

Физиологические исследования

УДК 612.825.1

Н.А. Худякова

РАЗЛИЧИЯ ЭЭГ-АКТИВНОСТИ У НАРКОТИЗИРОВАННЫХ И НЕНАРКОТИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИЙ BALB/C, CBA И C57BL/6

Проведены хронические опыты по исследованию электроэнцефалограммы 30 взрослых мышей линии BALB/c, CBA и C57bl/6. Достоверных отличий соотношения ритмов наркотизированных животных линии BALB/c от ненаркотизированных мышей той же линии не выявлено. Достоверные отличия наркотизированных мышей линии CBA от ненаркотизированных мышей той же линии обнаружены только по альфа-ритму, у наркотизированных животных мощность этого ритма повышалась. С высокой долей достоверности ($p < 0,0001$) соотношение ритмов ЭЭГ у наркотизированных мышей линии C57bl/6 отличается от такового у ненаркотизированных мышей той же линии. При этом видно, что мощность дельта-ритма наркотизированных мышей по сравнению с наркотизированными мышцами той же линии заметно падает, а мощность остальных трех ритмов возрастает. Достоверное ($p < 0,05$) увеличение относительного значения мощности бета-ритма у мышей линии BALB/c по сравнению с животными C57bl/6 свидетельствует о высокой возбудимости коры головного мозга у животных линии BALB/c и низкой – у C57bl/6.

Ключевые слова: ЭЭГ, BALB/c, CBA, C57bl/6, нембутал.

Около 40 % нейронов головного мозга млекопитающих содержит в качестве медиатора L-глутамат. Гиперактивация NMDA-рецепторов может являться причиной появления судорожной активности и связанной с ней эксайтотоксичности, приводящей к гибели нейронов. NMDA-рецептор имеет семь сайтов связывания лигандов, среди которых участок связывания агонистов и конкурентных антагонистов, участок связывания коагонистов (глицина и D-серина), участок связывания полиаминов, участок связывания «канальных» блокаторов (кетамин), участки связывания ионов магния, цинка, водорода. Кроме того, существуют специфические места связывания нейростероидов, нейропептидов и гистамина [1].

NMDA-рецепторы присутствуют в большинстве нейронов ЦНС, таким образом, активация этих рецепторов лежит в основе большинства быстрых процессов передачи сигнала в нервной системе. В связи с этим активация NMDA-рецепторов приводит к двум событиям: во-первых, деполяризации постсинаптической мембраны (обуславливается входом ионов Na^+ в клетку) и, во-вторых, активации Ca^{2+} -зависимых белков, включая кальмодулин-зависимые протеинкиназы, протеинкиназу C, фосфолипазу A2, NO-синтазу и т.д. Таким образом, активация NMDA-рецепторов приводит к запуску как межклеточной сигнализации (деполяризация мембраны, долговременная потенцияция), так и запуску внутриклеточных каскадов передачи сигнала. Реполяризация клеточной мембраны после активации NMDA-рецепторов происходит в основном за счет активности Na/K-АТФазы, которая восстанавливает градиенты ионов Na^+ и K^+ . Между NMDA-рецепторами и работой Na/K-АТФазы существует прямая функциональная связь [2; 3].

L-глутамат является основным медиатором проведения возбуждения в синапсах нервной системы позвоночных. Идентифицированы множественные глутаматные рецепторы, которые кроме участия в быстром проведении возбуждения являются также критическим фактором в пластичности синапсов. Нарушения Ca^{2+} -проницаемости ионных каналов приводят к ряду нейродегенеративных заболеваний, среди которых болезнь Паркинсона, паралич, эпилепсия [2].

Основными ингибиторными нейротрансмиттерами в ЦНС являются ГАМК и глицин. Что характерно, тормозный медиатор ГАМК содержат также 40 % нейронов центральной нервной системы. Глицин как медиатор присутствует в значительно меньшем количестве пресинаптических терминалей. ГАМК и глицин содержатся во вставочных нейронах, и благодаря этим рецепторам осуществляется пресинаптическое торможение в спинном мозге. ГАМК синтезируется при декарбоксилировании глутамата. Различают следующие основные рецепторные сайты этого рецептора: сайт связывания ГАМК или ее агониста и центры связывания аллостерических регуляторов, таких как нейростероиды, цинк, бензодиазепины и барбитураты. Особое значение имеют рецепторные области для связывания

с бензодиазепинами и барбитуратами, причем бензодиазепины усиливают ГАМК-эргическое торможение на пресинаптические терминалы. Все основные эффекты бензодиазепинов – седативный, противотревожный, противосудорожный, мышечной релаксации и другие – осуществляются через ГАМКА-рецепторы [4; 5]. В отличие от бензодиазепинов, повышающих аффинность ГАМК-рецептора по отношению к агонисту, барбитураты увеличивают время открытого состояния и проводимость канала такого рецептора [6; 7]. Барбитураты, как и бензодиазепины, широко используются в качестве антиэпилептических и седативных веществ; в частности, барбитураты способны вызывать глубокий сон и обеспечивать анестезию [7].

ГАМК_A-рецепторы являются ионотропными, связанные с ними ионные каналы проницаемы для анионов хлора и бикарбоната, что вызывает при открывании канала гиперполяризацию мембраны нейрона. Реполяризация мембраны нейрона поддерживается калий/хлорным котранспортером KCC2 [7; 8], который начинает выкачивать Cl⁻ наружу после реализации элементарного синаптического события.

NMDA-антагонисты обладают противосудорожным действием. Имеются данные об усилении антагонистами NMDA-рецепторов успокаивающего действия барбитуратов при развитии судорог, проявляющихся в различных модельных экспериментах.

Кроме того, предполагается, что ГАМК-эргическая система тонически ингибирует эффекты, опосредованные активацией NMDA-рецепторов. В то же время глутаматные рецепторы пресинаптически регулируют высвобождение ГАМК и могут таким образом осуществлять «ауторегулирование» собственных возбуждающих влияний [2].

Мыши линий BALB/c, CBA и C57bl/6 имеют достоверные различия возбудимости нервной системы, причем наименьшие пороги возбуждения характерны для BALB/c, наибольшие – для C57bl/6. Животные линии CBA характеризуются промежуточными значениями возбудимости [9].

Высокие пороговые токи, необходимые для вызова двигательных ответов у линии C57bl/6, согласуются с увеличенным содержанием в нейронах ЦНС тормозных медиаторных аминокислот (глицина – в 2 раза, ГАМК – на $\frac{3}{4}$), тогда как содержание аспарагина и глутаминовой кислоты у животных этой линии увеличено по сравнению с мышами линии BALB/c только на $\frac{1}{4}$ [10]. Особенности протекания процессов возбуждения и торможения в нервной клетке могут отражаться на ЭЭГ-активности линейных мышей и реакции ритмов ЭЭГ на введение наркотических препаратов. Поэтому нами было предпринято исследование ЭЭГ-активности у наркотизированных и ненаркотизированных мышей BALB/c, CBA и C57bl/6 с целью выяснения генетических особенностей ЭЭГ линейных животных и влияния нембутала на ритмы ЭЭГ.

Материалы и методы исследования

Проведены хронические опыты по исследованию ЭЭГ 30 взрослых мышей линии BALB/c, CBA и C57bl/6 обоего пола массой 19–30 г. Линейные животные были получены из питомника НЦБМТ ФМБА России «Столбовая», содержались и разводились в условиях вивария Удмуртского университета. Животные наркотизировались нембуталом (70 мг/кг, внутривенно). Местная анестезия кожи головы осуществлялась 0,5 %-ным раствором новокаина.

Для закрепления электродов на голове мыши проводилась операция по удалению всех мягких тканей с поверхности черепа. Костная поверхность черепа хорошо высушивалась и очищалась. Кюветка электродов, состоящая из 8 активных элементов, крепилась на поверхности черепа с помощью раствора фосфина. Для регистрации ЭЭГ использовался электроэнцефалограф «Энцефалан» («Медиком МТД», г. Таганрог). Регистрация ЭЭГ проводилась по 8-канальному отведению в течение 7 минут. На хвост животного прикреплялся индифферентный электрод. Анализировались следующие показатели: ОЗМ – относительное значение мощности (%) и относительное значение амплитуды (%). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA-8 и Prism 3.0. Вычислялись среднее значение параметра и ошибка среднего. Спектральный анализ ЭЭГ проводился при помощи программного обеспечения «Энцефалан».

При статистической обработке данных использовались непараметрический критерий Крускала–Уоллиса для сравнения ЭЭГ-активности мышей разных линий и критерий Вилкоксона для сравнения ЭЭГ наркотизированных и ненаркотизированных животных.

Результаты и их обсуждение

Электроэнцефалографическое исследование предполагало изучение таких параметров как ОЗМ (относительное значение мощности) и относительное значение амплитуды ритмов наркотизированных и ненаркотизированных мышей. Также в данном исследовании оценивалось влияние наркоза (нембутала) на параметры мощности ЭЭГ-ритмов мышей линий BALB/c (белые), C57bl/6 (черные) и CBA (агути). Как известно из литературных данных, преобладающими ритмами у животных являются дельта- (0,5–3 Гц) и тета-ритмы (4–8 Гц), а альфа- (8–13 Гц) и бета-ритмы (14–40 Гц) являются самыми высокоэнергетическими, поэтому их мощность ниже, что и наблюдается из диаграмм, представленных далее.

У ненаркотизированных мышей линии BALB/c относительная мощность дельта-активности составила $57,86 \pm 6,28$ %, тета-активности – $22,52 \pm 2,69$ %, альфа-активности – $11,52 \pm 2,16$ %, бета-активности – $7,93 \pm 1,52$ %. Достоверных отличий соотношения ритмов наркотизированных животных линии BALB/c от ненаркотизированных мышей той же линии не выявлено. При анализе ЭЭГ-активности мышей линии C57BL наблюдалось другое соотношение ритмов: у наркотизированных мышей относительное значение мощности дельта-активности составило $47,24 \pm 2,21$ %, тета-активности – $28,43 \pm 1,15$ %, альфа- активности – $12,17 \pm 0,98$ %, бета-активности – $11,69 \pm 1,20$ %. С высокой долей достоверности ($p < 0,0001$) соотношение ритмов ЭЭГ у наркотизированных мышей линии C57bl/6 отличается от такового у ненаркотизированных мышей той же линии. При этом видно, что мощность дельта-ритма наркотизированных мышей по сравнению с наркотизированными мышами той же линии заметно падает, а мощность остальных трех ритмов возрастает (рис. 1).

