

С.А. Мензиков, М.Н. Карпова, М.В. Калинина

Прямое вовлечение глюкозы и Mg^{2+} -АТФ в регуляцию ГАМК_A-сопряженной Cl^- , HCO_3^- -АТФазы плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro*

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

Исследовано влияние глюкозы и Mg^{2+} -АТФ на сопряженную с ГАМК_A-рецепторами Cl^- , HCO_3^- -АТФазу плазматических мембран мозга крыс, состоящую из «базальной» Mg^{2+} -АТФазы, активируемой ионами Cl^- и HCO_3^- . Установлено, что глюкоза (1–10 мкМ) снижает активность «базальной» Mg^{2+} -АТФазы на 17% и полностью устраняет активацию фермента 10 мМ Cl^- + 2 мМ HCO_3^- . Обнаружен различный эффект глюкозы и Mg^{2+} -АТФ на активацию фермента различными концентрациями ионов Cl^- + HCO_3^- . Показано, что в диапазоне высоких концентраций (>1 мМ) субстрата (Mg^{2+} -АТФ) активирование фермента низкими концентрациями 10 мМ Cl^- + 2 мМ HCO_3^- не происходит. Однако, в присутствии глюкозы (10 мМ) ингибирующий эффект субстрата на фермент нивелируется, т.е. активность Cl^- , HCO_3^- -АТФазы восстанавливается. В то же время, в присутствии высоких концентраций 40 мМ Cl^- + 2 мМ HCO_3^- в среде инкубации ингибирующий эффект глюкозы и Mg^{2+} -АТФ на активность фермента незначителен (~20%). Делается вывод о прямом вовлечении глюкозы и Mg^{2+} -АТФ в регуляцию ГАМК_A-сопряженной Cl^- , HCO_3^- -АТФазной активности нейрональных мембран при различных концентрациях анионов в среде инкубации.

Ключевые слова: глюкоза, Mg^{2+} -АТФ, Mg^{2+} -АТФаза, плазматические мембраны мозга крыс, Cl^- , HCO_3^-

S.A. Menzikov, M.N. Karpova, M.V. Kalinina

Direct involvement of the glucose and Mg^{2+} -ATP in the regulation of the GABA_A-coupled Cl^- , HCO_3^- -activated Mg^{2+} -ATPase of the plasma membrane from rat brain *in vitro* experiences

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315, Russia

Effect of the glucose and Mg^{2+} -ATP on the coupled with GABA_A-receptor Cl^- , HCO_3^- -activated Mg^{2+} -ATPase of the plasma membranes from rat brain involving from «basal» Mg^{2+} -ATPase which it is activated by Cl^- , HCO_3^- ions it was investigated. The glucose (1–10 mM) decreased the «basal» Mg^{2+} -ATPase activity on 17% and completely eliminated the enzyme activation by 10 mM Cl^- + 2 mM HCO_3^- ions. The variety effect of the glucose and Mg^{2+} -ATP on the activation of the «basal» Mg^{2+} -ATPase by variety concentrations of anions it was established. So it was found that in the presence Mg^{2+} -ATP in the incubation medium >1 mM the enzyme activation by 10 mM Cl^- + 2 mM HCO_3^- ions not appear. However, in the presence of the glucose (10 mM) the inhibiting effect of the Mg^{2+} -ATP on the enzyme is disappears and Cl^- , HCO_3^- -ATPase activity is restored. While, in the presence of the high concentrations 40 mM Cl^- + 8 mM HCO_3^- in the incubation medium the inhibiting effect of the glucose and Mg^{2+} -ATP it was negligible (~20%). It was conclusion about direct involvement of the glucose and Mg^{2+} -ATP in the regulation of the coupled with GABA_A-receptor Cl^- , HCO_3^- -ATPase activity of the neuronal membrane under different concentration anions in the incubation medium.

Key words: glucose, Mg^{2+} -ATP, Mg^{2+} -ATPase, plasma membranes from rat brain, chloride, bicarbonate

В плазматических мембранах нейронов мозга крыс существует ГАМК_A-сопряженная Cl^- , HCO_3^- -АТФаза, состоящая из «базальной» Mg^{2+} -АТФазы, активируемой одновременно ионами Cl^- и HCO_3^- при их соот-

ношении 5:1, и участвующая в ГАМК_A-индуцируемых Cl^- / HCO_3^- -обменных процессах [2, 3]. Обнаружено, что фермент вовлекается в конвульсант-индуцируемую судорожную активность мозга крыс [4]. Известно, что патогенез эпилепсии и судорожных состояний зависит не только от нарушения функционирования ГАМК_A-рецепторов, но и от энергетического состояния мозга, и в первую очередь, от метаболизма глюкозы [1, 5]. Кроме того,

Для корреспонденции: Карпова Маргарита Николаевна, д-р биологических наук, зав. лабораторией эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: karpovamn@gmail.com

показано, что функциональная активность транспортных АТФаз, а также «базальной» Mg^{2+} -АТФазы нейрональных мембран находится под контролем гликолитического АТФ [7, 13].

Цель исследования — выяснение влияния глюкозы и Mg^{2+} -АТФ на активность «базальной» Mg^{2+} -АТФазы в отсутствие и присутствии анионов в экспериментах *in vitro*.

Методика

Эксперименты выполнены на 25 крысах самцах Вистар массой 160—180 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. 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.

Получение фракции микросом

Для получения фракции микросом, обогащенной плазматическими мембранами, животных декапитировали. Извлекали кору мозга и гомогенизировали при 4°C в соотношении 1:8 в 10 мМ HEPES-Tris буфере, pH 7.2, содержащем 0,125 мМ ЭДТА, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид. Центрифугировали на ультрацентрифуге Beckman (США) в бакет-роторе (SW-28) при 10 000 г в течение 20 мин при 4°C. Полученный супернатант центрифугировали при 100 000 г в течение 1 ч при 4°C. Полученную в осадке микросомальную фракцию суспендировали в 10 мМ HEPES-Tris буфере, pH 7.2 и использовали для определения АТФазной активности.

Исследования *in vitro*

Для определения активности фермента, микросомальный препарат (~20 мкг) вносили в 0,5 мл среды инкубации, содержащей 10 мМ HEPES-Tris буфер, pH 7.2, 0,7—3 мМ $MgSO_4$, 0,7—3 мМ tris-АТФ, 10 мМ NaCl + 2 мМ $NaHCO_3$ или 40 мМ NaCl + 8 мМ $NaHCO_3$, и глюкозу (1—10 мМ). Удельную АТФазную активность оценивали по приросту неорганического фосфора (Φ_i) в 0,5 мл инкубационной среды при 30°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением в среду инкубации 1,8 мл 30%-ной H_2SO_4 . Содержание фосфора в пробах определяли методом Чена и выражали в мкмоль Φ_i /ч на 1 мг белка [2]. «Базальную» Mg^{2+} -АТФазную активность рассчитывали как разность активностей в присутствии и в отсутствие $MgSO_4$. Активность Cl^- , HCO_3^- -активируемой Mg^{2+} -АТФазы

(Cl^- , HCO_3^- -АТФазы) оценивали по разности между Mg^{2+} -АТФазными активностями в присутствии и в отсутствие $NaCl + NaHCO_3$.

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

Для выяснения специфичности действия глюкозы исследовали ее влияние на «базальную» Mg^{2+} -АТФазу и активирующее действие анионов на активность фермента. Результаты исследования показали, что в исследуемой фракции плазматических мембран активность «базальной» Mg^{2+} -АТФазы микросом мозга крыс составляет 7,8 мкмоль Φ_i /ч на 1 мг белка. В присутствии 10 мМ $Cl^- + 2$ мМ HCO_3^- активность Cl^- , HCO_3^- -АТФазы составила 3,2 мкмоль Φ_i /ч на 1 мг белка. Глюкоза в диапазоне концентраций 1—10 мМ снижает активность «базальной» Mg^{2+} -АТФазы на 17% и полностью устраняет активацию фермента анионами.

Ранее нами показано, что фермент активируется как низкими (~10 мМ $Cl^- + \sim 2$ мМ HCO_3^-), так и высокими (~40 мМ $Cl^- + \sim 8$ мМ HCO_3^-) концентрациями анионов и вовлечен в ГАМК_A-индуцируемые Cl^- , HCO_3^- -обменные процессы [3]. Кроме того, было установлено, что активация фермента низкими концентрациями анионов, ингибируется в присутствии субстрата Mg^{2+} -АТФ в среде инкубации >1 мМ. Поскольку полученные данные показали чувствительность Cl^- , HCO_3^- -АТФазной активности к глюкозе, представлялось важным исследовать ее влияние на фермент при его активации различными концентрациями анионов. Из результатов, представленных на рис. 1, видно, что Cl^- , HCO_3^- -АТФазная активность, выявляемая при низких концентрациях анионов, ингибируется концентрациями Mg^{2+} -АТФ выше 1 мМ. Однако в присутствии 10 мМ глюкозы ингибирующий эффект Mg^{2+} -АТФ на фермент нивелируется. В то же время при активации фермента высокими концентрациями анионов, ингибирующий эффект, как субстрата, так и глюкозы незначителен (рис. 2). Так, в присутствии 3 мМ Mg -АТФ в среде инкубации, активность Cl^- , HCO_3^- -АТФазы ингибируется на ~20%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о чувствительности АТФазы плазматических мембран мозга крыс к глюкозе. Однако влияние последней на ферментативную активность носит различный характер в зависимости от концентрации анионов и субстрата Mg^{2+} -АТФ в среде инкубации.

Известно, что торможение нейрона, по сравнению с возбуждением, характеризуется более быстрой и интенсивной активацией энергетического обмена [1, 5]. В частности, метаболизм глюкозы в мозге определяет уровень АТФ в нейронах, что является жизненно важным для функционирования ЦНС. Кроме того, гипер- или гипогликемия влияют на липидный состав и текучесть плазматических мембран и, как следствие, изменяют функциональную активность мембраносвязанных транспортных АТФаз P -типа, таких, как Na^+, K^+ -АТФаза и Ca^{2+} -АТФаза, а также «базальной» Mg^{2+} -АТФазы, роль которой в нейрональной мембране окончательно не установлена [7, 13]. Так, показано, что глюкоза в концентрации 1, 2 и 3 мМ ингибировала активность Mg^{2+} -АТФазы на 80, 50 и 40% соответственно [12]. В нашем исследовании глюкоза (5—10 мМ) также ингибирует активность «базальной» Mg^{2+} -АТФазы на 17%. Кроме того, присутствие в среде инкубации 10 мМ глюкозы ингибирует активацию фермента низкими концентрациями (10 мМ Cl^- + 2 мМ HCO_3^-) и практически не влияет на активацию фермента высокими концентрациями анионов. Эти результаты подтверждают ранее полученные данные о наличии у фермента двух устойчивых состояний, зависи-

мых от концентрации анионов и АТФ, что позволяет предполагать физиологическое значение влияния глюкозы на активность фермента [2]. В частности, в нейрональных мембранах взрослых животных ГАМК, взаимодействуя с ГАМК_A-рецепторами, увеличивает транспорт Cl^- в нейрон, в результате чего происходит гиперполяризация мембранного потенциала [5]. В то же время, при увеличении концентрации медиатора или частоты его воздействия на рецептор, наблюдаемое торможение переходит в возбуждение мембранного потенциала [11]. Общеизвестна важная роль HCO_3^- в возникновении ГАМК_A-возбуждения, однако, в отношении ионов Cl^- было предложено несколько гипотез. Так, одни авторы считают, что при ГАМК_A-индуцируемой деполяризации происходит выход Cl^- из клетки, тогда как другие полагают, что транспорт Cl^- направлен внутрь нейрона. Так, интенсивная активация ГАМК_A-рецепторов индуцирует Cl^-/HCO_3^- -проводимость, в ходе которой транспорт Cl^- , направленный из экстрацеллюлярного пространства в нейрон увеличивает концентрацию до 10 мМ, а ионы HCO_3^- транспортируются из нейрона, их концентрация увеличивается снаружи клетки от 2 мМ [11]. Наряду с этим имеются данные, что при концентрации Cl^- внутри нейрона выше 40 мМ, полярность двухфазного ГАМК_A-индуцируемого тока тоже меняется, т.е. Cl^-/HCO_3^- -ток изменяет свою направленность [9]. Такое предположение подтверждается результатами исследований, в которых установлено, что в нейрональной клетке с высоким содержанием ионов Cl^- не происходит аккумуляции этих

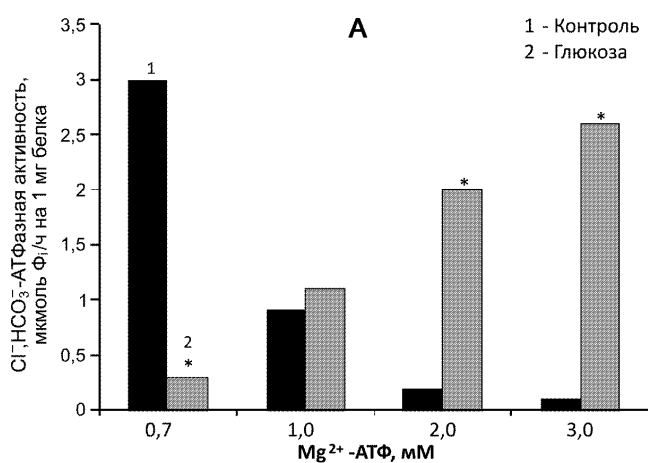


Рис. 1. Влияние глюкозы на активность Cl^-, HCO_3^- -АТФазы, активируемой низкими концентрациями (10 мМ NaCl + 2 мМ NaHCO₃) анионов ($M \pm m$): по оси абсцисс — концентрация Mg^{2+} -АТФ, мМ; по оси ординат — активирующий эффект ионов 10 мМ Cl^- + 2 мМ HCO_3^- , мкмоль Ф₁/ч на 1 мг белка.

* — $p < 0,05$ — достоверные отличия от значений активности фермента в контроле ($n=4$)

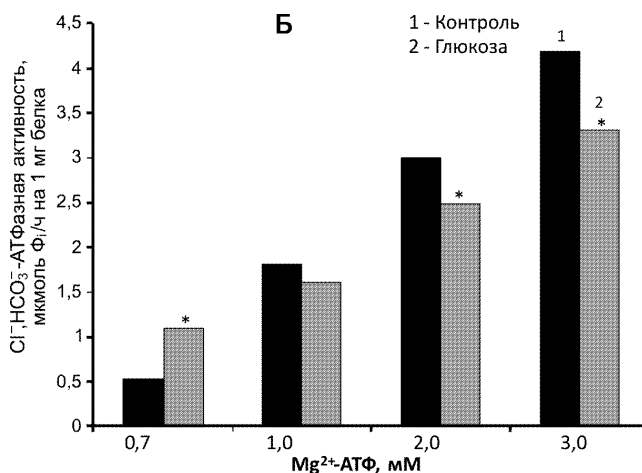


Рис. 2. Влияние глюкозы на активность Cl^-, HCO_3^- -АТФазы, активируемой высокими концентрациями (40 мМ NaCl + 8 мМ NaHCO₃) анионов ($M \pm m$): по оси абсцисс — концентрация Mg^{2+} -АТФ, мМ; по оси ординат — активирующий эффект ионов 40 мМ Cl^- + 8 мМ HCO_3^- , мкмоль Ф₁/ч на 1 мг белка.

* — $p < 0,05$ — достоверные отличия от значений активности фермента в контроле ($n=4$)

анионов, а наоборот, Cl^- истощается в начальной фазе ГАМК_A-индуцируемого постсинаптического тока [10]. Однако известно, что Cl^- -АТФаза в нейрональной клетке препятствует аккумуляции Cl^- в нейроне, но не его истощению [6]. Эти данные свидетельствуют о том, что в ходе ГАМК_A-индуцируемой деполяризации, в отличие от ГАМК_A-индуцируемой гиперполяризации, должна вовлекаться сопряженная с тормозными рецепторами АТФ-зависимая система, участвующая в поддержании концентрации внутриклеточного Cl^- за счет энергии гидролиза АТФ. Обнаруженная нами $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -АТФаза, которая выявляется как при низких, так и при высоких концентрациях анионов, по-видимому, и является таким ферментом, который гидролизует АТФ и участвует в ГАМК_A-индуцируемом $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -обменном процессе [2, 3]. Однако, как показывают полученные данные, глюкоза регулирует, в каком режиме будет работать фермент, т.е. влияние этой энергетической субстанции на активность ГАМК_A-сопряженного Cl^- -насоса играет важную физиологическую роль не только потому, что, через процессы гликолиза, обеспечивает тормозные рецепторы энергией, но и потому, что она напрямую регулирует определенное направление потока Cl^- , которое зависит не только от их концентрации, но и от внутриклеточной концентрации АТФ и ионов HCO_3^- . Дальнейшее исследование свойств фермента и роли глюкозы в регуляции АТФ-зависимого ГАМК_A-индуцируемого транспорта Cl^- через нейрональную мембрану может иметь важное значение для выяснения патогенеза ряда заболеваний, в частности эпилепсии. Так, выявлена функциональная связь между эпилептогенезом и снижением метаболизма глюкозы в определенных областях мозга [8].

Список литературы

1. *Ашмарин И.П., Стукалов П.В., Ещенко и др.* Биохимия мозга. — СПб.: С.-Петербургский университет, 1999. — 328 с.
2. *Мензиков С.А.* АТР-зависимая Cl^- -транспортная система нейрональных мембран: Структурная и функциональная сопряженность с ГАМК_A-рецепторами, роль в $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -обменных процессах, свойства. — Palmarium Academic Publishing, 2012. — 356 с.
3. *Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В.* Влияние ионов HCO_3^- на АТФ-зависимый сопряженный с ГАМК_A-рецепторами Cl^- -насос плазматических мембран мозга крыс // Бюл. exper. биол. — 2011. — Т. 152, №7. — С. 43-47.
4. *Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В.* Влияние пикротоксина на ГАМК_A-сопряженную $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -активируемую Mg^{2+} -АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс в экспериментах in vitro и in vivo // Патогенез. — 2011. — №1. — С. 31-34.
5. *Alvarez-Leefmans F.J., Delpire E.* Physiology and pathology of chloride transporters and channels in the nervous system: From molecules to diseases. — Publisher: Academic Press, 2009. — 500 p.
6. *Inagaki C., Hara M., Zeng X.T.* A Cl^- -pump in rat brain neurons // J. Exp. Zool. — 1996. — Vol. 275, №4. — P. 262-268.
7. *Kamboj S.S., Chopra K., Sandhir R.* Hyperglycemia-induced alterations in synaptosomal membrane fluidity and activity of membrane bound enzymes: beneficial effect of N-acetylcysteine supplementation // Neuroscience. — 2009. — Vol. 162, №2. — P. 349-358.
8. *Laschet J.J., Kurcewicz I., Minier F.* et al. Dysfunction of GABA(A) receptor glycolysis-dependent modulation in human partial epilepsy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104, №9. — P. 3472-3477.
9. *Perkins K.L., Wong R.K.S.* Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells // J. Neurophysiol. — 1996. — Vol. 76. — P. 3886-3894.
10. *Perkins K.L.* Cl^- accumulation does not account for the depolarizing phase of the synaptic GABA response in hippocampal pyramidal cells // J. Neurophysiol. — 1999. — Vol. 82. — P. 768-777.
11. *Staley K.J., Proctor W.R.* Modulation of mammalian dendritic GABA_A receptor function by the kinetics of Cl^- and HCO_3^- transport // J. Physiol. Lond. — 1999. — Vol. 519. — P. 693-712.
12. *Torlinska T., Grochowalska A.* Age-related changes of Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities in rat brain synaptosomes // J. Physiol. Pharmacol. — 2004. — Vol. 55, №2. — P. 457-465.
13. *Tsakiris S., Koromilas C., Schulpis K.H.* Reduced Mg^{2+} -ATPase activity in the hypoglycemic adult rat brain // J. Naturforsch C. — 2001. — Vol. 56, №9-10. — P. 912-914.

Поступила 20.12.12

Сведения об авторах:

Мензиков Сергей Арсентьевич, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН
Калинина Марина Васильевна, науч. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН