



## ТОРМОЖЕНИЕ КОНВУЛЬСАНТАМИ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ПРОТОНОВ В МЕМБРАНАХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКОВ МОЗГА: БЛОКАДА АНИОННОГО КАНАЛА

МЕЛЬНИК В. И., КРЫЖАНОВСКИЙ Г. Н., ШУКАЛОВА Т. Ф.,  
ТИТОВ С. Ю., ГЛЕБОВ Р. Н.

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Изучено влияние некоторых конвульсантов на активный транспорт протонов и активность  $H^+$ -АТФазы в мембранах синаптических пузырьков мозга крыс. Конвульсанты ингибировали транспорт  $H^+$ , располагаясь по их эффективности в следующем порядке: биккуллин > пикротоксин > пенициллин > бемеград > коразол. Величины  $I_{50}$  составили 0,12; 1,0; 2,7; 10 и 13 мМ соответственно. Конвульсанты, за исключением пенициллина, практически не влияли на активность  $H^+$ -АТФазы, чувствительной к ингибированию N-этилмалеймидом. Следовательно, торможение активного транспорта  $H^+$  не обусловлено прямым ингибированием  $H^+$ -насоса или разобщающим действием конвульсантов. Поэтому механизм ингибирования транспорта  $H^+$  может заключаться в блокаде анионного канала, приводящей к нарушению функционального сопряжения между транспортом  $H^+$  и  $Cl^-$ , необходимого для генерации градиента рН в мембране синаптических пузырьков.

Важнейшие функции синаптических пузырьков (СП) в нервных окончаниях мозга—активный захват медиаторов и их предшественников из цитоплазмы, активность ферментов метаболизма медиаторов—связаны с наличием трансмембранного градиента рН (внутри рН около 5), который поддерживается  $H^+$ -насосом ( $H^+$ -транспортной АТФазой) [1—3]. Активность  $H^+$ -насоса, в свою очередь, функционально сопряжена с анионным каналом, специфичным для ионов  $Cl^-$ : сопряженный транспорт  $H^+$  и  $Cl^-$  имеет электронейтральный характер, без такого сопряжения генерируемый  $H^+$ -насосом мембранный потенциал препятствует образованию сколько-нибудь значительной разности рН ( $\Delta pH$ ) [3]. Тем самым, анионный канал, вернее его проводимость для анионов, является важным регулятором метаболизма медиаторов в СП.

В ходе исследования анионной регуляции активного транспорта  $H^+$  в мембранах СП мы обнаружили, что он ингибируется некоторыми анионами, которые действуют, вероятно, на анионный канал, блокируя сопряжение между транспортом  $H^+$  и  $Cl^-$  [3]. В числе таких анионов

оказались тиоцианат ( $\text{SCN}^-$ ) и перхлорат ( $\text{ClO}_4^-$ ), являющиеся эффективными конвульсантами и вызывающие эпилептические явления у животных и человека [4]. Механизм эпилептогенного действия тиоцианата и перхлората предположительно связывали с ингибированием транспорта анионов, однако ни клеточная, ни субклеточная локализация транспортной системы не были твердо установлены [4]. Блокада (прямая или косвенная) каналов анионной проводимости и синаптических, рецепторзависимых, связанных с действием тормозных медиаторов, и внесинаптических, предполагается в качестве общего механизма действия целой группы конвульсантов, включающей биккукулин, пикротоксин, пенициллин, коразол [4, 5] и бемеград [6].

В связи с этим представляло интерес выяснить, является ли ингибирование несинаптических анионных каналов общим свойством этой группы конвульсантов. С этой целью исследовали их действие на активный транспорт  $\text{H}^+$  в мембранах СП, который в определенных условиях лимитируется состоянием проводимости анионного канала. Чтобы установить, какой элемент сопряженной системы ко-транспорта  $\text{H}^+$  и  $\text{Cl}^-$  подвержен влиянию конвульсантов— $\text{H}^+$ -насос или  $\text{Cl}^-$ -канал, параллельно исследовали их влияние на активность  $\text{H}^+$ -транспортной АТРАЗы мембран СП.

### Материалы и методы

Очищенные мембраны СП получали методом дифференциального центрифугирования осмотически разрушенной фракции синапсом мозга крыс [1, 3].

