

УДК 615.2 : 57.02

# ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ ГАМКА-РЕЦЕПТОРА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КЛОФЛУБИЦИНА

О.В. Варламова<sup>1</sup>, А.В. Бабкин<sup>1</sup>,  
И.С. Бердинских<sup>1</sup>, А.К. Назаров<sup>1</sup>,  
А.С. Садовникова<sup>1</sup>, А.С. Никифоров<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГУП «НЦ «Сигнал», 107014, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**В** статье представлены результаты определения уровня экспрессии (УЭ) генов, кодирующих субъединицы ГАМКа-рецептора *GABRA1*, *GABRB2* и *GABRG2* в гиппокампе крыс через 24 часа после однократного внутримышечного введения антагониста хлор-ионного канала ГАМКа-рецептора клофлубицина в дозах ЛД<sub>25</sub>, ЛД<sub>40</sub>, ЛД<sub>50</sub> и ЛД<sub>75</sub>. Выявлено, что клофлубицин не влиял на УЭ гена *GABRG2*. Наряду с этим УЭ гена *GABRA1* после введения клофлубицина в дозе ЛД<sub>40</sub> увеличивался в 7,5; ЛД<sub>50</sub> – в 7,0; ЛД<sub>75</sub> – в 5,0 раз. УЭ гена *GABRB2* также увеличивался в 3,6 раза после введения клофлубицина в дозе ЛД<sub>50</sub> и в 2,6 раза после введения в дозе равной ЛД<sub>75</sub>. Предполагается, что увеличение экспрессии генов *GABRA1* и *GABRB2* у крыс после введения клофлубицина в дозах выше ЛД<sub>25</sub> является компенсаторной реакцией организма на воздействие физиологически активного вещества (ФАВ), а субъединицы, кодируемые этими генами  $\alpha 1$  и  $\beta 2$  соответственно, включены в механизм развития судорожного эффекта.

**Ключевые слова:** Клофлубицин, ГАМКа-рецептор, уровень экспрессии, ген, *GABRA1*, *GABRB2*, *GABRG2*.

**Введение:** ГАМКа-рецепторный комплекс состоит из пяти полипептидных субъединиц и хлор-ионного канала. Каждая из субъединиц принадлежит к определенному семейству, которое делится на подтипы ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ;  $\beta 1$ - $\beta 3$ ;  $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ;  $\delta$ ;  $\epsilon$ ;  $\pi$ ;  $\theta$ ). В норме при взаимодействии молекул гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) с рецептором постсинаптической мембраны происходит изменение конформации хлор-ионного канала, в результате которого ионы хлора начинают свободно проникать внутрь клетки. Накопление ионов хлора внутри клетки приводит к гиперполяризации мембраны, и вследствие этого к понижению возбудимости нейронов [1]. Рецепторы ГАМКа расположены в основном в головном мозге, где наиболее распространенным вариантом комбинации субъединиц является  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ , которые кодируются генами *GABRA1*, *GABRB2* и *GABRG2* соответственно [2].

Высокая значимость ГАМК-ергической нейротрансмиссии в регуляции жизнедеятельности организма млекопитающих определяет возрастающий интерес к ФАВ, влияющим на ее актив-

ность. Одним из таких веществ является клофлубицин.

Клофлубицин входит в группу антагонистов хлор-ионных каналов рецепторов ГАМК и необратимо блокирует тормозную ГАМК-ергическую нейромедиацию. Его применение в качестве инсектицида и родентицида может приводить к отравлениям [3].

Известно, что интоксикации, вызываемые необратимыми ГАМК-литиками, в том числе клофлубицином, вызывают приступы судорог, которые плохо поддаются лечению [1]. Особенностью отравления необратимыми ГАМК-литиками является то, что признаки интоксикации характеризуются медленным развитием судорожного синдрома (в течение нескольких часов), а интенсивность судорог нарастает постепенно, приводя к развитию финального опистотонуса и гибели животных [2]. Терапия противосудорожными препаратами при отравлении необратимыми ГАМК-литиками малоэффективна [2].