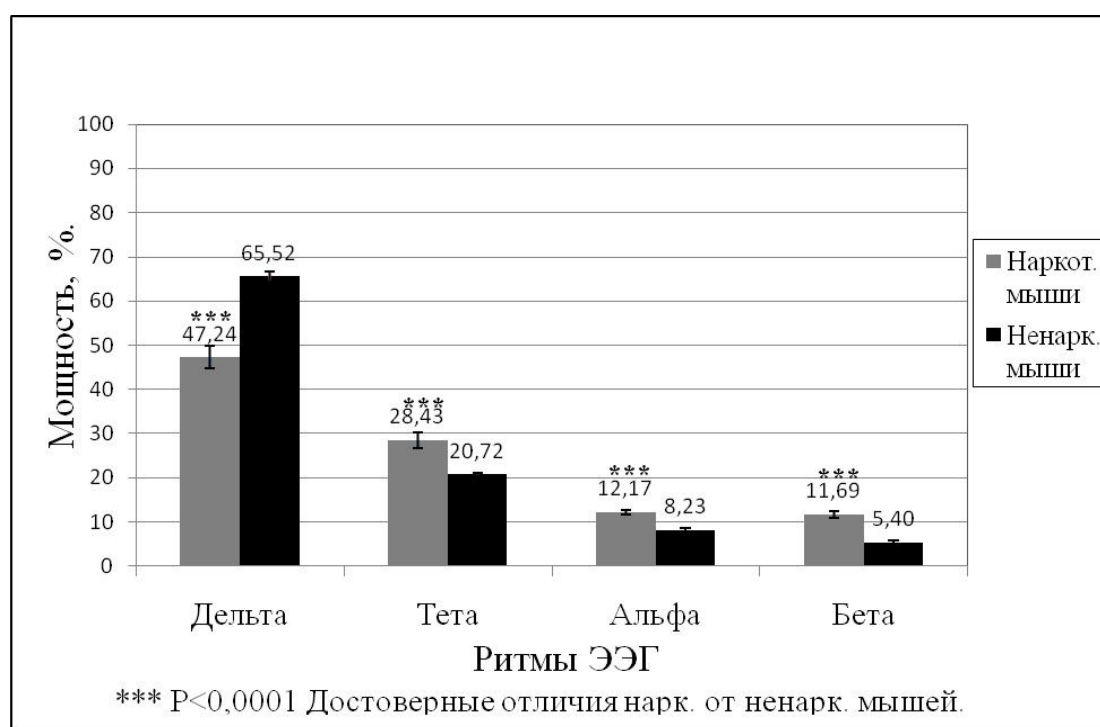


Рис. 1. Относительное значение мощности ЭЭГ-ритмов мышей линии C57bl/6, %

Увеличение ОЗМ альфа- и бета-ритмов при воздействии нембутала у мышей C57bl/6 происходит за счет достоверного ($p < 0,001$) роста амплитуды альфа- и бета-активности. Уменьшение ОЗМ дельта-ритма при воздействии наркоза связано с наличием достоверного ($p < 0,001$) снижения относительной амплитуды дельта-ритма, что можно отметить из рис. 2.

Достоверные отличия наркотизированных мышей линии CBA от ненаркотизированных мышей той же линии обнаружены только по альфа-ритму: относительное значение мощности его у бодрствующих животных составило $8,71 \pm 0,23$ %, у животных под наркозом – $9,19 \pm 0,21$ % ($p < 0,05$). Мощность дельта-диапазона составила $61,52 \pm 2,6$ %, тета – $22,65 \pm 1,44$ %, бета – $6,23 \pm 1,46$ % у ненаркотизированных животных. Достоверных изменений этих ритмов при воздействии нембутала не обнаруживается.