Активный транспорт  $\text{H}^+$  измеряли методом непрерывной регистрации изменений флуоресценции слабого основания акридиноранжа [1, 3]. Среда измерения содержала 2 мкМ акридиноранжа, 150 мМ KCl, 20 мМ HEPES/трис pH 7,4 при 25°. Через 4 мин после добавления мембран СП (7—15 мкг белка/мл) инициировали транспорт добавлением 1 мМ Mg-АТР. Исследуемые соединения (конвульсанты) вносили перед добавлением мембран СП. Транспортную активность выражали с помощью двух параметров—скорости транспорта и стационарной аккумуляции протонов [3].

АТРАЗные активности определяли путем инкубации мембран СП (15—25 мкг белка/мл) в среде, содержащей 150 мМ KCl и 20 мМ HEPES/трис pH 7,4 при 37°, а также исследуемые конвульсанты и другие агенты  $\pm 0,2$  мМ N-этилмаленимид (NEM). В части опытов вместо KCl среда содержала 300 мМ сахарозу и 10 мМ протонофор карбоинилцианид л-хлорофенилгидразон (ХКФ). После 20 мин преинкубации мембран в среде инициировали реакцию добавлением 2 мМ Mg-АТР и через 30 мин останавливали и определяли содержание освободившегося при гидролизе АТР  $\text{P}_i$  одностадийным методом с помощью стоп- $\text{P}_i$  реактива [3]. Активность  $\text{H}^+$ -АТРАЗы рассчитывали как разность между общей АТРАЗной активностью, измеренной в отсутствие

NEM, и «базальной» активностью, измеренной в присутствии NEM [3]. «Базальную» активность вычисляли по разности содержания фосфата между пробами, инкубировавшимися в присутствии мембран СП, и теми, в которые белок добавляли после остановки реакции.

В работе использовали бикукуллин и пикротоксин («Serva», ФРГ), ГАМК («Reanal», Венгрия), пенициллин (бензилпенициллин Г), бемебрид, коразол и феназепам отечественного производства.

Бикукуллин и пикротоксин растворяли в небольшом количестве 1 М HCl или 0,2 М триса, соответственно, при небольшом нагревании. После разбавления бидистиллированной водой их растворы содержали 10 мМ бикукуллин в 10 мМ HCl и 20 мМ пикротоксин в 4 мМ трисе. Бикукуллин, который плохо растворим при нейтральных значениях pH, при максимальной его концентрации (1 мМ) вызывал помутнение проб, однако после легкого нагревания помутнение исчезало и пробы оставались прозрачными за время эксперимента. Феназепам сначала растворяли в этаноле до 2 мМ концентрации, затем разбавляли водой в 10 раз. Остальные агенты применяли в виде водных растворов.

### Результаты исследований

Все исследованные конвульсанты блокировали активный транспорт  $H^+$  в мембранах СП концентрационнонезависимым образом (рис. 1). Самым сильным ингибитором был бикукуллин, для которого  $I_{50}$  (концентрация полумаксимального ингибирования) составила 0,12 мМ. По эффективности ингибирования остальные конвульсанты располагались в следующем порядке: пикротоксин  $\gg$  пенициллин  $>$  бемебрид  $>$  коразол, их величины  $I_{50}$  равнялись 1,0; 2,7; 10 и 13 мМ соответственно. Приведенные на рис. 1 концентрационные зависимости основаны на использовании аккумуляции  $H^+$  в качестве характеристики транспорта протонов, однако идентичные зависимости были получены при использовании другой характеристики—скорости транспорта, как это наблюдалось при исследовании действия других соединений [3].

Исследованные конвульсанты сами по себе не влияли на уровень флуоресценции зонда, в отличие от двух других конвульсантов—тиоцианата и перхлората [3]. Ни ГАМК, ни феназепам в достаточно высоких концентрациях (1,0 мМ и 1,0 мкМ соответственно) не предотвращали ингибирования транспорта конвульсантами, следовательно, действие последних не опосредовано ГАМК/бензодиазепин-рецепторным комплексом, о чем также свидетельствуют высокие значения  $I_{50}$  для бикукуллина и пикротоксина [7].

В общем случае возможны три механизма ингибирования активного транспорта  $H^+$ . Первый из них заключается в прямом торможении активности  $H^+$ -транспортной АТФазы, катализирующей векторную транслокацию  $H^+$ . Второй механизм состоит в не прямом, разобщающем действии, которое может быть обусловлено либо протонотормящим эффектом, создающим высокую проницаемость для  $H^+$ , либо эффектом проницающих слабых оснований, устраняющих  $\Delta pH$  в результате протони-

рования их в кислой внутривезикулярной среде, подобно аммиаку или, скажем, трифлазину, действие которого описано нами ранее [8]. Эффекты разобщителей должны проявляться в стимуляции активности  $H^+$ -АТФазы, работающей в их присутствии вхолостую. Наконец, третья возможность—блокада анионного канала, обеспечивающего электронейтральность суммарного процесса транслокации  $H^+$  и  $Cl^-$ . Устраняя генерацию  $\Delta pH$ , блокада анионного канала не должна приводить к существенным изменениям активности  $H^+$ -АТФазы.

