

И.Г. Ребров, М.В. Калинина

Влияние нарушения целостности синаптических мембран мозга крыс на функциональную активность ГАМК_A-рецептор/Cl⁻-ионофорного комплекса в ЦНС

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Исследовали функциональную активность ГАМК_A-рецептор/Cl⁻-ионофорного комплекса по величине мусцимол-стимулируемого входа радиоактивного изотопа ³⁶Cl⁻ в синаптонейросомы коры головного мозга крыс линии Вистар в условиях изменения структуры и проницаемости нейрональных мембран. Целостность мембран нарушали устранением Ca⁺² и Mg⁺² из среды инкубации и методом замораживания-оттаивания синаптонейросом. В обоих случаях наблюдалось увеличение базального входа ³⁶Cl⁻ в синаптонейросомы, свидетельствующее о повышении неспецифической проницаемости нейрональных мембран, и снижение активности ГАМК_A-рецептор/Cl⁻-ионофорного комплекса. Сделан вывод о взаимосвязи процессов повреждения нейрональных мембран и снижения тормозных процессов в эпилептическом очаге.

Ключевые слова: ГАМК_A-рецептор, синаптонейросомы, изотоп ³⁶Cl⁻, Ca⁺², Mg⁺²

I.G. Rebrov, M.V. Kalinina

Effect of damage integrity rat brain synaptic membranes on the functional activity GABA_A-receptor/Cl⁻-ionophore complex in the CNS

Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

Functional activity of the GABA_A-receptor/Cl⁻ ionophore complex was investigated the muscimol-stimulated entry of the radioactive isotope ³⁶Cl⁻ in synaptoneurosomes in changing the structure and permeability of neuronal membranes. Integrity of the membranes was damaged by removal of Ca⁺² and Mg⁺² from the incubation medium and by the method of freezing-thawing synaptoneurosomes. In both cases, an increase in basal ³⁶Cl⁻ entry into synaptoneurosomes, indicating increased nonspecific permeability of neuronal membranes, and decreased activity the GABA_A-receptor/Cl⁻ ionophore complex. The conclusion about the relationship of processes damage neuronal membranes and reducing the inhibitory processes in the epileptic focus.

Key words: GABA_A-receptor, synaptoneurosomes, isotope ³⁶Cl⁻, Ca⁺², Mg⁺²

ГАМК_A-рецептор/Cl⁻-ионофорный комплекс (ГАМК_A-РК), ключевое звено ГАМК-ергического торможения в ЦНС, играет важную роль в процессе эпилептогенеза. Снижение функциональной активности ГАМК_A-РК приводит к гиперактивации (эпилептизации) нейронов. Известно, что состояние гиперактивности нейронов в эпилептическом очаге сохраняется даже в отсутствие эпилептического припадка, что подтверждают данные ЭЭГ [10]. Одним из следствий перманентной гиперактивности нейронов является усиление перекисного окисления липидов и активация фосфолипаз с образованием высших жирных кислот из фосфолипидов [5]. Эти процессы приводят к возникновению пор и дефектов структуры в липид-

ном слое нейрональных мембран. Образование пор способствует увеличению неспецифической проницаемости мембраны, что приводит к уменьшению трансмембранных ионных градиентов. Конформационные изменения, возникающие в структуре мембраны, могут вызвать изменение сродства расположенных в мембране рецепторных комплексов к медиаторам и фармакологическим препаратам.

Двухвалентные катионы Ca⁺² и Mg⁺² играют важную роль в стабилизации клеточной мембраны. Они связывают между собой молекулы липидов, обеспечивая их упорядоченное расположение в клеточных мембранах. Устранение Ca⁺² и Mg⁺² из внеклеточной среды приводит к нарушению структуры клеточной мембраны и, как следствие, повышает ее неспецифическую проницаемость [4, 11]. Известно также, что замораживание—оттаивание мембран ме-

Для корреспонденции: Калинина Марина Васильевна, науч. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: kalinka0304@yandex.ru

няет их структуру. Замораживание липидного бислоя в результате фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель сопровождается появлением липидных пор, часть которых сохраняется при последующем оттаивании [1].

Поскольку ранее нами было показано, что при моделировании процесса эпилептогенеза посредством пентилентетразолового киндинга снижается уровень функциональной активности (ГАМК_A-РК) [3], то основной задачей данной работы являлось изучение связи между нарушениями проницаемости и структуры нейрональных мембран и функциональной активностью ГАМК_A-РК синаптонейросом. Нарушение целостности нейрональных мембран моделировали устранением Ca⁺² и Mg⁺² из среды инкубации и методом замораживания—оттаивания синаптонейросом.

Методика

В опытах использовали 30 самцов крыс линии Вистар массой 170—190 г. Животных содержали в обычных условиях вивария на стандартном пищевом рационе. В постановке эксперимента руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» ФГБУ «НИИОПП» РАМН, которые соответствуют требованиям Всемирного общества защиты животных (WSPA) и европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Синаптонейросомы выделяли из коры головного мозга крыс по методике Hollingsworth [9] с некоторыми изменениями [2]. Крыс декапитировали, выделяли кору головного мозга и при 0—4°C, гомогенизировали ее вручную — 5 фрикций в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в среде Кребса—Рингера следующего состава в мМ: NaCl — 145, KCl — 5, MgSO₄ — 1, CaCl₂ — 1, глюкоза — 10, HEPES — 10, рН=7,4 (20°C) в соотношении 1 г ткани на 15 мл среды. Гомогенат последовательно фильтровали через нейлоновые сита (Рахмановский комбинат, Россия) с размером ячеек 300, 99, 60 и 27 мкм. Фильтрат центрифугировали 5 мин при 2700 г, осадок ресуспендировали в том же объеме среды Кребса—Рингера и повторно центрифугировали при тех же условиях. Осадок после второго центрифугирования суспендировали в среде Кребса—Рингера таким образом, чтобы конечная концентрация синаптонейросом по белку была около 4 мг/мл. Синаптонейросомы использовали сразу после выделения. Замену инкубационной среды на среду без Ca⁺², без Mg⁺² или без Ca⁺² и Mg⁺² производили центрифугированием 5 мин при 2700 г, после чего осадок ресуспендировали в том же объеме соответствующего раствора. Функциональную активность ГАМК_A-рецептор/Cl⁻-ионофорного комплекса

определяли по методике Shwartz [8]. Вход ³⁶Cl⁻ в синаптонейросомы стимулировали агонистом ГАМК_A-рецептора мусцимолом. Суспензию синаптонейросом аликвотами по 100 мкл (400 мкг белка) разливали в пробирки и преинкубировали 30 мин при 20°C. Затем в пробы добавляли по 100 мкл раствора Кребса—Рингера, содержащего 0,5 мкКи ³⁶Cl⁻ («Изотоп», Россия) и мусцимол в концентрации от 2 до 100 мкМ. Через 5 с вход ³⁶Cl⁻ в синаптонейросомы останавливали фильтрованием через стекловолочные фильтры GF/C («Whatman», Англия) и промывали трижды четырьмя мл охлажденного до 0—4°C раствора Кребса—Рингера. Фильтры сушили, помещали во флаконы со сцинтиллятором и считали на счетчике РАСВЕТА (ЛКВ, Швеция). Синаптонейросомы использовали сразу после выделения. Мусцимол-стимулируемый вход ³⁶Cl⁻ в синаптонейросомы определяли по разности между входом ³⁶Cl⁻ в присутствии мусцимола и базальным входом изотопа.

