

## АТФазная АКТИВНОСТЬ В НЕЙРОНАХ И НЕЙРОГЛИИ ПРИ СУДОРОГАХ, ВЫЗВАННЫХ ПИКРОТОКСИНОМ

Т.И. ТОЛСТУХИНА, М.А. ФЛЕРОВ\*

Санкт-Петербургский Государственный университет Университетская наб.,  
д.7/9199034, Санкт-Петербург

\*Институт физиологии им.И.П. Павлова, РАН Санкт-Петербург, 199034,  
наб.Макарова, д.6, Эл. Почта: sts@infran.ru

Исследовали влияние судорог, вызванных введением пикротоксина крысам, на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы нейрональной и нейроглиальной фракции коры головного мозга. В нейроглии при судорогах активность  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазы увеличилась, в нейронах же ее значение осталось неизменным. Возможно, что  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза нейроглии играет роль регулятора ионных потоков и противосудорожного протектора нейронов. В восстановительный период АТФазные активности в нейрональных и глиальных клетках возвращаются к значениям контроля.

**Ключевые слова:** мозг, нейроны, нейроглия, судороги,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза.

**ВВЕДЕНИЕ.** Интерес исследователей к системе нейрон-нейроглия определяется ее способностью к саморегулированию и самонастройке при слаженной работе отдельных ее компартментов в норме и в экстремальных условиях. Роль каждого партнера в этом тандеме очень важна. И если ранее считали, что только нейроны выполняют специфические функции в ЦНС, а глия - «всего лишь» трофическую, то в настоящее время установлено, что последняя также вносит значительный вклад в поддержание гомеостаза мозга. Например, нейроглия способна защищать нейроны, "очищая" межклеточное пространство от избытка  $\text{K}^+$  [1]. Вызываемая ионами  $\text{K}^+$  деполяризация ведет к активации ферментов в глиальных клетках, вследствие чего начинают вырабатываться вещества, необходимые для поддержания метаболизма нейронов на нужном уровне, как в момент их повышенной активности, так и в последующий восстановительный период [2]. Способность глии аккумулировать ионы калия связана с еще одной ее функцией - участием в процессах удаления медиаторов и других сильно действующих агентов, выделяющихся в течение нейрональной активности. Кроме того клетки нейроглии участвуют в синтезе предшественников некоторых регуляторов, в дальнейшем поставляемых в нейроны.

Механизмы нейро-глиального партнерства при нормальной работе головного мозга, и, особенно при различных видах патологии до конца не изучены.

Несмотря на обширную литературу, посвященную молекулярным механизмам патогенеза эпилептической активности [3,4], недостаточно исследованы АТФазные системы, различных нейрональных и глиальных клеточных популяций при судорожных состояниях, и их участие в репарационных процессах в постсудорожный период. Установлено, что у больных эпилепсией имеются значительные изменения глиальных мембран, которые можно считать либо причиной, либо последствием судорог [5]. Глиальная АТФаза у эпилептиков начинает активироваться меньшим количеством ионов  $\text{K}^+$ . Ясно, что судороги

должны вызывать модуляцию АТФазной активности не только в нейроглии, но одновременно и в нейронах. Работ, посвященных взаимоотношениям АТФаз этих двух клеточных популяций при судорогах, практически нет, поэтому целью настоящей работы явилось изучение данного вопроса.

**МЕТОДИКА.** В экспериментах использовали крыс-самцов массой 120-150 г. Судороги вызывали внутрибрюшинным введением 0,25% пикротоксина [6, 7], из расчета 0,2 мл на 100 г массы животного. Крыс декапитировали на пике судорожной активности и после ее прекращения, когда восстанавливались нормальные поведенческие реакции животных (через 1-1,5 часа после наблюдаемого прекращения судорог). Мозг быстро извлекали и отмывали охлажденным физиологическим раствором. Кору больших полушарий помещали на охлажденные стеклянные пластинки, тщательно измельчали и выделяли фракции, обогащенные нейронами и нейроглией по методу Селлинджера с соавт. [8] в модификации Флерова [9]. В нейрональной и глиальной фракциях определяли содержание белка [10]. Полученные осадки клеточных фракций подвергали однократному замораживанию - оттаиванию с тем, чтобы активные центры АТФаз становились более доступными субстрату и ингибитору, что способствует более полному определению АТФазной активности [11,12]. Активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы рассчитывали по разности общей и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазных активностей, которые определяли в отсутствие и в присутствии убаина. Полученные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Известно, что пикротоксин преимущественно влияет на высшие отделы ЦНС [6,13], взаимодействуя с ГАМК-рецептор / Cl-ионофорным комплексом. Природа этого взаимодействия до сих пор не ясна, но существуют предположения, что пикротоксин либо вызывает "закупорку" хлорного канала, изменяя его проводимость или даже оставляя закрытым, либо блокирующее действие пикротоксина не прямое, а обусловлено конформационными изменениями ионофора [14]. В любом случае пикротоксин, воздействуя на синаптическую передачу [15], сдвигает равновесие между возбуждающими и тормозными медиаторными аминокислотами. У людей, страдающих эпилепсией, наблюдается снижение активности глутаматдекарбоксилазы - фермента синтеза ГАМК. Одновременно с этим наблюдается разрушение в мозге клеток, содержащих глутаматдекарбоксилазу [16]. Кроме того обнаружено, что у эпилептиков развитию спонтанной судорожной активности предшествует накопление внеклеточного глутамата в гиппокампе до потенциально нейротоксических величин [17]. Учитывая, что ингибитор  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы убаин тормозит захват ГАМК синапсом и глиальными клетками [18], а ионный ток  $\text{Na}^+$  в направлении своего химического градиента и  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза играют решающую роль в переносе полярных молекул ГАМК через мембрану нервного окончания [7], представляет несомненный интерес выяснить, как пикротоксиновые судороги изменяют АТФазную активность отдельно в нейронах и нейроглии.

