

УДК 616-092

## Уровень кортикостерона в крови у крыс с разным уровнем предрасположенности к аудиогенной эпилепсии

Федотова И.Б., Поликарпова А.В., Перепелкина О.В., Николаев Г.М., Смирнова О.В., Полетаева И.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

**Актуальность.** Селектированная на проявление судорог в ответ на сильный звук (аудиогенную эпилепсию, АЭ) линия крыс Крушинского-Молодкиной (КМ) — модель судорожных состояний человека, с быстрым развитием судорожного припадка в ответ на включение звука (100–120 дБ). Однако у крыс с АЭ изменений уровня кортикостерона (КС) в крови в связи с судорогами не определяли, хотя анализ связи АЭ и стресс-реакции — важная практическая задача. **Методы.** Уровень КС в образцах сыворотки крови определяли с помощью набора у крыс линии КМ, а также у крыс линии «0», селектированных из гибридной популяции КМ x Вистар на отсутствие АЭ, и у крыс популяции Вистар. **Результаты.** У всех крыс КМ был зарегистрирован аудиогенный припадок, тогда как у крыс линии «0» и Вистар судорог не было. Через 30 мин после действия звука (и судорог) у крыс КМ повышается уровень КС, тогда как сразу после судорог (через 1–3 мин) данная реакция не обнаруживается. У крыс линии «0» обнаружен достоверно более высокий фоновый уровень КС, по сравнению с КМ и Вистар. Уровень КС у них, как и у крыс Вистар, после действия звука не изменялся. **Заключение.** Подъем уровня КС в крови после действия звука наблюдали только у крыс КМ через 30 мин после припадка АЭ. Крысы линии «0», у которых нет судорог в ответ на звук, обнаружили более высокий, чем у КМ и Вистар уровень КС в фоне.

**Ключевые слова:** аудиогенная эпилепсия, линии крыс, уровень кортикостерона, акустический стресс.

**Для цитирования:** Федотова И.Б., Поликарпова А.В., Перепелкина О.В., Николаев Г.М., Смирнова О.В., Полетаева И.И. Уровень кортикостерона в крови у крыс с разным уровнем предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. Патогенез. 2018; 16(2): 64–67

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.64-67

**Для корреспонденции:** Полетаева Инга Игоревна, e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

**Финансирование.** Поддержано РФФИ грант № 15-04-01732 и Госпрограммой № НИОКР АААА-А16-116021660055-1.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 04.03.2018

### *Blood corticosterone in rats with different susceptibility to audiogenic epilepsy*

Fedotova I.B., Policarpova A.V., Perepelkina O.V., Nikolaev G.M., Smirnova O.V., Poletaeva I.I.

M.V.Lomonosov Moscow State University. Leninskie Gory 1, Moscow 119991, Russian Federation

**Aims.** The Krushinsky-Molodkina (KM) rat strain, which was selected for a seizure response to a sound (audiogenic epilepsy, AE), is known as a model of human seizure states. Although the association of blood CS with stress reaction is an important practical issue, blood levels of corticosterone (CS) have never been analyzed in rats with AE in relation with seizures. **Methods.** Serum concentration of CS was measured using IBL International Corticosterone ELISA kits in KM rats, rats of the «0» strain, which was selected (based on F2 KM x Wistar hybrids) for the lack of seizures in response to a sound, and Wistar rats. **Results.** All KM rats developed AE seizures in response to a sound while no seizures were observed in rats of the «0» strain and Wistar rats. The increase in blood CS was observed only in KM rats at 30 min after AE seizure. At background, the level of CS was significantly higher in rats of the «0» strain, which did not develop seizures in response to a sound, than in KM and Wistar rats. CS levels remained unchanged in both «0» and Wistar rats after the sound exposure. **Conclusions.** The increase in blood CS occurred in KM rats at 30 min after the seizure episode. At background, the CS level was higher in rats of the «0» strain, which did not respond with seizures to a sound, than in Wistar and KM rats. Therefore, the blood level of CS depends in a complicated way on both AE and the selection history of the «0» rat strain.

