

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

## Активность $Cl^-$ , $HCO_3^-$ -активируемой $Mg^{2+}$ -АТФазы, сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами нейрональных мембран мозга крыс, в присутствии пентилентетразола в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

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

В экспериментах *in vitro* установлено, что ГАМК (0,1 мкМ) активировал  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазу нейрональных мембран, а в присутствии 20 мкМ пентилентетразола (ПТЗ) эффект медиатора на фермент не проявлялся. ПТЗ (15–25 мкМ) в тех же условиях опыта увеличивал активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и ингибировал активирующий эффект ионов  $Cl^-$ + $HCO_3^-$  на фермент. Аналогичный эффект ПТЗ на активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и ее активацию анионами наблюдался и при внутрибрюшинном его введении животным в дозе 65 мг/кг (*in vivo*). Показано, что в диапазоне концентраций субстрата  $Mg^{2+}$ -АТФ (0,5–2,5 мМ) в среде инкубации, ПТЗ активировал «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазу и полностью ингибировал активирующий эффект анионов на фермент по сравнению с контролем. Делается заключение о вовлечении сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы нейрональных мембран в синаптическую передачу в ЦНС и в патогенез ПТЗ-индуцируемой судорожной активности мозга животных.

**Ключевые слова:** пентилентетразол, плазматические мембраны мозга крыс,  $Mg^{2+}$ -АТФаза, хлор, бикарбонат

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

## The activity of the $Cl^-$ , $HCO_3^-$ -activated $Mg^{2+}$ -ATPase coupled with GABA<sub>A</sub>-receptor of the neuronal membrane from rat brain in the presence pentylentetrazole both *in vitro* and *in vivo* experiences

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

It was found *in vitro* experience that GABA (0,1 μM) activated  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  ATPase neuronal membrane and in the presence 20 μM of the pentylentetrazole (PTZ) the effect of the neurotransmitter on the enzyme did not appear. The pentylentetrazole in range concentrations 15–25 M enhances the activity of the «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase and eliminated the activating effect of  $Cl^-$ + $HCO_3^-$  on the enzyme was found. Similar the effect of the PTZ on the activity of the «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase activity and it is activating by anions it was observed under intraperitoneal injection of the it at dose 65 mg/kg. In particular, it was found that in the range concentration of the substrate  $Mg^{2+}$ -ATP (0,5–2,5 mM) in the incubation medium the PTZ activated the «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase and fully eliminates the activating effect of the anions on the enzyme. It was conclusion about involved of the coupled with GABA<sub>A</sub>-receptor  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -activated  $Mg^{2+}$ -ATPase of the neuronal membrane under synaptic transmission of the CNS and pathogenesis of the PTZ-induced convulsions of the animal.

**Key words:** pentylentetrazole, plasma membranes from brain of rat,  $Mg^{2+}$ -ATPase, chloride, bicarbonate

$Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -активируемая  $Mg^{2+}$ -АТФаза плазматических мембран сопряжена с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами нейронов мозга животных и вовлечена в АТФ-зависимый транспорт ионов  $Cl^-$  через мембрану нейронов [3]. Активность сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы состоит из активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы, активи-

руемой ионами хлора и бикарбоната. Было установлено, что вектор направления (в клетку или из клетки) транспорта  $Cl^-$  и активность фермента регулируются ионами  $HCO_3^-$  [4], а также активаторами и блокаторами тормозных рецепторов. В частности, было показано, что ГАМК изменяет активность фермента, а пикротоксин — специфический блокатор ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, устраняет эффект медиатора [6]. Кроме того, нами было показано, что при действии конвульсанта пикротоксина в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, в плазматических мембранах мозга

Для корреспонденции: Карпова Маргарита Николаевна, д-р биол. наук, зав. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: niioopp@mail.ru

крыс ингибировалась активность сопряженного с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами фермента, что проявлялось в увеличении активности «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы и в ингибировании ее активации ионами Cl<sup>-</sup> и Cl<sup>-</sup>+HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> [5]. В то же время, активация фермента ионами HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> оставалась без изменения. В связи с этим представлялось целесообразным выяснить, будут ли происходить аналогичные изменения активности Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы, сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, при действии ГАМК и другого конвульсанта — пентилентетразола (ПТЗ) в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

### Методика

Работу проводили на 30 крысах самцах линии Вистар массой 160—170 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.

Для получения фракции микросом, обогащенной плазматическими мембранами, животных декапитировали, извлекали кору мозга, гомогенизировали при 4°C в соотношении 1:8 в 10 мМ Hepes-Tris буфере, рН 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 10 мМ Hepes-Tris буфером, рН 7.2 и использовали для определения АТФазной активности [6].

### Эксперименты *in vitro*

Для определения активности фермента микросомальный препарат (~20 мкг) вносили в 0,5 мл среды инкубации, содержащей 10 мМ Hepes-Tris буфер, рН 7.3, 1,0 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1,0 мМ Tris-АТФ, 40 мМ NaCl + 8 мМ NaHCO<sub>3</sub>, а при исследовании влияния ГАМК (0,1 мкМ) и ПТЗ (20 мкМ) лиганды преинкубировали с белком в течение 15 мин при 30°C. Удельную АТФазную активность оценивали по приросту неорганического фосфора (Ф<sub>i</sub>) в 0,5 мл инкубационной среды при 30°C в течение 30 мин, оставив добавление в среду инкубации 1,8 мл 30%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, определяли содержание фосфора в пробах методом Чена и выражали в мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка [6].

### Эксперименты *in vivo*

Острые генерализованные судороги у крыс вызвали внутрибрюшинным введением ПТЗ в дозе 65 мг/кг. Опытных животных декапитировали сразу после появления судорог тяжестью 4—5 баллов, т.е. на пике судорожной активности [2]. Контрольных животных декапитировали в те же временные сроки (2—5 мин) после введения физиологического раствора. Мозг быстро извлекали и отмывали охлажденным 10 мМ Hepes-tris буфером (рН 7,4), содержащим 0,125 мМ ЭДТА. Фракцию плазматических мембран из мозга контрольных и опытных животных получали по стандартной методике, описанной выше.

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). Статистически значимыми считали различия между группами при p<0,05.

### Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования *in vitro* показали, что активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы плазматических мембран мозга крыс составила 6,8 мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка (табл. 1). В присутствии ионов Cl<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> активность фермента увеличилась на 34% (p<0,05).

Ранее нами было показано, что активность Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы нейрональных мембран регулируется ГАМК<sub>A</sub>-ергическими лигандами [6]. Рецептор-зависимое аллостерическое действие ГАМК<sub>A</sub>-лигандов на фермент может иметь в зависимости от условий среды инкубации и преинкубации разнонаправленный характер, что проявляется в активировании или ингибировании активности «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы и как следствие в изменении ее активации анионами. В данной работе мы исследовали влияние ГАМК и ПТЗ на активность фермента. Из представленных данных видно, что в присутствии 0,1 мкМ ГАМК активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы увеличилась на 29%, а активирующий эффект ионов Cl<sup>-</sup>+HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> не проявился. ПТЗ в концентрации 20 мкМ устранял действие медиатора на активность фермента. Для выяснения специфичности влияния ПТЗ на «базальную» Mg<sup>2+</sup>-АТФазную активность исследовали его действие на активирующий эффект анионов на фермент. Установлено, что после преинкубации микросом с конвульсантом активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы увеличилась на 25% (p<0,05) и составила 8,5 мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка. В присутствии только ПТЗ акти-

Влияние анионов на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность в отсутствие и в присутствии 0,1 мкМ ГАМК, 20 мкМ ПТЗ и 0,1 мкМ ГАМК + 20 мкМ ПТЗ

Вносимый лиганд, мкМ	«Базальная» $Mg^{2+}$ -АТФазная активность, мкмоль $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка	
	В отсутствие анионов	40 мМ $Cl^-$ + 8 мМ $HCO_3^-$
Контроль	6,8±0,5	9,1±0,6*
ГАМК (0,1 мкМ)	8,8±0,4*	8,7±0,2
ПТЗ (20 мкМ)	8,5±0,7*	8,3±0,5
ГАМК 0,1 мкМ + ПТЗ 20 мкМ	7,2±0,5	9,4±0,8

Примечание. \* —  $p < 0,05$  достоверные отличия от значений активности фермента в контроле

Влияние ПТЗ на активирующий эффект ионов 40 мМ  $Cl^-$  + 8 мМ  $HCO_3^-$  на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс

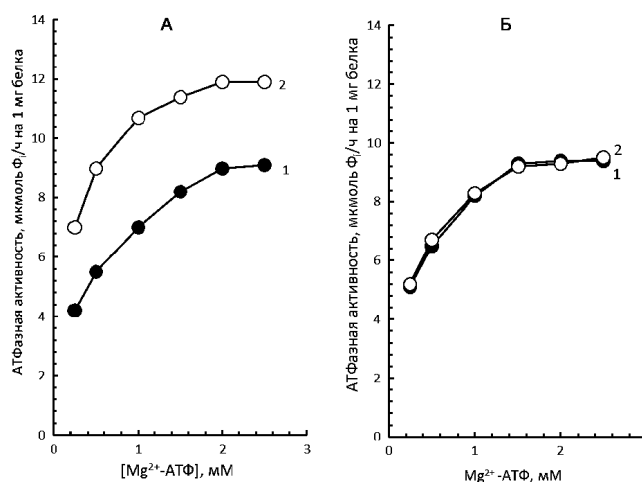
Пентилентетразол, мкМ	$Cl^-, HCO_3^-$ -АТФазная активность, мкмоль $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка
—	3,5±0,2
2,5	2,8±0,3
5,0	1,9±0,2
10	0,8±0,1
15	0
25	0

вирующий эффект ионов  $Cl^- + HCO_3^-$  на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазу также не проявлялся. Таким образом, в присутствии анионов как ГАМК, так и ПТЗ проявляли свойства ингибитора и подавляли их активирующий эффект на фермент, что может свидетельствовать о принадлежности исследуемых АТФазных активностей одному ферменту. Поэтому, если в присутствии активатора или блокатора активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы достигает максимальных значений, то, вследствие наличия у нее конечного максимального значения молекулярной активности (числа оборотов), дополнительной активации фермента анионами не происходит.

Следующим этапом работы было исследование различных концентраций ПТЗ на активность  $Cl^-, HCO_3^-$ -АТФазы нейронов мозга. Как видно из табл. 2, ПТЗ вызывает эффект ингибирования начиная с концентрации 2,5 мкМ, а в диапазоне концентраций 15—25 мкМ на 100% подавляет ферментативную активность.

Поскольку результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, показали высокую чувствительность исследуемого фермента к ПТЗ, представлялось важным исследовать влияние конвульсанта в условиях *in vivo*. Установлено, что по сравнению с контролем у опытных животных на пике судорожной реакции в исследуемом диапазоне концентраций  $Mg^{2+}$ -АТФ (0,25—2,5 мМ) наблюдалось увеличение на ~20% ( $p < 0,05$ ) активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран, но при

этом не происходила ее активация при концентрациях 40 мМ  $Cl^- + 8$  мМ  $HCO_3^-$  (рисунок). Таким образом, полученные результаты показали, что характер изменения активности фермента, в отсутствие и в присутствии анионов при ПТЗ-индуцируемой судорожной активности у крыс аналогичен изменениям



Активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран мозга крыс при различных концентрациях  $Mg^{2+}$ -АТФ в среде инкубации в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов  $Cl^- + HCO_3^-$ :

А — в контроле; Б — на пике судорожной активности.

По оси абсцисс — концентрация  $Mg$ -АТФ, мМ; по оси ординат — активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов  $Cl^- + HCO_3^-$ , мкмоль  $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка

активности фермента в экспериментах *in vitro*. Кроме того, эти результаты согласуются с нашими [5] и литературными данными [8], полученными при исследовании влияния на активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран другого конвульсанта, пикротоксина. Так, в условиях пикротоксин-индуцируемой судорожной активности происходило увеличение активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы на ~60—80% [5, 8]. Кроме того, наши результаты совпадают с данными, полученными электрофизиологическими и биохимическими исследованиями влияния ПТЗ на функцию ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Так, в электрофизиологическом исследовании рекомбинантных ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов было показано, что  $Cl^-$ -ток, индуцируемый 10 мкМ ГАМК ингибировался ПТЗ с  $I_{50}=0,62$  мМ [12]. В биохимических исследованиях также было установлено, что ПТЗ ингибирует ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемый транспорт  $^{36}Cl$  в синаптно-нейросомы из мозга крыс начиная с концентрации 1 мМ [2, 7]. В то же время, было показано, что ПТЗ незначительно уменьшает эффект связывания [ $^3H$ ]ГАМК или [ $^3H$ ]мусцимола гомогенатами из различных областей мозга крыс [13, 16]. В нашем исследовании ГАМК (10 мкМ) изменяет активность фермента, а ПТЗ устраняет эффект медиатора и в концентрационно-зависимой манере ингибирует его, что указывает на рецептор-зависимый путь их действия. Кроме того, ранее нами было установлено, что изучаемая АТФаза нейронов является полифункциональной аллостерической структурой, со свойствами фермента,  $Cl^-$ -насоса и лиганд-управляемого  $Cl^-$ -канала [3]. Преинкубация таких аллостерических белков с лигандами различной природы, увеличивает их чувствительность к последним. В нашем исследовании более высокая чувствительность фермента к ПТЗ также связана с аллостерическими свойствами исследуемого фермента.

Патогенез эпилепсии может быть связан не только с изменением в функциональной активности тормозных рецепторов [9], но и с нарушением энергетических процессов в нейрональных клетках [1]. Так, при ПТЗ-индуцируемой эпилепсии наблюдается изменение механизмов свободно-радикального перекисного окисления липидов [10] и митохондриальная дисфункция [15]. Результатом митохондриальной энцефалопатии является избирательное, в зависимости от слоя мозга, уменьшение концентрации глюкозы, АТФ и креатинфосфата [14]. Также было показано, что ПТЗ, связываясь на внешней стороне плазматических мембран, влиял на функциональную активность ионных каналов [11], транспортных АТФаз Р-типа, а также «общей» или так называемой «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы нейрональных клеток моз-

га животных [10]. Так, было установлено, что при введении крысам ПТЗ в дозе 40 мг/кг наблюдается увеличение на ~20% «общей»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран мозга [10]. В нашем исследовании в экспериментах *in vitro* и *in vivo* также происходит увеличение на 20—25% активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и снижение ее активации анионами, что, вероятно, в какой-то степени также связано с нарушением процессов перекисного окисления липидов. Однако, исходя из ранее полученных данных по влиянию ГАМК<sub>A</sub>-ергических лигандов на активность фермента [6], можно предположить, что основной эффект ПТЗ на фермент связан с прямым взаимодействием конвульсанта с молекулой белка и изменением ее конформации и, как следствие, гидролитических свойств.

Результаты проведенного нами исследования показали высокую чувствительность изучаемой  $Cl^-/HCO_3^-$ -активируемой  $Mg^{2+}$ -АТФазы нейрональных мембран мозга крыс к ПТЗ. Хотя этот конвульсант давно применяется в научных экспериментах, механизм его действия до конца не изучен. Однако было показано, что ПТЗ, через аллостерическое взаимодействие с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, конкурентно изменяет конформацию  $Cl^-$ -канала и снижает вход ионов  $Cl^-$  в нейрон [9, 12]. Блокирование активности тормозных рецепторов, в свою очередь, приводит к доминированию функции возбуждающих рецепторов и, как следствие, к возникновению эпилептической активности [9]. Структурная и функциональная сопряженность исследуемой АТФазы с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами и изменение ее функциональной активности при действии ПТЗ как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*, подтверждают ранее высказанное предположение об участии фермента в ГАМК<sub>A</sub>-управляемых  $Cl^-/HCO_3^-$ -обменных процессах через мембраны нейронов и его вовлечение в патологию ПТЗ-индуцируемой судорожной активности.

### Список литературы

1. Ашмарин И.П., Стукалов П.В., Ещенко и др. Биохимия мозга. — СПб.: С.-Петербургский университет, 1999. — 328 с.
2. Карпова М.Н., Ребров И.Г. Изменения функционального состояния ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса при экспериментальной эпилептизации мозга // Дизрегуляторная патология. — М.: Медицина, 2002. — С. 596—603.
3. Мензиков С.А., Карпова М.Н.  $Cl^-$ -транспортные механизмы в нейрональных мембранах и роль АТФ в их функционировании // Патогенез. — 2011, №1. — С. 4—10.
4. Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В. Влияние ионов  $HCO_3^-$  на АТФ-зависимый сопряженный с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $Cl^-$ -насос плазматических мембран мозга крыс // Бюл. экспер. биол. и мед. — 2011. — Т. 152, №7. — С. 43—47.

5. **Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В.** Влияние пикротоксина на ГАМК<sub>A</sub>-сопряженную Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-активируемую Mg<sup>2+</sup>-АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo* // Патогенез. — 2011. — №1. — С. 31–34.
6. **Мензиков С.А., Мензикова О.В.** Сравнительные свойства чувствительной к ГАМК<sub>A</sub>-ергическим лигандам Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-активируемой Mg<sup>2+</sup>-АТФазы плазматических мембран мозга рыб и крыс // Ж. эвол. биохим. и физиол. — 2007. — Т. 43, №3. — С. 246–253.
7. **Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А.** и др. Влияние классических конвульсантов на Cl<sup>-</sup>-проводимость ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса мембран клеток коры головного мозга животных на ранней стадии киндинга // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2007. — Т. 143, №1. — С. 17–19.
8. **Толстухина Т.И., Флеров М.А.** АТФазная активность в нейронах и нейроглии при судорогах, вызванных пикротоксином // Вопросы медицинской химии. — 1999. — №2. — С. 1–3.
9. **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.
10. **Guzman D.C., Vazquez I.E., Mejia G.B.** et al. Effect of pentylentetrazole and carbodiimide on oxidation stress markers in rat brain // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. — 2005. — Vol. 96. — P. 512–513.
11. **Hartung K., Hermann A.** Differential effects of pentylentetrazole on ion currents of Aplysia neurones // Brain Research. — 1987. — Vol. 419, №1–2. — P. 55–64.
12. **Huang R.-Q., Bell-Horner C.L., Dibas M.I.** et al. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptors mechanism and site of action // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2001. — Vol. 298, №3. — P. 986–995.
13. **Ito M., Chiu T.H., Rosenberg H.C.** Effects of pentylentetrazol on GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine/picrotoxinin receptor complexes in rat brain regions // Neurochem. Res. — 1986. — Vol. 11, №5. — P. 637–646.
14. **McCandless D.W., Dworsky S., Modak A.T.** et al. Pentylentetrazole-induced changes in cerebral energy metabolism in Tupai // Epilepsia. — 1987. — Vol. 28, №2. — P. 184–189.
15. **Patel M.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures // Free Radic. Biol. Med. — 2004. — Vol. 37, №12. — P. 1951–1962.
16. **Walsh L.A., Li M., Zhao T.J.** et al. Acute pentylentetrazol injection reduces rat GABA<sub>A</sub> receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with no effect on benzodiazepine site density // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1999. — Vol. 289, №3. — P. 1626–1633.

Поступила 26.03.12

#### Сведения об авторах:

Мензиков Сергей Арсентьевич, д-р биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Калинина Марина Васильевна, научн. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН