

ГИПОТЕЗА КОНТАМИНАЦИИ МЕМБРАН ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

Нечипуренко Ю.Д.¹, Касерес Х.Л.²¹ Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта РАН
ул. Вавилова, 32, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: nech99@mail.ru² Cuban Neurosciences Center

Street. 190 e / 25 and 27. Cubanacan. Playa. Havana. CP 11600

Поступила в редакцию: 20.07.2021

Аннотация. Приводятся данные в пользу гипотезы Альтрупа о контаминации мембраны, связывающей пароксизмальную деполяризацию, наблюдаемую при эпилептической активности, с пейсмекерным потенциалом. Предложена связь между физико-химическими характеристиками мембраны, текучестью и контаминациями, и способностью проводить импульс и перезаряжаться. Обсуждаются предложенные ранее способы лечения эпилепсии, основанные на кетогенной диете и их возможные механизмы в свете гипотезы Альтрупа. Среди возможных механизмов действия кетогенной диеты подчеркивается противозэпилептическое действие кетоновых тел, роль повышенного синтеза глутатиона и эффект полиненасыщенных жирных кислот и холестерина, включенных в состав диеты. Эти три механизма, среди других эффектов, приводят к регуляции текучести и других биофизических свойств липидного бислоя, а также к очищению мембраны от амфифильных примесей.

Ключевые слова: эпилептическая активность, пароксизмальная деполяризация, пейсмекерный потенциал, гипотеза Альтрупа, контаминация мембран, латеральное давление мембран, кетогенная диета, глутатион.

Для большинства типов эпилептической активности общим электрофизиологическим следом является пароксизмальная деполяризация (ПД). Во время эпилептической активности некоторые нейроны проявляют длительную деполяризацию большой амплитуды, это и есть пароксизмальная деполяризация мембранного потенциала (см. [1] и рис. 1).

Наши знания о нейрофизиологических основах эпилепсии далеко неполны, но некоторые исследователи ожидают, что, понимая биофизические основы ПД можно приблизиться к патофизиологии эпилепсии и очертить рациональные способы её лечения. В рамках доминирующей идеи о том, что эпилепсия является результатом дисбаланса между возбуждением и торможением в нервной ткани [2], было высказано предположение, что ПД являются гигантскими возбуждающими постсинаптическими потенциалами [3].

Ряд исследователей изучает возникновение и распространение эпилептической активности в буккальных ганглиях наземной улитки *Helix pomatia* [4-6]. Нервная система у *Helix* довольно проста, что позволяет использовать улитку как удобную модель для проведения биофизических экспериментов [7]. В частности, каждый из обоих буккальных ганглиев *Helix* имеет четыре гигантских нейрона с каждой стороны, и из них только нейрон Б3 способен систематически развивать ПД в присутствии таких проконвульсивных средств, как пентилентетразол (ПТЗ).

Эта простая модель позволяет подойти к пониманию развития эпилепсии у человека, несмотря на большое филогенетическое расстояние между человеком и улиткой [4].

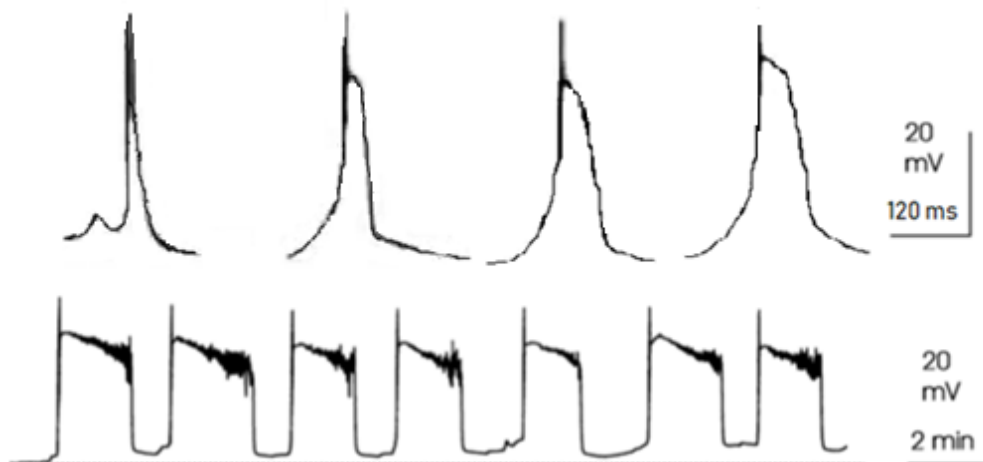


Рисунок 1. Пароксизмальные деполяризации, регистрируемые внутриклеточно в нейронах коры кошки при местном применении пентилентетразола (верхняя панель, адаптировано из [1]), и в нейроне *Helix* Б3 после применения 40 мМ ПТЗ (нижняя панель, неопубликованные данные авторов)

Возможность генерации ПД в нейронах, полностью изолированных как у беспозвоночных [4] так и у позвоночных [5], и тот факт, что ПД сопровождаются увеличением импеданса нейронов [3] не согласуется с идеей, что ПД имеют синаптическую природу. С другой стороны, в нейроне БЗ было отмечено, что с увеличением дозы проконвульсантов пейсмейкерные потенциалы превращаются в ПД [10]. На основе математической модели Кононенко для пейсмейкерного потенциала нейронов виноградной улитки [9, 11], Гарсия теоретически показал возможность перехода от пейсмейкерного потенциала к ПД [12].

Гипотеза контаминации мембраны.

Ульрих Альтруп выдвинул гипотезу мембранной контаминации более двадцати лет назад. Он полагал, что если вещества, так резко отличающиеся по механизму действия, как гептанол, пентилентетразол, этомидат, и даже низкая концентрация магния, способны индуцировать ПД, то основной механизм эпилептогенеза должен быть довольно неспецифическим. Разнообразные процессы, связанные с каналами утечки, калиевыми каналами, большим набором лиганд-зависимых каналов и др. подвержены влиянию в одном и том же диапазоне концентраций ПТЗ (а также этомидата). Эти наблюдения указывают на существование неспецифического механизма эпилептогенеза. Альтруп и его соавторы обнаружили при помощи весов Вильгельми, что эпилептогенные вещества ПТЗ и этомидат вызывают, в одном и том же диапазоне эпилептогенных концентраций, постепенное повышение латерального давления липидных монослоев [3].

Наконец, совокупность экспериментальных данных привела Альтрупа к гипотезе, что эпилептогенные амфифильные вещества проникают в липидный бислой мембраны нервной клетки, и что это включение увеличивает латеральное давление в бислое, вызывая ПД в нейронах, способных генерировать пейсмейкерные потенциалы. Повышенное латеральное давление снижает текучесть мембраны, влияя на подвижность мембранного белка и вызывая переход от жидко-конденсированного состояния к конденсированному твердому состоянию.

Белково-липидные взаимодействия и возбудимость нейронов.

Белково-липидные взаимодействия и их связь с возбудимостью обсуждались в течение нескольких десятилетий в биофизических исследованиях. Так, в лаборатории Твердислова было показано [13], что агенты, изменяющие биофизические свойства мембран (такие, как алкоголи гомологического ряда и ацетон) способны изменять сродство Na,K-АТФазы к моновалентным катионам. Классическая модель Ходжкина и Хаксли [14] уделяет мало внимания белково-липидным взаимодействиям. Тасаки предположил, что распространение нервного импульса сопровождается волной механического возбуждения, которая движется вдоль аксона [15]. В последнее время появились свидетельства того, что распространение потенциала действия сопровождается стабильным солитонем механической деформации клеточной мембраны [16]. В работах [16-19] было высказано предположение, что открытие ионных каналов, участвующих в генерации нервного возбуждения, требует механических изменений в двойном липидном слое. В пользу этого предположения приводится аргумент, что во время активации ионных каналов происходит деформация мембраны [16-17]. С другой стороны, измерения энтальпии во время распространения потенциала действия не соответствуют предсказаниям Ходжкина и Хаксли, но свидетельствуют в пользу модели распространяющегося механического импульса [18-19].

