

УДК 616—009.24;616.831;616.092.9

СВЯЗЫВАНИЕ ГАМК И ДИАЗЕПАМА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ, ГЕНЕТИЧЕСКИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К АУДИОГЕННЫМ СУДОРОЖНЫМ ПРИПАДКАМ

ЖУЛИН В. В., *ПЛЕСКАЧЕВА М. Г.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва *МГУ

У крыс-самцов линии *Крушинского-Молодкиной* (КМ), выведенных на способность к аудиогенным припадкам клонико-тонического типа, изучали состояние ГАМК и бензодиазепиновых рецепторов в теменной коре, мозжечке, стволе мозга. Активность рецепторов оценивали через сутки после однократного тестирования крыс в камере со звонком (120 дБ). Показатели крыс линии КМ сравнивали с данными контрольных беспородных самцов, у которых отсутствовала аудиогенная эпилептиформная реакция. Показано, что у крыс линии КМ снижено специфическое связывание $[^3H]$ дiazепама и $[^3H]$ ГАМК в мозжечке и коре. В стволе мозга пониженное связывание отмечено только для $[^3H]$ дiazепама. Дополнительная процедура вытеснения $[^3H]$ ГАМК немеченой ГАМК в коре мозга показала сходный характер вытеснения для обеих групп крыс. Это позволяет предположить, что пониженный уровень связывания в данном случае обусловлен уменьшением количества мест связывания.

Обсуждается возможная роль генетически закрепленного дефицита активности ГАМК и бензодиазепиновых рецепторов в качестве одной из причин повышенной судорожной готовности крыс линии КМ.

Аудиогенные судороги у грызунов—одна из известных экспериментальных моделей изучения механизмов эпилепсии [1, 2]. Специально выведенные на повышенную чувствительность к звуку крысы линии *Крушинского-Молодкиной* (КМ) [3, 4], дающие быстровозникающие и сильные припадки клонико-тонического типа могут быть удобным объектом, в частности для исследования генетически закрепленного нейрохимического комплекса, ответственного за генез судорожных состояний.

Существует гипотеза, согласно которой одной из причин возникновения различного типа эпилептиформных припадков является изменение состояния тормозных функций мозга [5, 6]. Эта гипотеза в определенной степени подтверждается экспериментальными данными об изменении в состоянии ГАМК-ергической системы мозга предрасположенных к аудиогенной эпилепсии животных [1, 2].

Одним из существенных звеньев ГАМК-ергической системы мозга являются ГАМК рецепторы, сопряженные с бензодиазепиновыми (БД) рецепторами и связанные с функционированием хлорного канала [7]. Исследование ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса животных, предрасположенных к аудиогенным судорогам,

может также дать ценную информацию для уточнения механизма противосудорожного действия бензодиазепинов.

Учитывая вышесказанное, в настоящей работе изучали связывание [^3H]ГАМК и [^3H]дiazепама с синаптическими мембранами различных отделов мозга крыс линии КМ.

Методы исследования

Интактных крыс-самцов линии КМ, выведенных в МГУ, или беспородных белых крыс-самцов в возрасте 6 недель (средняя масса 230 ± 12 г) помещали в камеру ($30 \times 45 \times 55$ см) с электрическим звонком, прикрепленным к потолку и обеспечивающим силу звука 120 дБ. Регистрировали латентный период начала двигательного возбуждения, длительность фазы двигательного возбуждения, время наступления и длительность развития судорог, а также степень припадка, которую оценивали по четырехбальной шкале [3]. Время наблюдения ограничивали 1 мин.

