции).

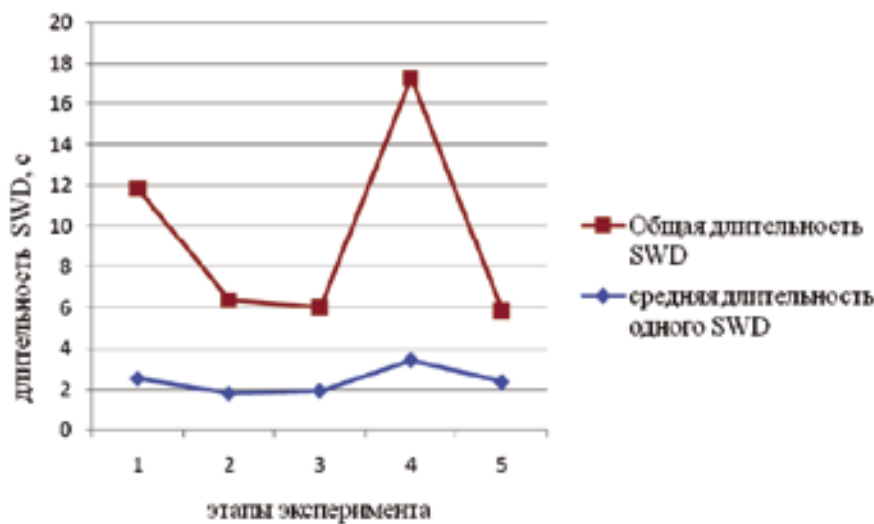


Рис. 3. Изменения средней продолжительности одного комплекса пик-волна и средней длительности всех пик-волновых разрядов по ходу всей записи ЭЭГ, т.е. за 500 с. Обозначения: 1 – контроль; 2 – гонадэктомия; 3 – 17 β -эстрадиол; 4 – 17 β -эстрадиол и прогестерон (эффект через 3 ч после инъекции); 5 – 17 β -эстрадиол и прогестерон (эффект на пятые сутки после инъекции).

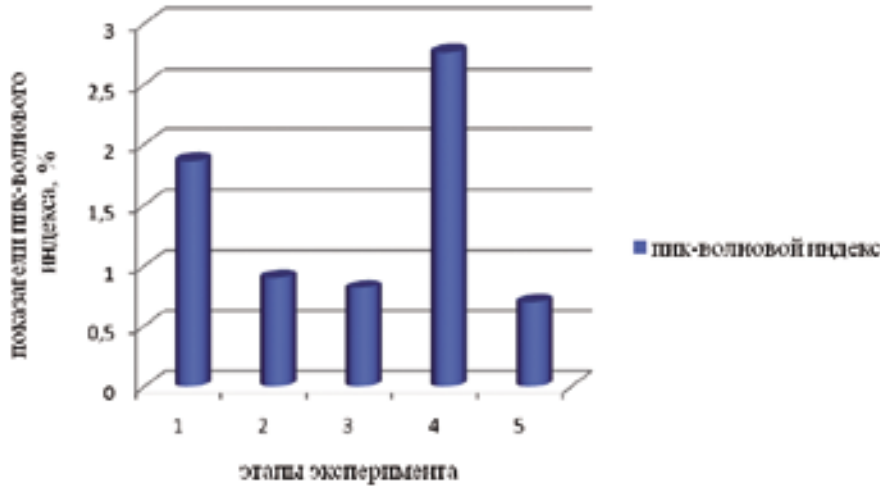


Рис. 4. Показатели пик-волнового индекса (%) у самок крыс линии WAG/Rij. Обозначения: 1 – контроль; 2 – гонадэктомия; 3 – 17 β -эстрадиол; 4 – 17 β -эстрадиол и прогестерон (эффект через 3 ч после инъекции); 5 – 17 β -эстрадиол и прогестерон (эффект на пятые сутки после инъекции).

Известно, что половые стероидные гормоны по-разному влияют на порог электросудорожной готовности мозга [7, 25]. Результаты нашего исследования демонстрируют следующее: эстро-

гены выступают как проконвульсанты, т.е. снижают электросудорожный порог, а прогестерон — как антиконвульсант, т.е. повышает электросудорожный порог.

