

## Wpływ flurazepamu i zewnątrzkomórkowego pH na amplitudę i kinetykę GABAergicznych prądów synaptycznych w hodowanych neuronach z hipokampa szczura\*

Piotr Brzeźnicki, Ewa Pindel, Tomasz Wójtowicz, Michał Piast,  
Jerzy W. Mozrzymas

Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego  
Katedra Biofizyki  
Akademia Medyczna we Wrocławiu

### Streszczenie

Stężenie jonów wodorowych (pH) i benzodiazepiny (BDZ) są czynnikami modulującymi receptory GABA<sub>A</sub>. W szczególności, wartość pH środowiska zewnątrzkomórkowego może zmieniać się w zależności od stanu fizjologicznego lub patologicznego. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań wpływu flurazepamu (benzodiazepiny) przy różnych wartościach zewnątrzkomórkowego pH (z zakresu 5.5 – 7.2) na amplitudę miniaturowych GABA-ergicznych inhibujących prądów synaptycznych (mIPSCs). Stwierdzono, że obecność flurazepamu prowadzi do zwiększenia amplitudy mIPSCs, ale efekt ten zależy od pH i jest największy przy silnie kwaśnych wartościach. Wpływ flurazepamu na amplitudę mIPSC osiąga nasycenie przy stężeniu ok. 1 μM dla wszystkich badanych wartości pH. Wyniki te wskazują na to, że modulacja prądów GABAergicznych przez benzodiazepiny jest zależna od odczynu środowiska.

**Słowa kluczowe:** flurazepam, benzodiazepiny, pH, receptory GABA<sub>A</sub>, patch-clamp, mIPSC.

Benzodiazepiny są związkami, które wspomagają aktywność receptorów GABA<sub>A</sub> [4, 9, 14]. Do tej grupy związków należą substancje stosowane jako leki przeciwpileptyczne (AED), przeciwkonwulsyjne, leki nasenne i uspokajające. Receptor GABA<sub>A</sub> zawierający podjednostkę γ2 posiada miejsce wiążące dla benzodiazepin, które znajduje się na interfejsie pomiędzy podjednostką γ2 i α [9, 11, 12, 13], co pozwala na bezpośrednią modulację działania receptora przez te związki. Głównym efektem oddziaływania benzodiazepin na receptor GABA

\* Praca dofinansowana przez KBN grant nr PBZ-MIN-001/P05/28

jest zwiększenie powinowactwa GABA do receptora  $GABA_A$  ( $GABA_A R$ ) [1]. W praktyce, najczęściej opisywanym efektem benzodiazepin jest zwiększenie amplitud i wydłużenie czasu deaktywacji prądów GABAergiczych [4, 2].

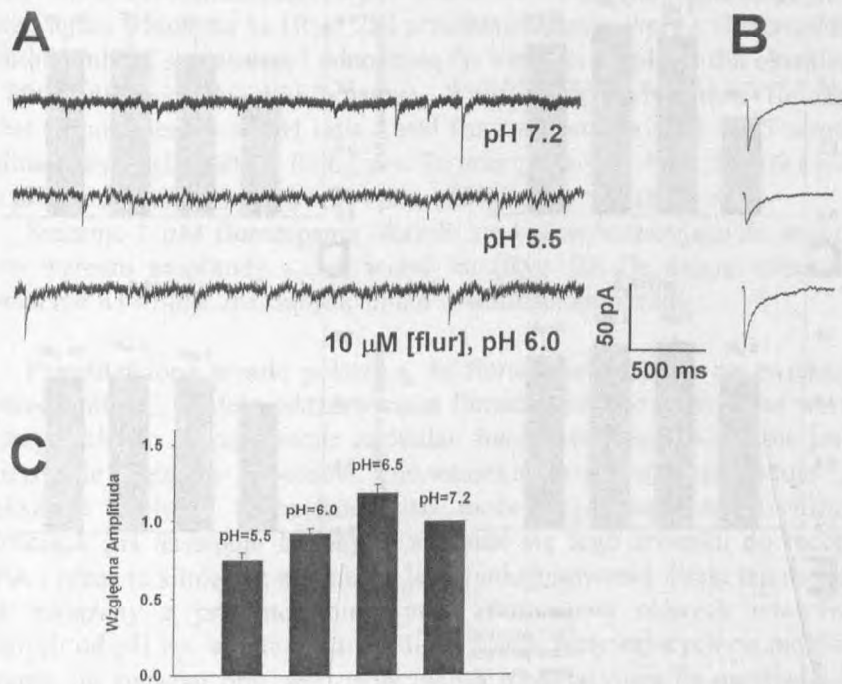
Innym czynnikiem, który silnie moduluje funkcjonowanie  $GABA_A R$  jest stężenie jonów wodorowych w bezpośrednim otoczeniu receptora [3, 8, 10]. Zakwaszenie roztworu powoduje redukcję amplitudy (przy b. niskich stężeniach GABA). pH jest jednym z parametrów, który może ulec zmianie w stanach chorobowych, patologicznych układu nerwowego, co z kolei może wpływać na efektywność działania leków, związków modulujących działanie receptora  $GABA_A$  [14]. Praca ta stara się odpowiedzieć na pytanie, jaki wpływ na modulację synaptycznych prądów GABAergiczych przez benzodiazepiny mają zmiany pH w środowisku zewnątrzkomórkowym.

