

ВЛИЯНИЕ ИНТРАЦЕРЕБРОВЕНТРИКУЛЯРНОГО ВВЕДЕНИЯ АТФ НА УРОВЕНЬ ПОСТОЯННОГО ПОТЕНЦИАЛА И МЕДЛЕННУЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА

Г. З. Суфианова¹, А. А. Суфианов², А. Г. Шапкин¹

Исследованы центральные электрофизиологические эффекты интрацеребровентрикулярного введения раствора аденозинтрифосфата (АТФ). Работа выполнена на здоровых беспородных крысах-самцах массой 180 – 220 г. Показано, что интрацеребровентрикулярная инъекция 0,05 мл 1 % раствора АТФ сопровождается первоначальным негативным сдвигом уровня постоянного потенциала (УПП) коры большого мозга и увеличением амплитуды медленной электрической активности, преимущественно за счет медленноволнового диапазона, с последующим стабильным позитивным сдвигом постоянного потенциала до $(7,25 \pm 0,68)$ мВ и восстановлением суммарной амплитуды ЭЭГ до исходного уровня. Введение раствора АТФ вызывает позитивные сдвиги УПП спинного мозга на $(3,37 \pm 0,39)$ мВ и соответствующее снижение амплитуды электромиограммы на $(13,01 \pm 2,23)$ %. Совокупность полученных нейрофизиологических данных свидетельствует о развитии на фоне интрацеребровентрикулярного введения АТФ в структурах ЦНС состояния торможения по гиперполяризационному типу, что предполагает наличие у этого вещества потенциальной нейропротекторной активности.

Ключевые слова: аденозинтрифосфат; уровень постоянного потенциала; электроэнцефалограмма; электромиограмма; спинной мозг.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений в терапии повреждений нервной системы является применение агонистов пуриновых рецепторов [2, 3, 5, 11]. С лечебной целью аналоги аденозина используют при мышечной дистрофии, спазме периферических сосудов, хронической коронарной недостаточности и миокардиодистрофии, а также в анестезиологии при проведении так называемой “аденозиновой аналгезии” [1, 11]. Широкое клиническое использование аналогов аденозина, в частности, препаратов аденозинтрифосфата (АТФ), как нейропротекторных препаратов ограничено в связи с отсутствием прямых нейрофизиологических данных об их влиянии на функциональное состояние нервной ткани.

Цель исследования — изучение влияния интрацеребровентрикулярного введения аденозинтрифосфата на спонтанную биоэлектрическую активность головного и спинного мозга в эксперименте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 46 здоровых беспородных крысах-самцах массой 180 – 220 г. Опыты осуществляли согласно “Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приказ

Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Все инвазивные процедуры проводили под адекватным обезболиванием этаминал-натрием (40 мг/кг внутривенно). Были выполнены 2 серии экспериментов. В первой серии (N = 26) изучали изменения медленной электрической активности и уровня постоянного потенциала (УПП) коры большого мозга и спинного мозга при интрацеребровентрикулярном введении 1 % раствора натриевой соли аденозин-5'-трифосфорной кислоты (АТФ) (ГП “Львовдиалек”, Украина), рН раствора 7,0 – 7,3. Препарат вводили интрацеребровентрикулярно в объеме 0,05 мл. В контрольной, второй группе (N = 20), животным вводили 0,9 % физиологический раствор NaCl в объеме 0,05 мл, рН раствора 7,0 – 7,4. Использовали только изоосмотические растворы АТФ и NaCl. Для оценки функционального состояния головного и спинного мозга использовали одновременную регистрацию медленной электрической активности (электроэнцефалограмма (ЭЭГ) и электромиограмма (ЭМГ)) как показателя функциональной активности, и УПП, отражающего уровень поляризации нервной ткани. Запись электрофизиологических показателей осуществляли непрерывно после стабилизации электрограммы, не ранее чем через 20 мин после начала исследования. После введения препарата регистрацию биоэлектрической активности осуществляли в течение 30 мин. Регистрацию биоэлектрической активности проводили по униполярной методике с помощью 8-канального усилителя постоянного тока с входным сопротивлением 100 МОм. Полученные данные оцифровывали с частотой 200 Гц и вводили в

¹ ГБОУ ВПО Тюменская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, Россия, 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 54; e-mail: sufarm@mail.ru

² ФГБУ “Федеральный центр нейрохирургии” Министерства здравоохранения РФ, Россия, 625032, Тюмень, ул. 4 км Червишевского тракта, д. 5; e-mail: sufianov@mail.ru

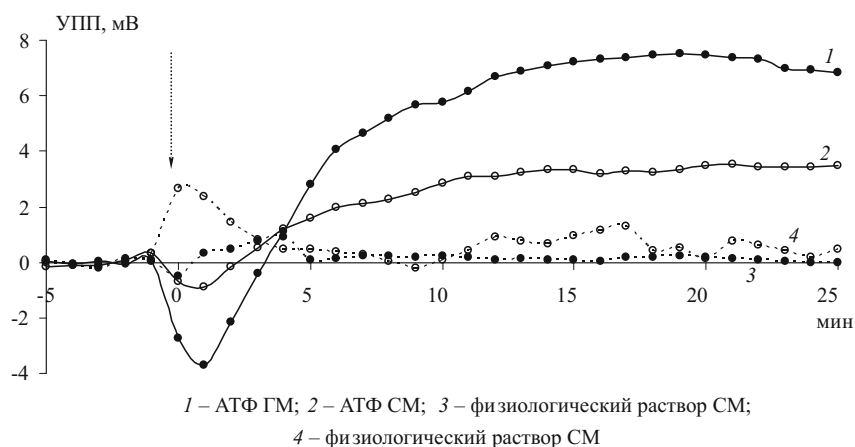


Рис. 1. Изменение уровня постоянного потенциала головного и спинного мозга в контрольной и основной группах. График изменения УПП: 1) головного мозга при введении 1 % раствора АТФ; 2) спинного мозга при введении 1 % раствора АТФ; 3) головного мозга при введении физиологического раствора (0,9 % NaCl); 4) спинного мозга при введении физиологического раствора (0,9 % NaCl).

компьютер для дальнейшей математической обработки. Электроды для исследования биоэлектрической активности головного мозга располагали эпидурально в симметричных точках в проекции лобных и теменных долей. Электроды для регистрации активности спинного мозга располагали на уровнях Th8, Th10, Th12 и L2. Учитывая однонаправленный характер изменений, функциональное состояние спинного и головного мозга оценивали путем усреднения биоэлектрических параметров по всем отведениям соответствующего отдела ЦНС. Построение амплитудного спектра ЭЭГ и ЭСГ осуществляли с помощью алгоритма быстрого преобразования Фурье с использованием стандартных функций Matlab. Эпохи анализа данным методом составляли 1 с. Для математической обработки брали только безартефактные участки. Значения амплитуд-

ного спектра усредняли по 5 частотным диапазонам: дельта-1 (0,5 – 0,78 Гц), дельта-2 (0,78 – 3,88 Гц), тета (3,88 – 7,75 Гц), альфа (7,75 – 12,4 Гц) и бета (12,4 – 32,6 Гц). Суммарную амплитуду медленной электрической активности рассчитывали путем усреднения амплитуд всего диапазона анализируемых частот.

Статистическую и математическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ MS Office 2003 и Matlab 7. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали параметрический критерий t Стьюдента и непараметрический критерий U Уилкоксона — Манна — Уитни. Результаты представлены в виде $(M \pm m)$, где M — среднее арифметическое, а m — ошибка средней. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

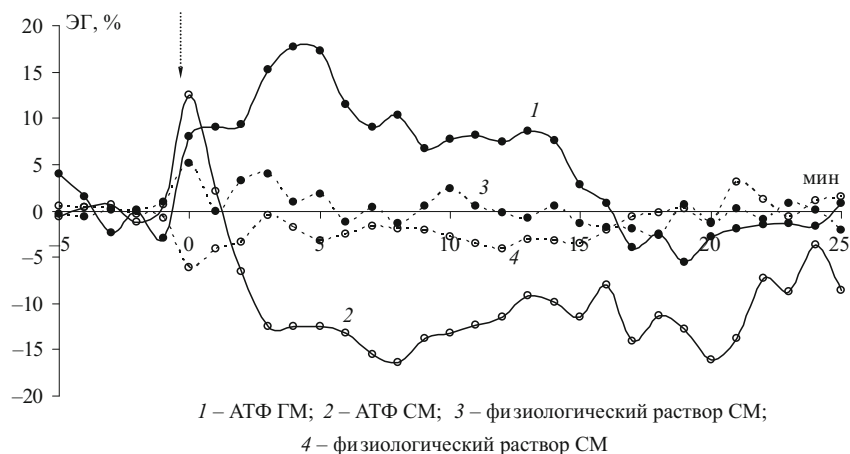


Рис. 2. Изменение суммарной амплитуды электрической активности головного и спинного мозга в контрольной и основной экспериментальной группах. График изменения: 1) электрической активности (ЭЭГ) головного мозга при введении 1 % раствора АТФ; 2) электрической активности (ЭСГ) спинного (ЭСГ) мозга при введении 1 % раствора АТФ; 3) электрической активности (ЭЭГ) головного мозга при введении физиологического раствора (0,9 % NaCl); 4) график изменения электрической активности (ЭСГ) спинного мозга при введении физиологического раствора (0,9 % NaCl).

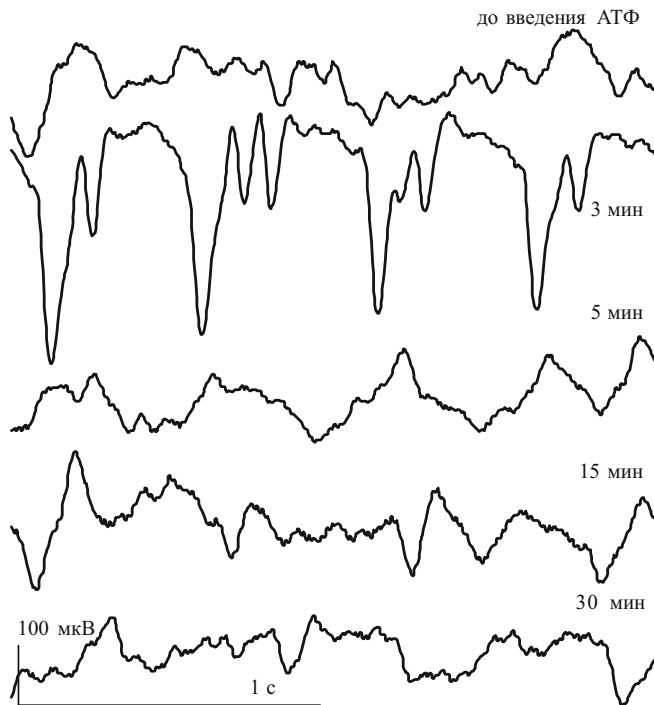


Рис. 3. Изменение формы ЭЭГ при интрацеребровентрикулярном введении АТФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При интрацеребровентрикулярном введении физиологического раствора у контрольных животных отмечалась тенденция к кратковременному увеличению суммарной амплитуды ЭЭГ и снижению амплитуды ЭСГ на 3–5 % без существенного преобладания того или иного частотного диапазона. Это сопровождалось позитивным сдвигом УПП головного мозга на 1–1,5 мВ. Через 3–5 мин регистрации ЭЭГ электрофизиологические параметры в этой группе не отличались от исходного значения (рис. 1, 2).

Интрацеребровентрикулярное введение 0,05 мл 1 % раствора АТФ вызывало кратковременные негативные сдвиги УПП на 2–5 мВ во всех отведениях коры большого мозга (рис. 1). Визуально в этот период наблюдалось общее возбуждение животного, увеличение двигательной активности. В последующем отмечалось постепенное угнетение двигательной активности и проявление гипногенного эффекта АТФ, однако состояние полного сна экспериментальных животных не наблюдали. Через 3–5 мин после введения препарата регистрировали постепенное увеличение поляризации нервной ткани, более выраженное в отделах коры, близких к месту инъекции. Максимальные позитивные изменения УПП были зарегистрированы на 10–15 мин исследования. Через 15–25 мин после введения препарата суммарно по всем отделам коры головного мозга УПП был стабильно позитивнее исходного уровня на $(7,25 \pm 0,68)$ мВ ($p < 0,01$) (таблица).

Изменения ЭЭГ характеризовались первоначальным увеличением амплитуды на 10–25 % с последующим снижением на 15 мин исследования до исходного уровня (рис. 3). Подобные изменения медленной электрической активности практически не зависели от расстояния до места инъекции. В первые 5 мин на фоне негативных сдвигов УПП отмечалось статистически значимое увеличение амплитуды дельта-1 ритма на $(22,07 \pm 9,45)$ % ($p < 0,05$) и снижение амплитуды тета ритма на $(13,34 \pm 0,04)$ % ($p < 0,01$), (рис. 1).

Через 5–15 мин, во время переходного периода изменений УПП, суммарная амплитуда ЭЭГ была достоверно выше исходного уровня на $(9,42 \pm 4,16)$ % ($p < 0,05$), однако эти изменения не отличались от предыдущего уровня. В этот период отмечалась тенденция к снижению мощности дельта-1 диапазона, который оставался значимо выше исходного значения ($p < 0,05$), и увеличивалась амплитуда дельта-2 ритма на $(16,24 \pm 4,33)$ % от исходного уровня ($p < 0,001$). Амплитуда тета-ритма оставалась ниже доинъекционного периода ($p < 0,001$), (таблица).

Период стабилизации УПП (15–25 мин исследования) характеризовался восстановлением амплитуды ритмов ЭЭГ. Значимые изменения в этот период зарегистрированы только в тета-диапазоне, амплитуда которого оставалась ниже исходной на $(12,68 \pm 2,42)$ % ($p < 0,01$).

Таким образом, интрацеребровентрикулярная инъекция 0,05 мл 1 % раствора АТФ сопровождается первоначальной негативизацией УПП и увеличением медленной электрической активности коры большого мозга преимущественно за счет медленноволнового диапазона с последующей стабильной позитивизацией постоянного потенциала на уровне $(7,25 \pm 0,68)$ мВ и восстановлением суммарной амплитуды ЭЭГ до исходного уровня.

Изменения УПП спинного мозга при интрацеребровентрикулярном введении АТФ были подобны изменениям потенциала в коре (рис. 1), однако эти изменения выражены значимо меньше.

В первые 5 мин отмечалось более кратковременная тенденция к негативизации постоянного потенциала до 1 мВ. Стабильные позитивные изменения УПП на 15–25 мин составили только $(3,37 \pm 0,39)$ мВ ($p < 0,01$ к исходному уровню). Электроотрицательные сдвиги УПП в первые 5 мин исследования сопровождались тенденцией к увеличению мощности ритмов на 10–15 % (рис. 2). С 5 мин исследования отмечалось стабильное снижение суммарной амплитуды ЭСГ на $(13,01 \pm 2,23)$ % ($p < 0,005$ к исходному уровню). Подобные изменения наблюдались практически во всех частотных диапазонах (таблица). Изменения ЭСГ не только не соответствовали, но и значимо отличались от изменений амплитуды медленной электрической активности в коре головного мозга.

Изменения амплитуды ритмов ЭЭГ, ЭСГ (мкВ) и УПП головного и спинного мозга (мВ) при интрацеребровентрикулярном введении АТФ

Время, мин	дельта-1	дельта-2	тета	альфа	бета	Средняя амплитуда	УПП, мВ
Головной мозг							
До введения АТФ	149,97 ± 5,19	91,46 ± 2,12	43,68 ± 0,91	20,54 ± 0,37	5,11 ± 0,17	62,15 ± 1,59	0,00 ± 0,05
0 – 5	183,06 ± 14,17 ^a	101,16 ± 6,49	37,85 ± 1,71 ^b	19,80 ± 0,75	5,68 ± 0,31	69,51 ± 4,55	-1,58 ± 1,33
5 – 15	169,39 ± 7,64 ^a	106,31 ± 3,96 ^b	38,85 ± 1,13 ^b	20,10 ± 0,51	5,38 ± 0,19	68,01 ± 2,59 ^a	5,49 ± 0,85 ^{b**}
15 – 25	148,16 ± 6,52 [*]	94,20 ± 3,17 ^{**}	38,14 ± 1,06 ^b	20,52 ± 0,44	4,90 ± 0,18 [*]	61,18 ± 2,18 [*]	7,25 ± 0,68 ^b
Спинальный мозг							
До введения АТФ	118,73 ± 5,98	57,76 ± 2,22	31,49 ± 0,80	14,79 ± 0,44	3,83 ± 0,13	45,32 ± 1,73	0,00 ± 0,06
0 – 5	116,20 ± 7,03	54,56 ± 2,00	30,44 ± 0,86	13,76 ± 0,42 ^a	3,59 ± 0,11	43,71 ± 1,83	-0,02 ± 0,33
5 – 15	99,17 ± 3,68 ^{b*}	52,20 ± 1,35 ^a	29,50 ± 0,52 ^a	12,85 ± 0,24 ^{b*}	3,40 ± 0,07 ^b	39,42 ± 1,01 ^{a*}	2,60 ± 0,34 ^{b** #}
15 – 25	101,09 ± 3,84 ^b	54,27 ± 1,32	29,32 ± 0,49 ^a	13,92 ± 0,34 ^{b**}	3,54 ± 0,07 ^a	40,43 ± 1,05 ^a	3,37 ± 0,40 ^{b #}

^a $p < 0,05$, ^b — $p < 0,01$ (относительно исходного уровня и контрольной группы); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (относительно предыдущего уровня).
$p < 0,01$ (в сравнении с аналогичными изменениями в головном мозге).

Таким образом, интрацеребровентрикулярное введение раствора АТФ вызывало позитивизацию УПП спинного мозга на ($3,37 \pm 0,39$) мВ и соответствующее снижение амплитуды ЭСГ на ($13,01 \pm 2,23$) %. Эти изменения значительно отличались от подобных в коре большого мозга.

По данным литературы, механизмы действия АТФ могут быть связаны с активацией специфических P1 и P2 рецепторов на мембране нервных клеток. Стимуляция ионотропных P2X рецепторов в ЦНС способствует выбросу возбуждающих нейромедиаторов и активации нервной ткани, что приводит к усилению болевых стимулов и увеличивает повреждение нервной ткани [5, 6, 8, 10, 12]. С другой стороны, активация метаболитных P2Y рецепторов сопровождается развитием торможения в структурах нервной системы. Возможно участие этих рецепторов в угнетении болевой импульсации [9, 15] и потенциальном нейропротекторном эффекте пуринов. При этом защитный эффект при активации P2Y рецепторов может быть связан со снижением выброса глутамата из терминалей нейронов, блокадой Ca^{2+} каналов в спинном мозге [7, 13] и подавлением глутаматной эксайтотоксичности [13, 14]. Вторичные эффекты АТФ связаны с ферментной деградацией до аденозина, действующего через P1 рецепторы [7, 8]. Наблюдаемые изменения биоэлектрической активности отражают развитие в структурах головного и спинного мозга первоначального состояния активации, вероятно, связанного со стимуляцией ионотропных P2X рецепторов, с последующим формированием состояния по типу гиперполяризационного торможения, вероятно, вследствие активации метаболитных P2Y и A1 аденозиновых рецепторов [2, 4]. При этом изменение электрической активности спинного мозга на фоне интрацеребровентрикулярного введения АТФ может быть связано как с непосредственным влиянием этого препарата на нервную ткань

спинного мозга, так и с изменением функционального состояния головного мозга, что объясняет более быстрое и более выраженное снижение амплитуды электромиограммы в сравнении с аналогичными изменениями в коре большого мозга на фоне менее выраженных сдвигов УПП.

ВЫВОДЫ

1. Интрацеребровентрикулярное введение АТФ сопровождается первоначальным электроотрицательным сдвигом УПП до 1 – 2 мВ и увеличением суммарной биоэлектрической активности спинного и головного мозга с последующим электропозитивным сдвигом УПП до 5 – 7 мВ и угнетением суммарной биоэлектрической активности нервной ткани.

2. Совокупность полученных нейрофизиологических данных свидетельствует о развитии на фоне интрацеребровентрикулярного введения АТФ в структурах ЦНС состояния торможения по гиперполяризационному типу, что предполагает наличие у этого препарата потенциальной нейропротекторной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. В. Лебедев, *Дис. канд. мед. наук*, Москва (2007).
2. Г. З. Суфианова, *Дис. докт. мед. наук*, Иркутск (2003).
3. Г. З. Суфианова, А. А. Суфианов, А. Г. Шапкин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, №Б/ЮЗ, 13 – 18 (2013).
4. А. Г. Шапкин, *Дис. канд. мед. наук*, Новосибирск (2005).
5. G. Burnstock, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **986**, 1 – 12 (2013).
6. G. Burnstock, B. B. Fredholm, A. Verkhratsky, *Curr. Top. Med. Chem.*, **11**(8), 973 – 1011 (2011).
7. H. Franke, U. Krügel, P. Illes, *Pflugers Arch.*, **452**(5), 622 – 644 (2006).
8. P. Illes, J. A. Ribeiro, *Eur. J. Pharmacol.*, **483**(1), 5 – 17 (2004).
9. C. Kennedy, T. S. Assis, A. J. Currie, et al., *J. Physiol.*, **553**(3), 683 – 694 (2003).
10. B. S. Khakh, R. A. North, *Neuron*, **4**, **76**(1), 51 – 69 (2012).
11. L. V. Lopes, A. M. Sebastiao, J. A. Ribeiro, *Curr. Top. Med. Chem.*, **11**(8), 1087 – 1101 (2011).

12. N. Matsumoto, M. Sorimachi, N. Akaike, *Brain Res.*, **1009**(1–2), 234–237 (2004).
13. G. A. Weisman, D. Ajit, R. Garrad, et al., *Purinergic Signal.*, **8**(3), 559–578 (2012).
14. S. Ortinau, B. Laube, H. Zimmermann, *J. Neurosci.*, **23**, 4996–5003 (2003).
15. J. Tu, L. P. Wang, *Neurosci. Bul.*, **25**(1), 27–32 (2009).

Поступила 19.01.15

INFLUENCE OF INTRACEREBROVENTRICULAR ATP ADMINISTRATION ON THE DC POTENTIAL AND SLOW ELECTRICAL ACTIVITY OF BRAIN AND SPINAL CORD

G. Z. Sufianova^{1*}, A. A. Sufianov², and A. G. Shapkin¹

¹ Tyumen State Medical University, ul. Odesskaya 54, Tyumen, 625023 Russia;

² Federal Center for Neurosurgery, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. 4 km Chervishevskii Trakt 5, Tyumen, 625023 Russia;

The central electrophysiological effects of intracerebroventricular (i.c.v.) administration of 1% solution of adenosine triphosphate (ATP) have been studied on a group of 46 male rats weighing 180–220 g. It is established that i.c.v. injection of 0.05 mL of 1% ATP solution is accompanied by the initial negative DC potential shifts in the cerebral cortex and increase in the EEG amplitude (mainly in the slow-wave range), followed by stable positive shift of the DC potential to 7.25 ± 0.68 mV and recovery of the total EEG amplitude to baseline. The i.c.v. administration of 0.05 mL of 1% ATP solution causes positive DC potential shift in spinal cord by 3.37 ± 0.39 mV and corresponding decrease in the electrospinogram amplitude by $13.01 \pm 2.23\%$. The total set of these neurophysiological data is indicative of the development of inhibition state according to the hyperpolarization mechanism in the CNS structures (on the background of i.c.v. administration of ATP), which suggests that this drug possesses a potential neuroprotective activity.

Keywords: adenosine triphosphate; DC potential; electroencephalogram; electrospinogram; spinal cord.