Можно также ожидать, что изменение состава и свойств мембранных амфифильных веществ повлияет и на пейсмейкерные потенциалы, вызывая аномальные изменения, которые приводят к эпилептогенезу, в соответствии с гипотезой контаминации мембран.

Механизм кетогенной диеты в свете гипотезы контаминации мембран.

С начала XX века известно, что кетогенная диета (КД) способна улучшить состояние пациентов с тяжелой эпилепсией. Типичная кетогенная диета очень богата жирами и бедна углеводами (обычно пропорция жиров к нежирам равна четыре к одному). В последние 30 лет КД вновь привлекла внимание специалистов. Около 50-60% пациентов, резистентных к нескольким противосудорожным лекарствам, уменьшают по крайней мере на 50% частоту припадков, и примерно 20% достигают полного подавления судорог.

Многие из эффектов КД могут получить объяснение в свете гипотезы о мембранной контаминации, предложенной Альтрупом. Мы выделяем следующие три аспекта КД:

- 1) противосудорожный эффект кетоновых тел,
- 2) связь глутатиона с противосудорожными эффектами КД и
- 3) значение полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и холестерина в действии КД.

Противосудорожное действие кетоновых тел.

Довольно давно была предложена гипотеза о том, что кетоновые тела могут действовать непосредственно как фармакологические агенты. Так, Кейт (1933) сообщил, что приступы, вызванные туйоном у кроликов, были купированы предварительной обработкой ацетоацетатом [20]. Позже это было подтверждено на модели мышей, чувствительных к аудиогенным припадкам [21]. Также есть сообщение о противосудорожном действии ацетона [22]. Лиходий и др. в 2003 г. [23] сообщили о дозозависимом подавлении судорожных приступов внутривенным введением ацетона в четырех отдельных моделях припадков и эпилепсии на животных. В поддержку идеи о том, что эффект ацетона является одним из основных механизмов действия КД, является тот факт, что пациенты с эпилепсией, которые положительно реагировали на КД, демонстрировали высокие уровни ацетона в головном мозге (выше 1 мМ) [24]. Этот результат привел к тому, что Лиходий и др. выдвинули идею, что ацетон является причинным фактором противосудорожных эффектов КД [23].

В то же время кетоновые тела, по видимому, не изменяют синаптическую передачу на уровне гиппокампа, что находится в полном соответствии с вышесказанным и наблюдениями Альтрупа [3]. Так, Тио и др. [25],

используя методы клеточной электрофизиологии обнаружили, что миллимолярные концентрации бета-гидроксипропионата и ацетоацетата не влияют на: *i*) возбуждающие постсинаптические потенциалы и всплески популяции в пирамидных нейронах CA1 после стимуляции коллатералов Шаффера; *ii*) спонтанную эпилептиформную активность в модели приступа гиппокампа-энторинальной коры; и *iii*) ионные токи, вызываемые глутаматом, каинатом и гамма-аминомасляной кислотой в нейронах гиппокампа.

Также было показано, что ацетон способен увеличивать текучесть липидной мембраны [26], что объясняет его противозепилептический эффект в контексте гипотезы Альтрупа. В целом следует подытожить, что среди множества возможных механизмов противосудорожного действия кетоновых тел, их влияние на вязкость мембраны и соответствующая стабилизация липидного бислоя может иметь фундаментальное значение.

Глутатион и механизм действия кетогенной диеты.

Снижение потребления глюкозы в мозге в конечном итоге может привести повышению уровня глутатиона (GSH), который участвует в окислительно-восстановительных реакциях и защищает клетку от активных форм кислорода (АФК) [27], а также путем прямой конъюгации выводит токсины и многие чужеродные и токсические соединения, этим стабилизируя структуру мембраны [28].

Роль глутатиона при эпилепсии хорошо известна. При помощи модели пилокарпиновых судорог на крысах обнаружено, что концентрация GSH уменьшилась на 54 и 58%, в стриатуме и лобной коре, соответственно [29]. При этом ожидается, что глутатион способствует снижению уровня контаминации мембраны, приводящий к развитию эпилепсии.

Полиненасыщенные жирные кислоты и кетогенная диета.

