

# Влияние пентилентетразола на ГАМК<sub>A</sub>-сопряженную Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-активируемую Mg<sup>2+</sup>-АТФазную активность нейрональных мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

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

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Исследовали влияние пентилентетразола (ПТЗ) на сопряженную с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-активируемую Mg<sup>2+</sup>-АТФазу плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* установлено, что ПТЗ (15–25 мкМ) увеличивает активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы и ингибирует активирующий эффект ионов Cl<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> на фермент. Аналогичный эффект ПТЗ на активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы и ее активацию анионами наблюдался при внутрибрюшинном его введении животным в дозе 65 мг/кг. Делается вывод о вовлечении сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-активируемой Mg<sup>2+</sup>-АТФазы нейрональных мембран в синаптическую передачу в ЦНС и в патогенез ПТЗ-индуцируемой судорожной активности.

**Ключевые слова:** пентилентетразол, плазматические мембраны мозга крыс, Mg<sup>2+</sup>-АТФаза, хлор, бикарбонат

## Введение

Патогенез эпилепсии и судорожных состояний связан не только с нарушением функции ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, но и с изменениями энергетических процессов в нейронах [1, 5]. Так, при эпилептогенезе в различных отделах мозга животных выявлены не только нарушения концентрации глюкозы, креатинфосфата и АТФ, но и изменения активности различных транспортных АТФаз [9, 12, 15].

Ранее нами было показано, что при действии конвульсанта пикротоксина в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в плазматических мембранах мозга крыс ингибировалась активность ГАМК<sub>A</sub>-сопряженной Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы, что проявлялось в увеличении активности «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы и в подавлении ее активации ионами Cl<sup>-</sup> и Cl<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> [3], тогда как 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 ГАМК<sub>A</sub>-сопряженной Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы при действии другого конвульсанта — пентилентетразола (ПТЗ) — в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

## Материалы и методы исследования

Работу проводили на крысах самцах Вистар массой 160–170 г. Животных содержали в обычных условиях вивария на стандартном пищевом рационе.

**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, и 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 [4].

**Исследования *in vitro*.** Для определения активности фермента микросомальный препарат (~20 мкг) вносили в 0,5 мл среды инкубации, содержащей 10 мМ Hepes-Tris бу-

фер, pH 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 ПТЗ (1–100 мкМ) его 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, останавливали добавлением 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 [4].

**Исследования *in vivo*.** Острые генерализованные судороги у крыс вызывали 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. 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 (pH 7,4), содержащим 0,125 мМ ЭДТА. Фракцию плазматических мембран из мозга контрольных и опытных животных получали по стандартной методике, описанной выше. Достоверность различия сравниваемых значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при p<0,05 (n=4).

## Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенного исследования *in vitro* показали, что в микросомальных препаратах, выделенных из мозга крыс, активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы плазматических мембран составила 7,2 мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка. В присутствии ионов Cl<sup>-</sup> и Cl<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> активность фермента увеличилась на 20% (p<0,05) и 40% (p<0,05), и составляла 8,6 и 10,1 мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка, соответственно. Для выяснения специфичности действия ПТЗ на «базальную» Mg<sup>2+</sup>-АТФазную активность исследовали его действие на активирующий эффект анионов. Установлено, что после преинкубации микросом с ПТЗ (20 мкМ) активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы увеличилась на 30% (p<0,05) и составила 9,4 мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка. В присутствии ПТЗ активирующий эффект ионов Cl<sup>-</sup> и Cl<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> на «базальную» Mg<sup>2+</sup>-АТФазу не проявлялся. Таким образом, в присутствии анионов конвульсант проявляет свойства ингибитора и по-

