

УДК 616-092.9

ВЛИЯНИЕ ТИОПЕРАМИДА, ОБРАТНОГО АГОНИСТА H₃ ГИСТАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ, НА РАЗРЯДЫ ПИК-ВОЛНА КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij

Самотаева И.С.

*Учреждение Российской академии наук
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
samotaeva_irina@mail.ru*

Крысы линии WAG/Rij являются генетической моделью absence-эпилепсии человека. Основным показателем неконвульсивной, absence-эпилепсии, является наличие на электроэнцефалограмме спонтанно возникающих генерализованных пик-волновых разрядов. Было определено изменение количества пик-волновых разрядов и средней длительности одиночного разряда крыс WAG/Rij под влиянием тиоперамида (5, 20 мг/кг), обратного агониста H₃ гистаминергических ауторецепторов.

Ключевые слова: гистамин, тиоперамид, пик-волновая активность.

Гистамин (ГА) долгое время после своего открытия (сэр Генри Дэйл, 1910 г.) привлекал внимание исследователей в связи с аллергическими реакциями и воспалением. И только ближе к концу 20-го века было показано существование и распределение гистамин-содержащих нейронов в мозге [3]. Тела гистаминовых нейронов расположены в гипоталамусе, в так называемом туберомамиллярном ядре, а их проекции расходятся практически во все отделы ЦНС. Считается, что ГА нейромодуляторная система принимает участие в регуляции спонтанной локомоторной активности, циркадного ритма цикла сон-бодрствование и общей активации ЦНС (arousal). Гистамин осуществляет свои функции с помощью воздействия на постсинаптические H₁- и H₂-рецепторы. Существуют также H₃-рецепторы, которые являются ауторецепторами и регулируют синтез и вы-

свобождение гистамина, находясь на телах и отростках ГА нейронов [1]. Обратный агонист H₃ ауторецепторов, например, тиоперамид, стабилизирует рецептор в неактивном состоянии, снижая, таким образом, его спонтанную (конституционную) активность, что приводит к увеличению синтеза и высвобождения нейронального гистамина. Все большее количество литературных данных свидетельствует о том, что гистаминергическая система мозга играет важную роль в патогенезе различных типов эпилептических припадков. Так, увеличение уровня ГА за счет введения его предшественника L-гистидина или тиоперамида приводит к снижению уровня эпилептической активности, вызванной максимальным электрошоком либо амигдалярным/пентилентетразоловым киндлингом [6]. С другой стороны, альфа-флуорометилгистидин, который явля-

ется ингибитором гистидиндекарбоксилазы и приводит к снижению уровня гистамина в ЦНС, вызывает усиление конвульсивных припадков. Большинство работ, посвященных изучению роли гистаминергической системы в патогенезе судорожной активности, проведены на различных моделях конвульсивной эпилепсии. В то же время об эффектах воздействия на ГА систему при неконвульсивной эпилепсии известно крайне мало [8]. Крысы линии WAG/Rij представляют генетическую модель absence-эпилепсии, неконвульсивной формы эпилепсии человека [2]. Для ЭЭГ крыс WAG/Rij характерны спонтанно возникающие генерализованные пик-волновые разряды (SWD), которые являются основным показателем absence-эпилепсии. Пик-волновые разряды возникают преимущественно во время спокойного бодрствования, переходов от бодрствования ко сну, а также во время начальной фазы медленноволнового сна [2]. Значительно реже SWD встречаются в периоды активного бодрствования и глубокого медленноволнового сна. Известно, что длительность отдельных фаз цикла сон-бодрствование может изменяться под воздействием гистаминергических препаратов [3]. Исходя из этого, представляется вероятным участие ГА системы в регуляции пик-волновой активности absence-эпилепсии крыс WAG/Rij. Целью данной работы было оценить влияние активации ГА системы на уровень SWD и поведение крыс WAG/Rij. В качестве фармакологического агента, активирующего гистами-

новую систему, был использован тиоперамид, который, в соответствии с литературными данными, значительно повышает уровень внеклеточного ГА и обладает антиконвульсивным действием.

Методика

Работа выполнена на самцах крыс линии WAG/Rij ($n = 12$, $m = 360 \pm 18$ г), привезенных из Нидерландов (Radboud University, Nijmegen) и с 1995г. разводимых в виварии ИВНД и НФ РАН. В свободное от экспериментов время животные содержались в стандартных условиях вивария при неограниченном доступе к пище и воде.