Механизм противосудорожного действия прогестерона является дискуссионным, в ряде исследований получены разные эффекты его влияния. Одни авторы описывали дозозависимое повышение числа и общей продолжительности пик-волновых разрядов у самок крыс линии *WAG/Rij* при внутривенном введении прогестерона [12, 13, 18]. В других экспериментальных исследованиях показан антиконвульсивный эффект прогестерона [8, 9, 11]. Было выявлено, что дозы прогестерона, превышающие его физиологический уровень, предохраняют экспериментальных животных от развития судорог, вызванных электрошоком [16].

Предложено несколько возможных механизмов его влияния на судорожную активность: 1) блокирование восходящей ретикулярной формации ствола головного мозга; 2) дисбаланс нейротрансмиттеров [25]. Согласно работам других авторов, одним из возможных механизмов изменения порога судорожной готовности мозга при назначении половых стероидов может быть влияние на уровень глюкозы в мозге [6, 7].

Резюмируя накопленные факты и на основании полученных нами данных по анализу суммарной ЭЭГ, которая отражает функциональную активность популяций нервных клеток, т.е. функциональное состояние головного мозга, можно сделать вывод, что колебание уровней овариальных стероидов, несомненно, играют важную роль в деятельности головного мозга, влияя на пик-волновую активность его отдельных областей при абсанс-эпилепсии, в частности переднего кортикального ядра миндалевидного комплекса мозга.

Выводы

Электрофизиологическим методом в условиях свободного поведения установлено, что в *COa* у самок крыс линии *WAG/Rij*, представляющих генетическую модель генерализованной абсансной эпилепсии:

1. Овариоэктомия снижает судорожную активность, что проявляется в сокращении числа и продолжительности абсансных разрядов, а также показателей пик-волнового индекса.

2. Заместительная терапия 17 β -эстрадиолом в дозе 10 мкг/100 г массы животного в течение двух дней не влияла ни на количество, ни на продолжительность пик-волновых разрядов.

3. Заместительная терапия 17 β -эстрадиолом в комбинации с прогестероном (5 мг/100 г) через три часа после их введения вызывали достоверное повышение частоты и продолжительности *SWD*.

4. Введение 17 β -эстрадиола в комбинации с прогестероном на пятые сутки показало антиконвульсивный эффект прогестерона (снижение количества и продолжительности пик-волновых комплексов и пик-волнового индекса), т.е. десинхронизирующее влияние на биоэлектрическую активность головного мозга.

Список литературы

1. **Авякан Г.Н., Олейникова О.М., Неробкова Л.Н. и др.** // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. 2002. № 3. С. 37-42.
2. **Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б.** Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. - М.: Наука. 1993. 269 с.
3. **Бабичев В.Н.** Нейроэндокринный эффект половых гормонов // Успехи