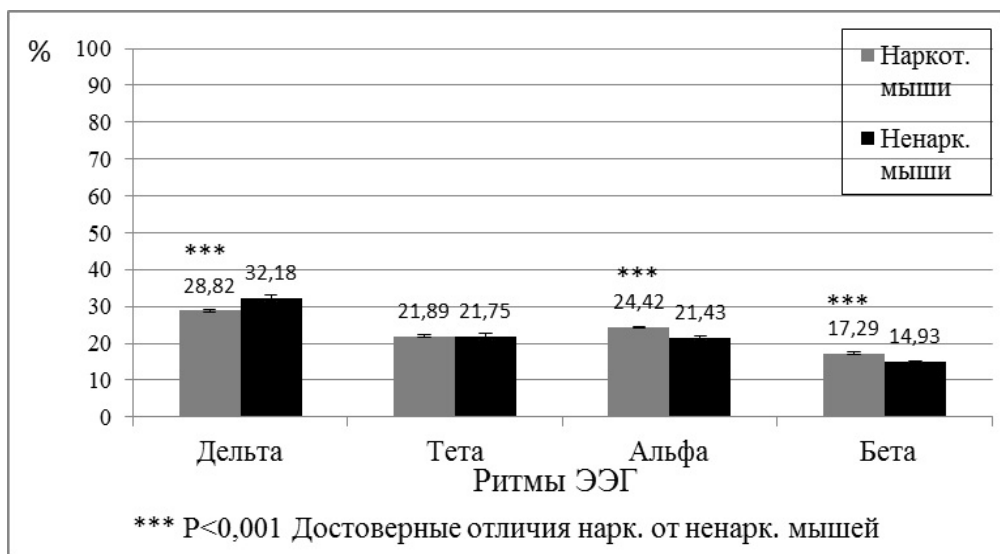


Рис. 2. Относительные значения амплитуды ЭЭГ-ритмов мышей линии C57bl/6, %

Достоверные отличия ($p < 0,05$) ненаркотизированных мышей линии BALB/c от ненаркотизированных мышей линии C57bl/6 обнаружены только по бета-ритму (рис. 3), мощность которого у мышей этой линии выше. Относительно мощности дельта-активности можно отметить самое низкое значение ОЗМ у мышей линии BALB и самое высокое значение этой ЭЭГ-активности у мышей C57bl/6. Животные линии BALB отличаются большей долей высокочастотных ритмов, что согласуется с данными о высокой возбудимости нервной системы у этих животных в противоположность низкой возбудимости у C57bl/6. Поскольку бета-ритм имеет корковое происхождение, то наибольшее значение ОЗМ этого ритма у мышей линии BALB/c свидетельствует о высокой возбудимости коры головного мозга и наименьшее значение ОЗМ – о низкой возбудимости у животных C57bl/6.

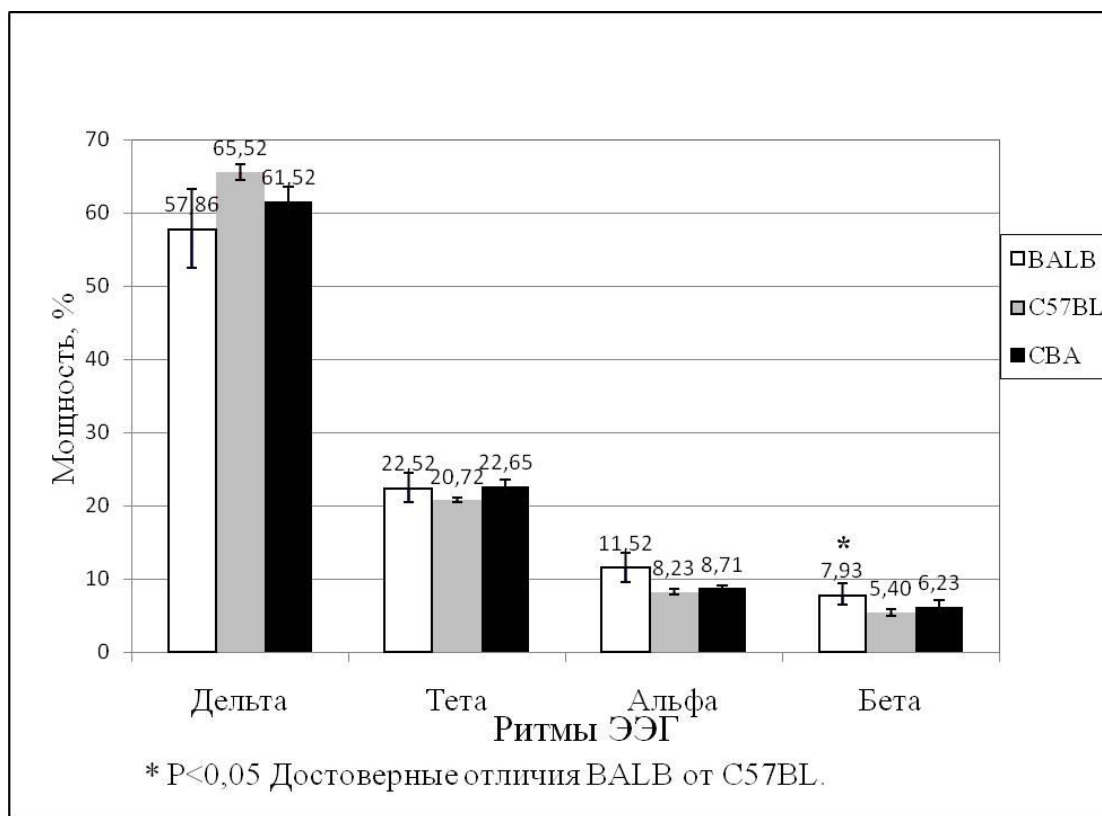


Рис. 3. Относительное значение мощности ЭЭГ-ритмов ненаркотизированных мышей, %

Мышей линии C57bl/6 можно охарактеризовать как модельных животных, имеющих высокий уровень возбуждающих и очень высокий уровень тормозных медиаторов [10] и их рецепторов [11]. У них быстро образуются и быстро в условиях эксперимента подвергаются угашению различные формы условных рефлексов [12]. Нембутал, связываясь с барбитуратным центром ГАМК-рецептора, способен увеличивать время открывания СГ-канала, вызывая торможение деятельности нервной системы вплоть до анестезии и комы. Поскольку мыши линии C57bl/6 характеризуются большей концентрацией медиатора ГАМК и ее рецепторов, то при воздействии используемой нами дозировки нембутала животные достигали стадии глубокого хирургического наркоза, однако быстрее выходили из наркоза, чем мыши других линий, вследствие связывания не всего пула ГАМК-рецепторов с антагонистом. При выходе из наркоза за несколько минут до пробуждения может наблюдаться увеличение доли высокоамплитудного альфа-ритма и снижение активности в дельта-диапазоне [13], что подтверждается на примере наших животных линии C57bl/6, которые действительно имеют меньшую продолжительность времени наркоза при введении его стандартной дозы. Сложный характер взаимодействия NMDA- и ГАМК-влияний, а также высокий уровень возбуждающих медиаторов способны оказать при воздействии стандартной дозировки нембутала десинхронизирующее влияние на ЭЭГ-активность у мышей линии C57bl/6. Таким образом, при использовании в экспериментах животных различных линий необходимо учитывать возбудимость нервной системы, которая является наибольшей у мышей линии BALB и наименьшей – у мышей линии C57bl/6.