Через сутки крыс декапитировали при помощи пильотины, извлекали головной мозг и на холоде отделяли ствол мозга с верхними и нижними бугорками четверохолмия, мозжечок и теменную кору. Ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера в 10 мл среды выделения (0,32 М сахарозы, 0,05 М трис HCl , 0,001 М ЭДТА, pH 7,4) при 4° . Гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин, осадок отбрасывали, а супернатант вновь центрифугировали при 20000 g 20 мин. Супернатант сливали, а осадки грубых синаптических мембран P_2 замораживали на ночь при -40° . Затем осадки суспендировали в 10 мл 50 мМ трис HCl , pH 7,4, центрифугировали при 20000 g 20 мин, разводили осадки в 5 мл 50 мМ трис HCl , pH 7,4 и замораживали гомогенаты на ночь при -40° . Размороженные гомогенаты вновь тщательно гомогенизировали. К 0,1 мл водного раствора [^3H]дiazепама (74 Ки/ммоль, «Amersham», Англия, конечная концентрация в пробе 4,88 нМ) добавляли 0,4 мл суспензии синаптических мембран. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 4° . Затем инкубационную смесь фильтровали под вакуумом через стекловолокнистый фильтр GF/C («Whatman», Англия) в течение 1 с и четырежды промывали фильтр 2 мл 50 мМ трис HCl , pH 7,4 при 4° . Высушенный фильтр помещали в сцинтилляционный флакон с 7 мл ЖС-8 («Реахим», СССР) и просчитывали на сцинтилляционном счетчике «Rackbeta» («ЛКВ», Швеция). Неспецифическое связывание определяли в присутствии $0,4 \cdot 10^{-8}$ М 7-бром-десметилдiazепама. Каждая проба общего и неспецифического связывания выполнена в двух параллелях. Количество белка определяли по Lowry и соавт. [8]. Определяли уровень специфического связывания как разность общего и неспецифического связывания. Рассчитывали удельный показатель специфического связывания на 1 мг белка.

Остаток гомогенатов синаптических мембран был заморожен на ночь при -40° . К оттаявшим гомогенатам (3,4 мл) добавляли 8 мл 0,02%-ного тритона X-100 в 50 мл 50 мМ трис- HCl pH 7,4 и инкуби-

ровали 20 мин при 37°, затем смесь центрифугировали при 20000 g 20 мин при 4°, супернатант сливали, и замораживали осадки на ночь при -40°. Оттаявшие осадки суспендировали в 3 мл 50 мМ трис-HCl pH 7,4 при 4°. К 0,1 мл водного раствора [³H]ГАМК («Изотоп», Ленинград; конечная концентрация в пробе 37,1 нМ) добавляли 0,4 мл синаптических мембран и инкубировали 30 мин при 4°. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 10⁻³ М ГАМК. Остальные параметры процесса и расчеты были такие же, как при связывании [³H]диазепама.

Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. Ранговые корреляции рассчитывали по Спирмену.

Результаты исследования

Среднее значение латентного периода наступления волны двигательного возбуждения от начала действия аудиогенного раздражителя у крыс-самцов линии КМ (среднее из 10) было $3,3 \pm 0,5$ с; продолжительность двигательного возбуждения— $5,2 \pm 0,7$ с; длительность припадка от 2- до 3-й степени— $5,2 \pm 0,7$ с; время от начала действия раздражителя до максимального развития судорог $15,5 \pm 0,9$ с (табл. 1). У всех 10 крыс линии КМ зарегистрированы выраженные клонико-тонические судороги 3- или 4-й степени. Ни одна из 10 контрольных крыс не дала судорог и реакций двигательного возбуждения.

Таблица 1
Показатели развития аудиогенной судорожной реакции у крыс-самцов линии КМ

№	I, с	II, с	III, с	IV, с	Степень припадка
1	5	6	3	14	3
2	2	4	4	13	4*
3	2	3	4	12	4*
4	2	4	5	14	4*
5	6	8	5	19	3
6	5	10	5	20	3
7	4	5	10	19	3
8	3	4	5	14	4*
9	2	4	3	14	4
10	2	4	8	15	4*

Примечание. I—время от начала действия звукового раздражителя до начала двигательного возбуждения; II—длительность фазы двигательного возбуждения; III—длительность развития припадка от 2- до 3-й степени; IV—время от начала действия звукового раздражителя до момента максимального развития судорог. 3—тоническое напряжение туловища и передних конечностей, переворачивание крысы набок, подергивания задних лапок; 4*—почти полное тоническое напряжение со исключением задних конечностей; 4—полное тоническое напряжение с вытягиванием передних и задних конечностей.