Для регистрации ЭЭГ крысам под наркозом (400 мг/кг хлоралгидрат внутривентриально, 2 % новокаин подкожно для местного обезболивания) были вживлены электроды, представляющие собой стальные микровинты. Винты размещались над лобными, височными и затылочными областями коры. Референтный электрод располагался над мозжечком. Восстановительный послеоперационный период составлял как минимум 10 дней. Перед началом экспериментов крыс приучали к экспериментальной камере в течение 3-х дней. Тиоперамид (Thiopamide maleate, Tocris Bioscience) в дозе 5 мг/кг ($n=6$) и 20 мг/кг ($n=6$) вводили внутривентриально. В качестве контроля использовали физраствор (0,9 % NaCl, 1 мл). Запись ЭЭГ производили в течение 1 часа до инъекции и 2-х часов после. Для регистрации и анализа ЭЭГ использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3 (Dmitry Yu. Izmailov, 2002-2007). В ходе ана-

лиза осуществляли подсчет количества и определение средней длительности пик-волновых разрядов за 30-ти минутные интервалы.

Одновременно с регистрацией ЭЭГ осуществлялась видеозапись (DCR-DVD7E, Sony Corporation) поведения крыс WAG/Rij с целью оценки возможного влияния тиоперамида на уровень активности животных. После каждого эксперимента видеозаписи копировались на персональный компьютер для последующего анализа. Для анализа поведения был использован, с некоторыми изменениями, метод, описанный в работе Kitanaka и соавторов (2005) [7]. А именно, видеозапись разбивалась на 10-секундные интервалы, и тому типу поведения, которое преобладало в данный 10-секундный интервал, присваивалось значение «1», а остальным «0». Количество единиц для каждого поведения суммировалось за 30-минутные периоды в течение 1 часа до и 2-х часов после введения тиоперамида либо физраствора. Типы поведения, о которых идет речь, были следующие: локомоторная активность (перемещение всех четырех лап), принюхивание (возможны перемещения двух лап), умывание, спокойное бодрствование (периоды неподвижности) либо сон. Отдельно подсчитывалось количество стоек.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения STATISTICA 6.0. Сравнение средних величин различных показателей проводили по критерию Стьюдента. Кроме

того, использовали дисперсионный анализ (ANOVA).

