

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1;616.853.7

ВЛИЯНИЕ АУДИОГЕННЫХ СУДОРОГ НА АКТИВНОСТЬ
ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ В СИНАПТОСОМАХ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ЛИНИИ
КРУШИНСКОГО—МОЛОДКИНОЙ

ДЕМИНА М. Н., ТУРОВСКИЙ В. С., ДАМБИНОВА С. А.

Одной из особенностей ЦНС грызунов является предрасположенность к эпилептиформным судорожным припадкам при действии звукового раздражения. Наиболее ярко этот феномен проявляется у крыс линии Крушинского—Молодкиной (К—М) с генетической склонностью к таким аудиогенным судорогам. Животных этой линии обычно и используют в качестве модели для изучения механизмов развития наследственных признаков эпилепсии у человека [1].

Судорожные припадки приводят к глубоким, как правило, обратимым изменениям в ряде метаболических систем головного мозга. Существенное внимание в связи с этим привлекают исследования тех наследственных биохимических дефектов, выявляемых в межприступный период, которые могут иметь значение для формирования процессов возбуждения и торможения у крыс К—М. Особое значение в этом отношении приобретает изучение метаболизма одного из основных возбуждающих нейромедиаторов—глутамата и его производных, в частности ГАМК, важного тормозного нейромедиатора в ЦНС.

Большая часть ГАМК образуется из глутаминовой кислоты под действием глутаматдекарбоксилазы (L-глутамат-1-декарбоксилазы; КФ 4.1.1.15). Как было показано Löscher и Frey [2], при эпилепсии в головном мозгу повышено количество возбуждающих нейромедиаторов (ацетилхолина, норадреналина, глутамата), в то время как количество тормозных (серотонина, ГАМК) снижено. Судорожные припадки по-разному влияли на количество ГАМК: в одних случаях наблюдали его снижение, в других оно оставалось без изменений и, более того, даже незначительно повышалось. Эти авторы считают, что важной причиной снижения содержания ГАМК в головном мозгу при эпилепсии является недостаточная активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК). Далее было обнаружено, что активность ГДК чувствительна к судорогам любой природы. Так, при действии пикротоксина, пентетразола и других возбуждающих аген-

тов наблюдали полное исчезновение активности этого фермента. В гомогенатах мозга мышей и крыс, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии, выявлено пониженное содержание ГАМК, что связано, по-видимому, со снижением активности ГДК.

В связи с этими данными для выяснения роли ГДК в генезе наследственной повышенной судорожной готовности было желательным исследовать факторы, влияющие на изменение активности этого фермента непосредственно в синапсосомах. В задачу настоящего исследования и входило определение активности ГДК во фракциях синаптических окончаний больших полушарий головного мозга крыс линии К—М* в состоянии спокойного бодрствования и после звукового раздражения, сопоставляя полученные данные с результатами аналогичных исследований у крыс Вистар в одних и тех же условиях.

В опытах использовали крыс-самцов массой 180—200 г. Судорожный припадок вызывали звуком силой 40 дБ в течение 5 с. Всех животных К—М и контрольных крыс Вистар предварительно тестировали на чувствительность к звуковому раздражению.

После декапитации быстро извлекали головной мозг, отделяли кору больших полушарий и гомогенизировали в холодном растворе 0,32 М сахарозы, содержащем 1,7 ммоль пиридоксальфосфата (ПДФ) для сохранения активности ГДК. Гомогенат центрифугировали при 1000 г в течение 15 мин. Полученную надосадочную фракцию далее центрифугировали 15 мин при 10000 г. Осадок неочищенных митохондрий и синапсосом суспендировали в том же растворе сахарозы, наносили на ступенчатый градиент фикола и получали фракции по методу Autilio и др. [3]. Все операции проводили при 4° в присутствии ПДФ. В результате были получены следующие фракции: Φ_1 —мелкие, Φ_2 —синаптические мембраны, Φ_3 —легкие синапсосомы, Φ_4 —тяжелые синапсосомы, Φ_5 —митохондрии. Измерение удельной активности Na^+ , K^+ -активируемой Mg^{2+} -зависимой АТФазы [4] показало, что во фракциях Φ_3 и Φ_4 она была в 3 раза выше, чем во фракции Φ_1 . Это свидетельствовало о достаточной чистоте получаемых синапсосомных фракций. Электронномикроскопическое исследование последних установило, что они на 85% состояли из синапсосом [5].

Активность ГДК определяли флуориметрическим методом [6]. Содержание белка определяли по методу Bradford [7]. Статистическую обработку данных проводили непараметрическим методом [8].

Как видно из приведенной таблицы, озвучивание крыс по-разному влияло на активность ГДК в синапсосомах коры больших полушарий головного мозга у крыс К—М и контрольных—линии Вистар. При этом особое внимание привлекали изменения, происходившие во фракции легких синапсосом (Φ_3).

* Авторы выражают глубокую благодарность заведующей лабораторией генетики высшей нервной деятельности Института физиологии им. И. П. Павлова АН СССР проф. Н. Г. Лопатиной за регулярное предоставление крыс К—М и постоянное внимание к работе.

Если у крыс линии Вистар в состоянии спокойного бодрствования активность ГДК во фракции Φ_3 составляла 47,2 мкмоль ГАМК/мг белка/ч, то после их озвучивания активность фермента в этой фракции практически отсутствовала. Активность ГДК во фракции тяжелых синапсом (Φ_4) и митохондрий (Φ_5) после озвучивания животных значительно возрастала ($p < 0,05$).

Опыты же на крысах линии К—М показали, что в их синапсомах, полученных у животных в состоянии спокойного бодрствования, активности ГДК во фракции Φ_3 не было, в то время как после припадков, вызванных звуком, активность фермента в этой фракции появилась, достигая 37,4 мкмоль ГАМК/мг белка/ч. В митохондриальной фракции (Φ_5) активность ГДК несколько падала, тогда как во фракции тяжелых синапсом (Φ_4) она оставалась без изменений.

Таблица

Влияние озвучивания крыс линий Вистар и Крушинского—Молодкиной на активность ГДК в синапсомах коры больших полушарий головного мозга (в мкмоль ГАМК/мг белка/ч)

Линия крыс, условия опыта	Количество опытов n	Фракции				
		Φ_1	Φ_2	Φ_3	Φ_4	Φ_5
Вистар	8	0	17,2±6,3	47,2±13,1	55,5±17,7	35,4±11,2
Вистар, озвучивание	3	0	0	0	113,5±22,4	84,9±8,3
К—М, без припадков	5	0	0	0	71,1±11,6	62,7±15,1
К—М, припадки	5	0	0	37,4±12,3	60,8±11,0	34,1±6,6

Эти данные позволяют полагать о наличии наследственного дефекта в активности ГДК в синаптическом аппарате головного мозга у крыс линии К—М, причем с извращенной реакцией на звук.

Механизм установленных нами изменений активности ГДК в настоящее время объяснить пока еще не представляется возможным. Не исключено, что у крыс линии К—М, находящихся в спокойном состоянии, ГДК в легких синапсомах имеется, но она заторможена и проявляется лишь после припадков, который создает условия активирования этого фермента с образованием ГАМК. Весьма вероятно, что при этом имеют значение ионы Ca , которые могут высвобождаться в синапсах при возбуждении. Важную роль этих ионов в активации ГДК обсуждали неоднократно [9, 10]. При этом недавно было показано [11], что ионы Ca ответственны за прикрепление ГДК к мембранам синапсом, синтез и выброс ГАМК в нервных терминалях. Далее установлено, что у животных с генетической предрасположенностью к аудиогенным судорогам имеет место необычное поведение Ca^{2+} в клетках нервной ткани. Так, у мышей линии ДВА/2N, подверженных аудиогенным припадкам, была обнаружена сниженная активность Ca^{2+} -зависимой

АТРазы мембранных фракций [12]. У крыс линии К—М было выявлено [9] изменение распределения кальция в клеточных ядрах при судорожной активности.

В связи с этими фактами и кажется допустимым, что нарушение Ca^{2+} -транспортирующих систем в клетках мозга может в значительной мере обуславливать снижение связывания ГДК с синаптическими мембранами и тем самым резкое падение активности этого фермента в межпреступный период, способствуя снижению порога возбудимости у крыс линии К—М. И в наших опытах активация ГДК во фракции легких синапсом (Ф₃) в результате судорог у этих животных могла быть следствием значительного выхода Ca^{2+} и перераспределения данных ионов в цитоструктурах нервной ткани. Несомненно, что это предположение подлежит экспериментальной проверке.

THE INFLUENCE OF AUDIOGENIC CONVULSIONS ON GLUTAMATE DECARBOXYLASE ACTIVITY IN KRUSHINSKY—MOLODKINA RATS BRAIN SYNAPTOSOMES

DEMINA M. N., TUROVSKY V. S., DAMBINOVA S. A.

Institute of Experimental Medicine, USSR Academy of Medical Sciences,
Leningrad

The activity of glutamate decarboxylase has been measured in brain cortex subcellular fractions of Wistar and Krushinsky—Molodkina rats. It has been detected that on exposure to sound (40 dcb, 1 min) the enzyme activity markedly increased in Wistar rats (heavy synaptosomes and mitochondrial fraction), whereas in the case of Krushinsky—Molodkina rats the effect was the opposite one.

The data are interpreted in view of the possible role of Ca^{2+} in modulation and regulation of glutamate decarboxylase activity.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бехтерева Н. П., Камбарова Д. К., Поздеев В. К.—В кн.: Устойчивое патологическое состояние при болезнях мозга (под ред. Н. П. Бехтеревой), Л., Медицина, с. 45—54, 1975.
2. Löscher W., Frey H. H. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 296, 263—279, 1977.
3. Autillo L. A., Appel S. H., Pettis P., Gambetti P. L. Biochemistry, 7, 2615—2622, 1968.
4. Kurokawa M., Sakamoto T., Kato M. Biochem. J., 97, 833—844, 1965.
5. Надтоцкий В. В. Субклеточная характеристика синапсов головного мозга при разных функциональных состояниях центральной нервной системы. Автореф. канд. дис., Л., 28 с., 1978.
6. Lowe I. P., Robins E., Eyerman G. S. J. Neurochem., 3, 8—18, 1958.
7. Bradford M. M. Analyt. Biochem., 72, 248—256, 1976.
8. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов, Л., Изд-во ЛГУ, с. 11—13, 1975.
9. Salganikoff L., Robertis E. J. Neurochem., 12, 287—309, 1965.

10. Разумовская Н. И., Дамбинова С. А., Демина М. Н., Говорова Л. В. Бюл. экспер. биол. и мед., 91, 677—679, 1981.
11. Covarrubatas M., Tapia R. J. Neurochem., 31, 1209—1214, 1978.
12. Rosenblatt D. E., Lauter C. I., Trams E. J. J. Neurochem., 27, 1299—1304, 1976.

Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины АМН СССР,
Ленинград

Поступила 8.II 1982