Связывание [³H]диазепама с синаптическими мембранами у крыс линии КМ было снижено по отношению к показателям контрольных крыс во всех исследованных отделах мозга (табл. 2). Наибольшие различия отмечены в мозжечке (28,5%) и стволе мозга (22,2%), однако и в коре больших полушарий мозга за счет чрезвычайно низ-

ких коэффициентов вариабельности рядов (7 и 4%) различия достоверны (7,1%).

Как и в случае связывания [^3H]диазепама, связывание [^3H]ГАМК у крыс линии КМ в наибольшей степени отличалось от контрольных животных в мозжечке (—36,9%). Более низким у крыс линии КМ был и уровень связывания [^3H]ГАМК в коре мозга (18,5%). В стволе мозга по этому показателю различий обнаружено не было.

Таким образом, общей характерной чертой крыс линии КМ является пониженный уровень связывания ГАМК и БД рецепторов в различных отделах головного мозга, что и служит, вероятно, одной из существенных причин низкой эффективности соответствующих тормозных систем. Безусловно, используя суммарный показатель—уровень связывания, нельзя однозначно определить, какой параметр изменен: количество доступных мест связывания, их аффинность или то и другое вместе. Если учитывать известные данные о гетерогенности БД рецепторов (высоко- и низкоаффинные БД рецепторы

Таблица 2

Показатели связывания [^3H]диазепама и [^3H]ГАМК с синептическими мембранами мозга беспородных крыс и крыс линии Крушинского-Молодкиной

Г р у п п а	Специфическое связывание (фмоль/мг белка)					
	[^3H]диазепам (4,83 нМ)			[^3H] ГАМК (27,1 нМ)		
	ствол	мозжечок	кора	ствол	мозжечок	кора
Беспородные крысы-самцы (n=10)	343,45±14,97	422,04±15,76	726,34±16,05	256,32±15,75	1131,81±28,33	(53,14±29,36)
Крысы самцы линии КМ (n=10)	298,31±13,02**	301,88±23,04**	674,78±9,88*	261,02±18,31	714,24±33,32**	534,18±29,82*

Примечание. n—количество животных; *p<0,01, **p<0,001 по отношению к группе беспородных крыс.

«центрального» и «периферического» типа, [9]) и ГАМК рецепторов (высоко- и низкоаффинные ГАМК_A рецепторы и ГАМК_B рецепторы, [10]), ответ на этот вопрос требует дополнительных экспериментов, однако мы сделали первый шаг в этом направлении, исследуя вытеснение [^3H]ГАМК из мембран коры линейных и беспородных крыс различными концентрациями немеченой ГАМК. Несмотря на значительные различия в абсолютных показателях связывания, графики вытеснения [^3H]ГАМК немеченой ГАМК, представленные в относительных величинах (% ингибирования), для обеих групп животных практически совпали (рис. 1). Этот факт свидетельствует о том, что пониженный уровень связывания [^3H]ГАМК в коре крыс линии КМ обусловлен, по-видимому, изменением не количества, а количества доступных для [^3H]ГАМК мест связывания.

Внутри каждой группы животных рассчитывали корреляции

между показателями связывания. У беспородных крыс в стволе мозга связывание [^3H]диазепама коррелирует с связыванием [^3H]ГАМК ($r=0,745$); связывание [^3H]диазепама в стволе мозга коррелирует со связыванием [^3H]ГАМК в мозжечке ($r=0,648$); обратной корреляцией связаны показатели связывания [^3H]ГАМК в стволе мозга и [^3H]диазепама в мозжечке ($r=-0,624$). Ни одна из описанных корреляций не обнаружена в группе крыс КМ, однако у этих животных, коррелирует связывание [^3H]диазепама в мозжечке и коре ($r=-0,683$). Не вдаваясь в детальный анализ корреляций, можно констатировать, что корреляционные соотношения между показателями связывания [^3H]диазепама и [^3H]ГАМК у крыс КМ значительно отличаются от таковых у крыс, резистентных к аудиогенному раздражителю.