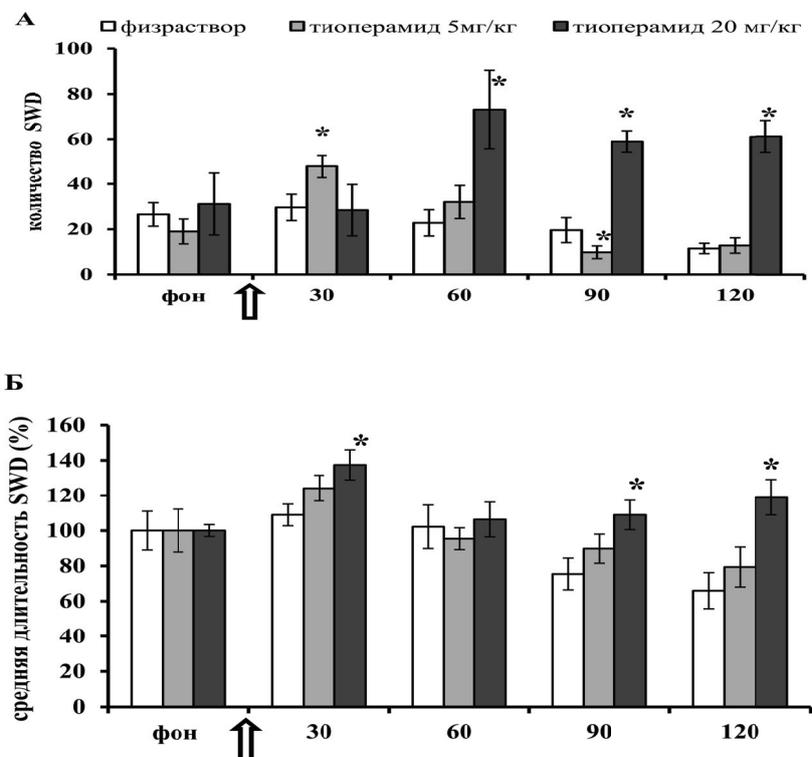
Результаты исследований

Введение тиоперамида вызвало значительное увеличение количества разрядов пик-волна. При этом время начала усиления SWD и длительность усиления зависели от дозы тиоперамида (5, 20 мг/кг). После введения тиоперамида в дозе 5 мг/кг максимальное увеличение количества SWD наблюдалось в течение первых 30-ти минут (277 ± 29 % от уровня в фоне; $p < 0,01$). Затем следовало постепенное снижение количества разрядов пик-волна. В третий 30-минутный интервал их уровень снизился ниже фонового (57 ± 16 %; $p < 0,05$). Максимальное усиление SWD под влиянием более высокой дозы тиоперамида (20 мг/кг) количественно не превосходило (238 ± 52 %; $p < 0,05$) усиления после низкой дозы (5 мг/кг) и возникало позже по сравнению с последним, а именно, в течение второго 30-минутного интервала после инъекции. Повышение количества разрядов после 20 мг/кг сохранялось в течение всего второго часа после введения ($p < 0,05$). Изменений в структуре и частотной характеристике разрядов установлено не было. В контрольных экспериментах уровень SWD существенно не отличался от уровня в фоновой записи (рисунок А).

Кроме повышения количества пик-волновых разрядов, введение тиоперамида привело также к увеличению средней длительности одиночного SWD (рисунок Б). Однако статистически значимым ($p < 0,05$)

этот эффект был только под влиянием более высокой дозы тиоперамида (20 мг/кг). Контрольное введение не вызвало существенного изменения средней длительности SWD. Более подробный анализ показал, что увеличение средней длительности разряда пик-волна после тиоперамида происходило за счет снижения доли SWD длительностью 1-3 секунды и одновременного увеличения доли SWD длительностью 3-5 секунд в общем количестве разрядов.

В отличие от пик-волновой активности поведение крыс WAG/Rij под влиянием тиоперамида (5, 20 мг/кг) практически не изменилось. Наблюдалось только небольшое увеличение суммарного времени спокойного бодрствования и сна после введения тиоперамида (5мг/кг) по сравнению с физраствором (таблица). Однако данное отличие было значимым только в третий 30-минутный период после инъекции.



*Изменение спонтанной пик-волновой активности крыс WAG/Rij под влиянием тиоперамида. А — изменение количества пик-волновых разрядов. Количество разрядов в фоне представлено усредненными величинами за два последовательных 30-ти минутных интервала. Б — изменение средней длительности одиночного пик-волнового разряда. За 100 % принята средняя длительность одиночного SWD в фоне. В каждой группе n=6. По оси абсцисс: время записи ЭЭГ в минутах. Стрелкой отмечено введение тиоперамида либо физраствора. Данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего (\pm SEM). * — $p < 0,05$ (по сравнению с физраствором).*

Изменение суммарного времени спокойного бодрствования и сна после введения тиоперамида

интервалы времени после введения (мин)	физраствор	тиоперамид 5 мг/кг		тиоперамид 20 мг/кг
0-30	91 ± 9	114 ± 3	$p=0,08$	100 ± 8
30-60	123 ± 2	132 ± 6		125 ± 1
60-90	131 ± 6	147 ± 2	$p=0,04$	136 ± 3
90-120	142 ± 5	140 ± 6		137 ± 3

Количество 10-ти секундных интервалов, преобладающим поведением для которых было спокойное бодрствование или сон. Подсчет количества интервалов производился за 30-ти минутные отрезки времени. В каждой группе $n=6$. Отличия (значимые и на уровне тенденции) между группами тиоперамида (5 мг/кг) и физраствора отмечены в таблице. Данные приведены в виде средних величин ± стандартная ошибка среднего ($\pm SEM$).

Обсуждение результатов

Тиоперамид, известным действием которого является увеличение уровня внеклеточного гистамина [6], вызвал усиление пик-волновой активности absence-эпилепсии крыс WAG/Rij. При этом увеличение количества разрядов под влиянием низкой дозы (5 мг/кг) происходило в первые 30 минут после введения и было сравнительно кратким, тогда как тиоперамид в дозе 20 мг/кг привел к более позднему (вторые 30 минут), но и более длительному увеличению SWD. Под воздействием тиоперамида увеличилась также средняя длительность одиночного разряда.

Усиление пик-волновых разрядов крыс WAG/Rij, наблюдаемое в данных экспериментах, не соответствует антиэпилептическому эффекту тиоперамида, заявленному в работах других авторов, проведенных на разных моделях конвульсивной

эпилепсии [6]. Интересно, что далеко не все антиконвульсанты эффективны при неконвульсивной форме эпилепсии. Так, карбамазепин и фенитоин, успешно подавляющие конвульсивные припадки, вызывают усиление разрядов пик-волна absence-эпилепсии [2]. Различное действие антиконвульсантов, предположительно, определяется той ролью, которую осуществляет основная тормозная, ГАМК-ергическая, система мозга при каждой из двух форм эпилепсии. Считается, что при конвульсивной эпилепсии ГАМК-система гипоактивна. Это приводит в дисбалансу тормозной и возбуждающей (глутамат) систем ЦНС и способствует развитию судорог. С другой стороны, при неконвульсивной, absence-эпилепсии, препараты, усиливающие ГАМК опосредованное торможение, в основном, вызывают увеличение количества пик-волновых разрядов [2]. Это при-

водит к предположению о гиперфункции ГАМК при неконвульсивной эпилепсии. Многими авторами высказывается гипотеза о том, что антиконвульсивный эффект гистамина связан со стимуляцией высвобождения ГАМК через H_1 рецепторы [5]. Кроме того, гистамин является лигандом аллостерического сайта на бета-субъединице ГАМК-А рецептора и потенцирует действие ГАМК [10]. Таким образом, эффект тиоперамида, выражающийся в подавлении конвульсивных приступов, в сообщениях других авторов, и усилении пиковых разрядов крыс WAG/Rij в данной работе, может быть, по крайней мере отчасти, следствием усиления ГАМК-ергической трансмиссии.

Механизм антиконвульсивного действия гистамина также может быть связан с его общим активирующим действием в ЦНС (arousal). Nishida и соавторы (2007) [9] показали, что стимуляция туберомамиллярного ядра электрическими импульсами вызывает повышение уровня гистамина во фронтальной коре, десинхронизацию ЭЭГ (arousal) и подавление эпилептических припадков, вызванных пентилентетразолом, у крыс. В другой работе нокаутирование по гену H_1 рецептора привело к снижению количества эпизодов кратких пробуждений, но не общей длительности медленноволнового сна у мышей [4]. Это, по мнению авторов, говорит о том, что физиологическая роль H_1 рецепторов состоит не в регуляции длительности фаз циркадного ритма, а в

контроле перехода от медленноволнового сна к бодрствованию. Вероятность возникновения приступов absence-эпилепсии зависит от уровня бодрствования. Наибольшее количество приступов наблюдается при переходных состояниях от бодрствования ко сну и во время первой фазы медленноволнового сна [2]. Отсюда следует, что наблюдаемое в настоящей работе увеличение количества разрядов пик-волна крыс WAG/Rij после введения тиоперамида может отражать влияние повышенного уровня гистамина на вероятность перехода от одной фазы циркадного ритма к другой.

Более низкая доза (5 мг/кг) тиоперамида вызвала увеличение количества SWD быстрее, чем высокая (рис. А). Различная динамика изменения SWD в зависимости от дозы тиоперамида говорит о возможности вовлечения в регуляцию пик-волновых разрядов не только H_3 ауторецепторов, но и H_3 гетерорецепторов, расположенных пресинаптически на нейронах других модуляторных систем мозга и влияющих на высвобождение дофамина, норадреналина и серотонина [3]. Другими словами, изменение пик-волновой активности крыс WAG/Rij после инъекции тиоперамида может быть результатом комплексного воздействия обратного агониста H_3 рецепторов на функционирование моноаминергических систем ЦНС.

Тиоперамид вызвал также увеличение средней длительности одиночного SWD (рис. Б), которая наряду с количеством раз-

рядов характеризует уровень пик-волновой активности. Статистически значимым этот эффект был только после 20 мг/кг тиоперамида, причем и в течение первых 30 минут после введения, когда количество разрядов существенно не отличалось от уровня в контрольной группе. Следовательно, усиление SWD под влиянием высокой дозы тиоперамида происходило уже в первый 30-минутный интервал, но не за счет количества, а за счет увеличения средней длительности пик-волнового разряда. Это возможно, поскольку количество и средняя длительность разрядов регулируются различными механизмами [2].

Поведение крыс WAG/Rij практически не изменилось после введения тиоперамида. Было отмечено только небольшое увеличение времени спокойного бодрствования и сна (Таблица 1) под влиянием низкой дозы препарата (5 мг/кг). По некоторым литературным данным, тиоперамид вызывает усиление локомоторной активности, что, однако, не подтверждается в других работах [3]. Указанное несоответствие, возможно, объясняется различием доз тиоперамида, вида животных, используемых в эксперименте, и экспериментальных условий.

Заключение

Результаты данной работы позволяют заключить, что гистаминергическая система мозга принимает участие в регуляции пик-волновых разрядов крыс линии WAG/Rij, генетической модели absence-эпилепсии человека. Введение обратного

агониста H₃ гистаминовых рецепторов, тиоперамида, известным действием которого является увеличение уровня внеклеточного гистамина, приводит к усилению пик-волновой активности в ЭЭГ крыс WAG/Rij. Сложная динамика изменения неконвульсивной эпилептической активности под влиянием тиоперамида говорит о возможном влиянии не только гистамина, но и других моноаминов, а также ГАМК, высвобождение которых пресинаптически регулируют H₃ гетерорецепторы. Дальнейшие исследования необходимы для установления роли H₁, H₂ и H₃ рецепторов, а также взаимодействия гистаминергической с другими медиаторными системами мозга при регуляции спонтанных пик-волновых разрядов absence-эпилепсии.

Список литературы

1. Arrang J.M., Garbarg M., Schwartz J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor // *Nature*. 1983. Vol. 302. P. 832–837.
2. Coenen A.M.L., van Luijckelaar E.L.J.M. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats // *Behavioural Genetics*. 2003. Vol. 33. P. 635–655.
3. Haas H.L., Sergeeva O.A., Selbach O. Histamine in the nervous system // *Physiol Rev*. 2008. Vol. 88. № 3. P. 1183–1241.
4. Huang Z.L., Mochizuki T., Qu W.M., Hong Z.Y., Watanabe T., Urade Y., Hayaishi O. Altered sleep-wake characteristics and lack of arousal response to H₃ receptor antagonist in histamine H₁ receptor knockout mice // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. Vol. 103. P. 4687–4692.

5. Ishizawa K., Chen Z., Okuma C., Sugimoto Y., Fujii Y., Kamei C. Participation of GABAergic and histaminergic systems in inhibiting amygdaloid kindled seizures // *Jpn J Pharmacol.* 2000. Vol. 82. № 1. P. 48-53.
6. Kamei C. Involvement of central histamine in amygdaloid kindled seizures in rats // *Behav Brain Res.* 2001. Vol. 124. P. 243–250.
7. Kitanaka J., Kitanaka N., Tatsuta T., Takemura M. 2-Phenylethylamine in combination with *l*-deprenyl lowers the striatal level of dopamine and prolongs the duration of the stereotypy in mice // *Pharmacol Biochem Behav.* 2005. Vol. 82. P. 488–494.
8. Midzyanovskaya I., Kopilov M., Fedotova E., Kuznetsova G., Tuomisto L. Dual effect of pyrilmine on absence seizures in WAG/Rij rats // *Inflamm Res.* 2005. Vol. 54. (Suppl. 1). S. 40-41.
9. Nishida N., Huang Z.L., Mikuni N., Miura Y., Urade Y., Hashimoto N. Deep brain stimulation of the posterior hypothalamus activates the histaminergic system to exert antiepileptic effect in rat pentylenetetrazol model // *Exp Neurol.* 2007. Vol. 205. № 1. P. 132-144.
10. Saras A., Gisselmann G., Vogt-Eisele A.K., Erlkamp K.S., Kletke O., Pusch H., Hatt H. Histamine action on vertebrate GABAA receptors: direct channel gating and potentiation of GABA responses // *J Biol Chem.* 2008. Vol. 283. № 16. P. 10470-10475.

EFFECT OF THIOPERAMIDE, AN INVERSE AGONIST OF H₃ HISTAMINE RECEPTORS, ON SPIKE AND WAVE DISCHARGES IN WAG/Rij RATS

Samotaeva I.S.

*Establishment of the Russian Academy of Sciences
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology
samotaeva_irina@mail.ru*

**WAG/Rij rat strain represents a genetic model of human absence epilepsy. Spontaneously occurring generalized spike-wave discharges (SWD) recorded in electroencephalogram are the main hallmark of absence epilepsy. The changes in the amount of spike-wave discharges and mean duration of a single SWD were assessed after administration of thio-
preamide (5, 20 mg/kg) which is an inverse agonist of H₃ histamine autoreceptors.**

Keywords: histamine, tioperamid, peak-wave activity.