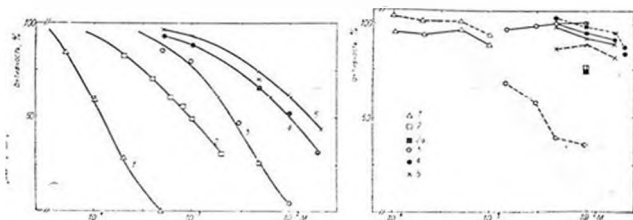


Рис. 1. Действие конвульсантов на аккумуляцию протонов  $H^+$ -насосом мембран синаптических пузырьков: 1—биккуллиин, 2—пикротоксин, 3—пенициллин, 4—бемегрид, 5—коразон.

Рис. 2. Влияние конвульсантов на активность  $H^+$ -АТФазы (---) и «базальной», NEM резистентной АТФазы (—) мембран синаптических пузырьков в присутствии 0,15 М KCl: 1—биккуллиин, 2—пикротоксин ( $H^+$ -АТФаза), 2а—пикротоксин («базальная» АТФаза), 3—пенициллин, 4—бемегрид, 5—коразон.

При измерении активности  $H^+$ -АТФазы в среде, оптимальной для транспорта протонов, конвульсанты (за исключением пенициллина) проявляли незначительное влияние (рис. 2) в том диапазоне концентраций, в котором они сильно ингибировали транспорт  $H^+$ . «Базальная» АТФазная активность, наблюдаемая в присутствии NEM, тоже мало зависела от присутствия конвульсантов. Сходные результаты были получены при измерении активности  $H^+$ -АТФазы в разобленном состоянии—в сахарозной среде в присутствии протонофора ХКФ (данные не приводятся).

Так как стимуляция активности  $H^+$ -АТФазы не отмечалась, возможность проявления конвульсантами свойств разобщителей можно исключить из рассмотрения. Выраженным ингибирующим действием обладал только пенициллин, причем даже в концентрации, практически полностью подавляющей активный транспорт  $H^+$  (рис. 1), пенициллин тормозил активность  $H^+$ -АТФазы только наполовину (рис. 2). Следовательно, прямое ингибирование активности  $H^+$ -транспортной АТФазы, даже весьма заметное, не может являться основным механизмом действия конвульсантов на транспорт  $H^+$ . Поэтому в основе ингибирования конвульсантами активного транспорта  $H^+$  может лежать только один из возможных механизмов, а именно, блокада анионного канала.

## Обсуждение результатов

Полученные результаты показывают, что исследованные конвульсанты подавляют активный транспорт  $H^+$  в мембранах СП мозга путем блокады функционально сопряженного с  $H^+$ -насосом  $Cl^-$ -канала. Такое действие конвульсантов, в первую очередь, можно сопоставить с их действием на  $Cl^-$ -проводимость, опосредованную ГАМК/бензодиазепин-рецепторным комплексом. Правда, механизмы действия конвульсантов на этот процесс могут различаться. Классические антагонисты синаптического действия ГАМК—биксукуллин и пикротоксин действуют на разных уровнях. Первый является конкурентным ингибитором связывания ГАМК с рецептором, а второй, не влияя прямо на связывание медиатора, взаимодействует с особым участком, получившим название конвульсантного, который локализован непосредственно на хлоридном канале или вблизи него [7]. В обоих случаях связывание конвульсанта в конечном счете блокирует транслокацию  $Cl^-$ , лежащую в основе физиологического действия тормозного медиатора.

Остальные исследованные нами конвульсанты проявляют себя в отношении ГАМК-рецепторного комплекса аналогично пикротоксину (а не биксукуллину). Так, пенициллин антагонизирует синаптическое действие ГАМК, блокируя индуцированное медиатором повышение проницаемости для хлорида [5, 9]. Такой же эффект—блокада синаптического действия ГАМК [9, 10], обусловленная подавлением  $Cl^-$ -проницаемости [10] вследствие связывания с конвульсантным участком [11, 12], характерен и для коразола. Бемеград антагонизирует синаптическое действие ГАМК [6, 13] неконкурентным образом [13], не влияя прямо на связывание ГАМК [14].

В мембране СП хлоридный канал, конечно, не связан с ГАМК-рецептором. Примечательно, что его блокируют не только те конвульсанты, которые взаимодействуют с  $Cl^-$ -каналом ГАМК-рецептора, но и биксукуллин. Более того, биксукуллин является самым сильным блокатором в этой группе. Однако сродство к нему (в данном случае величина  $I_{50}$ )  $Cl^-$ -канала мембраны СП более чем на порядок ниже, чем сродство ГАМК-рецептора [7]. В то же время и сродство к остальным конвульсантам также отличается от сродства к ним конвульсантного участка ГАМК-рецепторного комплекса, особенно в отношении пикротоксина [7, 11, 12, 14]. Таким образом, несмотря на то, что все конвульсанты, способные взаимодействовать с ГАМК-рецепторным комплексом, являются блокаторами  $Cl^-$ -канала мембраны СП, последний обладает своим, характерным для него, фармакологическим профилем.

Блокада анионного канала мембраны СП наблюдается при таких концентрациях конвульсантов, при которых для них характерны не только синаптические, опосредованные через ГАМК-рецепторный комплекс, но и несинаптические эффекты. Несинаптическое действие описано для пенициллина [5, 15], пикротоксина [16—18], биксукуллина

[15, 18] и наблюдается при более высоких концентрациях, чем синаптическое действие. Несинаптические эффе́кты конвульсантов заключаются прежде всего в увеличении сопротивления мембраны и снижении ионной проводимости, что сопровождается частичной деполяризацией. Это приводит к увеличению возбудимости мембраны, что может еще более усилить синаптическое действие конвульсантов, обусловленное снятием тормозных влияний [5]. Истинные механизмы, лежащие в основе несинаптического действия конвульсантов, изучены слабо вследствие значительных методических трудностей, их связывают с ингибированием либо хлоридной [5], либо калиевой [15] проводимости.

Как было указано ранее [3], между  $\text{Cl}^-$ -каналом мембраны СП и внесинаптическими анионными каналами наблюдается заметное сходство. Оно проявляется в значительной близости (если не идентичности) их кинетических свойств: анионной специфичности, отношении к ингибиторам, величине  $K_m$  для  $\text{Cl}^-$  [3]. Совпадение диапазонов концентраций, в которых проявляется несинаптическое действие конвульсантов и блокирование ими  $\text{Cl}^-$ -канала мембраны СП вместе с отмеченной близостью свойств двух анионных каналов свидетельствуют в пользу того, что несинаптическое действие конвульсантов вызвано инактивацией внесинаптических анионных каналов [6]. К сожалению, достаточно надежные биохимические методы изучения  $\text{Cl}^-$ -канала, разработанные для мембран СП [4], используют уникальную особенность этих мембран — функциональное сопряжение между  $\text{H}^+$ -насосом и  $\text{Cl}^-$ -каналом, и поэтому непригодны для изучения анионных каналов в тех мембранах, которые лишены такого сопряжения.

Физиологические последствия блокады анионного (хлоридного) канала и связанного с этим ингибирования активного транспорта протонов в мембране СП оценить в настоящее время пока трудно. Несомненно, они должны включать серьезные нарушения метаболизма медиаторов, в частности, в тех его аспектах, которые регулируются трансмембранным градиентом  $\text{pH}$  в синаптических пузырьках. Тот факт, что по эффективности блокирования анионного канала мембраны СП конвульсанты располагаются в том же порядке, который характеризует их относительные конвульсантные свойства *in vivo* [4, 6, 13,], позволяет считать, что этот эффект может играть роль в их эпилептогенном действии. Выявляемое при анализе наших результатов и литературных данных многообразие возможных мишеней действия (ГАМК-рецепторный комплекс, внесинаптические анионные каналы, система сопряженного транспорта  $\text{H}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в СП) позволяет объяснить тонкие отличия между представителями этой достаточно однородной группы конвульсантов (в которую можно включить также тиоцианат и перхлорат) в отношении некоторых клинических проявлений и в их ответе на фармакологические воздействия.

С другой стороны, конвульсанты могут оказаться полезным средством для изучения хлоридного канала мембраны СП, его структуры и функции, сопряжения с  $\text{H}^+$ -насосом, сходства и различий с другими

аннионными каналами, в особенности теми, которые локализованы в различных синаптических и внесинаптических участках нейрональных мембран.

## INHIBITION OF THE ACTIVE PROTON TRANSPORT IN BRAIN SYNAPTIC VESICLES MEMBRANES BY CONVULSANTS: BLOCK OF AN ANION CHANNEL

MELNIK V. I., KRYZHANOVSKY G. N., SHUKALOVA T. F.,  
TITOV S. Yu., GLEBOV R. N.

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The effects of some convulsants on the active proton transport and  $H^+$ -ATPase activity were studied in synaptic vesicle membranes from rat brain. The convulsants inhibited the  $H^+$  transport with the rank order of potencies: bicuculline  $\gg$  picrotoxin  $\gg$  penicillin  $\gg$  bemegride  $\gg$  pentylenetetrazole. Corresponding  $I_{50}$  values were 0,12; 1,0; 2,7; 10 and 13 mM.  $H^+$ -ATPase activity sensitive to inhibition by N-ethylmaleimide was relatively unaffected by convulsants except for penicillin which inhibited it maximally by 50%. Therefore, the inhibition of the active  $H^+$  transport is not due to a direct action on the  $H^+$ -pump or to an uncoupling effect of the convulsants. The mechanism of the inhibition thus appears to represent a block of an anion channel resulting in an impairment of the functional coupling between the  $H^+$  and  $Cl^-$  fluxes involved in the generation of a pH gradient across the membrane of synaptic vesicles.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Мельник В. И., Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, № 1, с. 35—38, 1985.
2. Stadler H., Taukita S. EMBO J., v. 3, № 13, p. 3333—3337, 1984.
3. Мельник В. И., Глебов Р. Н. Всесоюз. конф. по нейронаукам. Тезисы докл. Киев, с. 33, 1986.
4. Woodbury D. M. Adv. Neurol., v. 27, p. 249—303, 1980.
5. Hochner B., Spira M. E., Werman R. Brain Res., v. 107, № 1, p. 85—103, 1976.
6. Scholfield C. N. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., v. 318, № 4, p. 274—280, 1982.
7. Olsen R. W., Wong E. H. F., Stavber G. B., King R. G. Federat. Proc., v. 43, № 13, p. 2773—2778, 1984.
8. Антониюков Н. М., Мельник В. И., Глебов Р. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 102, № 12, с. 714—717, 1986.
9. Macdonald R. L., Barker J. L. Nature, v. 267, № 5613, p. 720—721, 1977.
10. Pellmar T. C., Wilson W. A. Science, v. 197, № 4306, p. 912—914, 1977.
11. Squires R. F., Suederup E., Grawley J. N., Skolntek P., Paul S. M. Life Sci., v. 35, № 14, p. 1439—1444, 1984.

12. Ramanjaneyulu R., Ticku M. K. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 98, № 3/4, p. 337—346, 1984.
13. Simmonds M. A. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 63, № 3, p. 495—502, 1978.
14. Skerritt J. H., Johnston G. A. R. *Neurochem. Res.*, v. 8, № 10, p. 1351—1362, 1983.
15. Heyer E. J., Nowak L. M., Macdonald R. L. *Brain Res.*, v. 232, № 1, p. 41—56, 1982.
16. Ozeki M., Freeman A. R., Grundfest H. *J. Gen. Physiol.*, v. 49, № 6, p. 1334—1349, 1966.
17. Barker J. L., MacDonald J. F. *Science*, v. 208, № 4447, p. 1054—1056, 1980.
18. Freeman A. R. *J. Neurobiol.*, v. 4, № 6, p. 567—582, 1973.

Поступила 20. III 1986

---

ЧАРЧЛЭНД П. С. Нейрофилософия. К объединенной науке о мышлении мозга (англ.). 524 с.

*Churchland Patricia S. Neurophilosophy. Toward a Unified Science of the Mind Brain.* 524 p.

По словам D. C. Dennet, «Нейрофилософия» является тем введением в нейронауки, в котором нуждаются философы, и тем введением в философию мышления, в котором нуждаются нейробиологи. Пять глав первой части книги, объединенные в разделе «Элементарные понятия нейронаук», посвящены описанию истории науки о нервной системе и служат общим введением в нейроанатомию и нейропсихологию. Во второй части, озаглавленной «Последние достижения в философии науки», выдвигается проблема взаимосвязи между мыслью и организмом в широком контексте философии науки. Основываясь на новейших достижениях в этой области, автор приводит аргументы в пользу редукционистской стратегии и современные объяснения на традиционную критику ее со стороны дуалистов и антиредукционистов. Книгу завершает третья часть «Перспективы нейрофилософии», где представлены и обсуждаются некоторые из наиболее обещающих теоретических разработок, ныне применяющихся в функциональной нейробиологии и коннекционистских моделях, связанных с работами по искусственному интеллекту.