**Key words:** audiogenic epilepsy, rat strains, corticosterone level, acoustic stress.

**For citation:** Fedotova I.B., Policarpova A.V., Perepelkina O.V., Nikolaev G.M., Smirnova O.V., Poletaeva I.I. [Blood corticosterone in rats with different susceptibility to audiogenic epilepsy]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(2): 64–67 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.64-67

**For correspondence:** Poletaeva Inga Igorevna, e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

**Funding.** Supported by RFBR, grant № 15-04-01732 and State program № НИОКР АААА-А16-116021660055-1.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 04.03.2018

## Введение

Аудиогенная эпилепсия (АЭ) грызунов (эпилептиформные судорожные припадки в ответ на сильный звук) широко используется как модель судорожных состояний человека, в частности, для оценки эффективности новых противосудорожных препаратов. Данное явление описано у крыс, мышей и хомяков лабораторных линий, и исследуется, в частности, на линиях, специально селективных на выраженность этого признака [1–5].

Предъявление сильного звука (звонок) или тона определенной частоты вызывает у животного сильное двигательное возбуждение (так называемый «клонический бег»), которое сменяется клоническими, а затем тоническими судорогами. Для описания феномена АЭ (и связанных с ней явлений в ЦНС) достаточно широко используют термин «акустический стресс», хотя прямым оценкам реакций системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники (НПА) и определения уровня кортикостерона (КС) в крови в ответ на действие звука у животных этих линий не проводили. Показано, однако, что у крыс линии WAR (Wistar Audiogenic Rats), селективной в Бразилии, обнаруживается более высокая реактивность оси НПА после таких воздействий, как введение 8 нг АКТГ и 15 мин обездвиживания (restrain stress). Реакция на эти воздействия — повышение уровня кортикостерона (КС) — была достоверно более интенсивной у крыс WAR, чем у контрольных крыс популяции Вистар, не обнаруживавших АЭ [6]. В то же время нет данных по возможным изменениям уровня КС у этих крыс при действии звука и развитии судорожного припадка АЭ, хотя изменения уровня КС в ответ на умеренный стрессор у животных других видов описаны [7].

Целью настоящей работы было определение уровня КС в крови крыс трех генотипов в фоне, сразу после действия звука, а также через 30 мин после звукового воздействия. Были использованы крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ) с высокой предрасположенностью к АЭ [5], крысы популяции Вистар (без АЭ) и крысы линии «0», селективной из гибридной популяции КМ/Вистар на отсутствие АЭ [8].

## Материалы и методы исследования

**Экспериментальные животные.** Данные получены суммарно по 36 крысам-самцам линий КМ, «0» и популяции Вистар. Из них было 12 крыс линии КМ (с максимальной интенсивностью АЭ); 12 крыс линии «0» (отсутствие припадка АЭ при троекратной экспозиции действию звука); 12 крыс популяции Вистар, также не обнаруживавших АЭ (исходно получены из питомника ИБХ «Пушино», разведение вивария биологического факультета ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова «Чашниково»). Все крысы были в возрасте около 4 месяцев ( $\pm 10$  дней), масса тела в среднем составляла 350 г.

Действие звука оценивали в прозрачной пластиковой звукоприглушающей камере со встроенным «аудиторным» звонком (сила звука 120 дБ).

Исследования проводились в соответствии с биоэтическими требованиями Декларации 2010 ЕС.