Проведено 4 серии опытов. В 1-й серии опытов изучали изменения входа ³⁶Cl⁻ в синаптонейросомы в стандартной среде содержащей 1 мМ Mg⁺², но без Ca⁺². 2-я серия опытов была проведена со средой инкубации без Mg⁺², но с Ca⁺². В 3-й серии опытов в среде без Mg⁺² и Ca⁺². Вход ³⁶Cl⁻ в синаптонейросомы в 1—3 сериях опытов определяли через 10 с и 30 мин после изменения среды инкубации. В 4-й серии проводили замораживание синаптонейросом на 24 ч при -15°C и последующее оттаивание в течение 2 ч при комнатной температуре.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием стандартного пакета программ Statistica for Windows по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой значимости показателей и различий рассматриваемых выборок по t-критерию Стьюдента. Числовые данные представлены как среднее значение (M) ± стандартная ошибка (m). Достоверными считали различия между группами при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты опытов по исследованию влияния двухвалентных катионов кальция и магния на вход ³⁶Cl⁻ в синаптонейросомы представлены в таблицах: базальный вход представлен в табл. 1, мусцимол-стимулируемый — в табл. 2.

В 1-й серии опытов через 10 с после удаления кальция из среды инкубации синаптонейросом (путем замены стандартной среды на безкальциевую) базальный вход ³⁶Cl⁻ по сравнению с контролем практически не изменялся, тогда как мусцимол-стимулируемый вход уменьшался на 27,8%. Через 30 мин после удаления кальция из среды инкубации было

Таблица 1

Базальный вход $^{36}\text{Cl}^-$ в синаптонейросомы в нмоль $\text{Cl}/\text{мг}$ белка через 10 с и через 30 мин

Среда инкубации	Время инкубации	
	10 с	30 мин
Контроль с Ca^{+2} и Mg^{+2}	43,2±2,3	41,5±3,2
Опыт без Ca^{+2}	44,6±3,5	33,4±2,4
Опыт без Mg^{+2}	42,5±3,9	49,8±9,4
Опыт без Ca^{+2} и Mg^{+2}	49,4±3,4	58,7±5,0*

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 2

Мусцимол-стимулируемый вход $^{36}\text{Cl}^-$ в синаптонейросомы в нмоль $\text{Cl}/\text{мг}$ белка через 10 с и через 30 мин

Среда инкубации	Время инкубации	
	10 с	30 мин
Контроль с Ca^{+2} и Mg^{+2}	31,8±4,2	30,5±4,3
Опыт без Ca^{+2}	20,9±3,1*	32,7±5,2
Опыт мусцимол без Mg^{+2}	16,4±3,9**	19,5±9,8**
Опыт мусцимол без Ca^{+2} и Mg^{+2}	5,5±3,8*	-0,8±7,1*

Примечание. * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,05$ по сравнению с контролем

выявлено снижение базального входа $^{36}\text{Cl}^-$ на 25,6%, а мусцимол-стимулируемый вход практически полностью восстанавливался до контрольного уровня. То есть, устранение Ca^{+2} из среды инкубации оказывает влияние на вход $^{36}\text{Cl}^-$ только на начальном этапе.

Следующая 2-я серия была проведена со средой инкубации без Mg^{+2} , но с Ca^{+2} . Через 10 с после устранения ионов магния из среды базальный вход $^{36}\text{Cl}^-$ практически не отличался от контрольного, а мусцимол-стимулируемый вход $^{36}\text{Cl}^-$ уменьшался до 48,4% от контрольного уровня.

В 3-й серии опытов в среде без Ca^{+2} и Mg^{+2} через 10 с базальный вход возрастал на 11,9%, а мусцимол-стимулируемый уменьшался в 8,2 раза, через 30 мин базальный вход был выше контрольного на 20%, а мусцимол-стимулируемый был на достоверном нулевом уровне.

В 4-й серии опытов синаптонейросомы подвергали процедуре замораживания—оттаивания. Замораживание синаптонейросом на 24 ч при -15°C и последующее оттаивание (2 ч при комнатной температуре) приводило повышению базального входа на 47,5% с 37,1±3,2 до 63,6±4,8 нмоль $\text{Cl}/\text{мг}$ белка и уменьшению мусцимол-стимулируемого на 56% с 26,9±1,8 до 15,1±3,7 нмоль $\text{Cl}/\text{мг}$ белка, т.е. результату, подобному эффекту устранение двухвалентных катионов из среды инкубации. С другой стороны, не всякое изменение структуры синаптических мембран приводило к увеличению базального и уменьшению мусцимол-зависимого входа $^{36}\text{Cl}^-$.