- физиологических наук. 2005. Т. 36. № 1. С. 54-67.
4. **Зенков Л.Р.** Клиническая электроэнцефалография (с элементами эпилептологии). Руководство для врачей. 3-е изд. - М.: МЕДпрессинформ. 2004. 368 с.
5. **Кабак Я.М.** Практикум по эндокринологии. - М.: Изд-во МГУ. 1968. 275 с.
6. **Карлов В.А., Власов П.Н.** Клинические, электроэнцефалографические, гормональные особенности и терапия катамениальных эпилептических припадков // Неврологический журнал. 1997. № 4. С. 19-23.
7. **Крыжановский Г.Н., Глебов Р.Н.** Гормоны и эпилептическая активность. Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 1984. Т. 84. Вып. 6. С. 930-937.
8. **Лекомцева Е.В.** Патогенетические механизмы участия гиппокампальной формации и стриарного комплекса при нарушениях центральной нейроэндокринной регуляции // Український медичний часопис. 2006. № 2. С. 57-64.
9. **Меньшикова Н.С., Серова О.Ф., Власов П.Н.** Особенности функции яичников у больных эпилепсией // Российский вестник акушера-гинеколога. 2007. № 4. С. 40-44.
10. **Толмачева Е.А.** Роль половых стероидов в регуляции спайк-волновой активности у крыс линии WAG/RIJ: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. - М. 2006. 24 с.
11. **Филатова Ю.Б., Воронина Т.А., Авакян Г.Н., Неробкова Л.Н., Ридер Ф.К., Клодт П.М., Кудрин В.С., Авакян Г.Г., Гайдуков И.А.** Изменение содержания тормозных и возбуждающих аминокислот и эпилептической активности в структурах мозга самок крыс с кобальтовой эпилепсией в зависимости от фазы эстрального цикла // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2012. № 1. С. 29-33.
12. **Чепурнов С.А., Чепурнова Е.А., Толмачева Е.А. и др.** Беременность крыс линии WAG/Rij – изменения уровней прогестерона и эстрадиола и генерализованной абсансной эпилепсии // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2002. Т. 88. № 6. С. 741-750.
13. **Bazyan A.S., Luijtelaaar G.** Neurochemical and behavioral features in genetic absence epilepsy and in acutely induced absence seizures // Neurology. 2013; 48 pp.
14. **Coenen A.M., Van Luijtelaaar E.L.** Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. Behav Genet 2003;33(6):635-655.
- Herzog A.G.** Disorders of reproduction in patients with epilepsy: primary neurological mechanisms. Seizure 2008;17(2):101-110.
15. **Hopkins A.** Epilepsy. London: Chapman & Hall Medical. 1987. 585 p.
16. **Kostopoulos G.K.** Spike-and-wave discharges as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. Clin. Neurophysiol. 2000;111 (Suppl 2):527-538.
17. **Luijtelaaar G., van, Budziszewska B., Jaworska-Feil L., Ellis J., Coenen A., Lason W.** The ovarian hormones and absence epilepsy: a long-term EEG study and pharmacological effects in a genetic absence epilepsy model. Epilepsy research 2001;46(3):225-239.
18. **Luijtelaaar E.J.L.M., van Coenen A.M.L.** Two types of electrocortical

- paroxysms in an inbred strain of rats. *Neurosci. Lett.* 1986; 70:393-397.
19. **Meeren H.K., van Luijtelaa E.L., Lopes da Silva F.H., Berdiev R.K., Chepurnova N.E., Chepurnov S.A. & Coenen A.M.** The cortico-thalamic theory for generalised spike-wave discharges. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* 2004;35(1):3-19.
20. **Panayiotopoulos C.P.** Typical absence seizures and related epileptic syndromes: assessment of current state and directions of future research. *Epilepsia* 2008. 49(12): 2131-2139.
21. **Paxinos G., Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Sydney. Academic Press. 1998.
22. **Pierson R.C., Lyons A.M., Greenfield L.J. Jr.** Gonadal steroids regulate GABAA receptor subunit mRNA expression in NT2-N neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005. 138(2):105-115.
23. **Vreeburg J.T.M., Schretlen P.J.M., Baum M.J.** Specific, high-affinity binding of 17 β -estradiol in cytosols from several brain region and pituitary of intact and castrated adult male rats. *Endocrinology* 1975; 97(4): 969-977.
24. **Wang Q.** The roles of estrogen and progesterin in epileptogenesis and their mechanisms of action. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 2000; 31(3): 231-233.

Steroid regulation of neuronal excitability in the anterior cortical nucleus of the brain's amygdala in WAG/Rij rats

I.I. Sadrtidnova, Z.R. Khismatullina

The present paper studies the seizure activity dynamics at different concentrations of sex steroids using electroencephalographic method. For the first time the experimental animal study shows the influence of normal level of female sex hormones with their deficit and after hormone replacement therapy with 17 β -estradiol and progesterone on the quantitative and qualitative characteristics of spike-wave discharges. The animals being observed are WAG/Rij female rats representing a genetic model of generalized absence epilepsy in humans. It has been experimentally established that estrogen and progesterone are involved in the spike-wave discharges formation mechanisms accompanied with absence seizures in WAG/Rij female rats.

Key words: absence epilepsy, WAG/Rij rats, electroencephalogram, 17 β -estradiol, progesterone, spike-wave discharges.