**Сбор образцов крови.** Уровень КС для каждого животного определяли в образцах сыворотки, полученной из крови, которую собирали при забое животного методом быстрого обезглавливания (гильотинный нож фирмы

Open Science. Москва, Россия). Кровь собирали в стерильные пробирки и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего инкубировали еще 20 минут при 4°C. Для лучшего отделения сыворотки образовавшийся сгусток крови отделяли от стенок пробирки тонкой стеклянной палочкой, после чего центрифугировали пробирки с кровью при 2500 об/мин в течение 15 минут. Готовую сыворотку переносили в чистую пробирку и хранили при -20°C до анализа.

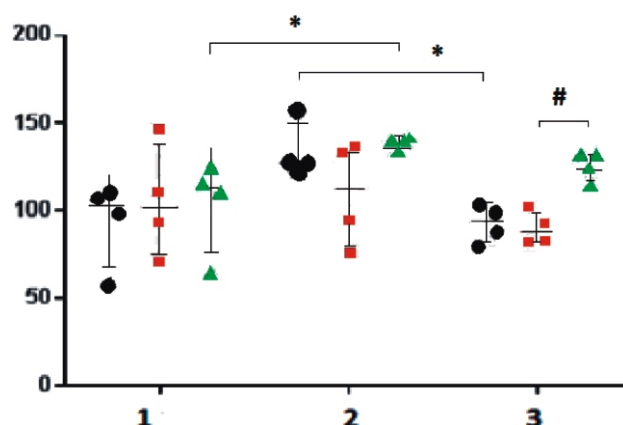
Уровень КС в образцах сыворотки крови определяли с помощью набора IBL International Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA kit, следуя предложенному производителем протоколу.

**Статистика.** Статистический анализ результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 6. Достоверность различий полученных величин уровня КС оценивали с помощью критерия Краскела—Уоллиса с поправкой на множественные сравнения. Различия при  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

## Результаты и обсуждение

Уровень КС в крови в «фоне», т.е. без предъявления звука, был достоверно ( $p < 0,05$ ) выше у крыс линии «0» по сравнению с линиями КМ и Вистар, у которых уровень КС был сходным. Также уровень КС достоверно не отличался у крыс линий КМ и Вистар при определении его сразу после воздействия звука (рисунок), и в период развития припадка с тоническими судорогами у крыс линии КМ. У крыс популяции Вистар судороги отсутствовали.

Через 30 мин после предъявления звука у крыс линии КМ уровень КС в крови был выше, чем в «фоне» и сразу после действия звука (в последнем случае — достоверно), что свидетельствует о развитии стресс-реакции у этих животных. Уровень КС у крыс линии «0» через 30 мин после действия звука не отличался от «фонового» и оставался выше относительно других групп. У крыс Вистар он также был сходным во всех трех условиях опыта. Отметим, что хотя аудиогенных припадков не было ни у крыс линии



Уровень кортикостерона в крови (ось ординат, нг/мл) у крыс 3 генотипов (1 — Вистар, 2 — линия «0», 3 — линия КМ, каждой точке соответствуют данные по отдельному животному, в группах по 4 крысы). Обозначения групп: черные кружки — фоновые значения, без действия звука, светло-серые квадраты — сразу после выключения звука, серые треугольники — через 30 мин. после выключения звука. \* — статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличается от крыс другой линии внутри одной группы, # — статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия между группами у крыс одной линии.

«0», ни у Вистар, у крыс линии «0», селективной из популяции гибридов между КМ и Вистар [8] КС был достоверно выше, чем у Вистар.

Настоящие результаты показали, что сразу (через 1—3 мин после действия звука) изменений в уровне КС не происходит, что согласуется с особенностями формирования реакции гипоталамо-гипофизарной оси у млекопитающих [7]. Несмотря на малый объем выборок, использованных в настоящей работе, можно видеть, что во всех трех условиях опыта (в фоне, сразу после действия звука и через 30 мин после него) разброс данных у крыс линии КМ был значительно ниже, чем у крыс линий Вистар и «0» (рисунок). Возможно, что причиной этого является высокая степень инбридинга линии КМ (более 50 поколений), который проводили в условиях строгой селекции на максимальную интенсивность аудиогенного судорожного припадка. Через 30 мин после действия звука изменения уровня КС были обнаружены только у крыс линии КМ (у которых в ответ на сильный звук были судороги). Ни у Вистар, ни у крыс линии «0» через 30 мин после действия звука изменений в уровне КС не произошло. Можно было бы связать отсроченное повышение уровня КС у крыс КМ с развитием у них аудиогенных судорог. Однако изначально высокий уровень КС у крыс линии «0» (нет судорог в ответ на звук) не позволяет сделать столь однозначный вывод. Линия крыс «0» поддерживается в режиме строгого отбора — в размножение (и в эксперименты) берутся животные, которые не обнаруживают признаков аудиогенной эпилепсии (даже клонического бега) после трехкратного тестирования, при том, что экспозиции звука даются с 5—7-дневными интервалами. Нельзя исключить, что такой критерий отбора и режим тестирования и является причиной хронически повышенного уровня КС (как коррелятивный признак при селекции). Возможно, что отсутствие изменений в уровне КС после действия звука у крыс «0», есть проявление именно высокой активности оси НРА.

Отметим также, что крысы, не обнаруживающие судорог в ответ на сильный звук (линия «0» и Вистар), отличаются друг от друга по уровню КС в сыворотке крови как в «фоне», так и через 30 мин (в этом случае — достоверно) после действия звука.

У крыс Вистар (по данным экспериментов 10—15 лет назад) примерно 15—20% крыс обнаруживали невысокий уровень предрасположенности к развитию аудиогенных судорожных припадков. В настоящее время крысы Вистар этот признак не обнаруживают в 100% случаев, что предположительно можно связать с переводом их в *spf* состояние в питомнике Пушино (который имел место несколько лет назад). Отметим, что у крыс двух групп, не дающих припадков в ответ на звук, «генетический фон» различается. Линия «0» — это потомки крыс, полученных от скрещивания первых поколений гибридов Вистар/КМ на родительскую линию КМ (с последующей селекцией на отсутствие судорог в ответ на звук). То есть, у крыс линии «0» есть определенная доля «генетического фона» линии КМ. Тот факт, что уровень КС в плазме крови у крыс линии «0» в фоне оказался выше, чем у крыс КМ (у которых он одинаков с таковым у крыс линии Вистар), свидетельствует о сложной системе определения этого признака и нуждается в дополнительных исследованиях. Можно также заключить, что отсутствие судорог в ответ на звук (характерное для крыс Вистар и «0») не связано с уровнем

КС в спокойном состоянии животных, поскольку сходные по отсутствию судорог животные достоверно различаются по этому признаку.

У крыс линии КМ (с интенсивной аудиогенной эпилепсией) через 30 мин после действия звука уровень КС был выше, что можно трактовать как развитие «стресс-реакции». Действие этого же «стрессора» (звука) на крыс линии «0» и крыс Вистар подобной реакции не вызвало.

Таким образом, уровень КС крови сложным образом зависит и от АЭ, и от истории селекции крыс на отсутствие АЭ.

## Выводы

1. Аудиогенный судорожный припадок у крыс КМ сопровождается развитием стресс-реакции, которая выявляется в виде повышения уровня кортикостерона в крови через 30 мин после воздействия. Сразу после судорог (через 1—3 мин) стресс-реакция не обнаруживается.

2. Крысы линии «0», селективные из гибридной популяции КМ/Вистар на отсутствие судорог в ответ на звук, обнаруживают достоверно более высокий фоновый уровень кортикостерона, чем у животных обеих родительских генетических групп, он не изменяется после действия звука.

## Список литературы

1. Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Поletaeva И.И. Крысы линии Крушинского-Молодкиной: исследование аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2006; 56 (3): 298-316.
2. Barrera-Bailon B., Oliveira J.A.C., Lopez D.E., Munoz L.J., Garcia-Cairasco N., Sancho C. Pharmacological and neuroethological study of the acute and chronic effects of lamotrigine in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy Behav.* 2017; 71(Pt B): 207-217. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.11.00
3. Garcia-Cairasco N., Umeoka E.H.L., Cortes de Oliveira J.A. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy Behav.* 2017; 71(Pt B): 250-273. DOI:10.1016/j.yebeh.2017.04.001
4. Munoz L.J., Carballosa-Gautam M.M., Yanowsky K., Garcia-Atares N., Lopez D.E. The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy Behav.* 2017; 71(Pt B): 181-192. DOI: 10.1016/j.yebeh.2016.03.002
5. Poletaeva I.I., Surina N.M., Kostina Z.A., Perepelkina O.V., Fedotova I.B. The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy Behav.* 2017; 71(Pt B): 130-141. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.04.072
6. Umeoka E.H.L., Garcia S.B., Antunes-Rodriguesa J., Eliaza L.L.K., Garcia-Cairasco N. Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. *Brain Res.* 2011; 1381: 141-147. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.01.042
7. Merlot E., Mounier A.M., Prunier A. Endocrine response of gilts to various common stressors: a comparison of indicators and methods of analysis. *Physiol. Behav.* 2011; 102 (3-4): 259-265. DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.11.009
8. Федотова И.Б., Костына З.А., Сурина Н.М., Поletaeva И.И. Селекция лабораторных крыс на признак «отсутствие предрасположенности к аудиогенной эпилепсии». *Генетика*. 2014; 48 (6), 685-691.

## References

1. Semiokhina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva I.I. [Rats of Krushinsky-Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, vascular pathology and behavior]. *Zhurnal vysshei nervnoi deyatel'nosti im. I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity]*. 2006. 56 (3): 298-316. (in Russian)



2. Barrera-Bailon B., Oliveira J.A.C., Lopez D.E., Munoz L.J., Garcia-Cairasco N., Sancho C. Pharmacological and neuroethological study of the acute and chronic effects of lamotrigine in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy Behav.* 2017; 71(Pt B): 207-217. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.11.00
3. Garcia-Cairasco N., Umeoka E.H.L., Cortes de Oliveira J.A. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy Behav.* 2017; 71(Pt B): 250-273. DOI:10.1016/j.yebeh.2017.04.001
4. Munoz L.J., Carballosa-Gautam M.M., Yanowsky K., Garcia-Atares N., Lopez D.E. The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy Behav.* 2017; 71(Pt B): 181-192. DOI: 10.1016/j.yebeh.2016.03.002
5. Poletaeva I.I., Surina N.M., Kostina Z.A., Perepelkina O.V., Fedotova I.B. The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65years. *Epilepsy Behav.* 2017; 71(Pt B): 130-141. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.04.072
6. Umeoka E.H.L., Garcia S.B., Antunes-Rodrigues J., Eliaza L.L.K., Garcia-Cairasco N. Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. *Brain Res.* 2011; 1381: 141-147. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.01.042
7. Merlot E., Mounier A.M., Prunier A. Endocrine response of gilts to various common stressors: a comparison of indicators and methods of analysis. *Physiol. Behav.* 2011; 102 (3-4): 259-265. DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.11.009
8. Fedotova I.B., Kostina Z.A., Surina N.M., Poletaeva I.I. [Laboratory rat selection for the trait «the absence of audiogenic seizure proneness»]. *Genetika [Genetics]*. 2014; 48 (6), 685-691. (in Russian)

#### **Сведения об авторах:**

**Федотова Ирина Борисовна** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Поликарпова Анна Вадимовна** — младший научный сотрудник лаборатории эндокринологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Перепелкина Ольга Викторовна** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Николаев Георгий Михайлович** — младший научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Смирнова Ольга Вячеславовна** — доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией эндокринологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Поletaева Инга Игоревна** — доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»