Проведенные нами исследования позволяют заключить, что повреждение синаптических мембран посредством как устранения Ca^{+2} и Mg^{+2} из среды инкубации, так и замораживанием—оттаиванием синаптонейросом приводит к увеличению базального входа $^{36}\text{Cl}^-$ в синаптонейросомы. Это свидетельствует о повышении неспецифической проницаемости, которое наблюдается при нарушении целостности мембраны, например образование мембранных пор [6, 7]. Кроме того, наблюдается уменьшение мусцимол-стимулируемого входа $^{36}\text{Cl}^-$ в синаптонейросомы в не только этих условиях, но и в отсутствие одного из катионов — либо Ca^{+2} , либо Mg^{+2} , когда неспецифическая проницаемость не изменяется. То есть, повреждение синаптических мембран приводит к снижению функциональной активности ГАМК_A-РК. Возможными причинами снижения функциональной активности ГАМК_A-РК могут быть нарушение структуры синаптической мембраны, например изменение ее текучести [10]. Повышение неспецифической проницаемости мембраны вследствие образования липидных пор приводит к изменению трансмембранных градиентов ионов, прежде всего аниона хлора [8], что также способствует снижению функциональной активности ГАМК_A-РК.

Таким образом, можно сделать вывод, что повреждение нейрональных мембран в эпилептическом очаге будет приводить к уменьшению функциональной активности ГАМК_A-РК, т.е. к снижению торможения. Это, в свою очередь, будет способствовать дальнейшей гиперактивации нейронов с последующим усилением процессов, повреждающих синаптические мембраны.

Список литературы

1. Антонов В.Ф., Аюсов А.А., Норик В.П. и др. Мягкая порация плоских бислойных липидных мембран из дипальмитоилфосфатидилхолина при температуре фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель // Биофизика. — 2005. — Т. 50 (5). — С. 867-877.
2. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А. и др. Cl⁻-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс на средней стадии развития хронической эпилептизации мозга (фармакологического киндлинга) // Бюлл. Экспер. Биол. и мед. — 2007. — Т. 143, №11. — С. 507-509.
3. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А. и др. Cl⁻-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс после развития хронической эпилептизации мозга (фармакологического киндлинга) // Бюлл. Экспер. Биол. и мед. — 2008. — Т. 145, — №3. — С. 255-258.
4. Семенова С.Б., Ю.А. Эндогенные катион-транспортирующие каналы в клетках миелоидной лейкемии человека // Биологические мембраны. — 2006. — Т. 23, №4. — С. 321-329.
5. Гвозденко Т.А. Возрастные аспекты состояния пероксидации липидов и антиоксидантной защиты при действии аллоксана // Бюлл. Экспер. Биол. и мед. — 2005. — Т. 139, №3. — С. 283-287.
6. Agre P. The Aquaporin Water Channels // Proc. Am. Thorac. Soc. — 2006. — Vol. 3(1). — P. 5-13.
7. Alex E., Peter W. Membrane lysis during biological membrane fusion: collateral damage by misregulated fusion machines // J. Cell. Biol. — 2008. — Vol. 183(2). — P. 167-188.
8. Cesetti T., Ciccolini F., Li Y. GABA Not Only a Neurotransmitter: Osmotic Regulation by GABA_AR Signaling // Front. Cell. Neurosci. — 2012. — Vol. 6. — P. 3.
9. Hollingsworth E.B., McNeal E.T., Burton J.L. et al. Biochemical characterization of a filtered synaptoneurososome preparation from guinea pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-generating systems, receptors, and enzymes // J. Neurosci. — 1985. — Vol. 5. — P. 2240-2253.
10. Kaplan P.W. The EEG of status epilepticus // J. Clin. Neurophysiol. — 2006. — 23. — P. 221-229.
11. Sato A., Takagi K., Kano K. et al. Ca²⁺ stabilizes the semiquinone radical of pyrroloquinoline quinone // Biochem. J. — 2001. — Vol. 357(3). — P. 893-898.

Поступила 13.06.12

Сведения об авторах:

Ребров Игорь Григорьевич, канд. биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН