

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ГАМК-ПОЗИТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ФОНОВУЮ И ВЫЗВАННУЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ РАЗДРАЖЕНИЕМ ВЕРХНЕГО САГИТТАЛЬНОГО СИНУСА АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ КАУДАЛЬНОГО ЯДРА ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА КРЫСЫ

А. Ю. Соколов¹, А. В. Амелин¹, Ю. Д. Игнатов¹, С. С. Пантелеев²

Высокая эффективность ГАМК-позитивных препаратов в превентивном и abortивном лечении мигрени и кластерной головной боли доказана в многочисленных клинических исследованиях. Вместе с тем механизмы их действия при цефалгиях остаются неясными из-за малого количества исследований на экспериментальных моделях головной боли. В острых экспериментах на крысах изучено влияние баклофена (2,5; 5; 10 и 15 мг/кг, в вену) и вальпроата (25; 50; 100 и 200 мг/кг, в вену) на фоновую и вызванную электрическим раздражением верхнего сагиттального синуса активность нейронов спинального ядра тройничного нерва. Показано, что вальпроат и баклофен дозозависимо угнетают фоновую и вызванную активность нейронов тройничного комплекса, определено участие ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов в реализации этого эффекта. Полученные результаты могут являться экспериментальным объяснением клинической эффективности ГАМК-позитивных препаратов при сосудистых головных болях.

Ключевые слова: мигрень, краниоваскулярная боль, тройничный комплекс, нейрональная активность, ГАМК, баклофен, вальпроат

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возрос интерес клиницистов к использованию ГАМК-ергических препаратов для лечения первичных головных болей. Многочисленные клинические исследования свидетельствуют о высокой эффективности ингибитора ГАМК-трансаминазы вальпроата и ГАМК_B-миметика баклофена как в профилактике, так и при купировании приступов мигрени и кластерных головных болей [5, 7, 12]. Однако механизмы действия этих препаратов остаются мало изученными. Для исследования фармакодинамики лекарственных средств, используемых при лечении цефалгий, предложен ряд экспериментальных моделей, в частности, модель краниоваскулярной боли, основанная на тригемино-васкулярной теории патогенеза мигрени [1].

Целью настоящей работы явилось изучение на модели краниоваскулярной боли влияния баклофена и вальпроата на активность нейронов каудального ядра тройничного нерва и оценка роли разных подтипов ГАМК-рецепторов в реализации эффектов указанных веществ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 65 наркотизированных уретаном (ICN, США, 1,2–1,5 г/кг, внутривенно) крысах линии Вистар массой 250–400 г. В целом условия содержания и использование животных в эксперименте соответствовали требованиям GLP и находились под контролем Этического комитета СПбГМУ. Для введения препаратов и регистрации артериального давления катетеризировали, соответственно, бедренную вену и артерию. После трахеостомии животное помещали в стереотаксический аппарат (“Медикор”, Венгрия). Для экспозиции твердой мозговой оболочки проводили краниотомию в теменной области. Для доступа к верхним сегментам спинного мозга выполняли ламинэктомию на уровне первого шейного позвонка с последующим удалением мозговых оболочек. После внутривенного введения тубокурарина (2–3 мг/кг) животное переводили на ИВЛ (модернизированный аппарат ВИТА-1, Россия) с частотой дыхательных движений 75–100 в мин и объемом 2–4 мл. На протяжении всего эксперимента среднее артериальное давление поддерживали в пределах 70–110 мм рт. ст. Температуру тела животного контролировали ректальным термометром и поддерживали на уровне 37–38 °С с помощью специальной подогревающей подставки и водяного термостата (U-10, Германия). Регистрацию нейрональной активности проводили внеклеточно с помощью вольфрамовых микроэлектродов с диаметром кончика 5 мкм и

¹ Институт фармакологии им. А. В. Вальдмана Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8.

² Лаборатория кортико-висцеральной физиологии (зав. — С. С. Пантелеев) Института физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6.

сопротивлением 12 МОм. Погружение микроэлектрода в ткань мозга осуществляли на глубину 0,2 – 1,3 мм от поверхности с шагом 4 мкм с помощью электронного манипулятора (ПМ-2, ИНФ, Россия) на участке от 0 до 3,5 мм каудальнее обуха и от 1,5 до 2,5 мм латеральнее средней линии. Для регистрации и анализа отбирали нейроны, отвечающие на электрическое и механическое (волоски фон Фрея) раздражение верхнего сагиттального синуса, а также на ипсилатеральную механическую стимуляцию кожи морды в лобно-глазнично-височной области. Для электрического раздражения твердой мозговой оболочки использовали биполярные серебряные электроды в виде шариков диаметром 0,3 мм с межэлектродным расстоянием 1 мм и сопротивлением около 50 кОм, которые накладывали параллельно верхнему сагиттальному синусу. Стимуляцию проводили одиночными прямоугольными импульсами тока силой 0,5 – 1 мА и длительностью 0,25 мс с помощью электростимулятора ЭСУ-2, Россия.

Отводимую микроэлектродом нейрональную активность после усиления подавали на вход аналого-цифрового преобразователя (AD-32, Россия) для ввода в персональный компьютер. Визуализацию ответов нейронов, управление стимуляцией и автоматическое построение перистимульных гистограмм осуществляли с помощью специального программного обеспечения, работающего в режиме реального времени [2]. Электрическое раздражение осуществляли сериями из 20 стимулов с частотой следования около 0,3 Гц. Накопление и подсчет спайков проводили в интервале 250 мс до и 250 мс после нанесения каждого стимула.

Фоновую и вызванную активность нейронов регистрировали до и через 5, 10, 15, 20, 30 и 45 мин после введения препарата.

Влияние вальпроата натрия (депакин, “SANOFI”, Франция) на нейрональную активность оценивали в дозах 25, 50, 100 и 200 мг/кг. Влияние баклофена (ICN, США) — в дозах 2,5, 5, 10 и 15 мг/кг. Изучаемые вещества разводили *ex tempore* в 1 мл физиологического раствора и вводили внутривенно медленно в течение 1 мин. Животные были разбиты случайным образом на 9 экспериментальных групп по 5 животных в каждой. Каждая доза указанных веществ тестировалась на одной группе. В контрольной группе вводили эквивалентный объем физиологического раствора при равных условиях эксперимента. Для анализа нейрохимического механизма действия тестируемых веществ использовали блокаторы ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов — бикакуллин (ICN, США) в дозе 1 мг/кг и 5-аминовалериановую кислоту (ICN, США) в дозе 25 мг/кг, соответственно. Указанные средства разводили *ex tempore* в 0,3 мл физиологического раствора и вводили внутривенно медленно в течение 30 с за 10 мин до введения исследуемых препаратов. Исследование проводили на 4 группах животных по 5 крыс в каждой.

Животных выводили из эксперимента введением уретана в дозе не менее 3 г/кг, в вену. Для статистической оценки и графического представления полученных данных применяли программный пакет Origin 7.5. Определение достоверности полученных результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного критерия Тьюки. В графиках данные представлены как среднее значение \pm SEM.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электрическая и механическая стимуляция верхнего сагиттального синуса, а также тактильное раздражение кожи морды в лобно-глазнично-височной области сопровождалось увеличением в 3 – 8 раз частоты разрядов нейронов ипсилатерального спинального ядра тройничного нерва. Аналогичное раздражение указанных областей, наносимое на противоположной стороне, не вызывало ответных реакций этих нейронов.

Введение баклофена во всех исследованных дозах сопровождалось торможением фоновой активности нейронов спинального ядра тройничного нерва по сравнению с исходными значениями. В дозах 2,5, 10 и 15 мг/кг достоверное по сравнению с контролем угнетение фоновой активности начиналось с 5-й минуты, а в дозе 5 мг/кг — с 15-й минуты после введения и продолжалось в течение всего периода регистрации (рис. 1, а). В целом баклофен тормозил реакции нейронов спинального ядра тройничного нерва на электрическую стимуляцию верхнего сагиттального синуса. Так, в дозе 15 мг/кг угнетающее действие препарата развивалось непосредственно после его введения, а в дозах 2,5 и 10 мг/кг — спустя 20 мин. В дозе 5 мг/кг действие баклофена было более сложным. Сначала наблюдалось усиление ответов нейронов на стимуляцию синуса, которое достигало максимума ($140,9 \pm 22,8$ % от исходного значения) к 10-й минуте после введения препарата. Через 15 – 20 мин реакции нейронов уменьшались до исходного уровня и к концу периода регистрации становились достоверно меньше контрольных значений (рис. 1, б).

Введение вальпроата в дозах 50, 100 и 200 мг/кг сопровождалось выраженным и достоверным по сравнению с контролем торможением фоновой активности нейронов спинального ядра тройничного нерва, которое начиналось с 5-й минуты после введения и продолжалось в течение всего периода регистрации. В дозе 25 мг/кг вальпроат вызывал противоположный эффект в виде усиления фоновых разрядов, которое достигало достоверно отличимого от контроля максимума ($191,3 \pm 19,9$ % от исходного значения) к 30-й минуте после введения, с последующим их уменьшением до исходного уровня к концу периода регистрации (рис. 2, а). В дозе 25 мг/кг вальпроат не изменял, а в остальных дозах достоверно по сравнению с конт-

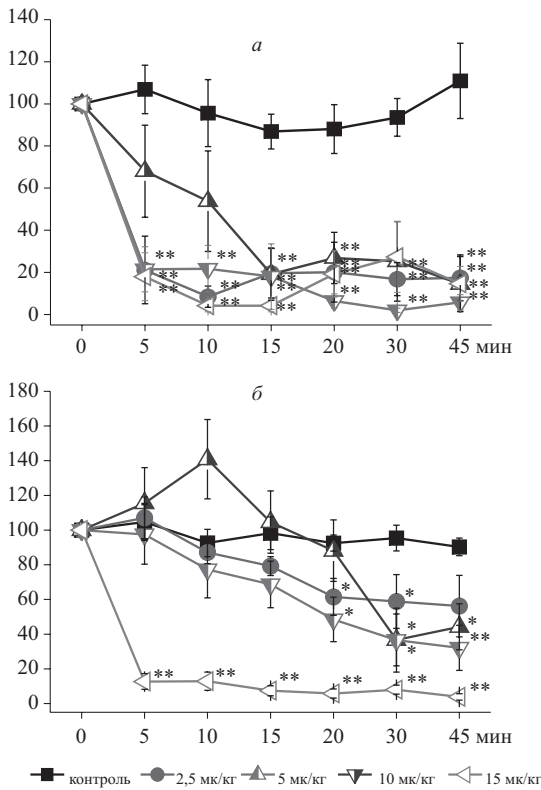


Рис. 1. Влияние баклофена на фоновую (а) и вызванную электрическим раздражением верхнего сагиттального синуса (б) активность нейронов спинального ядра тройничного нерва.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время, мин, по оси ординат — частота разрядов нейронов в % к исходному значению до введения препарата. Здесь и на рис. 2 и 3 изменения по сравнению с контролем достоверны при: * — $p < 0,05$ и ** — $p < 0,01$.

ролем угнетал ответы нейронов на электрическую стимуляцию верхнего сагиттального синуса (рис. 2, б).

Предварительное назначение антагониста ГАМК_B-рецепторов 5-аминовалериановой кислоты (5-АВК), но не ГАМК_A-антагониста бикикуллина, полностью устраняло угнетающее влияние баклофена на фоновую и вызванную нейрональную активность. В то же время 5-АВК и бикикуллин в равной степени ослабляли, но не отменяли эффекты вальпроата (рис. 3).

Таким образом, установлено, что баклофен и вальпроат в целом оказывали тормозное влияние на фоновую и вызванную электрической стимуляцией верхнего сагиттального синуса активность нейронов спинального ядра тройничного нерва, однако механизмы их действия различны.

Так, устранение эффектов баклофена предварительным введением 5-АВК, но не бикикуллина, указывает на то, что его действие на нейрональную активность опосредовано ГАМК_B-рецепторами. По всей видимости, тормозное влияние препарата на фоновую и вызванную активность нейронов спинального ядра тройничного нерва может быть связано, во-первых, с активацией постсинаптических ГАМК_B-рецепторов на мембранах указанных нейронов, что приводит к их ги-

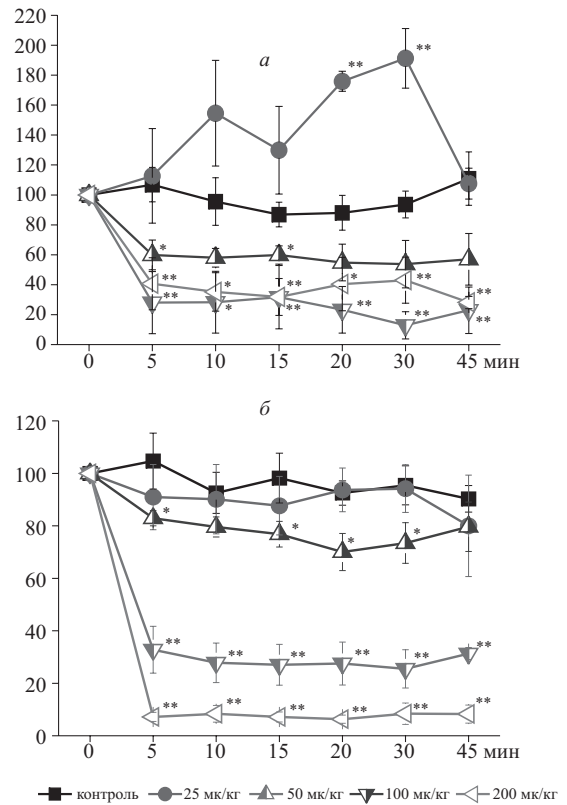


Рис. 2. Влияние вальпроата на фоновую (а) и вызванную электрическим раздражением верхнего сагиттального синуса (б) активность нейронов спинального ядра тройничного нерва.

Обозначения те же, что на рис. 1.

перполяризации [10], во-вторых, с активацией пресинаптических ГАМК_B-рецепторов окончаний глутаматергических волокон, непосредственно контактирующих с нейронами каудального ядра [11], что вызывает угнетение выделения из них глутамата [4], в-третьих, с активацией ГАМК_B-рецепторов нейронов Гассерова узла, что сопровождается торможением передачи ноцицептивного потока от твердой мозговой оболочки [13].

Вместе с тем в малых дозах (2,5 и, особенно, 5 мг/кг) влияние баклофена на вызванную активность можно охарактеризовать как биполярное, или “активирующее-угнетающее”. Ранее схожая картина была показана в формалиновом тесте: в малых дозах баклофен усиливал боль, а в больших обладал антиноцицептивным действием [8]. Кроме того, имеются данные о том, что в малых дозах баклофен действует преимущественно на пресинаптическом уровне, а в больших — как на пре- так и на постсинаптическом, с чем и связан его преобладающий обезболивающий эффект [14]. Следует добавить, что баклофен способен активировать не только пресинаптические ГАМК_B-рецепторы на окончаниях возбуждающих глутаматергических волокон в спинальном ядре [4], но и ауторецепторы на ГАМК-ергических терминалях, что будет сопровождаться угнетением выделения из них тормозного меди-

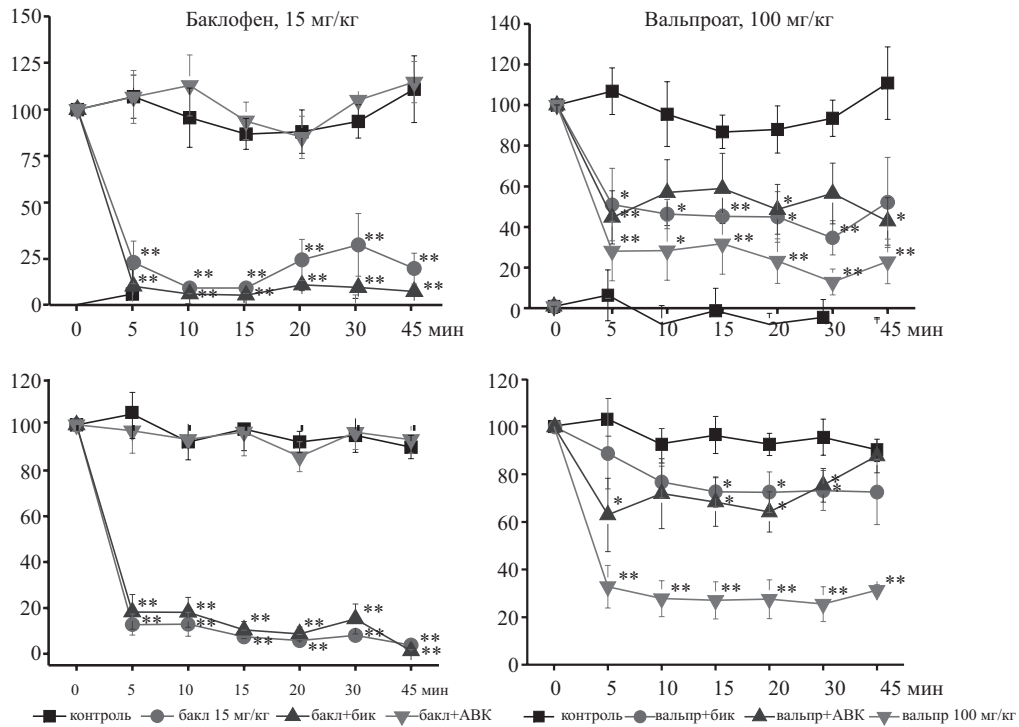


Рис. 3. Влияние баклофена и вальпроата на фоновую и вызванную электрическим раздражением верхнего сагиттального синуса активность нейронов спинального ядра тройничного нерва на фоне блокады ГАМК-рецепторов.

По оси абсцисс — время (в мин) до (0) и после (5 – 45) введения препаратов, препаратов на фоне предварительного введения бикикуллина или 5-аминовалериановой кислоты (АВК) и физиологического раствора (обозначения на графике).

По оси ординат — частота разрядов нейронов в % к исходному значению до введения препаратов.

тора ГАМК. Учитывая эти сведения, можно объяснить фазные изменения вызванной активности под влиянием малых доз баклофена. По всей видимости, в дозах 2,5 и 5 мг/кг препарат первые 10 – 15 мин действует пресинаптически, активируя ГАМК_B-рецепторы глутамат- и ГАМК-ергических терминалей. При этом, возможно, возникает дисбаланс в модуляции тормозной и возбуждающей передачи с преобладанием последней. По всей видимости, баклофен в малых дозах не обеспечивает быстрого и полного выключения мощного ноцицептивного потока, вызванного электрическим раздражением твердой мозговой оболочки. Поэтому в начальном периоде действия препарата отмечается усиление нейрональных ответов. Однако увеличение времени экспозиции или дозы баклофена приводит к его взаимодействию с постсинаптическими ГАМК_B-рецепторами нейронов спинального ядра, что сопровождается выраженным угнетением их активности.

Введение вальпроата в относительно малой дозе (25 мг/кг) сопровождалось увеличением фоновой активности нейронов ядра тройничного нерва, а в более высоких (50 – 200 мг/кг) — ее уменьшением. Известно, что вальпроат тормозит утилизацию эндогенной ГАМК, что приводит к увеличению ее концентрации в ЦНС [9]. В наших опытах угнетающее действие вальпроата на активность нейронов тройничного комплекса, в отличие от баклофена, примерно одинаково зависело от функционального состояния как ГАМК_A-, так

и ГАМК_B-рецепторов. Блокада любого из этих рецепторов сопровождалась уменьшением, но не прекращением ингибирующего влияния вальпроата на нейрональную активность. Вместе с тем в литературе имеются сведения, что в некоторых структурах ЦНС ГАМК может оказывать возбуждающее бикикуллиноразимое влияние на нейрональную активность, которое реализуется при малых ее концентрациях [3]. Возможно, этот эффект мы и наблюдали при введении вальпроата в дозе 25 мг/кг. По всей видимости, в этих условиях происходит преобладание парадоксального деполяризующего эффекта низких концентраций ГАМК, реализующегося через ГАМК_A-рецепторы мембран нейронов спинального ядра. Однако увеличение дозы вальпроата приводило к проявлению его ингибирующего влияния на фоновую активность нейронов, что может быть следствием повышения уровня эндогенной ГАМК и реализации ее тормозного действия. При этом, скорее всего, конечный угнетающий эффект вальпроата, как непрямого ГАМК-миметика, реализуется не только через ГАМК_A-, но и через ГАМК_B-рецепторы, роль которых обсуждалась выше.

Тормозное влияние вальпроата на вызванную активность нейронов выглядит более плавным по сравнению с баклофеном. Мы полагаем, что это связано с его непрямым действием на оба подтипа ГАМК-рецепторов через увеличение уровня эндогенной ГАМК. Вероятно, в условиях резко возросшего ноцицептивного

потока суммарная активация не только ГАМК_B-, но и ГАМК_A-рецепторов, также имеющих как пост-, так и пресинаптическую локализацию [11] в ядре тройничного нерва, приводит к развитию постепенного дозозависимого уменьшения ответных нейрональных реакций.

В настоящее время в литературе активно обсуждается роль сенситизации нейронов тройничного комплекса в патогенезе первичных цефалгий [6]. Предполагается, что центральная сенситизация, т.е. стойкое повышение возбудимости нейронов спинального ядра определяет некоторые особенности клинической картины мигрени, например, развитие аллодинии и является патофизиологической основой механизма хронизации головных болей. В своем исследовании мы показали, что в основе клинической эффективности вальпроата и баклофена при лечении первичных цефалгий может лежать их угнетающее действие на возбудимость нейронов спинального ядра тройничного нерва. Представляется перспективным дальнейшее экспериментальное изучение различных ГАМК-позитивных препаратов с целью выявления их антицефалгической активности и определения механизмов действия при головных болях.

ВЫВОДЫ

1. Внутривенное введение баклофена и вальпроата сопровождается угнетением фоновой и вызванной электрическим раздражением верхнего сагиттального синуса активности нейронов тройничного комплекса.

2. В отличие от баклофена, реализация угнетающего эффекта вальпроата на активность нейронов спинального ядра тройничного нерва в равной степени зависит от функционального состояния как ГАМК_A-, так и ГАМК_B-рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Амелин, Ю. Д. Игнатов, А. А. Скоромец, *Мигрень — патогенез, клиника и лечение*, СПб (2001).
2. С. С. Пантелеев, *Тез. докл. междунар. конф. "Механизмы функционирования висцеральных систем"*, СПб (2001), сс. 270 – 271.
3. E. Bracci and S. Panzeri, *J. Neurophysiol.*, **95**(2), 1285 – 1290 (2006).
4. Q. Chen and H. L. Pan, *Neuroscience.*, **142**(2), 595 – 606 (2006).
5. F. G. Freitag, S. D. Collins, H. A. Carlson, et al., *Neurology.*, **58**(11), 1652 – 1659 (2002).
6. P. J. Goadsby, *Eur. Neurol.*, **53**(1), 10 – 16 (2005).
7. R. Hering-Hanit and N. Gadoth, *Curr. Pain Headache Rep.*, **5**(1), 79 – 82 (2001).
8. M. Iyadomi, I. Iyadomi, E. Kumamoto, et al., *Pain*, **85**(3), 385 – 393 (2000).
9. C. U. Johannessen, *Neurochemistry Int.*, **37**, 103 – 110 (2000).
10. K. Obrietan and A. N. van den Pol, *J. Neurophysiol.*, **82**(1), 94 – 102 (1999).
11. N. M. Ramadan, *CNS Spectr.*, **8**(6), 446 – 449 (2003).
12. P. D. Reiter, J. Nickisch, and G. Merritt, *Headache.*, **45**(7), 899 – 903 (2005).
13. M. Takeda, T. Tanimoto, M. Ikeda, et al., *Neuroscience*, **123**, 491 – 505 (2004).
14. D. Wang, L. N. Cui, and L. P. Renaud, *Neuroscience*, **118**(1), 49 – 58 (2003).

Поступила 21.12.07

EFFECT OF GABA-POSITIVE DRUGS ON THE BACKGROUND AND SUPERIOR SAGITTAL SINUS-ELECTROSTIMULATED ACTIVITY OF NEURONS IN THE NUCLEUS TRIGEMINALIS CAUDALIS OF RATS

A. Yu. Sokolov¹, A. V. Amelin¹, Yu. D. Ignatov¹, and S. S. Panteleev²

¹ Val'dman Institute of Pharmacology, St. Petersburg State Medical University, ul. L. Tolstogo 6/8, St. Petersburg, 197022, Russia

² Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Makarov emb. 6, St. Petersburg, 199034 Russia

There is extensive clinical evidence for the high efficacy of GABA-ergic drugs in prophylactic and abortive treatment of migraine and cluster headache, while the mechanisms of anticephalgic drugs action are not clear, in particular, because of insufficient number of investigations on experimental headache models. In this study, the influence of baclofen (i.v.) in doses 2.5, 5, 10, and 15 mg/kg and valproate (i.v.) in doses 25, 50, 100, and 200 mg/kg on the background activity of the trigeminal nucleus caudalis neurons and that evoked by electrical stimulation of the superior sagittal sinus was investigated in series of acute experiments on rats. It is established, that baclofen and valproate reduce both the background and evoked activity of trigeminal complex neurons in dose-dependent manner, thus determining the role of GABA-A and GABA-B receptors in realization of this effect. These results provide experimental basis for explanation of the clinical efficacy of the GABA-positive drugs in vascular headaches.