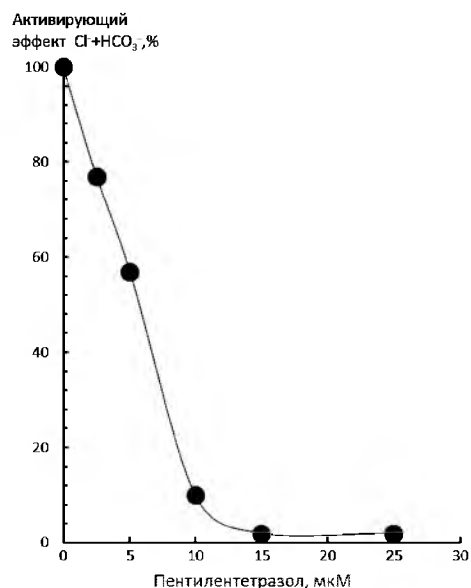
давляет их активирующий эффект на фермент, что может свидетельствовать о рецептор-зависимом механизме его действия и принадлежности исследуемых АТФазных активностей одному ферменту. Поэтому, если в присутствии активатора или блокатора активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы достигает максимальных значений, то, вследствие наличия у нее конечного максимального значения молекулярной активности (числа оборотов) [4], дополнительной активации фермента ионами  $Cl^-$  и/или  $Cl^- + HCO_3^-$  не происходит.

В данном исследовании максимальная активация «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы наблюдалась в присутствии в среде инкубации одновременно ионов  $Cl^- + HCO_3^-$ . В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать влияние различных концентраций ПТЗ на совместный эффект анионов на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс. Обнаружено, что ПТЗ в диапазоне концентраций 2–10 мкМ снижает активирующий эффект анионов на фермент, а в концентрациях 15–25 мкМ полностью ингибирует его (рисунок).

Поскольку результаты ранее проведенных исследований свидетельствуют о функциональной и структурной сопряженности АТФазы нейрональных мембран мозга крыс с ГАМК<sub>A</sub>/бензодиазепиновым  $Cl^-$ -канальным комплексом [2, 4], представлялось важным установить влияние ПТЗ на исследуемую АТФазу в условиях *in vivo*. Установлено, что у опытных животных на пике судорожной реакции наблюдалось увеличение на 36% ( $p < 0,05$ ) активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран, но при этом не происходила ее активация ионами 10 мМ  $Cl^-$  и 40 мМ  $Cl^- + 8$  мМ  $HCO_3^-$  (таблица).

Таким образом, характер изменения активности фермента в отсутствие и в присутствии анионов при ПТЗ-индуцируемой судорожной активности у крыс аналогичен изменениям активности фермента в опытах *in vitro*. Кроме того, эти результаты согласуются с данными, полученными нами ранее о влиянии другого конвульсанта пикротоксина на активность этого фермента [3]. Свойство блокаторов выступать при определенных условиях в роли активаторов представлено в литературе многочисленными данными [4]. При исследовании хемочувствительных ионных каналов установлено, что действие блокаторов на рецепторные белки отличается от их действия в присутствии другого лиганда. Так, показано, что бикикуллин и габазин — блокаторы функции ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов — в диапазоне концентраций 1–100 мкМ ингибируют ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемый мембранный потенциал, тогда как в отсутствие ГАМК оба лиганда, подобно медиатору, проявляют свойства агонистов и индуцируют  $Cl^-$ -ток [14]. В другой работе было показано, что ПТЗ вызывает активирование, а не ингибирование, мутантных, устойчивых к пикротоксину ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов экспрессированных в НЕК 293 клетки [6].

В электрофизиологическом исследовании установлено, что чувствительность ( $I_{50}$ ) рекомбинантных ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов к ПТЗ составляет 0,6 мМ [10]. Ранее нами было дока-



Влияние пентилентетразола (ПТЗ) на активирующий эффект ионов  $Cl^- + HCO_3^-$  на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс. По оси абсцисс — концентрация ПТЗ, мкМ; по оси ординат — активирующий эффект ионов  $Cl^- + HCO_3^-$ , %: значения точек по оси абсцисс — 0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0; значения точек по оси ординат — 100; 77; 57; 10; 2; 2

зано, что ГАМК<sub>A</sub>-сопряженная  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -активируемая  $Mg^{2+}$ -АТФаза нейрональных мембран является полифункциональной белковой олигомерной структурой, которая одновременно является ферментом (АТФ-гидролазная активность),  $Cl^-$ -насосом (участвует в АТФ-зависимом транспорте  $Cl^-$ ) и лиганд-управляемым  $Cl^-$ -каналом (ГАМК<sub>A</sub>-рецептором), обладающей аллостерическими свойствами [2, 4]. Рецептор-зависимое аллостерическое действие ГАМК<sub>A</sub>-лигандов на фермент может иметь в зависимости от условий среды инкубации и преинкубации оппозитный характер, что проявляется в активировании или ингибировании активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и, как следствие, в изменении ее активации анионами. Показано, что преинкубация таких аллостерических белков с лигандами различной природы, увеличивает их чувствительность к последним [4]. В данной работе более высокая чувствительность исследуемой АТФазы к ПТЗ, скорее всего, связана с аллостерическими свойствами исследуемого фермента.

Известно, что ПТЗ вызывает нарушение энергетического обмена в нейронах мозга животных. В частности, этот конвульсант индуцировал дисфункцию митохондрий [11] и нарушение метаболизма гликолиза [8]. Кроме того, ПТЗ оказывал различные эффекты на ионные токи и транспортные АТФазы плазматических мембран нейрональных клеток животных. В частности, в биохимическом исследовании было показано, что ПТЗ ингибирует  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазу с  $K_i = 10$  мМ нейрональных мембран мозга крыс [7], тогда как в другом

Таблица

«Базальная»  $Mg^{2+}$ -АТФазная активность нейрональной фракции, выделенной из мозга контрольных и опытных животных (*in vivo*)

Условия опыта	«Базальная» $Mg^{2+}$ -АТФазная активность, мкмоль $\Phi_1$ /ч на 1 мг белка		
	«Базальная»	В присутствии 10 мМ $Cl^-$	В присутствии 40 мМ $Cl^- + 8$ мМ $HCO_3^-$
Контроль	7,5±0,7	8,8±0,9	9,7±0,9
Опыт	10,2±0,5 *	10,6±0,8	9,8±1,0

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

исследовании он вызывал активирование фермента [9]. На основании полученных данных авторами был сделан вывод, что изменения активности транспортных АТФаз нейрональных мембран связаны с участием процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов при их повреждении ПТЗ [9]. Наряду с этим было выявлено изменение активности не только таких транспортных АТФаз Р-типа, как  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, но и нечувствительной к убаину «общей»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы или «базальной»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы. Хотя функциональная роль «базальной»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы в нейрональной мембране еще до конца не установлена, но уже в ранних исследованиях было обнаружено, что активность фермента регулируется (активируется или ингибируется) при фармаколого-токсикологических воздействиях на нейрональные структуры, что позволило констатировать несомненную значимость ее участия в синаптической передаче [4]. Результаты наших исследований также показали, что активность исследуемой «базальной»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы на ~90% специфически регулируется активаторами и блокаторами тормозных рецепторов и не связана с экто-АТФазами нейрональных мембран. Эти данные согласуются с результатами других исследований свидетельствующих о том, что ПТЗ не влияет на экто-нуклеотидазы нейрональных мембран, но ингибирует активность аденозиндезаминазы [13].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о чувствительности к ПТЗ исследуемой ГАМК<sub>A</sub>-связанной  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы плазматических мембран мозга крыс. Несмотря на то, что ПТЗ широко используется в научных исследованиях в качестве конвульсанта, механизм его действия еще окончательно не выяснен. На молекулярном уровне установлено, что ПТЗ взаимодействует с аллостерическим сайтом связывания близким к месту взаимодействия пикротоксина на молекуле ГАМК<sub>A</sub>/бензодиазепинового  $\text{Cl}^-$ -канального рецепторного комплекса. Результатом такого взаимодействия является изменение конформации  $\text{Cl}^-$ -канала и уменьшение  $\text{Cl}^-$ -проводимости в нейрон [10]. Нарушение функции ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов приводит к дисбалансу равновесия между тормозными и возбуждающими рецепторами и возникновению судорожной активности. Функциональные изменения активности ГАМК<sub>A</sub>-связанной  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -активируемой  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы при действии ПТЗ, а также ранее установленное влияние пикротоксина на активность фермента [3], указывают на вовлечение фермента в ГАМК<sub>A</sub>-регулируемые  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменные процессы в нейрональных мембранах мозга животных и в патогенез судорожной активности.

## Список литературы

1. Ашмарин И.П., Стукалов П.В., Ещенко Н.Д. и др. Биохимия мозга. — СПб.: С-Петербургский университет, 1999. — 328 с.
2. Мензиков С.А., Карпова М.Н.  $\text{Cl}^-$ -транспортные механизмы в нейрональных мембранах и роль АТФ в их функционировании// Патогенез. — 2011. — №1. — С. 4—10.
3. Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В. Влияние пикротоксина на ГАМКА-связанную  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -активируемую  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс в эксперименте in vitro и in vivo// Патогенез. — 2011. — №1. — С. 31—34.
4. Мензиков С.А., Мензикова О.В. Сравнительные свойства чувствительной к ГАМКА-ергическим лигандам  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -активируемой  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран мозга рыб и крыс // Ж. эвол. биохим. и физиол. — 2007. — Т. 43, №3. — С. 246—253.
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. Dibas M.I., Dillon G.H. The CNS convulsant pentylenetetrazole stimulates GABA-activated current in picrotoxin-resistant GABAA receptors // Neurosci. Lett. — 2000. — Vol. 285, №3. — P. 193—196.
7. Dubberke R., Vasilets L.A., Schwarz W. Inhibition of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  pump by the epileptogenic pentylenetetrazole// Pflugers Arch. — Eur. J. Physiol. — 1998. — Vol. 437, №1. — P. 79—85.
8. Gasior M., Yankura J., Hartman A.L. et al. Anticonvulsant and proconvulsant actions of 2-deoxy-d-glucose// Epilepsia. — 2010. — Vol. 51, №8. — P. 1385—1394.
9. Guzman D.C., Vazquez I.E., Mejia G.B. et al. Effect of pentylenetetrazole and carbodiimide on oxidation stress markers in rat brain// Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. — 2005. — Vol. 96. — P. 512—513.
10. Huang R.-Q., Bell-Horner C.L., Dibas M.I. et al. Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action// J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2001. — Vol. 298, №3. — P. 986—995.
11. Naseer M.I., Ullah N., Ullah I. et al. Vitamin C protects against ethanol and PTZ-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat hippocampal neurons// Synapse. — 2011. — Vol. 65, №7. — P. 562—571.
12. Pumain R., Ahmed M.S., Kurcewicz I. et al. Review Liability of GABAA receptor function in human partial epilepsy: possible relationship to hypometabolism// Epilepsia. — 2008. — Vol. 49, №8. — P. 87—90.
13. Siebel A.M., Piato A.L., Capiotti K.M. et al. PTZ-induced seizures inhibit adenosine deamination in adult zebrafish brain membranes// Brain Res. Bull. — 2011. — Vol. 86, №5—6. — P. 385—389.
14. Ueno S., Bracamontes J., Zorumski C. et al. Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor// J. Neurosci. — 1997. — Vol. 17, №2. — P. 625—634.
15. Walton N.Y., Nagy A.K., Treiman D.M. et al. Altered residual ATP content in rat brain cortex subcellular fractions following status epilepticus induced by lithium and pilocarpine// J. Mol. Neurosc. — 1998. — Vol. 11, №3. — P. 233—242.

## **Effect of pentylenetetrazole on the GABA<sub>A</sub>-coupled $\text{Cl}^-$ , $\text{HCO}_3^-$ -activated $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the plasma membrane from rat brain both in vitro and in vivo experiences**

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

Federal State Budgetary Institution «Institute of General Pathology and Phathophysiology» under the Russian Academy of Medical Sciences.  
Moscow, 125315, Baltiyskaya street, 8

*Effect of the pentylenetetrazole (PTZ) on the coupled with GABA<sub>A</sub>-receptor  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -activated  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the plasma membranes from rat brain it was investigated both experiences in vitro and in vivo. It was found in vitro that pentylenetetrazole in range concentrations 15—20  $\mu\text{M}$  enhances the activity of the «basal»  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase and eliminated the activating effect of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-$  on the enzyme. Similar the effect of the PTZ on the activity of the «basal»  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity and it is activating by anions it was observed under intraperitoneal injection of the it at dose 65 mg/kg. It was conclusion about involved of the coupled with GABA<sub>A</sub>-receptor  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -activated  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the neuronal membrane under synaptic transmission of the CNS and pathogenesis of the PTZ-induced seizures.*

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