

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ПОЛОВЫЕ ОТЛИЧИЯ ПУЛА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ-НЕЙРОМЕДИАТОРОВ У КРЫС КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ

С.А. Кривопалов^{1,2}, Б.Г. Юшков^{1,3}, М.Ю. Быкова¹, К.Н. Забегалов²*

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,

620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106; *эл. почта: s.krivopalov@gmail.com

²Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,

620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

³Институт медицинских клеточных технологий, 620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а

Изучение роли нейромедиаторных систем в патогенезе эпилепсии – одно из приоритетных направлений эпилептологии. Новые данные о функциях свободных аминокислот-нейромедиаторов в центральной нервной системе имеют наибольшую значимость и определяют перспективы создания новых эффективных противосудорожных средств. В клинической медицине уже устоялось мнение о том, что эпилепсия имеет отчетливые половые особенности. Однако на сегодняшний день ещё не накоплено достаточно данных, подводящих под это представление биохимическую основу. Целью настоящих исследований было изучение половых отличий в содержании аминокислот-нейромедиаторов головного мозга у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ) – модели врожденной аудиогенной эпилепсии. Концентрации Asp, Glu, ГАМК, Gly и Tau определены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в продолговатом мозге, гиппокампе и коре больших полушарий. Биохимический анализ проведён для интактных крыс КМ – животных после серии эпилептиформных припадков – и контрольной группы линии Вистар. Результаты биохимического анализа свидетельствуют о том, что наряду с общими закономерностями распределения свободных аминокислот-нейромедиаторов в головном мозге, не зависящими ни от пола, ни от предрасположенности к судорогам, существуют отчетливые половые различия как у крыс Вистар, так и у КМ. Аудиогенная эпилепсия крыс КМ характеризуется сглаживанием как половых отличий, так и характерной для линии Вистар разницы между корой и продолговатым мозгом в содержании свободных аминокислот. Серия из шести ежедневных аудиостимуляций вызывает у самцов и самок КМ различные изменения концентраций свободных аминокислот в головном мозге. Изменения, наблюдаемые у самцов после припадков, носят общемозговой характер и проявляются в повышении концентрации ГАМК и падении уровня Gly (во всех отделах), снижении содержания Tau (в коре и гиппокампе). При этом в коре возрастает концентрация Glu и снижается уровень Asp. У самок же наблюдается повышение уровня Glu (во всех отделах), в гиппокампе возрастают концентрации Gly и Asp, при этом содержание ГАМК не изменяется. Таким образом, после серии эпилептиформных припадков у крыс КМ устанавливается новое устойчивое состояние пула исследуемых аминокислот, различное у самцов и самок. При этом характер половых отличий после перенесенных приступов существенно изменяется.

Ключевые слова: свободные аминокислоты; нейромедиаторы; мозг; половые отличия; аудиогенная эпилепсия

DOI: 10.18097/PBMC20206602124

ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике сформировалось чёткое представление об эпилепсии, как о заболевании, имеющем отчетливые половые особенности, находящие свое отражение в распространенности заболевания и особенностях проявлений психопатологического синдрома у мужчин и женщин.

В последнее время всё больше внимания уделяется изучению биохимических механизмов эпилептогенеза [1-4]. При этом особое место отводится нейромедиаторным системам, в частности роли свободных аминокислот, выполняющих функцию передачи сигнала [5-8]. Считается, что их содержание у здоровых животных существенно отличается в разных отделах головного мозга и характеризуется в каждом из них постоянством своего состава [9].

При развитии патологии характер распределения аминокислот в различных отделах мозга изменяется и, как правило, достигает иного равновесного состояния [10, 11]. При этом

наибольшие сдвиги концентраций характерны именно для тех аминокислот, которые выполняют функции нейротрансмиттеров.

Вместе с тем, накопленные данные о распределении аминокислот-нейромедиаторов в разных зонах мозга при эпилепсии нередко противоречивы и фрагментарны [2, 5, 7, 12].

Задача выявить половые отличия в концентрациях аминокислот-нейромедиаторов у крыс с аудиогенной эпилепсией ранее никем не ставилась, хотя существуют достаточные основания для разделения эпилептогенеза самцов и самок [13-15].

Целью работы было изучение половых отличий в содержании нейромедиаторов: возбуждающих (аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu)) аминокислот и тормозных (гамма-аминомасляной (ГАМК) кислоты, глицина (Gly) и таурина (Tau)) в продолговатом мозге, гиппокампе и коре больших полушарий у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ) – модели генетической аудиогенной эпилепсии.

МЕТОДИКА

Исследования выполнены на крысах линии КМ (массой 250-300 г, возраст 4-6 месяцев), полученных в рамках договора о сотрудничестве с лабораторией физиологии и генетики поведения кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Количественное определение аминокислот-нейромедиаторов в структурах головного мозга крыс линии КМ проводили после серии аудиостимуляций – по одной стимуляции в день, шесть дней подряд. Интактных животных той же линии использовали для выявления эффекта ежедневных провокаций припадка.

Предварительный отбор животных по интенсивности судорожного припадка не проводили, поскольку дизайн исследования предполагал измерение уровня аминокислот-нейромедиаторов и в интактном мозге крыс КМ. Вместе с тем, неоднородность популяции линейных животных по интенсивности индуцируемых судорог обусловила необходимость выбраковки части особей на начальных этапах эксперимента.

Выбраковку животных проводили с учётом родства особей и данных первой аудиостимуляции экспериментальной группы. Животных экспериментальной группы, обнаруживающих в ответ на звуковой раздражитель припадок менее 3 баллов по шкале Крушинского [16], исключали из опыта вместе со всеми крысами того же помёта, безотносительно их групповой принадлежности и силы припадка.

По итогам отбора были сформированы две группы крыс КМ по 7 самцов и 7 самок в каждой: интактная и экспериментальная (средний балл = 3,71). При этом животных из одного помёта распределяли в равных отношениях между группами (распределение закладывалось еще до выбраковки). В качестве контроля использовали 14 крыс линии Вистар, соответствующих первым двум группам по своим физиологическим параметрам (пол, возраст, вес).

Провокация эпилептиформных припадков

Провокацию эпилептиформных припадков проводили в специальном пластиковом контейнере размером 45×30×40 см. В качестве звукового стимула использовали классический раздражитель (звонок, интенсивность звука 100±2 дБ) [16]. Аудиостимуляцию прекращали в момент появления явных признаков клонико-тонических судорог. Животных интактной и контрольной групп аудиостимуляции не подвергали.

Крыс выводили из эксперимента на седьмой день исследований путём дислокации шейных позвонков и последующего обескровливания в состоянии полной анестезии (эфир для наркоза производства “Кузбассоргхим”, Россия). Все исследования проводили с соблюдением биоэтических норм.

Все животные от самого рождения до вывода из эксперимента находились в одинаковых условиях содержания на стандартном полнорационном корме.

Биохимический анализ пула свободных аминокислот-нейромедиаторов гиппокампа, фронтальной коры и продолговатого мозга

Отпрепарированные от цельного мозга гиппокамп, кору больших полушарий и продолговатый мозг помещали в морозильную камеру на 30 мин при температуре -80°C. Заморозку, а также последующую гомогенизацию материала, выполненную при комнатной температуре, проводили в одноразовой посуде. Выделенные отделы мозга гомогенизировали в 0,2 М хлорной кислоте, которую добавляли к образцам в массовом отношении 1:10. Полученный гомогенат центрифугировали при 13000 g в течение 15 мин при температуре 4°C. После фильтрации с использованием фильтра Millex (0,2 мкм) (“Millipore”, США) полученный супернатант хранили при -80°C.

Оборудование и реактивы

Количественное определение свободных аминокислот осуществляли методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В работе использовали стандарты аминокислот фирмы “Fluka” (Швейцария), дабсил хлорид (DABS-Cl) также предоставлен “Fluka”, остальные реактивы – отечественного производства (квалификации не ниже х.ч.). Все органические растворители, использованные для дабсилирования и ВЭЖХ-анализа были аналитического качества и поставлены “Panreac” (Испания). Экстракционные среды и подвижные фазы, а также растворы стандартов были приготовлены с использованием воды для ВЭЖХ, полученной при помощи системы очистки воды Millipore Milli-Q Integral 5 (“Millipore”).

Хроматографическая система состояла из насоса Smartline 1000 (“Knauer”, Германия), инжектора с петлёй объёмом 20 мкл, спектрофотометрического детектора K-2501 (“Knauer”).

Разделение свободных аминокислот проводили на колонке Luna 3u C18(2) 100A 150×4,6 мм (“Phenomenex”, США). Идентификацию и количественный анализ производили при помощи программы EuroChrom (“Knauer”) путём сравнения результатов анализа исследуемых объектов с калибровочной кривой смеси аминокислот на основе стандартной смеси физиологических аминокислот фирмы “Fluka”.

ВЭЖХ-анализ свободных аминокислот

ВЭЖХ-анализ свободных аминокислот проводили по методике Chang J. [17] и Syu K. [18] в модификации. Для дериватизации аминокислот 150 мкл супернатанта смешивали с 1,5 мл 0,2 М NaHCO₃ (pH 9,0) и 3 мл раствора дабсил хлорида (1,3 мг дабсил хлорида в 1 мл ацетонитрила). После нагревания при 70°C в течение 20 мин и последующего охлаждения к пробам добавляли 1,5 мл буфера для разведения образца (25 mM H₃PO₄ в смеси вода:ацетонитрил (90:10), pH 7,0). 20 мкл полученного образца вводили в колонку. Для хроматографического разделения

ПОЛОВЫЕ ОТЛИЧИЯ ПУЛА МЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ У КРЫС КМ

производных аминокислот готовили две подвижные фазы: 24 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 6,6 – ацетонитрил (82:18 по объёму) (элюент А) и ацетонитрил-пропанол-2 (40:60 по объёму) (элюент В). Разделение проводили в градиентном режиме при температуре колонки 45°C. Начальные условия составляли 95% элюент А и 5% элюент В, от 4 до 8 мин градиент изменяли к 20% элюента В, с 8 до 15 мин – к 25% элюента В, с 15 до 32 мин – к 60% элюента В, с 32 до 33 мин – к 100% элюента В, от 33 до 36 мин – 100% элюент В, с 36 до 37 мин – к 5% элюента В и оставляли так до следующей инъекции. Скорость потока подвижной фазы составляла 1,0 мл/мин. Детектирование осуществляли при длине волны 436 нм.

Статистическая обработка данных

Обработку данных выполняли с помощью пакета статистических программ STATISTICA 10. Вследствие не нормального распределения значений большинства показателей для оценки значимости различий между группами использовался непараметрический критерий Краскела-Уолиса (Kruskal-Wallis ANOVA). Множественные попарные сравнения средних рангов для всех групп проводили при помощи теста Данна (Dunn's test) в рамках апостериорных процедур непараметрического аналога дисперсионного анализа ($\alpha > 0,95$).

Таблица 1. Концентрации свободных аминокислот-нейромедиаторов в различных структурах головного мозга крыс линий Вистар и КМ (нмоль/г ткани)

СТРУКТУРА	САМКИ		САМЦЫ	
	Вистар	КМ	Вистар	КМ
ASP				
Кора	747,43±58,22 ^{#^}	1401,37±200,16 ^{*^}	2511,41±421,66 ^{1#^}	2074,49±364,36 [^]
Гиппокамп	359,98±40,27 [#]	423,67±43,39 [#]	1441,11±283,42 ^{1#}	397,72±36,5 [#]
Продолговатый мозг	2188,58±401,59	1326,31±111,89	8940,76±797,26 ¹	2662,54±285,07 ^{*1}
GLU				
Кора	302,45±80,49 [^]	275,91±31,4 [^]	784,93±159,12 ^{1^}	87,26±15,52 ^{*1#}
Гиппокамп	69,67±8,26 [#]	64,1±7,78 [#]	185,41±40,95 ^{1#}	153,87±43,64 [#]
Продолговатый мозг	322,28±53,62	488,74±111,52	535,22±51,55 ¹	798,59±223,11
GLY				
Кора	32,43±6,81 ^{#^}	56,09±7,65 [^]	84,43±31,87 ^{#^}	263,4±48,82 ^{*1#^}
Гиппокамп	10,11±1,79 [#]	6,54±0,87 ^{*#}	15,43±2,87 [#]	10,89±2,2 [#]
Продолговатый мозг	73,52±10,39	77,44±8,54	221,16±18,85 ¹	107,44±20,98 [*]
ГАМК				
Кора	1335,03±319,01 [^]	732,35±123,67 [^]	1495,61±439,19 ^{#^}	315,1±47,08 ^{*1#}
Гиппокамп	191,72±51,41 [#]	226,51±44,4 [#]	435,58±58,71 ^{1#}	234,96±50,62 ^{*#}
Продолговатый мозг	1100,46±314,4	1024,52±185,47	3240,57±367,56 ¹	1680,58±254,1 [*]
TAU				
Кора	392,66±79,04 ^{#^}	122,12±21,04 ^{*^}	128±28,76 ^{1#}	627,83±123,89 ^{*1#^}
Гиппокамп	31,25±5,72 [#]	41,73±6,53 [#]	86,24±20,35 ^{1#}	56,7±11,88 [#]
Продолговатый мозг	193,1±46,18	175,54±33,79	623,45±94,34 ¹	152,79±33,47 [*]

Примечание. Здесь и в таблице 2 символом * обозначены достоверные отличия от соответствующей группы крыс Вистар; ! – половые отличия; # – отличия от продолговатого мозга; ^ – отличия от гиппокампа ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что независимо от линии и пола животных минимальные концентрации большинства изученных аминокислот отмечаются в гиппокампе, а максимальные – в продолговатом мозге и коре больших полушарий (табл. 1).

При этом, как у крыс Вистар, так и у крыс КМ прослеживаются отчётливые половые отличия распределения свободных аминокислот-нейромедиаторов в различных отделах мозга.

Так, у самцов Вистар концентрация Asp и Glu во всех исследованных отделах мозга выше, чем у самок. Более высокие концентрации ГАМК и Tau у самцов этой линии выявлены в гиппокампе и продолговатом мозге, а Gly – только в продолговатом мозге.

Единственной для Вистар зоной мозга, где концентрация свободной кислоты (Tau) определялась выше у самок, чем у самцов, была кора больших полушарий.

Характер распределения аминокислот по исследуемым зонам у самцов и самок Вистар имеет схожие черты: концентрации Asp и Gly имеют самые высокие значения в продолговатом мозге, меньшие – в коре, а минимальные – в гиппокампе.

В коре определяются более высокие, по сравнению с гиппокампом, значения Glu (на уровне продолговатого мозга).

Половые различия в распределении аминокислот у Вистар касаются двух аминокислот, обладающих тормозным эффектом. Так, концентрации ГАМК в коре у самок находятся на сравнительно высоком уровне – близком к значениям продолговатого мозга, а Tau – даже выше, чем в продолговатом мозге. Для самцов, напротив, характерны, более низкие значения ГАМК и Tau в коре – существенно ниже, чем в продолговатом мозге.

У крыс линии КМ половые различия в содержании свободных аминокислот выражены слабее в гиппокампе и продолговатом мозге. Повышенное (по сравнению с самками) содержание Asp у самцов КМ характерно только для продолговатого мозга, а Glu – для гиппокампа.

Что касается коры, то половых отличий здесь у КМ больше: по сравнению с самками, у самцов ниже концентрация ГАМК и выше уровень свободных Glu и Tau. В последнем случае выявленная закономерность прямо противоположна таковой у Вистар.

Половые различия в распределении свободных аминокислот-нейромедиаторов по зонам мозга у крыс КМ также имеют ряд особенностей, которые отличают их от крыс Вистар. Так, для самок КМ характерны равновысокие концентрации уже всех изученных соединений (а не только Glu и ГАМК) в коре и продолговатом мозге, оставаясь при этом выше, чем в гиппокампе.

Таблица 2. Концентрации свободных аминокислот-нейромедиаторов в различных структурах головного мозга крыс линии КМ после серии аудиогенных судорожных припадков (нмоль/г ткани)

СТРУКТУРА	САМКИ		САМЦЫ	
	интактные	после судорог	интактные	после судорог
ASP				
Кора	1401,37±200,16 [^]	1401,52±447,99	2074,49±364,36 ^{1^}	596,57±205,64 ^{*#}
Гиппокамп	423,67±43,39 [#]	919,39±228,91 [*]	397,72±36,5 [#]	350,61±39,69 [#]
Продолговатый мозг	1326,31±111,89	2028,33±512,94	2662,54±285,07	2364,16±572,01
GLU				
Кора	275,91±31,4 [^]	637±114,1 [*]	87,26±15,52 ^{1#}	439,69±130,4 ^{1*^}
Гиппокамп	64,1±7,78 [#]	394,16±126,11 ^{*#}	153,87±43,64 [#]	73,42±11,17 ^{1#}
Продолговатый мозг	488,74±111,52	1036,26±150,06 [*]	798,59±223,11	513,67±113,1
GLY				
Кора	56,09±7,65 [^]	46,88±13,68	263,4±48,82 ^{1#^}	64,25±16,89 ^{*#^}
Гиппокамп	6,54±0,87 [#]	17,39±2,31 ^{*#}	10,89±2,2 [#]	6,49±1,09 ^{1#}
Продолговатый мозг	77,44±8,54	80,81±13,67	107,44±20,98	134,67±18,59
ГАМК				
Кора	732,35±123,67 [^]	900,93±212,07 [^]	315,1±47,08 ^{1#}	1165,93±335,93 ^{*^}
Гиппокамп	226,51±44,4 [#]	143,78±48,34 [#]	234,96±50,62 [#]	137,73±39,82 [#]
Продолговатый мозг	1024,52±185,47	1072±211,35	1680,58±254,1	1376,54±182,57
TAU				
Кора	122,12±21,04 [^]	190,32±49,83 [^]	627,83±123,89 ^{1#^}	213,88±71,81 ^{*^}
Гиппокамп	41,73±6,53 [#]	35,19±11,68 [#]	56,7±11,88 [#]	37,37±1,7 [#]
Продолговатый мозг	175,54±33,79	187,29±38,47	152,79±33,47	156,75±48,08

Уровень свободных Glu и ГАМК в коре у самцов КМ снижен и соответствует гиппокампу. Концентрации остальных аминокислот, наоборот, высоки и находятся на уровне продолговатого мозга (Asp) или даже его превосходят (Glu и Tau).

После серии аудиогенных припадков в коре у самцов повышаются уровни Glu, ГАМК и понижаются – Asp, Gly и Tau, в то время как у самок растёт уровень свободного Glu во всех отделах мозга и возрастает концентрация Asp и Gly в гиппокампе (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Чрезвычайно быстрый метаболизм, присущий головному мозгу, а также высокий уровень специфичности транспортных систем нейромедиаторов дают основания полагать, что после серии эпилептиформных припадков у крыс КМ устанавливается новое устойчивое состояние пула исследуемых аминокислот.

Вероятно, устойчивые сдвиги в соотношении свободных аминокислот-нейромедиаторов происходят у крыс КМ уже после первого перенесённого припадка в жизни, определяя изменения в поведении и характере последующих рефлекторных судорог [14].

Выявленные особенности распределения свободных аминокислот в головном мозге самцов в целом согласуются с данными других исследователей, указывая на дисбаланс между ГАМК, Gly и Tau [19, 20]. Однако характер этого распределения у самцов и самок существенно отличается.

Половые различия наблюдаются как у линии Вистар, так и у произошедшей из нее линии КМ, хотя и не столь резкие. В последнем случае характер этих отличий существенно изменяется после серии ежедневных провокаций припадков.

Эффекты регулярных судорог хотя и обнаруживаются во всех исследуемых зонах головного мозга, также имеют половую специфику, затрагивая у самцов только кору больших полушарий, а у самок – преимущественно гиппокамп.

Совокупность изменений в коре, обнаруженных после припадков у самцов и включающих увеличение концентрации свободной Glu (имеет чрезвычайно важное значение в энергетическом обеспечении головного мозга, вызывает спонтанную деполяризацию) и снижение концентрации Glu (повышение судорожной готовности) и Tau, по всей видимости, свидетельствует о формировании вторичного очага эпилептической активности [21, 22]. В таком случае понижение концентрации свободной Asp и увеличение уровня ГАМК можно расценивать как компенсаторную реакцию ГАМК-ергической системы в ответ на спровоцированное систематическое повышение интенсивности нервных процессов в коре [7].

У самок, отличающихся более низкой по сравнению с самцами исходной концентрацией Glu (снижает судорожную готовность), формирования вторичного эпилептического очага за время эксперимента не происходит. Повышенное содержание Glu во всех зонах после серии припадков и отсутствие реакции со стороны ГАМК-ергической системы могут являться следствием феномена распространяющейся депрессии [23, 24].

Недостаточность ГАМК-ергической системы и, наоборот, избыточная функция глутаматергической системы рассматриваются в настоящее время в качестве основной причины повышения судорожной готовности мозга при аудиогенной эпилепсии у крыс [5-7]. Полученные данные свидетельствуют, что вышеуказанные системы у разнополых животных дают различные ответы на одно и то же воздействие (режим фоностимуляций). Так, у самцов все изменения носят локальный характер, а у самок затрагивают все исследуемые зоны, но обуславливаются, в основном, ответом со стороны глутаматергической системы.

Столь разные реакции самцов и самок, предположительно, определяются различиями в исходной организации нервных процессов, установившейся в онтогенезе ещё до начала ежедневных предъявлений стимула. Для более глубокой интерпретации данных требуется проведение специальных исследований, направленных на изучение феномена созревания мозга, когда под действием ГАМК происходит формирование путей передачи сигналов [21].

Нарушение функций ГАМК-ергической системы в период созревания мозга часто обусловлены генетически и могут вызывать различные неврологические заболевания, в том числе эпилепсию [25]. Вероятно, у крыс, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам, также

имеет место нарушение организации процессов созревания мозга. Об этом косвенно свидетельствуют повышенное количество ГАМК-ергических нейронов в нижнем двухолмий новорожденных крысят линии GEPR [26] и сниженная чувствительность ГАМК-бензодиазепиновых рецепторов в мозжечке и теменной коре крыс КМ [27].

В таком случае, выявленные половые отличия исходного распределения свободных аминокислот-нейромедиаторов у крыс КМ могут быть обусловлены модулирующим действием (усиление и пролонгация эффекта) эстрадиола на функцию ГАМК в раннем постнатальном периоде [15].

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания Института иммунологии и физиологии УрО РАН (ИИФ УрО РАН) (Регистрационный номер НИОКТР №АААА-А18-118020590108-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные процедуры проведены в соответствии с требованиями Директивы Европейского Союза 2010/10/63 EU, одобрены этическим комитетом ИИФ УрО РАН и отвечают нормам, установленным приказом МЗ РФ №267 от 19.06.2003.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nomura S., Inoue T., Imoto H., Suehiro E., Maruta Y., Hirayama Y., Suzuki M. (2017) *Epilepsia*, **58**(4), 627-634.
2. Werner F.-M., Coveñas R. (2017) *Epilepsy & Behavior*, **71**, 124-129.
3. Akramova D. (2017) *J. Neurol. Sci.*, **381**, 333-333.
4. Feng H.J., Faingold C.L. (2017) *Epilepsy & Behavior*, **71**(Pt B), 174-180.
5. de Sarro G., Russo E., Citraro R., Meldrum B.S. (2017) *Epilepsy & Behavior*, **71**, 165-173.
6. Ribak C.E. (2017) *Epilepsy & Behavior*, **71**, 160-164.
7. Poletaeva I.I., Surina N.M., Kostina Z.A., Perepelkina O.V., Fedotova I.B. (2017) *Epilepsy & Behavior*, **71**, 130-141.
8. Westmark C.J. (2018) *J. Nutrition*, **148**(3), 307-308.
9. Walls A.B., Waagepetersen H.S., Bak L.K., Schousboe A., Sonnewald U. (2015) *Neurochem. Re.*, **40**(2), 402-409.
10. Cooper A.J.L., Jeitner T.M. (2016) *Biomolecules*, **6**(2), 16, DOI: UNSP 1610.3390/biom6020016
11. Adriana P.M.L., Alcira R.M.B., Jatziri C.G.I., Roberto Z.H.S., Luis C.P.J., Berenice S.H.K., Griselda M.T.J. (2018) *Epilepsy Res.*, **140**, 111-119.
12. Garcia-Cairasco N., Umeoka E.H.L., de Oliveira J.A.C. (2017) *Epilepsy & Behavior*, **71**, 250-273.
13. Кривопалов С.А., Юшков Б.Г. (2015) Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова, **65**(6), 756-765. [Krivopalov S.A., Yushkov B.G. (2015) *JVND*, **65**(6), 756-765.]

14. Кривопалов С.А., Юшков Б.Г. (2018) Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова, **68**(5), 637-645. [Krivopalov S.A., Yushkov B.G. (2018) JVND, **68**(5), 637-645.]
15. Bassani S., Cwetsch A.W., Gerosa L., Serratto G.M., Folci A., Hall I.F., Mazzanti M., Cancedda L., Passafaro M. (2018) Human Molecular Genetics, DOI: 10.1093/hmg/ddy019
16. Крушинский Л.В. (1960) Формирование поведения животных в норме и патологии, Изд-во Моск. ун-та, М. [Krushinskij L.V. (1960) Formirovanie povedeniya zhivotnyh v norme i patologii, Izd-vo Mosk. un-ta, M.]
17. Chang J.-Y., Knecht R., Braun D.G. (1981) Biochem. J., **199**(3), 547-555.
18. Syu K.-Y., Lin C.-L., Huang H.-C., Lin J.-K. (2008) J. Agric. Food Chem., **56**(17), 7637-7643.
19. Раевский К., Башкатова В., Косачева Е., Кудрин В., Семюхина А., Федотова И. (1998) Нейрохимия, **15**(3), 281-285. [Raevskij K., Bashkatova V., Kosacheva E., Kudrin V., Semioxina A., Fedotova I. (1998) Neurokhimiya, **15**(3), 281-285.]
20. Onodera K., Tuomisto L., Tacke U., Airaksinen M. (1992) Met. Find. Exper. Clin. Pharmacol., **14**(1), 13-16.
21. Лесик О., Жаднов В. (2017) Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова, **25**(1). [Lesik O., Zhadnov V. (2017) I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald, **25**(1).] DOI: 10.23888/PAVLOVJ20171118-132
22. Vinogradova L.V. (2017) Epilepsy & Behavior, **71**, 142-153.
23. Lener M.S., Niciu M.J., Ballard E.D., Park M., Park L.T., Nugent A.C., Zarate C.A. (2017) Biological Psychiatry, **81**(10), 886-897.
24. Kanner A.M. (2017) Neurochem. Res., **42**(7), 2071-2076.
25. Bozzi Y., Casarosa S., Caleo M. (2012) Front. Psychiatry, **3**, 19.
26. Roberts R.C., Kim H.L., Ribak C.E. (1985) Developmental Brain Res., **23**(2), 277-281.
27. Жулин В., Плескачева М. (1991) Нейрохимия, **10**(1-2), 10-17. [Zhulin V., Pleskacheva M. (1991) Neurokhimiya, **10**(1-2), 10-17.]

Поступила в редакцию: 13. 03. 2019.
После доработки: 06. 02. 2020.
Принята к печати: 11. 02. 2020.

GENDER DIFFERENCES IN THE POOL OF FREE AMINO ACID NEUROTRANSMITTERS IN KRUSHINSKY-MOLODKINA RATS

S.A. Krivopalov^{1,2*}, B.G. Yushkov^{1,3}, M.Yu. Bykova¹, K.N. Zabegalov²

¹Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS,
106 Pervomaiskaya str., Yekaterinburg, 620049 Russia; *e-mail: s.krivopalov@gmail.com

²Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin,
19 Mira str., Yekaterinburg, 620002 Russia

³Institute of Medical Cell Technologies,
22a Karla Marksa str., Yekaterinburg, 620026 Russia

The study of the role of neurotransmitter systems in the pathogenesis of epilepsy is one of the priorities of epileptology. New data on the functions of free neurotransmitter-like amino acid in the central nervous system are of the greatest importance and determine the prospects for the development of novel effective anticonvulsants. It is widely believed in clinical medicine that epilepsy has distinct gender characteristics. The aim of this study was to investigate the gender peculiarities in the content of neurotransmitter amino acids in the brain of Krushinsky-Molodkina (KM) rats, which were used as model organisms for the study of genetically induced audiogenic epilepsy. The content of Asp, Glu, GABA, Gly, and Tau of the medulla oblongata, hippocampus and cerebral cortex were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) in intact KM rats, KM rats exposed to a series of epileptiform seizures, and Wistar rats (control group). Both the Wistar and KM rats had gender distinctions in the distribution of free amino acids among the investigated brain parts. The audiogenic epilepsy was characterized by smoothing gender differences as well as differences between the concentrations of free amino acids in the cortex and medulla oblongata, specific for Wistar rats. The changes observed in male rats after the set of seizures included the increase in GABA concentration and a decrease in the Gly level in all investigated brain parts, as well as the decrease of the Tau content in the cortex and hippocampus. At the same time, the Glu content in cortex increased, while the Asp level decreased. After 6 days of audiogenic stimulations the female KM rats demonstrated the increase in the Glu level in all investigated brain parts, the increase in Gly and Asp levels in hippocampus, and no changes in the GABA content. Thus, after the set of epileptiform seizures the KM rats achieved a new steady state of the studied amino acids pool, which differed in males and females. In this case, gender differences significantly changed after the seizures.

Key words: free amino acids; neurotransmitters; brain; gender differences; audiogenic epilepsy

Funding. The work was performed within the framework of the state task of the IIF UB RAS (Registration number AAAA-A18-118020590108-7).

Received: 13.03.2019, revised: 06.02.2020, accepted: 11.02.2010.