Badania przeprowadzono na hodowlach komórek nerwowych, pochodzących z hipokampa szczura (2-3 dni po urodzeniu). Procedura preparacji hodowli została przedstawiona w szczegółach w pracy [7]. 2-3 dniowe szczury zostały zdekapitowane, hipokamp został wyekstrahowany, pocięty, potraktowany enzymami trawiącymi i zdysocjowany na pojedyncze komórki, które wysiane zostały na płytkach Petriego i pozostawione w inkubatorze przez przynajmniej tydzień. W tym czasie, dochodzi do wytworzenia dużej ilości funkcjonalnych połączeń synaptycznych. Pomiarów wykonano przy użyciu techniki patch-clamp, w konfiguracji whole-cell, rejestrując miniaturowe, inhibujące prądy postsynaptyczne (mIPSCs), przy obecności blokerów: tetrodotoksyny (TTX,  $1 \mu M$ ) blokującej napięciowo zależne kanały sodowe, i kwasu kinurynowego ( $1 mM$ ) blokującego transmisję glutamatergiczną (AMPA i NMDA). Rejestracje wykonano przy stałym, ustalonym na  $-70 mV$  napięciu błonowym.

Roztwór zewnątrzkomórkowy miał następujący skład: NaCl  $137 mM$ , KCl  $5 mM$ ,  $CaCl_2$   $2 mM$ ,  $MgCl_2$   $1 mM$ , D-glukoza  $20 mM$ , HEPES  $10 mM$ , pH roztworu doprowadzone do odpowiedniego pH ( $6.0 - 7.2$ ) przy użyciu NaOH. Dla pH =  $5.5$ , zamiast buforu HEPES użyty został bufor MES  $15 mM$ . Pipeta pomiarowa wypełniona była roztworem o składzie: CsCl  $137 mM$ ,  $CaCl_2$   $1 mM$ ,  $MgCl_2$   $2 mM$ , BABTA  $11 mM$ , ATP  $2 mM$ , pH =  $7.2$  miareczkowane przy użyciu CsOH.

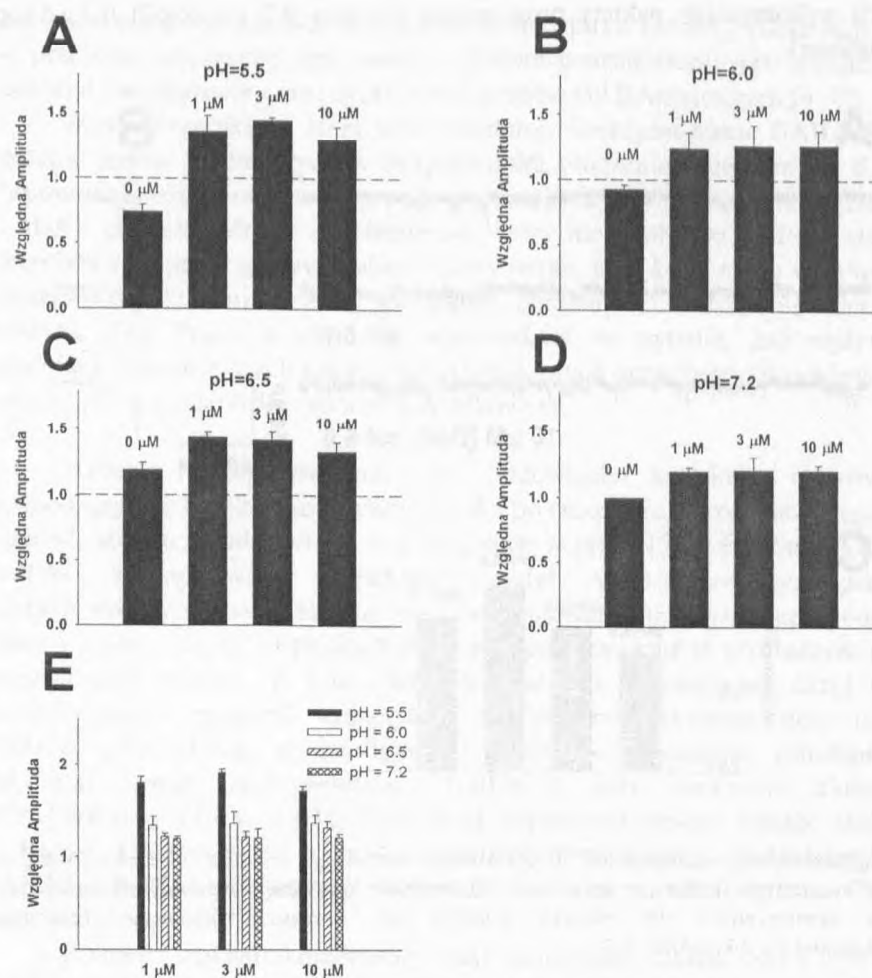
Roztwór standardowy, o danym pH i ustalonym stężeniu flurazepamu, podawano w bezpośrednie otoczenie badanej komórki. Prądy synaptyczne wykazywały bardzo duże zróżnicowanie zarówno jeśli idzie o amplitudę jak i przebieg czasowy (Ryc. 1A) dlatego też w celu ich opisania każdorazowo dokonano ich algebraicznego uśrednienia (Ryc. 1B). Do akwizycji i analizy

danych wykorzystano pakiety programowe clampex 9.2 i clampfit 9.2 (Axon Instruments).



**Ryc. 1.** Przykładowe rejestracje mIPSC dla różnych wartości pH (A) oraz uśrednione wartości prądów mierzonych w danych warunkach (B). Wartości względnej amplitudy miniaturowych prądów synaptycznych dla różnych wartości pH zewnątrzkomórkowego (zmierzone z przynajmniej  $n = 3$  komórek) (C).

Stosując wyżej opisaną metodologię, dokonano analizy zależności amplitudy miniaturowych prądów synaptycznych od zewnątrzkomórkowego pH i stężenia flurazepamu. Wartość średniej amplitudy dla kontrolnego pH = 7.2 wyniosła  $44.8 \pm 1.3$  pA ( $n = 50$ ). Stwierdzono, że zmniejszające się pH powoduje początkowo wzrost amplitudy mIPSC (dla pH = 6.5), ale dalsze zmniejszanie wartości pH prowadzi do zmniejszenia tego parametru [Ryc. 1C]. Wyniki te potwierdzają efekt jonów wodorowych na prądy GABAergiczne opisany w pracach [3, 8]. Flurazepam zwiększał amplitudę mIPSCs, ale efekt ten był zależny od wartości pH. Ryc. 2A-D przedstawia względne zmiany amplitud (względem średniej amplitudy mIPSCs zmierzonej przy pH = 7.2 na tej samej komórce) przy różnych wartościach pH i stężeniach flurazepamu.



**Ryc. 2.** Wykres zależności względnej amplitudy mIPSC od stężenia flurazepamu (przerwaną linią zaznaczono poziom odpowiadający wartości względnej amplitudy  $[I_{\text{pH} + \text{flurazepam}} / I_{\text{pH}=7.2}]$  dla pH = 7.2) dla (A) pH = 5.5, (B) pH = 6.0, (C) pH = 6.5 i (D) pH = 7.2, (E) względna wartość amplitudy (mierzone względem pH kontrolnego = 7.2), (F) wartość względnej amplitudy  $[I_{\text{pH} + \text{flurazepam}} / I_{\text{pH}}]$  odniesionej do danej wartości pH.

Największy wpływ flurazepamu na amplitudę stwierdzono przy wartości pH = 5.5: choć średnia amplituda mIPSCs przy pH = 5.5 i nieobecności flurazepamu uległa zmniejszeniu do  $0.75 \pm 0.05$  ( $n = 5$ , względem amplitud przy pH kontrolnym równym 7.2) to przy stężeniu 3 μM flurazepamu amplituda wzrastała do  $1.45 \pm 0.02$  ( $n = 3$ ) (Ryc. 2A). Dla porównania, przy pH = 7.2 i stężeniu flurazepamu 3 μM wystąpił wzrost amplitudy do  $1.21 \pm 0.09$  ( $n = 4$ )

[Ryc. 2D]. Wyniki te wskazują na bardzo ważną obserwację, że wpływ flurazepamu na amplitudy mIPSCs jest uzależniony od wartości pH w środowisku zewnątrzkomórkowym. Zależność efektu flurazepamu od pH jest jeszcze lepiej widoczna na [Ryc. 2E] przedstawiającym wpływ flurazepamu na amplitudę mIPSCs mierzoną i odnoszoną do wartości amplitud dla określonego pH (przy nieobecności flurazepamu). Wzrost amplitudy przez flurazepam zależał monotonicznie od pH i dla 1  $\mu$ M flurazepamu przy pH = 5.5 względna amplituda wyniosła  $1.81 \pm 0.06$  (n = 3), przy pH = 6.0  $1.34 \pm 0.09$  (n = 3), przy pH = 6.5  $1.22 \pm 0.03$  (n = 3) i przy pH 7.2  $1.20 \pm 0.02$  (n = 5).

Stężenie 1  $\mu$ M flurazepamu okazało się być wystarczające do nasycenia efektu wzrostu amplitudy – jak widać na (Ryc. 2A-D) dalsze zwiększanie stężenia nie wywołuje znaczących zmian w wartości amplitudy.

Przedstawione wyniki pokazują, że flurazepam wpływa na zwiększenie amplitudy mIPSC, a efekt oddziaływania flurazepamu jest zależny od wartości pH przy jakim to oddziaływanie zachodzi. Bardzo wyraźnie widoczne jest, że zmniejszenie stężenie protonów (zakwaszenie roztworu), powoduje silne zwiększenie wpływu flurazepamu, co może sugerować, że w niższych wartościach pH następuje łatwiejsze wiązanie się tego związku do receptora GABA i przez to silniejszą modulację jego funkcjonowania. Efekt ten może być także związany z przyjmowaniem przez flurazepam różnych właściwości zależnych od pH np. uprotonowania, dimeryzacji, wpływających na możliwość wiązania się związku oraz jego właściwości modulacyjne. Ta możliwość jest jednak mało prawdopodobna ze względu na to, że wartość  $pK_a$  dla flurazepamu wynosi 8.16, co sugeruje iż zakwaszanie roztworu poniżej wartości kontrolnej (7.2) nie powinno istotnie wpływać na uprotonowanie flurazepamu. Jest możliwe, że różny wpływ flurazepamu na amplitudy mIPSCs przy różnych wartościach pH jest konsekwencją nakładania się wpływu tych dwóch czynników w warunkach bardzo krótkiej ekspozycji receptorów na synaptycznie wydzielony GABA. Przy silnie kwaśnych pH, stała wiązania staje się tak powolna, że bardzo krótkotrwała ekspozycja receptorów synaptycznych na neuroprzekaźnik (czas przebywania neuroprzekaźnika w synapsie jest szacowany na ok. kilkaset mikrosekund, [15]) jest niewystarczająca by doszło do aktywacji receptorów w takim stopniu jak ma to miejsce w warunkach kontrolnych. Pojawienie się flurazepamu przy kwaśnym pH odwraca efekt zakwaszenia środowiska na stałą wiązania. Należy jednak podkreślić, że niska wartość pH wpływa ponadto na zmniejszenie desensytyzacji [3]. A zatem, sumaryczne działanie obniżonego pH i flurazepamu może doprowadzić do zmniejszenia desensytyzacji przy niezmiennym lub nawet zwiększonym powinowactwie receptora GABA<sub>A</sub> do jego agonisty (wpływ pH i flurazepamu na

stałą wiązania się kompensują). W tej sytuacji, wydzielony synaptycznie agonista, przy niskim pH i w obecności flurazepamu, może doprowadzić do znacznego wzrostu amplitudy mIPSCs, gdyż większa proporcja związanych receptorów przejdzie do stanu konformacyjnego otwartego kosztem stanu zdesensytyzowanego (patrz dyskusja o mechanizmie wpływu pH na receptory GABA<sub>A</sub> w parcy [3]).

Konkludując, najważniejszym wnioskiem z niniejszej pracy jest to, iż flurazepam silnie moduluje GABAergiczne prądy synaptyczne i efekt ten jest bardzo istotnie modulowany przez zmiany wartości pH środowiska zewnątrzkomórkowego. Obserwacja ta wydaje się bardzo ważna, gdyż jak już wspomniano we wstępie, wartość pH roztworów zewnątrzkomórkowych może ulegać istotnym zmianom w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych.

### Piśmiennictwo

1. Dian-Shi Wang,a, Shun-Yan Lu, Zhen Hong and Hai-Lei Zhua (2003) Biphasic action of midazolam on GABA<sub>A</sub> receptor-mediated responses in rat sacral dorsal commissural neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309 (2003) 893–899.
2. Reynolds J. N., Maitra R. (1996) Propofol and flurazepam act synergistically to potentiate GABA<sub>A</sub> receptor activation in human recombinant receptors. *European J. of Pharmacology* 314 151-156.
3. Mozrzymas J.W., Żarnowska E.D., Pytel M., Mercik K. (2003). Modulation of GABA<sub>A</sub> receptors by hydrogen ions reveals synaptic GABA transient and a crucial role of the desensitization process. *J.Neurosci*. 23: 7981-7992.
4. Poncer J.C., Durr R., Gahwiler B.H. and Thompson S.M.. Modulation of Synaptic GABA<sub>A</sub> Receptor Function by Benzodiazepines in Area CA3 of Rat Hippocampal Slice Cultures. *Neuropharmacology*. Vol. 35. No.9/10 1169-1179.
5. M.V., Westbrook G.L. (1995) Desensitized states prolong GABA<sub>A</sub> channel responses to brief agonist pulses. *Neuron* 15: 181-191.
6. Ming-De Wang, Mozibur Rahman, Di Zhu, (2005) Protons inhibit Cl<sup>-</sup> conductance by direct or allosteric interaction with the GABA-binding site in the rat recombinant  $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$  and  $\alpha_1\beta_2$  GABA<sub>A</sub> receptor. *Euro. J. of Pharm.* 528 1 – 6.
7. Andjus P.R., Stevic-Marinovic Z., Cherubini E. (1997) Immunoglobulins from motoneurone disease patients enhance glutamate release from rat hippocampal neurons in culture, 504 103-112.
8. Pasternack M., Smirnov S., Kaila K. (1996) Proton Modulation of Functionally Distinct GABA<sub>A</sub> Receptors in Acutely Isolated Pyramidal Neurons of Rat Hippocampus. *Neuropharmacology* Vol. 35, No. 9/10, 1279 – 1288.
9. Wafford K.A. (2005), GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Current Opinion in Pharmacology* 5: 47 – 52.

10. Krishek B.J., Amato A. (1996), Proton sensitivity of the GABA<sub>A</sub> receptor is associated with receptor subunit composition. *J. Physiol.* 492 ( Pt 2):431-43.
11. Berezhony D., Nyfelet Y., Gonthier A. (2004) On the Benzodiazepine Binding Pocket in GABA<sub>A</sub> Receptors. *J. Biolog. Chem.* Vol. 279, No. 5 3160 – 3168.
12. Ogris W., Poltl A., Sieghard W., (2004) Affinity of various benzodiazepine site ligands in mice with a point mutation in the GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 2 subunit. *Biochemical Pharmacology* 68 1621–1629.
13. Boileau A.J., Baur R., Sharkey E., Singel E., Czajkowski C. (2002) The relative amount of cRNA coding for  $\gamma$ 2 subunit affects stimulation by benzodiazepines in GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* 43 695 – 700.
14. Borchardt M. (1999) Review of the clinical Pharmacology and use of the benzodiazepines. *J. Perianesthesia Nursing*, Vol. 14 No. 2 65 – 72.
15. Mozrzymas J.W. (2004) Dynamism of GABA<sub>A</sub> receptor activation shapes the “personality” of GABA<sub>A</sub> receptor activation shapes the “personality” of inhibitory synapses. *Neuropharmacology*, 47 945–960.

Adres do korespondencji:

**Piotr Brzeźnicki**

Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego

Katedra Biofizyki

Akademia Medyczna we Wrocławiu

ul. Chałubińskiego 3

50-368 Wrocław

Tel.: (48 71) 7841551

e-mail: pbrzez@interia.pl