Выводы

1. Достоверные ($p < 0,0001$) отличия относительной мощности ЭЭГ-ритмов в альфа-, бета-, тета- и дельта-диапазонах были выявлены только у мышей линии C57bl/6 при воздействии наркоза.
2. Достоверное ($p < 0,05$) увеличение относительного значения мощности бета-ритма у мышей линии BALB/c по сравнению с животными C57bl/6 свидетельствует о высокой возбудимости коры головного мозга у животных линии BALB/c и низкой – у C57bl/6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беспалов А.Ю., Звартау Э.Э. Нейропсихофармакология антагонистов NMDA-рецепторов. СПб.: Невский Диалект. 2000. 297 с.
2. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. Волгоград: Семь ветров, 1999. 640 с.
3. Ананьев В.Н. Рецепторные механизмы действия нейтральных газов на поглощение кислорода организмом // Фундаментальные исследования. 2013. № 11. С. 11-16.
4. Харкевич Д.А. Фармакология. М.: Гэотар Медицина, 2006. 664 с.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Умеренков; Новая волна. 2000. Т. 1. 543 с.
6. Eghbali M., Gage P.W., Birnir B. Pentobarbital modulates gamma-aminobutyric acid-activated single-channel conductance in rat cultured hippocampal neurons // Mol. Pharmacol. 2000. Vol. 58, № 3. P. 463-469.
7. Семьянов А.В. ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия // Нейрофизиология. 2002. Т. 34, № 1. С. 82-92.
8. Rivera C., Voipio J., Payne J.A., Ruusuvuori E., Lahtinen H., Lamsa K., Pirvola U., Saarma M., Kaila K. The K⁺/Cl⁻-co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation // Nature. 1999. Vol. 397, N 6716. P. 251-255.
9. Дмитриев Ю.С., Вайдо А.И. Исследование некоторых параметров функционального состояния нервной системы и особенности поведения в связи с их наследственной обусловленностью у инбредных линий мышей. Анализ наследования порога возбудимости нервно-мышечного аппарата у инбредных линий мышей // Генетика. 1981. Т. 17, № 2. С. 282-290.
10. Шубенина Е.В., Кудрин В.С., Клодт П.М., Покровский А.А., Гудашева Т.А., Воронина Т.А., Островская Р.У. Межлинейные различия в содержании возбуждающих и тормозных нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга мышей линий DBA/2J, BALB/c и C57BL/6; Особенности действия дипептидного антипсихотического средства дилепта // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. Т. 71, № 4. С. 7-10.
11. Ковалёв Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г. Действие пирacetama на поведение и рецепторы мозга мышей C57BL/6 и BALB/c – ноотропный и анксиолитический эффекты // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. № 9. С. 3-10.
12. Дубровина Н.И., Редькина А.В. Латентное торможение и угашение условной реакции пассивного избегания у мышей линий C57BL/6J и DBA/2J // Российский физиологический журн. им. И.М. Сеченова. 2012. Т. 98, № 4. С. 488-496.

13. Purdon P.L., Pierce E.T., Mukamel E.A., Prerau M.J., Walsh J.L., Wong K.F., Salazar-Gomez A.F., Harrell P.G., Sampson A.L., Cimenser A., Ching S., Kopell N.J., Tavares-Stoeckel C., Habeeb K., Merhar R., Brown E.N. Electroencephalogram signatures of loss and recovery of consciousness from propofol // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. Vol. 110, N 12. P. 1142-1151.

Поступила в редакцию 20.06.15

N.A. Khudyakova

DIFFERENCES IN EEG ACTIVITY BETWEEN ANESTHETIZED AND AWAKE MICE OF LINES BALB/C, CBA AND C57BL/6

Chronic experiments were conducted to study the electroencephalogram of 30 adult mice of lines BALB/c, CBA and C57bl/6. No significant differences in the ratio of rhythms between anesthetized animals of the line BALB/c and awake mice of the same line were detected. Significant differences between anesthetized mice of the CBA line and awake mice of the same line were found only by alpha rhythm: in anesthetized animals the power of this rhythm increased. With a high degree of significance ($p < 0.0001$) ratio of EEG rhythms in anesthetized mice C57bl/6 differs from that in awake mice of the same line. It is clear that the power of delta-rhythm in anesthetized mice compared to awake mice of the same line drops significantly, and the power of other three rhythms increases. Statistically significant ($p < 0.05$) increase of relative power values of beta-rhythm in mice of the BALB/c compared with animals C57bl/6 indicates a high excitability of the cerebral cortex in animals of the line BALB/c and low excitability – for the line C57bl/6.

Keywords: EEG, BALB/c, CBA, C57bl/6, nembital.

Худякова Нина Алексеевна,
кандидат биологических наук, доцент кафедры
анатомии и физиологии человека и животных
ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1)
E-mail: whitemouse@udm.ru

Khudyakova N.A.,
Candidate of Biology, Associate Professor
at Department of Anatomy and Human and Animal
Physiology
Udmurt State University
Universitetskaya st., 1/1, Izhevsk, Russia, 426034
E-mail: whitemouse@udm.ru