



УДК 612.822.1.015

ТОРМОЖЕНИЕ КОНВУЛЬСАНТАМИ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ПРОТОНОВ В МЕМБРАНАХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКОВ МОЭГА: 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^+ -ATРазы в мембранах синаптических пузырьков мозга крыс. Конвульсанты ингибировали транспорт H^+ , располагаясь по их эффективности в следующем порядке: бикууллин \gg никротоксин \gg пенициллин \gg бензогрид \gg ксеразол. 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^+ -ATРазы, чувствительной к ингибированию N -этилмалеимидом. 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 pH 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 трансмембранныго градиента pH (внутри pH около 5), который поддерживается H^+ -насосом (H^+ -транспортной АТРазой) [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 pH (ΔpH) [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 (SCN^-) и перхлорат (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 несинаптических, предполагается в качестве общего механизма действия целой группы конвульсантов, включающей бикукуллии, пикротоксии, пенициллии, коразо-, [4, 5] и бемегрил [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 H^+ в мембранах СП, который в определенных условиях лимитируется состоянием проводимости анионного канала. Чтобы установить, какой элемент сопряженной системы ко-транспорта H^+ и Cl^- подвержен влиянию конвульсантов— H^+ -насос или Cl^- -канал, параллельно исследовали их влияние на активность H^+ -транспортной АТРазы мембран СП.

Материалы и методы

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

Активный транспорт H^+ измеряли методом непрерывной регистрации изменений флуоресценции слабого основания акридинорана [1, 3]. Среда измерения содержала 2 мкМ акридинорана, 150 мМ KCl, 20 мМ HEPES/трис рН 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 рН 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 мкМ протонофор карбонилцианид m-хлорофенилгидразон (ХКФ). После 20 мин преникубации мембран в среде инициировали реакцию добавлением 2 мМ Mg-АТР и через 30 мин останавливали и определяли содержание свободнодиспергирующегося при гидролизе АТР Р, одностадийным методом с помощью стоп-Р₁ реактива [3]. Активность H⁺-АТРаз 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 тези, в которые белок добавляли после остановки реакции.

В работе использовали бикукуллин и пикротоксин («Serva», ФРГ), ГАМК («Reanal», Венгрия), ленициллин (бензилпенициллин Г), бемегрид, 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 пикротоксина 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 концентрационно зависимым 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 > пенициллин > бемегрид > 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 АТРазы, катализирующей векторную транслокацию H^+ . Второй механизм состоит в непрямом, разобщающем действии, которое может быть обусловлено либо протонофорным эффектом, создающим высокую проницаемость для H^+ , либо эффектом проникающих слабых оснований, устраняющих $\Delta\mu H$ в результате протеци-

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

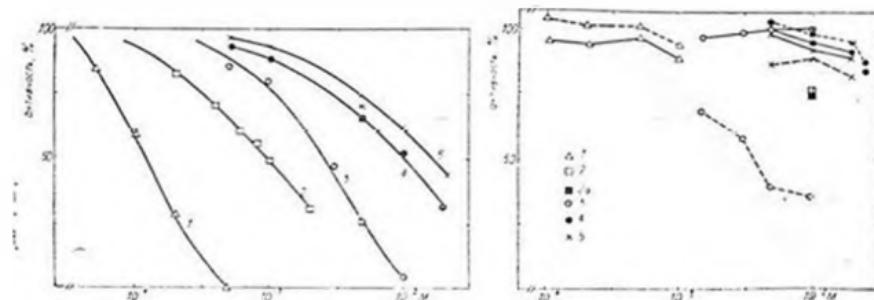


Рис. 1. Действие конвульсивтов на аккумуляцию протонов H^+ -насосом мембран синаптических пузырьков: 1—биккууллин, 2—пиротексин, 3—пенициллин, 4—бемегрид, 5—коразол

Рис. 2. Влияние конвульсивтов на активность H^+ -АТРазы (---) и «базальной» NEM резистентной АТРазы (—) мембранны синаптических пузырьков в присутствии 0,15 M KCl: 1—биккууллин, 2—пиротексин (H^+ -АТРаза), 2a—пиротексин («базальная» АТРаза), 3—пенициллин, 4—бемегрид, 5—коразол

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

Так как стимуляция активности H^+ -АТРазы не отмечалась, возможность проявления конвульсивтами 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^+ -АТРазы только наполовину (рис. 2). Следовательно, прямое ингибирование активности H^+ -транспортной АТРазы, даже весьма заметное, не может являться основным механизмом действия конвульсивтов на транспорт H^+ . Поэтому в основе ингибирования конвульсивтами 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—биккууллин 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 исследовавшиеся нами конвульсанты проявляют себя в отношении ГАМК-рецепторного комплекса аналогично пикротоксину (а не биккууллину). 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. Бемегрид антагонизирует синаптическое действие ГАМК [6, 13] неконкурентным образом [13], не влияя прямо на связывание ГАМК [14].

В мемbrane 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 биккууллин. Более того, биккууллин является самым сильным блокатором в этой группе. Однако сродство к нему (в данном случае величина I_{50}) Cl^- -канала мембранны 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 мембранны СП, последний обладает своим, характерным для него, фармакологическим профилем.

Блокада анионного канала мембранны 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], биккууллина

[15, 18] и наблюдается при более высоких концентрациях, чем синаптическое действие. Несинаптические эффекты конвульсантов заключаются прежде всего в увеличении сопротивления мембранны и снижении ионной проводимости, что сопровождается частичной деполяризацией. Это приводит к увеличению возбудимости мембранны, 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 Cl⁻-каналом мембранны 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_{in} для Cl⁻ [3]. Совпадение диапазонов концентраций, в которых проявляется несинаптическое действие конвульсантов и блокирование ими Cl⁻-канала мембранны 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 Cl⁻-канала, разработанные для мембранны СП [4], используют уникальную особенность этих мембран—функциональное сопряжение между H⁺-насосом и Cl⁻-каналом, и поэтому непригодны для изучения анионных каналов в тех мембранных, которые лишены такого сопряжения.

Физиологические последствия блокады анионного (хлоридного) канала и связанного с этим ингибирования активного транспорта протонов в мембранны СП оценить в настоящее время пока трудис. Несомненно, они должны включать серьезные нарушения метаболизма медиаторов, в частности, в тех его аспектах, которые регулируются трансмембранным градиентом pH в синаптических пузырьках. Тот факт, что по эффективности блокирования анионного канала мембранны СП конвульсанты располагаются в том же порядке, который характеризует их относительные конвульсантические свойства *in vivo* [4, 6, 13], позволяет считать, что этот эффект может играть роль в их антилептогенном действии. Выявляемое при анализе наших результатов и литературных данных многообразие возможных мишней действия (ГАМК-рецепторный комплекс, внесинаптические анионные каналы, система сопряженного транспорта H⁺ и Cl⁻ в СП) позволяет объяснить тонкие различия 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 мембранны СП, его структуры и функции, сопряжения с H⁺-насосом, сходства и различий с другими

анонионными 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>picrotoxin>penicillin>bemegride>pentylenetetrazole. Corresponding I₅₀ 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., Tsukita S. EMBO J., v. 3, № 13, p. 3333—3337, 1984.
3. Мельник В. И., Глебов Р. Н. Всесоюзн. конф. по нейронаукам. Тезисы докл.. Киев, с. 33, 1986.
4. Woodbury D. M. Adv. Neurol., v. 27, p. 249—303, 1980.
5. Hochner B., Spiro M. E., Werman R. Brain Res., v. 107, № 1, p. 85—103, 1976.
6. Scholfield C. N. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 318, № 4, p. 274—280, 1982.
7. Olsen R. W., Wong E. H. F., Stauber G. B., King R. G. Federat. Proc., v. 43, № 13, p. 2773—2778, 1984.
8. Антоников 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., Saederup E., Gravley J., Nilsson Skolnick P., Paul S. M. Life Sci., v. 35, № 14, p. 1439—1444, 1984.

12. Rumanjaneyulu 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 мыслящем мозге (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 мышлением 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 применявшихся в функциональной нейробиологии и концепционистских моделях, связанных с работами по искусственно му интеллекту.