Введение некоторых ФАВ приводит к изменению транскрипции генов, продукты которых

Варламова Ольга Вячеславовна (Varlamova Olga Vyacheslavovna), младший научный сотрудник ФГУП «НЦ «Сигнал», 107014, г. Москва, Lyolisik@mail.ru  
Бабкин Александр Владимирович (Babkin Aleksandr Vladimirovich), кандидат биологических наук, заведующий лабораторией ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Бердинских Ирина Сергеевна (Berdinskih Irina Sergeevna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Назаров Андрей Константинович (Nazarov Andrej Konstantinovich), научный сотрудник ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Садовникова Анастасия Сергеевна (Sadovnikova Anastasiya Sergeevna), лаборант ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Никифоров Александр Сергеевич (Nikiforov Aleksandr Sergeevich), доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ

участвуют во взаимодействии с данными веществами. Такие изменения можно выявить, определив уровень экспрессии генов в тканях-мишенях. На данный момент в литературе есть несколько примеров значительного изменения уровня экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМКа-рецептора после формирования судорожного синдрома [4-9].

Однако до настоящего времени остается неизученным вопрос влияния клофлуцидина на изменение уровня экспрессии генов ГАМКа-рецептора. Возможно, данное исследование поможет также внести вклад в понимание более точного механизма взаимодействия неконкурентных антагонистов хлор-ионного канала ГАМКа-рецептора с его субъединицами.

В связи с этим целью данного исследования являлось изучение уровня экспрессии генов *GABRA1*, *GABRB2* и *GABRG2*, кодирующих субъединицы  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 2$  ГАМКа-рецептора после введения клофлуцидина.

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена в соответствии с Национальными и Международными правилами работы с лабораторными животными. Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 180-240 г, содержащихся в условиях вивария. За 12 часов до начала эксперимента животных не кормили. Для достижения поставленной цели крысам однократно, внутримышечно вводили клофлуцидин в дозах ЛД<sub>25</sub> (n=150), ЛД<sub>40</sub> (n=12), ЛД<sub>50</sub> (n=36) и ЛД<sub>75</sub> (n=150). Контрольной группе крыс вводили растворитель (n=22).

Степень судорожной активности оценивали по пятибальной шкале и регистрировали время наступления той или иной стадии отравления [10]. Через одни сутки после введения клофлуцидина у выживших крыс отобрали образцы тканей гиппокампа, и выделяли РНК с использованием реагентов «ExtractRNA» (Евроген, Россия). После выделения РНК обрабатывали ДНКазой «DNase I» (Thermo Scientific, США).

С помощью обратной транскриптазы «High capacity cDNA revertase transcription kit» (Applied Biosystems, США) на основе РНК была синтезирована кДНК. Далее с помощью ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих праймеров и зондов «TaqMan Gene Expression Assays» (Applied Biosystems, США) определяли уровень экспрессии генов *GABRA1*, *GABRB2* и *GABRG2* относительно референсного гена 18S рРНК на амплификаторе QuantStudio 12K flex (Applied Biosystems, США).

Для определения относительного количества кДНК, соответствующего относительному количеству мРНК, использовали разведения пулированных исследуемых образцов, при помощи которых осуществлялось построение калибровочных кривых. Показатель УЭ гена определя-

ли относительно референсного гена 18S рРНК по следующей формуле:

$$УЭ = \frac{\text{количество мРНК определяемого гена}}{\text{количество мРНК гена 18S рРНК}} \times 100\%$$

где УЭ – относительный уровень экспрессии гена [11].

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Крускала-Уоллиса, критерия Дана для множественного сравнения и коэффициента корреляции Спирмена.

**Результаты и обсуждение.** В таблице 1 представлены результаты оценки развития признаков интоксикации после введения крысам клофлуцидина в разных дозах.

Показано, что время наступления судорог различной степени обратно пропорционально вводимой дозе клофлуцидина. Чем выше вводимая доза, тем раньше наступала каждая из степеней судорожной активности и большее количество животных достигало мощных клонико-тонических судорог.

В результате проведенных исследований было установлено, что УЭ гена *GABRA1* у крыс через одни сутки после введения клофлуцидина в дозах ЛД<sub>40</sub>, ЛД<sub>50</sub> и ЛД<sub>75</sub> статистически значимо отличается от контрольных животных (рис. 1).

Из данных, представленных на рисунке 2 видно, что с повышением дозы отмечается тенденция к увеличению УЭ гена *GABRA1*. После введения клофлуцидина в дозе ЛД<sub>40</sub> УЭ гена *GABRA1* увеличивается в 7,5 раз; ЛД<sub>50</sub> – в 7,0 раз, а при введении ЛД<sub>75</sub> – в 5,0 раз соответственно. Коэффициент корреляции ( $R_s$ ) УЭ и дозы клофлуцидина составляет 0,7 при  $p < 0,05$ , что свидетельствует о сильной связи между этими двумя характеристиками.

При исследовании УЭ гена *GABRB2* статистически значимые различия по сравнению с контрольными животными регистрировали через 1 сутки после введения клофлуцидина в дозах ЛД<sub>50</sub> и ЛД<sub>75</sub> (рис. 2). После введения клофлуцидина в дозе ЛД<sub>50</sub> УЭ гена *GABRB2* увеличился в 3,6 раза, ЛД<sub>75</sub> – в 2,6 раза соответственно. Коэффициент корреляции ( $R_s$ ) УЭ гена *GABRB2* с дозой клофлуцидина составляет 0,56 при  $p < 0,05$ .

Анализ УЭ гена *GABRG2* в гиппокампе крыс после введения клофлуцидина на разных дозах выявил, что данный показатель значимо не отличается от контрольных животных (рис. 3).

Из полученных результатов следует, что в гиппокампе крыс через одни сутки после введения клофлуцидина УЭ генов *GABRA1* (ЛД<sub>40</sub>, ЛД<sub>50</sub> и ЛД<sub>75</sub>), *GABRB2* (ЛД<sub>50</sub> и ЛД<sub>75</sub>) увеличивался и не изменялся для гена *GABRG2*.

На рисунке 4 представлены значения УЭ генов *GABRA1* и *GABRB2* в каждой группе. После

Таблица 1

**Развитие признаков интоксикации при внутримышечном введении клофлубицина крысам  
в дозах ЛД<sub>25</sub> – ЛД<sub>75</sub>**

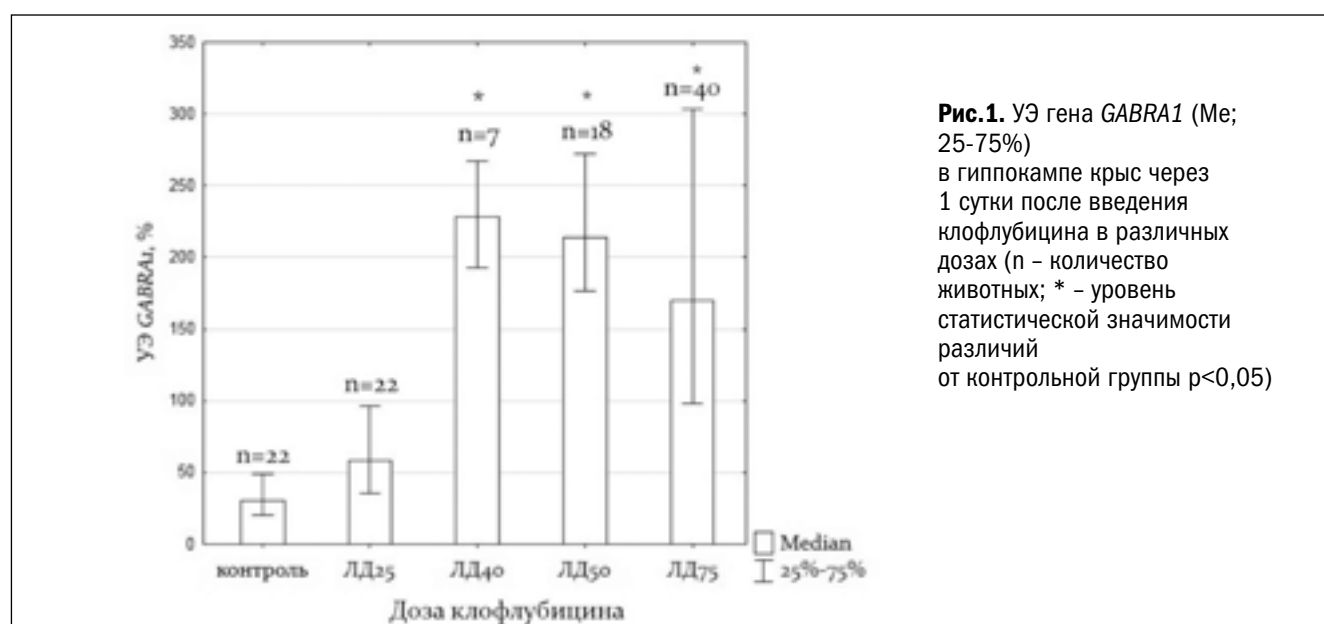
Степень судорожной активности	Среднее время наступления (M±SD), мин (n; %)			
	ЛД <sub>25</sub> (n=150)	ЛД <sub>40</sub> (n=12)	ЛД <sub>50</sub> (n=36)	ЛД <sub>75</sub> (n=150)
1-2	миоклонические вздрагивания головы или туловища, тризм жевательных мышц, клонические судороги передних конечностей, мелкий тремор			
	43,2±16,7 (n=150; 100 %)	36,0±8,0 (n=12; 100 %)	31,0±9,0 (n=36; 100 %)	23,5±8,2 (n=150; 100 %)
3-4	подъем на задние конечности, крупный тремор, клонические судороги всего тела			
	151,2±79,4 (n=116; 77,3 %)	85,0±25,0 (n=12; 100 %)	70,0±28,0 (n=36; 100 %)	46,4±25,7 (n=150; 100 %)
5	мощные клонико-тонические судороги, судороги в боковом положении, опистотонус, судороги типа «дикий бег»			
	508,9±235,4 (n=20; 13 %)	300,0±60,0 (n=3; 25%)	250,0±60,0 (n=22; 61 %)	214,0±100,0 (n=49; 32 %)

Примечание - n – количество животных; % животных от общего числа в группе

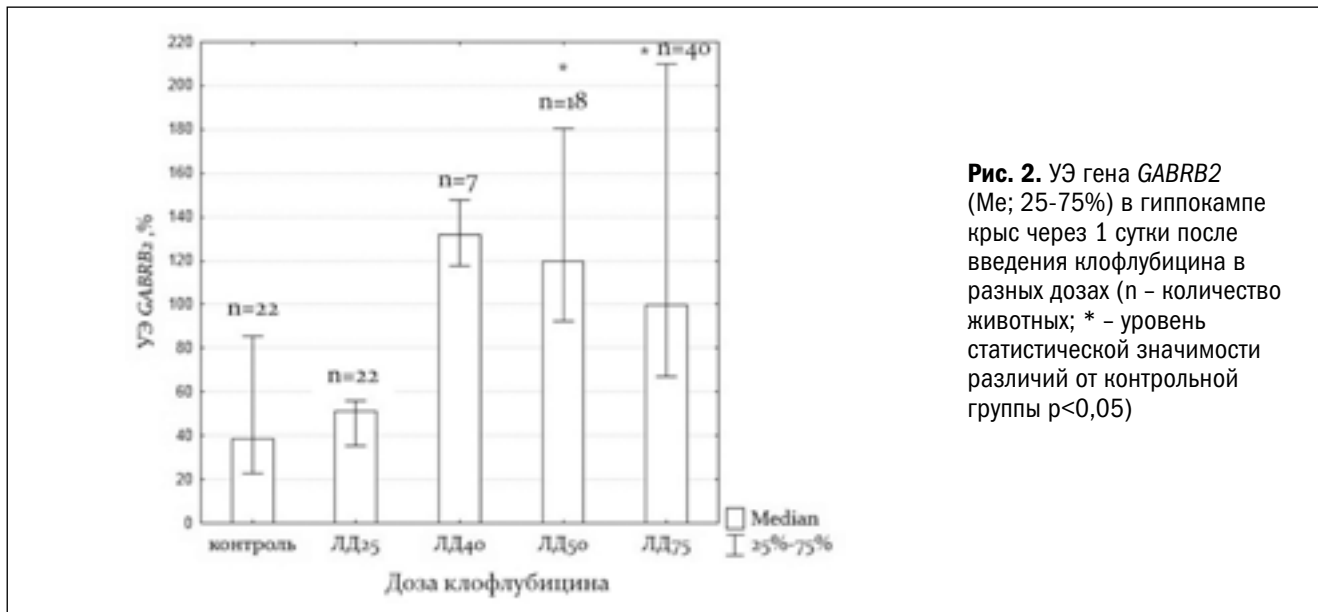
введения клофлубицина в дозах ЛД<sub>40</sub> и ЛД<sub>50</sub> УЭ гена *GABRA1* в 1,7 раза выше чем УЭ *GABRB2*. Анализ УЭ обоих генов выявил сильную связь этих показателей, коэффициент корреляции Rs составил 0,63.

До настоящего времени молекулярный механизм действия клофлубицина на ГАМКа-рецептор установлен не в полной мере. Предполагается, что после связывания необратимых ГАМК-литиков с субъединицами рецептора, меняется конформация последнего, за счет чего блокируется поступление ионов хлора внутрь клетки [1]. Однако не известно, на каких субъ-

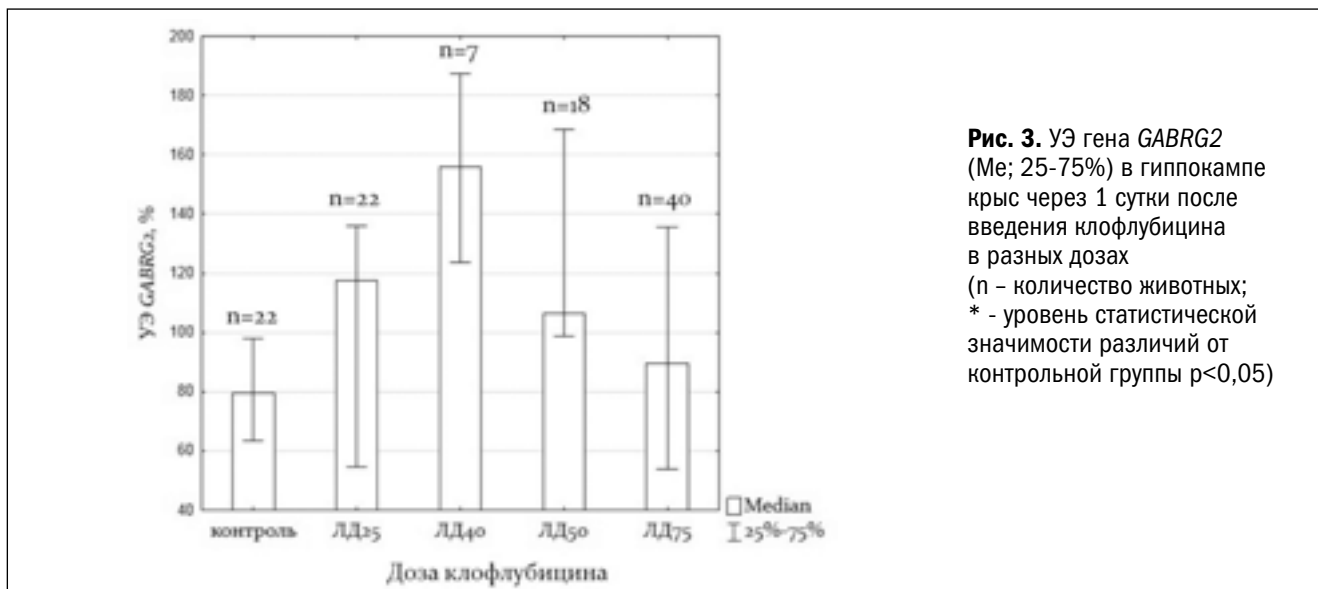
единицах ГАМКа-рецептора находятся сайты связывания клофлубицина. Увеличение экспрессии генов *GABRA1* и *GABRB2* в гиппокампе у выживших после отравления клофлубицином крыс может свидетельствовать о важной роли продуктов этих генов – субъединиц  $\alpha 1$  и  $\beta 2$  ГАМКа-рецептора в развитии интоксикации. В то же время отсутствие изменений в УЭ гена *GABRG2* дает основание предположить, что субъединица  $\gamma 2$  ГАМКа-рецептора не играет существенной роли в формировании токсикодинамических характеристик интоксикации клофлубицином.



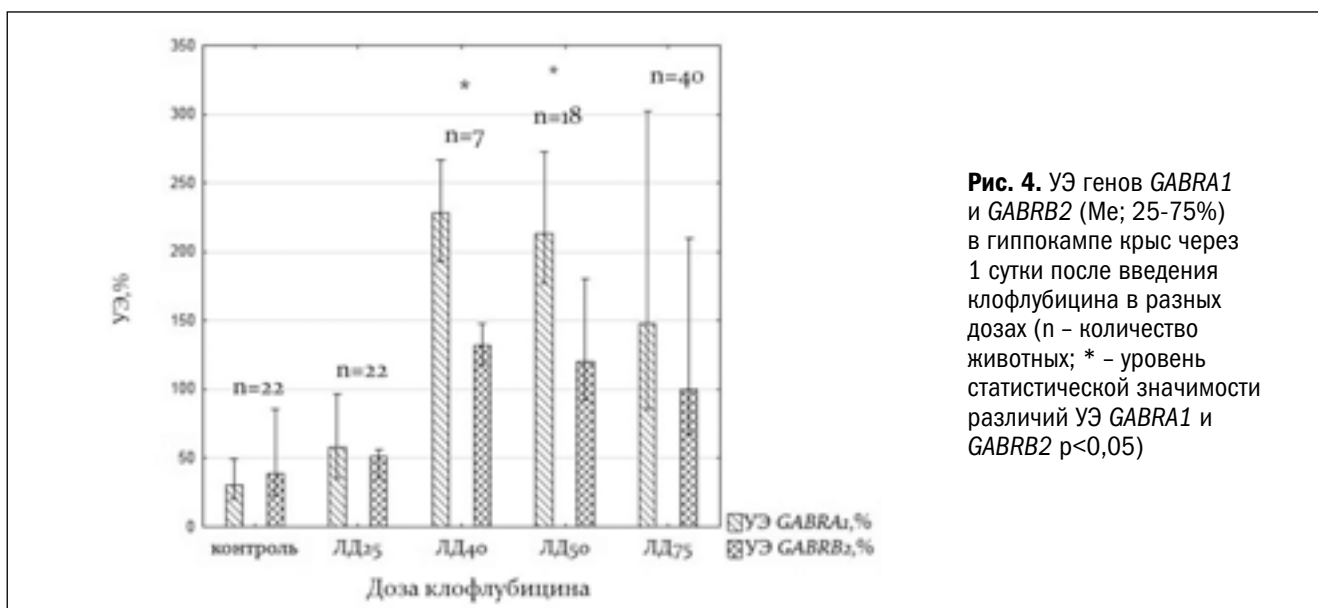
**Рис.1.** УЭ гена *GABRA1* (Me; 25-75%) в гиппокампе крыс через 1 сутки после введения клофлубицина в различных дозах (n – количество животных; \* – уровень статистической значимости различий от контрольной группы  $p < 0,05$ )



**Рис. 2.** УЭ гена *GABRB2* (Me; 25-75%) в гиппокампе крыс через 1 сутки после введения клофлуцидина в разных дозах (n – количество животных; \* – уровень статистической значимости различий от контрольной группы  $p < 0,05$ )



**Рис. 3.** УЭ гена *GABRG2* (Me; 25-75%) в гиппокампе крыс через 1 сутки после введения клофлуцидина в разных дозах (n – количество животных; \* – уровень статистической значимости различий от контрольной группы  $p < 0,05$ )



**Рис. 4.** УЭ генов *GABRA1* и *GABRB2* (Me; 25-75%) в гиппокампе крыс через 1 сутки после введения клофлуцидина в разных дозах (n – количество животных; \* – уровень статистической значимости различий УЭ *GABRA1* и *GABRB2*  $p < 0,05$ )

Известно, что на субъединицах и находятся сайты связывания гамма-аминомасляной кислоты – основного лиганда ГАМК-рецептора. Их взаимодействие увеличивает проходимость ионного канала и приводит к снижению возбудимости нейронов. На основании полученных данных, можно предположить, что увеличение экспрессии генов *GABRA1* и *GABRB2* у крыс после введения клофлубицина является физиологической реакцией организма на воздействие ФАВ, в ходе которой происходит увеличение свободных от клофлубицина рецепторов и соответственно увеличение связывания с ГАМК.

**Закключение.** В ходе проведенных экспериментальных исследований установлено, что через одни сутки после введения клофлубицина уровень экспрессии генов *GABRA1* (LD<sub>40</sub>, LD<sub>50</sub> и LD<sub>75</sub>) и *GABRB2* (LD<sub>50</sub> и LD<sub>75</sub>) в гиппокампе крыс увеличивается, а УЭ гена *GABRG2* остается неизменным.

На основании полученных данных, можно предположить, что после введения клофлубицина увеличивается экспрессия генов *GABRA1* и *GABRB2*, которая стимулирует увеличение количества свободных рецепторов ГАМК, тем самым повышается их сродство к нейромедиатору.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головки А.И., Головки С.И., Зефирова С.Ю., Софронов Г.А. Токсикология ГАМК-литиков. СПб.: Нива; 1996.
2. Korpi ER, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABAA receptors. *Prog. Neurobiol*; jun;67(2):113-159.
3. Бажин А.А. Особенности патогенеза поврежденных органов и тканей при отравлении клофлубицином: Автореф. дис... канд. мед. наук. СПб.; 2010.
4. Guang Yang, Jinxian Gao, Yuexia Jia, Lin Yan, Jianqiang Yu, Yuanxu Jiang. Oxyphoridine through intrathecal injection induces antinociception and increases the expression of the GABAα1 receptor in the spinal cord of mice. *Planta Med*. 2012; 78: 874-880.
5. Zhang G, Roal Y.H., Hsu F.-C., Coulter D.A., Brooks-Kayal A.R. Effectus of status epilepticus on hippocampal GABAα receptors are age-dependent. *Neuroscience*. 2004, 125: 299-303.
6. Jazvinscak Jembrek M, Pericic D, Svob Strac D, Vlajinic J. Differential effect of diazepam treatment and withdrawal on recombinant GABAA receptor expression and functional coupling. *Brain res*. 2008, dec 30, 1246: 29-40.

## REFERENCES:

1. Golovko A.I., Golovko S.I., Zefirova S.J., Sofronov G.A. The toxicology of GABA-lytics. SPb.: Niva, 1996. (in Russian)
2. Korpi ER, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABAA receptors. *Prog. Neurobiol*; jun;67(2):113-159.
3. Bazhin A.A. Features of the pathogenesis of damage of organs and tissues in cases of poisoning by kloflubicin. *Dr. med. sci. diss.* Spb.: S. M. Kirov Military Medical Academy; 2010 (in Russian).
4. Guang Yang, Jinxian Gao, Yuexia Jia, Lin Yan, Jianqiang Yu, Yuanxu Jiang. Oxyphoridine through intrathecal injection induces antinociception and increases the expression of the GABAα1 receptor in the spinal cord of mice. *Planta Med*. 2012; 78: 874-880.
5. Zhang G, Roal Y.H., Hsu F.-C., Coulter D.A., Brooks-Kayal A.R. Effectus of status epilepticus on hippocampal GABAα receptors are age-dependent. *Neuroscience*. 2004, 125: 299-303.
6. Jazvinscak Jembrek M, Pericic D, Svob Strac D, Vlajinic J. Differential effect of diazepam treatment and withdrawal on recombinant GABAA receptor expression and functional coupling. *Brain res*. 2008,

7. Bo T, Chen Y, Li J, Li XF, Mao DA, Wang TM et. al. Short-term effects of recurrent neonatal seizures on gamma-aminobutyric acid A receptor alpha 1 and beta 2 subunit expression in the brain. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Zhi*. 2008, jun, 10(3): 371-5.
8. Qu J, Liao YH, Kou ZZ, Wei YY, Huang J, Chen J et al. Puerarin alleviates noise-induced hearing loss via affecting PKCγ and GABAB receptor expression. *J Neurosci*. 2015; feb 15;349(1-2):110-116.
9. Drexel M, Puhakka N, Kirchmair E, Hörtnagl H, Pitkänen A, Sperk G. Expression of GABA receptor subunits

- in the hippocampus and thalamus after experimental traumatic brain injury. *Neuropharmacology*. 2015; jan;88:122-313.
10. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы: руководство. М.: Медицина, 1997.
  11. Мисюрин В.А. Исследование особенностей экспрессии и распространенности раково-тестикулярных генов: Дис... канд биол наук. М.; 2014

- Expression of GABA receptor subunits in the hippocampus and thalamus after experimental traumatic brain injury. *Neuropharmacology*. 2015; jan;88:122-313.
10. Kryzhanovskij G.N. General pathophysiology of the nervous system: guide. Moscow: Medicine, 1997 (in Russian).
  11. Misiurin V.A. Investigation of the features of expression and prevalence of testicular cancer-gene: *Dr. bio. sci. diss.* Moscow, 2014 (in Russian).

O.V. Varlamova<sup>1</sup>, A.V. Babkin<sup>1</sup>, I.S. Berdinskih<sup>1</sup>, A.K. Nazarov<sup>1</sup>, A.S. Sadovnikova<sup>1</sup>, A.S. Nikiforov<sup>2</sup>

## INVESTIGATION OF THE LEVEL OF GENE EXPRESSION OF SUBUNITS OF GABA RECEPTOR AFTER ADMINISTRATION OF KLOFLUBICIN

<sup>1</sup>Scientific Center «Signal», 107014, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>State Research Testing Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

The article presents the results of determining the level of expression of genes encoding GABA receptor subunits *GABRA1*, *GABRB2*, and *GABRG2* in the hippocampus of rats 24 hours after a single intramuscular administration of the antagonist of the chloro-ion channel of GABA receptor of kloflubicin in a dose of LD<sub>25</sub>, LD<sub>40</sub>, LD<sub>50</sub>, and LD<sub>75</sub>. It is revealed that kloflubicin has no influence on the relative level of *GABRG2* gene expression. At the same time, the relative level of *GABRA1* gene expression increases 7,5, 7,0, and 5,0 times after administration of kloflubicin in a dose of LD<sub>40</sub>, LD<sub>50</sub>, and LD<sub>75</sub>, respectively. The relative level of *GABRB2* gene expression also increases 3,6 and 2,6 times after administration of kloflubicin in a dose of LD<sub>50</sub> and LD<sub>75</sub>, respectively. It is assumed that increase in the level of gene expression of *GABRA1* and *GABRB2* in rats after administration of kloflubicin in doses above LD<sub>25</sub> is a compensatory reaction of the body to the effect of physiologically active substance, and subunits encoded by these genes α1 and β2, respectively, are included in the mechanism of convulsive effect.

**Keywords:** kloflubicin, GABA receptor, expression level, gene, *GABRA1*, *GABRB2*, *GABRG2*.

Материал поступил в редакцию 11.07.2018 г.