Кетогенная диета усиливает мобилизацию полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) из жировой ткани в печень и мозг [30]. В частности, КД обогащенная среднецепочечными триглицеридами является основным методом лечения лекарственно-резистентной эпилепсии. Разветвленные производные октановой кислоты, жира со средней длиной цепи, входят в состав рациона при новых методах лечения лекарственно-устойчивой эпилепсии, но структурная основа этой функциональности пока не определена. Было обнаружено, что на модели ПТЗ судорог в срезах гиппокампа крыс выявляется специфичная для точки ветвления активность, которая сравнима с противозепилептическим эффектом вальпроевой кислоты. Это показывает, что жирные кислоты, присутствующие в КД, могут прямым образом оказывать противосудорожное действие.

Другой механизм противозепилептического эффекта кетогенной диеты может быть обусловлен воздействием холестерина, который регулирует текучесть мембран. Холестерин, содержащийся в плазматических мембранах эукариот, модулирует текучесть мембран, делая мембрану менее жидкой при более высоких температурах (например, температуре тела 37 °C) за счет ограничения движения фосфолипидов и более жидкой при более низких температурах за счет предотвращения плотной упаковки фосфолипидов [31].

Обсуждение.

Противозепилептическое действие КД пока не нашло объяснения. Мы полагаем, что на основе гипотезы Альтрупа о контаминации бислоя, можно объяснить известные факты о КД: она приводит к уменьшению контаминации мембран. Так, роль кетоновых тел в стабилизации бислоя может быть связана с влиянием на такие физические свойства бислоя, как текучесть, а также с их действием в качестве антиоксидантов.

Увеличенная активность глутатиона способствует деконтаминации мембран и препятствует действию окислительных агентов. ПНЖК, присутствующие в КД, играют важную роль в стабилизации поврежденных мембран в эпилептической мозговой ткани.

Заметим, что более подробно мы пишем о связи контаминации мембран и эпилепсии и обосновываем эти представления в работе [32].

Заключение.

Совокупность собственных и литературных данных предоставляет новые факты, которые поддерживают и уточняют гипотезу контаминации мембраны, предложенную Ульрихом Альтрупом. Кетогенная диета может изменить свойства двойного липидного слоя мембраны нейрона посредством различных механизмов: во-первых, возможно прямое действия ацетона и других кетоновых тел, во-вторых, усиление синтеза холестерина, стабилизирующего текучесть мембраны и обладающего противозепилептическим действием. Также при КД может происходить повышение уровня глутатиона, который уменьшает уровень АФК и захватывает эпилептогенные амфифильные вещества. И, наконец, ПНЖК могут стабилизировать поврежденные мембраны.

Благодарности. Авторы благодарят Дениса Семенова, Рональдо Гарсия Рейес, Ольгу Остроумову, Леонида Яковенко и Юрия Ермакова за полезные обсуждения. Работа выполнена при поддержке Кубинского Научного Фонда (FONCI), Проект Нефармакологической Антиэпилептической Терапии, координируемый Кубинским Центром Нейронаук а также финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук России на 2013–2020 годы (темы №01201363818 и № 01201363820).

Список литературы / References:

1. Walden J., Straub H., Speckmann E.J. Epileptogenesis: contributions of calcium ions and antiepileptic calcium antagonists. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 1992, vol. 140, pp. 41-46.
2. Engelborghs S., D'Hooge R., De Deyn P.P. Pathophysiology of epilepsy. *Acta Neurol. Belg.*, 2000, vol. 100, pp. 201-213.

3. Altrup U., Hader M., Hernandez Caceres J.L., Malcharek S., Meyer M., Galla H.-J. Epileptogenic drugs in a model nervous system: Electrophysiological effects and incorporation into a phospholipid layer. *Brain Research*, 2006, vol. 1122, pp. 65-77.
4. Wiemann M., Wittkowski W., Altrup U., Speckmann E.-J., Alterations of neuronal fibers after epileptic activity induced by pentylenetetrazol: fine structure investigated by calcium cytochemistry and neurobiotin labeling (buccal ganglia, *Helix pomatia*). *Cell Tissue Res*, vol. 996, no. 286, pp. 43-53;
5. Speckmann E.-J., Caspers H. Paroxysmal depolarization induced by pentylenetetrazol in isolated neurons of *Helix pomatia*. *Epilepsia*, 1973, vol. 14, pp. 397-408.
6. Segal M. Epileptiform activity in microcultures containing one hippocampal neuron. *J. Neurophysiol*, 1991, vol. 65, pp. 761-770.
7. Никитин Е.С., Балабан П.М. Структурно-функциональная организация сети серотонинэргических нейронов наземной улитки. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова*, 2011, vol. 61, no. 6, pp. 750-762. [Nikitin E.S., Balaban P.M. Structural and functional organization of the network of serotonergic neurons of the land snail. *Journal of Higher Nervous Activity named after I. P. Pavlov*, 2011, vol. 61, no. 6, pp. 750-762. (In Russ.)]
8. Fiest K.M., Sauro K.M., Wiebe S., Patten S.B., Kwon, C.S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D.L., Jette N. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, 2017, vol. 88, pp. 296-303.
9. Kramer R.H., Zucker R.S. Calcium-dependent inward current in *Aplysia* bursting pace-maker neurones. *The Journal of Physiology*, 1985, vol. 362, no. 1, pp. 107-130.
10. Altrup U., Hader M., Storz U. Endogenous pacemaker potentials develop into paroxysmal. depolarization shifts (PDSs) with application of an epileptogenic drug. *Brain Research*, 2003, vol. 975, pp. 73-84.
11. Kononenko N.I. Dissection of a model for membrane potential oscillations in bursting neuron of snail, *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol*, 1994, vol. 107A, pp. 323-332.
12. Garcia Reyes R.C. Study of the dynamics of paroxysmal depolarization shifts in stochastic neuronal models. *B.Sc. Thesis, Faculty of Mathematics, Havana University*, 2020.
13. Rezaeva M.N., Khenchel M., Hernandez J.L., Tverdislov V.A. Effect of a number of homologous monoatomic alcohols on the activity of Na, K-ATPase and its reaction with potassium ions. *Biofizika*, 1980, vol. 25, no. 1, pp. 41-43.
14. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol*, 1952, vol. 117, pp. 500-544.
15. Тасаки И. *Нервное возбуждение. Макромолекулярный подход*. Москва, Мир, 1971, 224 с. [Tasaki I. *Nervous excitement. Macromolecular approach*. Moscow, Mir, 1971, 224 p. (In Russ.)]
16. Tasaki I., Iwasa K. Rapid pressure changes and surface displacements in the squid giant axon associated with production of action potentials. *The Japanese journal of physiology*, 1982, vol. 32, no. 1, pp. 69-81.
17. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. *Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: Учеб, пособие*. Воронеж: Издательство Воронежского государственного университета, 2000, 296 с. [Artyukhov V.G., Nakvasina M.A. *Biological membranes: structural organization, functions, modification by physico-chemical agents: Textbook, manual*. Voronezh: Voronezh State University Publishing House, 2000, 296 p. (In Russ.)]
18. Godfrey J.R., Diaz M.P., Pincus M., Kovacs-Balint Z., Feczko E., Earl E., Miranda-Dominguez O., Fair D., Sanchez M.M., Wilson M.E., Michopoulos V. Diet matters: Glucocorticoid-related neuroadaptations associated with calorie intake in female rhesus monkeys. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, vol. 91, pp. 169-178.
19. Abbott B.C., Hill A.V. Howarth J.V. The positive and negative heat production associated with a nerve impulse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 1958, vol. 148, no. 931, pp. 149-187.
20. Keith H.M. Factors influencing experimentally produced convulsions. *Arch. Neurol. Psych.*, 1933, vol. 29, pp. 148-154
21. Bough K.J., Rho J.M. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia*, 2007, vol. 48, pp. 43-58.
22. Keith H.M. The effect of various factors on experimentally produced convulsions. *American Journal of Diseases of Children*, 1931, vol. 41, no. 3, pp. 532-543.
23. Likhodii S.S., Serbanescu I., Cortez M.A., Murphy P., Snead III O.C., Burnham W. M. Anticonvulsant properties of acetone, a brain ketone elevated by the ketogenic diet. *Annals of neurology*, 2003, vol. 54, no. 2, pp. 219-226.
24. Seymour K.J., Bluml S., Sutherling J., Sutherling W., Ross B.D. Identification of cerebral acetone by 1H-MRS in patients with epilepsy controlled by ketogenic diet. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 1999, vol. 8, no. 1, pp. 33-42.
25. Thio L.L., Wong M., Yamada K.A. Ketone bodies do not directly alter excitatory or inhibitory hippocampal synaptic transmission. *Neurology*, 2000, vol. 54, no. 2, pp. 325-325.
26. Dyrda G., Boniewska-Bernacka E., Man D., Barchiewicz K., Slota, R. The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane. *Molecular biology reports*, 2019, vol. 46, no. 3, pp. 3225-3232.
27. Stovbun S.V., Yakovenko L.V., The Physicochemical Basis of the Biological Activity and Pharmacological Properties of the Antiviral Agent Panavir. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Fizika*, 2014, no. 6, pp. 101-106.
28. Franks N.P., Lieb W.R. Volatile general anaesthetics activate a novel neuronal K⁺ current. *Nature*, 1988, vol. 333, pp. 662-664.

29. Junior H.V.N., Fonteles M.M.D.F., Mendes de Freitas R. Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitrite levels and adaptive pathways against oxidative stress in the frontal cortex and striatum. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2009, vol. 2, no. 3, pp. 130-137.

30. Harayama T., Shimizu, T. Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *Journal of Lipid Research*, 2020, vol. 61, no. 8, pp. 1150-1160.

31. Martinez-Seara M.H., Rog T., Karttunen M., Vattulainen I., Reigada Kim D.Y., van Brederode H., Sullivan P.G., Spain W.J., Rho J.M., Ketone bodies protect neocortical neurons against acute oxidative stress. *Epilepsia*, 2004, vol. 45, suppl. 7, p. 199.

32. Нечипуренко Ю.Д., Гарсия Рейес Р.С., Эрнандес Касерес Х.Л. Гипотеза контаминации мембран нейронов при эпилепсии и механизм анти-конвульсивного эффекта кетогенной диеты. *Биофизика*, в печати. [Nechipurenko Yu.D., Garcia Reyes R.S., Hernandez Caceres H.L. The hypothesis of contamination of neuronal membranes in epilepsy and the mechanism of the anti-convulsive effect of the ketogenic diet. *Biophysics*, in press (In Russ.)]

MEMBRANE CONTAMINATION HYPOTHESIS FOR EPILEPTIC ACTIVITY

Nechipurenko Yu. D.¹, Hernandez Caceres J. L.²

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences

32 Vavilov str., Moscow, 119991, Russia; e-mail: nech99@mail.ru

² Cuban Center for Neurosciences

Avenida 25 esquina a 198, Playa, La Habana, Cuba; e-mail: jose.caceres@cneuro.edu.cu

Abstract. Evidences are provided supporting Altrup's membrane pollution hypothesis that links paroxysmal depolarization shifts observed during epileptic activity, and pacemaker potentials. It is proposed a connection between membrane's physic-chemical characteristics, fluidity and pollution with neuron's ability to conduct impulses during excitation. There are discussed previously used means of epilepsy treatment based on the ketogenic diet, as well as their possible mechanisms on the light of Altrup's hypothesis. Among possible mechanisms for ketogenic diet, we underline ketone bodies antiepileptic action the role of increased synthesis of glutathione as well as the role played by polyunsaturated fatty acids (PUFA) and cholesterol as components included into the ketogenic diet. These three mechanisms, among others, lead to a regulation of fluidity and other biophysical properties of the membrane bilayer as well as to a cleansing of the membrane from amphiphilic pollutants, in accordance with Altrup's hypothesis.

Key words: *Epileptic activity, paroxysmal depolarization shifts, pacemaker potential, Altrup's hypothesis, membrane pollution, lateral pressure, ketogenic diet, glutathione.*