На заключительном этапе работы были рассчитаны корреляции между показателями развития судорожного припадков и связыванием [^3H]диазепама и [^3H]ГАМК у крыс линии КМ. Из всех рассчитанных корреляций лишь одна оказалась достоверной: связывание [^3H]ГАМК в мозжечке коррелирует с длительностью развития припадков от 2- до 3-й степени (табл. 1) ($r=0,691$).

Обсуждение результатов

Следует отметить, что единственными критериями подбора животных для опыта были возраст и масса. Учитывая, что все крысы линии КМ в ответ на аудиогенный раздражитель в 100% случаев дали судороги, а беспородные белые крысы не дали судорог вообще, можно условно считать, что исследовались фенотипически противоположные популяции животных: предрасположенные и неперепредрасположенные к аудиогенным судорогам. При кардинальном различии реакций на звук сравниваемые группы животных значительно отличались друг от друга и по состоянию тормозных систем мозга, а именно: у крыс линии КМ понижено связывание меченых ГАМК и диазепама, что может в какой-то степени свидетельствовать об уменьшении эффективности использования ГАМК и БД рецепторов.

По современным представлениям, аудиогенные судороги у грызунов связаны, главным образом, с судорожной активностью стволовых и подкорковых образований, в основном продолговатого мозга и нижнего двухолмия [5, 11]. Нами показано, что у крыс линии КМ уровень связывания [^3H]диазепама в препарате, состоящем из мембран клеток ствола мозга и пластинки крыши, достоверно снижен. По-видимому, у крыс линии КМ пониженный уровень связывания [^3H]диазепама в данном препарате обусловлен изменением БД рецепторов, локализованных в верхнем двухолмии. На это указывают данные о высокой плотности ГАМК и БД рецепторов в этой структуре, так как аналогичные показатели для нижнего двухолмия и продолговатого мозга весьма малы [12].

Известно, что другая из изучаемых нами структур—мозжечок характеризуется самой высокой плотностью ГАМК рецепторов всех

типов и средней плотностью БД рецепторов «центрального» типа [12]. Важно отметить, что из трех изученных отделов мозга крыс линии КМ именно в мозжечке обнаружено максимальное отличие от контрольных животных—снижение уровня связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ и особенно $[^3\text{H}]\text{диазепама}$. Тормозное влияние этой структуры на развитие припадков показано в экспериментах, что позволяет рассматривать мозжечок в качестве «антисистемы», то есть одной из структур, функционирование которых подавляет патологическую гиперреактивность мозга [13]. Обнаруженная нами положительная корреляция длительности развития припадков и показателей связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в этой структуре также свидетельствует об участии мозжечка в механизмах торможения судорожной реакции. Характерно также, что выявленные у резистентных к судорогам крыс взаимосвязи между показателями связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ и $[^3\text{H}]\text{диазепама}$, относящиеся к мозжечку, отсутствуют у крыс линии КМ.

Особый интерес вызывают отличия по связыванию $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ и $[^3\text{H}]\text{диазепама}$, обнаруженные в теменной коре крыс линии КМ. В литературе имеются единичные и противоречивые данные по состоянию ГАМК и БД рецепторов у чувствительных к звуковому раздражителю крыс и мышей. Полученные нами результаты о значительном снижении показателей связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ и небольшом уменьшении связывания $[^3\text{H}]\text{диазепама}$ отчасти подтверждают данные об уменьшении плотности соответствующих рецепторов у мышей [14, 15]. В то же время исследования, проведенные на отличной от нашей линии крыс, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам (GEPR—Genetically Epilepsy-Prone Rats [2]), показали увеличение по сравнению с контролем числа доступных мест связывания для $[^3\text{H}]\text{мусцимола}$ и незначительное увеличение аналогичного показателя для $[^3\text{H}]\text{флуниотразепама}$ [16]. Эти расхождения с полученными нами данными могут быть вызваны рядом методических различий. В частности, отметим, что авторы вышеупомянутой работы, в отличие от нас, для оценки ГАМК рецепторов использовали $[^3\text{H}]\text{мусцимол}$. В настоящее время стало известно, что $[^3\text{H}]\text{мусцимол}$ помимо ГАМК рецепторов связывается с другими участками клеточной мембраны [17], то есть повышение связывания, обнаруженное ими, может быть обусловлено не только реакцией с ГАМК рецепторами.

Суммируя полученные нами данные, можно заключить, что крысы линии КМ, предрасположенные к аудиогенным судорогам, видимо, отличаются значительным нарушением функционирования тормозной ГАМК-ергической системы мозга. Для данной линии крыс это выражается в уменьшении связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в ряде структур мозга, а также в обнаруженном другими авторами увеличении содержания ГАМК в мозгу этих крыс [18]. Существующие данные о том, что системное введение крысам линии КМ ГАМК в больших дозах снижает в ряде случаев степень припадков, также косвенно свидетельствуют о дефектности ГАМК системы у крыс КМ [19]. Од-

нако неясно, как компенсирующее действие ГАМК в этом случае соотносится с приведенными выше данными о повышенном уровне этого медиатора в мозгу крыс КМ.

Дефектность ГАМК-ергической системы исследуемых крыс, вероятно, усиливается и за счет снижения связывающих параметров БД рецепторов. Как известно, бензодиазепины—экзогенные лиганды БД рецепторов—имеют выраженное противосудорожное действие [20]. У ряда бензодиазепинов, в частности диазепам, обнаружена почти стопроцентная корреляция между способностью купировать судороги и уровнем связывания с БД рецепторами мозга [21]. Кроме того, бензодиазепины облегчают и связывание ГАМК с ГАМК рецепторами и, таким образом, в определенной степени могут восстанавливать дефицит активности самой ГАМК-ергической передачи [7, 12].

В заключение следует отметить, что в механизме возникновения и развития аудиогенного судорожного припадка у грызунов существенную роль играют не только ГАМК-ергическая и связанная с ней БД система, но и другие холинергические системы, в частности моноаминергические, ацетилхолинергическая, глутаматергическая и др. системы [1, 2]. Конкретно для крыс линии КМ показана дефектность моноаминергических систем [22, 23], высокая активность АХЭ в коре мозга [24]. Однако не обнаружены различия по показателям связывания меченого глутамата у крыс линий КМ и *Wistar* [25]. Таким образом, генетическая предрасположенность к аудиогенным судорогам у животных определяется комплексом нейрохимических изменений, требующих, соответственно, и комплексного подхода к оценке наиболее вероятных механизмов генеза судорожной активности.

GABA- AND BENZODIAZEPINE RECEPTORS IN THE BRAIN OF KRUSHINSKY-MOLODKINA RATS GENETICALLY PRONE TO AUDIOGENIC SEIZURES

ZHULIN V. V., *PLESKACHEVA M. G.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR Academy
of Sciences, Moscow

*Moscow State University

GABA- and benzodiazepine receptors of neocortex, cerebellum and brainstem of Krushinsky-Molodkina (KM) rats bred on capacity to audiogenic seizures were studied. Binding parameters of these receptors were estimated in 24 hour after a single testing of rats in the box supplied with a bell (120 dB). Binding data of KM rats were compared with the data of control mongrel male rats which had not any audiogenic seizure reaction. It has been shown that specific binding of [^3H]diazepam and [^3H]GABA in neocortex and cerebellum of KM rats were diminished as compared with control ones. The decrease of specific binding in brainstem was found for [^3H]diazepam only. Using additional assay of [^3H]GABA binding inhibition by unlabelled GABA in neocor-

tex the decrease of specific binding caused by lowering of binding sites quantity has been defined. The deficiency of GABA- and benzodiazepine receptors binding capacity as one of the reasons of high seizure activity of KM rats is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Biziere K., Chambon J. P. *Rev. Neurol.*, v. 143, N 5, p. 329—340, 1987.
2. Fisher R. S. *Brain Res. Rev.*, v. 14, p. 245—278, 1989.
3. Крушинский Л. В. Формирование поведения животных в норме и патологии. М., МГУ, 1960.
4. Krushinsky L. V., Molodkina L. N., Fless D. A., Dobrokhotova L. P., Steshenko A. P., Semiokhina A. F., Zorina Z. A., Romanova L. G.—In: *Physiological effects of noise* (eds. B. L. Welch, A. S. Welch), New York, Plenum Press, p. 159—183, 1970.
5. Крушинский Л. В., Молодкина Л. Н., Флесс Д. А., Доброхотова Л. П., Стещенко А. П., Семиохина А. Ф., Зорина Э. А., Романова Л. Г., Цурита П. Эпилепсия (периодический бюллетень информационных и методических материалов проблемной комиссии по проблеме союзного значения «Эпилепсия»), Тбилиси, № 5, с. 37—49, 1972.
6. Аксентьев С. Б., Левинский М. В. *Журн. невропат. и психиатрии*, т. 90, вып. 1, с. 136—146, 1990.
7. Richards J. G., Mohler H. *Neuropharmacology*, v. 23, № 2B, p. 233—242, 1984.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
9. Narangos P. J., Patel J., Clark-Rosenberg R. *Nol. Pharmacol.*, v. 22, N 1, p. 26—32, 1982.
10. Schoch P., Richards J. G., Haring P., Takacs B., Stahl C., Stachelin T., Haeffely W., Mohler H. *Nature*, v. 314, N 6007, p. 168—171, 1985.
11. Browning R. A. *Life Sci.*, v. 39, N 10, p. 857—867, 1986.
12. McCabe R. T., Wamsley J. K. *Life Sci.*, v. 39, N 21, p. 1937—1945, 1986.
13. Крыжановский Г. Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы: генераторные механизмы нейропатологических синдромов. М., Медицина, 1980.
14. Ticku M. K. *J. Neurochem.*, v. 33, p. 1135—1138, 1979.
15. Horton R. W., Prestwich S. A., Meldrum B. S. *J. Neurochem.*, v. 39, p. 864—876, 1982.
16. Booker J. D., Dailey J. W., Jobe P. C., Lanet J. D. *Life Sci.*, v. 39, N 9, p. 799—806, 1986.
17. Jr. P. M., Bashir-Elahi R., Chader G. J. *Neurochem. Int.*, v. 8, N 2, p. 233—237, 1986.
18. Логинова Г. А., Сергиенко Н. Г., Попова Л. Д. I съезд медицинских генетиков Укр. ССР: Тез. докл., Львов, с. 149—150, 1988.
19. Рябикская Е. А., Габидова Н. М. *Журн. высшей нервной деятельности*, т. 32, вып. 1, с. 47—53, 1982.
20. Левинский М. В. *Журн. невропатол. и психиатрии*, т. 89, вып. 6, с. 118—126, 1989.
21. Paul S. M., Syapin P. J., Paugh B. A., Moncada V., Scolnick P. *Nature*, v. 281, p. 688—689, 1979.
22. Долина С. А. *Журн. невропатол. и психиатрии*, т. 82, вып. 6, с. 40—45, 1982.
23. Сергиенко Н. Г., Логинова Г. А. *Вопр. мед. химии*, т. 29, № 6, с. 21—24, 1983.
24. Еремеев Н. С.—В кн.: *Генетика поведения*, Ленинград, Наука, с. 88—92, 1969.
25. Дамбинова С. А., Городинский А. И. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 94, № 2, с. 58—59, 1982.

Поступила 6. XI. 1990