Из данных, представленных в таблице 1 видно, что при действии пикротоксина в нейрональной фракции наблюдается резкое увеличение как общей АТФазной активности (на 76,5%), так и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазной активности (на 89%). На этом фоне достоверных изменений активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы не обнаружено. В восстановительный период активность АТФаз приближается к норме.

Для нейроглии общая,  $\text{Mg}^{2+}$  - и  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ - АТФазные активности значительно выше, чем в нейронах (табл.2).

При действии пикротоксина в нейроглии в отличие от нейронов увеличиваются все АТФазные активности: активность  $\text{Mg}$ -АТФазы увеличивается на 42%, а  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы - на 65%. В восстановительный период активности АТФаз возвращались к исходным значениям.



Таблица 1. АТФазная активность нейрональной фракции, выделенной из коры головного мозга крыс при введении пикротоксина и в восстановительный период (в мкмолях Фн на мг белка в час)

	АТФазная активность		
	Общая	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>
Контроль	8,27±0,51	5,91±0,39	2,31±0,38
Опыт	14,60±0,82**	11,18±0,72**	2,91±0,26
Восстановление	6,08±0,14**	5,06±0,12*	1,05±0,15**

Достоверность различий - \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Таблица 2. АТФазная активность нейроглиальной фракции, выделенной из коры головного мозга крыс при введении пикротоксина и в восстановительный период (в мкмолях Фн на мг белка в час)

	АТФазная активность		
	Общая	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>
Контроль	28,30±1,34	18,68±0,95	9,48±0,89
Опыт	42,46±0,98**	26,71±0,84**	15,68±0,78**
Восстановление	27,21±1,09**	18,81±1,00**	8,41±0,80**

Достоверность различий - \*\* -  $p < 0,01$

Индивидуальная реакция Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФаз нейронов и нейроглии на пикротоксиновые судороги связана не столько с их различиями в молекулярной массе и в электрофоретической подвижности [19], сколько с неодинаковой способностью поглощать ионы K<sup>+</sup> [3, 20, 21, 22, 23]. А.И. Ройтбаком выдвинута достаточно убедительная гипотеза о защитной роли глии при эпилептическом возбуждении по отношению к нейронам от повышенных концентраций калия. В процессах удаления ионов K<sup>+</sup> из межклеточных щелей участвуют как астроциты, так и олигодендроциты [1].

Совокупность имеющихся в настоящее время экспериментальных данных позволяет заключить, что глиальные клетки действуют как пространственный буфер, перераспределяя накопившиеся в межклеточных щелях ионы K<sup>+</sup> от мест перенасыщения ими к местам недостатка K<sup>+</sup>, и как аккумулятор ионов K<sup>+</sup> [23]. В разных ситуациях эти механизмы действуют с различной эффективностью. Имеются свидетельства, что во время эпилептической активности, когда нейроны теряют ионы K<sup>+</sup> (до 77% от контроля), приобретая Na<sup>+</sup> (160% от контроля), нейроглия накапливает ионы K<sup>+</sup> (131% от контроля), отдавая до 76% от контроля ионов Na<sup>+</sup> [21]. Предполагают, что у больных фокальной эпилепсией клетки нейроглии в процессе пролиферации теряют способность K<sup>+</sup> буфера [24].

Активация глиальной Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы скорее всего направлена на поглощение клетками нейроглии ионов K<sup>+</sup> и на поддержании работы Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-насоса в нейронах на постоянном уровне. Важным фактором, препятствующим увеличению Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазной активности в нейронах, возможно, является усиленное поступление в клетку ионов Ca<sup>2+</sup>, параллельно которому стимулируется высвобождение ГАМК [25]. Согласно мембранной теории возбуждения, при возбуждении нейронов, сначала открываются Na<sup>+</sup>-каналы (по которым быстро поступает небольшая часть ионов Ca<sup>2+</sup>), затем Ca-каналы (по которым поступает основная часть Ca<sup>2+</sup>, необходимая для секреции) и только затем K<sup>+</sup>-каналы. Иными словами, изменения концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> при возбуждении первичны и предопределяют время и мощность последующего накопления внеклеточного калия

[3]. Вероятно,  $\text{Ca}^{2+}$  является причиной некоторого понижения активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы нейронов в восстановительный период в нашем эксперименте. По видимому, перераспределение ионных потоков в нейронах еще не закончилось.

Наблюдаемое в глиальной фракции снижение  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазной активности до контрольного уровня в восстановительный период по сравнению с результатом, полученным для судорожного припадка, вероятно, связано с тем, что в этих клетках уже восстановился внутри- и межклеточный ионный баланс.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают концепцию нейроглиального партнерства [22,26] в поддержании гомеостаза мозга на определенном уровне, при этом главным предназначением глии является не только хранение информации, передаваемой и модулируемой нейронами, но и выполнение ею защитных функций при экстремальных воздействиях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Barres B.A., Chun L.L.Y., Corey D.P. (1988.) *Glia*, 1, 10-30;
2. Флеров М.А. (1996.) В кн. Нейрохимия (ред. И.П.Ашмарин, П.В.Стукалов), с. 193-207;
3. Глебов Р.Н., Крыжановский Г.Н. (1983.) Усп. физиол. наук, 14 (1), 102-119;
4. Глебов Р.Н., Крыжановский Г.Н. (1984.) Усп. физиол. наук, 15 (3), 83-107;
5. Grisar T., Delgado-Escueta A.V., Frank G. (1982) *Neurosci. Lett.*, 10, Suppl. 216;
6. Ильюченко Р.Ю. (1972.) Фармакология поведения и памяти. Новосибирск. Наука.
7. Раевский К.С., Георгиев В.П. (1986.) Медиаторные аминокислоты. М. Медицина.
8. Sellinger O., Azuerra J.M., Johnson D.B. et al. (1971.) *Nature New Biol.* (London), 230 (16), 253-256;
9. Флеров М.А. (1979) Вестник ЛГУ, 9, 80-86;
10. Lowry O.H., Rosebrough K.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951.) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275;
11. Глебов Р.Н., Шевцов В.В., Гришанкова Е.В., Сальская И.Р., Мезенцев А.И. (1971.) Бюлл. эксп. биол. мед., 72, (10), 36-38;
12. Толстухина Т.И. (1982.) В кн.: Методы биохимических исследований. (ред. М.И.Прохорова) Л-д, с. 256-258;
13. Сытинский И.А. (1977.) ГАМК - медиатор торможения. Л. Наука.
14. Farrant M., Webster R.A. GABA antagonists. Their use and mechanism of action. pp. 161-203;
15. Tipia R. (1976.) *Bol. Estud. Med. y biol.* 150.
16. Tasker J.G., Duker F.E. (1991.) *Neurochem. Res.* 16, 251-262;
17. During M.J., Spenser D.D. (1993.) *Lancet*, 8861, 1607-1610;
18. Henn F., Hamberger A. (1971.) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 2686-2690;
19. Guillaume D., Grisar T., Delgado-Escueta A.V. (1986.) Dynamic properties of glial cells. (ed. T.Grisar e.a.) Oxford, N.Y. pp.165-176.
20. Куффлер С., Николс Дж. (1979.) От нейрона к мозгу. М. Мир.
21. Погадаев К.И. (1986) Эпилептология и патохимия мозга.
22. Ройтбак А.И. Глия и ее роль в нервной деятельности. С-Пб.: Наука.
23. Walz W., Wurtke W., Hertz L. (1984) *Brain. Res.*, 292, 367-374;
24. Pollen D.A., Trachtenberg M.G. (1990) *Science*. 167, 1252-1254;

25. Bernath S., Zigmond M.J. (1990.) *Neuroscience*, **36**, 677-682;
26. Флеров М.А. (1992.) Особенности метаболизма фосфолипидов нейронов и нейроглии при различных функциональных состояниях ЦНС. Докт. дисс. С-Пб.

Поступила 10. 06. 97 г.

# **ATPase ACTIVITY OF NEURONE AND NEUROGLIA UNDER PICROTOXIN-INDUCED CONVULSIONS**

T.I.TOLSTUKHINA, M.A.FLEROV

SPb-State University, I.P.Pavlov Physiological Institute.  
199034, St.-Petersburg, nab.Makarova 6, sts@infran.ru

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was studied in neurones and neuroglia under conditions of convulsions caused by picrotoxin administration. Picrotoxin is a stimulant which causes convulsions by supression of presynaptic inhibition. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in neuroglia was increased in convulsion, bat was not altered in neurones. It is possible, that glial Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity plays the role of neuronal ion's flows regulator and neuronal protector from convulsions. In recovery period ATPase activities in neuronal and neuroglial cells run up to control.

**Key words:** Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, neurones, neuroglia, seizures, brain, the picrotoxin.