

РОЛЬ ГАМК-РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ СУДОРОГ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ГИПЕРБАРИЧЕСКИМ КИСЛОРОДОМ

© 2025 г. О. С. Алексеева^{1,*}, Т. Ф. Платонова¹, И. Т. Демченко¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: osa72@inbox.ru

Поступила в редакцию 18.03.2025 г.
После доработки 17.04.2025 г.
Принята к публикации 18.04.2025 г.

Использование гипербарического кислорода (ГБО₂) в медицине и при подводных погружениях сопряжено с риском его токсического (судорожного) действия на ЦНС, патофизиологические механизмы которого изучены недостаточно. Распространенной гипотезой о механизме ГБО₂-вызываемых судорог является представление о том, что экстремальная гипероксия подавляет ГАМК-ергическую функцию с последующим усилением возбуждения ЦНС, приводящего к судорогам. Дефицит ГАМК-ергической функции в ГБО₂ обусловлен снижением синтеза медиатора, тогда как вовлечение других компонентов тормозной нейротрансмиссии, в частности рецепторов ГАМК, остается неясным. Целью настоящей работы являлось изучение причастности ГАМК-рецепторов к развитию гипербарических кислородных судорог. При выполнении работы оценивались моторные судороги в ГБО₂ у крыс, которым перед гипероксической экспозицией в боковой желудочек головного мозга вводили агонисты ГАМК-рецепторов: мусцимол или баклофен. Аффинность рецепторов ГАМК к этим препаратам оценивалась также на фоне повышенного уровня мозговой ГАМК, вызываемого внутрижелудочковым введением нипекотовой кислоты. Новыми данными выполненными исследований являются: 1) активация ГАМК-А-рецепторов с помощью мусцимола задерживала появление судорог в ГБО₂; 2) агонист ГАМК-В-рецепторов – баклофен, ослаблял развитие гипербарических кислородных судорог, но его противосудорожный эффект был достоверно ниже, чем у мусцимола; 3) противосудорожная эффективность мусцимола и баклофена сохранялась при повышении внеклеточного ГАМК, вызываемого ингибированием ГАМК-транспортёров с помощью нипекотовой кислоты. Аффинность ГАМК-А- и ГАМК-В-рецепторов к тормозному нейромедиатору не изменялась в условиях гипербарической гипероксии.

Ключевые слова: гипербарический кислород, судороги, гамма-аминомасляная кислота, ГАМК-рецепторы, баклофен, мусцимол, нипекотовая кислота

DOI: 10.31857/S0869813925060083, **EDN:** teqxls

ВВЕДЕНИЕ

Использование кислорода под повышенным давлением или гипербарического кислорода (ГБО₂) в медицине и при подводных погружениях для производственных и военных нужд сопряжено с риском его токсического действия на ЦНС, патогенез

которого малоизучен. Согласно существующей концепции, судорожный эффект ГБО₂ реализуется через повышенную продукцию реактивных форм кислорода и азота (RONS), которые посредством реакций окисления и нитрозилирования вызывают посттрансляционную модификацию белков в различных компонентах нейрональной передачи в глутамат- и ГАМК-ергических системах головного мозга. Ранее было установлено, что ключевые элементы RONS – супероксиданион (O₂⁻) и оксид азота (NO), а также их производные, включая перекись водорода (H₂O₂), гидроксильный радикал (OH) и пероксинитрит (ONOO⁻), повышают возбудимость ЦНС по мере увеличения парциального давления вдыхаемого O₂ и продолжительности его действия [1, 2]. Избыточное накопление RONS при дыхании ГБО₂ всегда предшествует судорожным реакциям ЦНС, включая прогрессирующее нарушение движений и электрической активности мозга [3, 4].

Ключевой проблемой в изучении патологических реакций ЦНС на экстремальную гипероксию является идентификация мишеней действия RONS. Принимая во внимание короткое время существования RONS, можно предположить, что место их продукции и мишени действия колокализованы даже в одной клетке. Подтверждением сказанному являются данные о локализации мишеней для RONS в ГАМК-ергической нейротрансмиссии на примере понижения синтеза гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в мозге животных, находящихся под действием ГБО₂ [3–8]. Основной причиной дефицита ГАМК при действии ГБО₂ является ингибирование глутаматдекарбоксилазы (ГАД) за счет ее S-нитрозилирования по остаткам цистеина с помощью оксида азота (NO) и его производных [9]. Мы полагаем, что другой мишенью действия RONS в ГАМК-ергической системе могут быть ГАМК-рецепторы, аффинность которых к тормозному медиатору может изменяться в гипероксической среде. ГАМК является основным тормозным нейромедиатором в ЦНС. Большинство нейронов, использующих ГАМК в качестве основного тормозного нейромедиатора, являются интернейронами, которые способны изменять возбудимость в нейронных цепях, регулируя гипервозбуждение, опосредованное глутаматергическими нейронами.

Нейромедиатор ГАМК действует на три типа рецепторов, которые подразделяются на ионотропные (ГАМК-А, ГАМК-С) и метаботропные – ГАМК-В. В составе всех типов рецепторов присутствуют белковые молекулы, посттрансляционная конформация и функция которых могут изменяться под действием RONS. Рецептор ГАМК типа А (ГАМК-А) представляет собой лиганд-управляемый хлорный канал, который проводит быстрые тормозные сигналы посредством гиперполяризации постсинаптической мембраны, тогда как метаботропный рецептор ГАМК-В служит для проведения медленных и продолжительных тормозных сигналов через G-белки и вторичные мессенджеры. Многочисленные исследования *in vitro* показывают участие RONS в ГАМК-опосредованной нейротрансмиссии посредством фазического и тонического торможения в системе ГАМК, а также в высвобождении тормозного медиатора из пресинаптических окончаний [10]. Эти данные позволяют предположить причастность ГАМК-рецепторов к развитию судорог в условиях повышенного образования редокс-молекул при гипербарической гипероксии.

Целью настоящей работы явилось изучение роли ГАМК-рецепторов в развитии гипервозбуждения ЦНС при гипербарической гипероксии, проявляющегося в виде эпилептиформной ЭЭГ-активности и моторных судорожных припадков. Для выполнения работы оценивали развитие судорог у крыс, которым перед ГБО₂-экспозицией в боковой желудочек головного мозга вводили агонисты ГАМК-рецепторов: мусцимол и баклофен. Противосудорожную эффективность агонистов ГАМК-рецепторов верифицировали также на фоне повышенного внутримозгового уровня ГАМК, вызываемого введением никеитовой кислоты.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали крыс линии Wistar массой 287–326 г, полученных из питомника “Рапполово” (Ленинградская обл., Россия). До начала опытов животным под наркозом (золетил-100, 50 мг/кг) в латеральный желудочек мозга вводили металлические канюли согласно стереотаксическим координатам [11]: AP = –1.0 мм, LM = ±1.5 мм, V = 3.5 мм. Канюлю закрепляли на черепе с помощью двух стальных винтов и стоматологического цемента. Через 7 дней после операции каждому животному перед опытом в боковой желудочек мозга вводили отдельно баклофен, мусцимол или нипекотовую кислоту. Все вещества были закуплены в Sigma Aldrich (США). Препараты растворяли в искусственном ликворе, имеющем следующий состав: (мМ) 127 NaCl; 1.0 KCl; 1.2 KH_2PO_4 ; 26 NaHCO_3 ; 10 D-глюкозы; 2.4 CaCl_2 ; 1.3 MgCl_2 . Коррекция pH ликвора осуществлялась с помощью насыщения раствора смесью 5% CO_2 + воздух до значений 7.2–7.4. Содержание препаратов во вводимом растворе объемом 10 мкл составляло: 0.5 мкг нипекотовой кислоты, 0.5 мкг мусцимола и 1.0 мкг баклофена. Выбор доз основывался на наших исследованиях [12] и работах других авторов [13, 14]. Животным контрольной группы вводили искусственный ликвор в таком же объеме – 10 мкл. После введения препаратов крыс помещали в барокамеру объемом 100 л по два животных в каждом опыте. Повышение давления кислорода в камере до 5 АТА осуществляли со скоростью 1 АТА/мин. Температуру в камере поддерживали в пределах 23–25 °С, влажность – около 60%, содержание CO_2 не превышало 0.05%.

Во время ГБО₂-экспозиции проводили непрерывный видеомониторинг животных в барокамере. Гипербарическую экспозицию продолжали до появления генерализованных клонических или тонических судорог, а при их отсутствии максимально до 90 мин. Время декомпрессии составляло 8 мин. Для анализа результатов фиксировали время (в минутах) появления различных двигательных нарушений у животных от начала кислородной экспозиции под давлением 5 АТА. Для количественной оценки времени развития судорог у крыс в барокамере нами была адаптирована известная шкала судорожных состояний [15]. Всего в хронических опытах использовано 59 крыс, разделенных на шесть групп. В контрольной группе 1 ($n = 15$) животным перед гипербарической кислородной экспозицией в желудочек мозга вводили искусственный ликвор. Животным группы 2 ($n = 12$) в мозговой желудочек вводили баклофен, а крысам группы 3 ($n = 11$) – мусцимол. В группе 4 ($n = 7$) проявления судорог оценивали после введения нипекотовой кислоты, а в группе 5 ($n = 7$) и группе 6 ($n = 7$) нипекотовую кислоту вводили совместно с баклофеном или мусцимолом.

В серии опытов на наркотизированных крысах с помощью внутримозгового микродиализа измеряли содержание ГАМК в стриатуме во время кислородной экспозиции при давлении 5 АТА. Выбор стриатума обусловлен участием этой структуры в составе стриопаллидарной системы в развитии ГБО₂-инициированных судорог [16]. Подробное изложение метода измерений ГАМК в мозге представлено в наших публикациях [17, 18]. Кратко, наркотизированному животному в латеральный желудочек мозга имплантировали металлические канюли для введения исследуемых препаратов по ранее описанной технологии. Одновременно в стриатум (координаты по [11]: AP = +1.0 мм, LM = ± 2.5 мм, V = 5.8 мм) вводили микродиализные канюли (СМА/11, СМА/Microdialysis АВ, Швеция). Во время ГБО₂-экспозиции канюли перфузировали искусственным ликвором со скоростью 1.0 мкл/мин, а пробы диализата автоматически отбирали каждые 15 мин с помощью коллектора, расположенного в барокамере рядом с животным (СМА 142 Microfraction Collector, АВ, Швеция). Измерения ГАМК в пробах проводили с помощью высокопроизводительной жидкостной хроматографии (HPLC) с электрохимической детекцией ГАМК (ESA model 5100А). Содержание ГАМК в пробах диализата определяли в мкмоль/л по калибровочным стандартам.

Микродиализные канюли после имплантации в стриатум перфузировали искусственным ликвором в течение всего экспериментального периода. За 30 мин до ГБО₂ в мозговой желудочек вводили искусственный ликвор (контроль), мусцимол (0.5 мкг) или нипекотовую кислоту (0.5 мкг). Одновременно с микродиализом у крыс в ГБО₂ регистрировали ЭЭГ с помощью двух винтов, введенных билатерально в теменную часть черепа до соприкосновения с твердой мозговой оболочкой. В опытах на наркотизированных животных использовано 15 крыс, разделенных на три группы по пять животных в каждой.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью дисперсионного анализа SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, США). Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA использовали для сравнения латентных периодов судорожных реакций в ГБО₂ у животных при введении искусственного ликвора и агонистов ГАМК-рецепторов. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA применяли для сравнения изменения содержания ГАМК в стриатуме крыс контрольной и экспериментальных групп. Для выявления достоверности отличий использовали парный *t*-критерий с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Все данные представлены как $M \pm SEM$, при этом в качестве статистически значимых принимали значения $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У контрольной группы крыс во время экспозиции ГБО₂ наблюдались характерные паттерны моторных нарушений, которые проявлялись в определенной последовательности стадий. Мы использовали известную 5-уровневую шкалу судорожных состояний [15], но не нашли четких различий между стадиями 3 и 4 в указанной классификации, поэтому ограничились выделением четырех стадий в развитии судорог у крыс в ГБО₂.

После окончания компрессии и достижения давления в барокамере 5 АТА животные в течение 7–10 мин оставались неподвижными. После этого у крыс появлялся интенсивный груминг, кратковременные сокращения отдельных мышц мордочки, легкое потряхивание головы и передних лап, переходящие у части животных в кратковременные встряхивания всего тела типа эффекта “мокрой собаки”, длительностью 1–3 с (*стадия 1*). На *стадии 2* наблюдались повторяющиеся локальные сокращения мышц мордочки, головы, передних конечностей, а также всего тела. Проявлялись непродолжительные кивания головой. Такие миоклонии продолжались от 5 до 15 с и могли повторяться через несколько минут. На *стадии 3* у животных появлялись ритмические сокращения мышц всего тела продолжительностью от 10 до 25 с, при этом животные могли вставать на задние лапы, пятиться назад и бить хвостом. *Стадия 4* у животных характеризовалась наличием генерализованных клонических или тонических конвульсий. Судорожный припадок сопровождался гипервентиляцией, являющейся коррелятом гиперактивации симпатической нервной системы.

Стадийное развитие судорожных проявлений у крыс в ГБО₂ сохранялось и после внутрижелудочкового введения баклофена или мусцимола, однако в обоих случаях латентный период развития судорог увеличивался для всех стадий. Как оказалось, более эффективным противосудорожным действием обладал мусцимол, при введении которого 4-я стадия генерализованных конвульсий не наблюдалась у 40% животных (рис. 1).

Достоверное увеличение латентного периода появления 4-й стадии генерализованных судорог у животных при дыхании кислородом под давлением 5 АТА было выявлено после введения в мозговой желудочек двух агонистов ГАМК, при этом противосудорожная активность мусцимола была достоверно выше, чем у баклофена (рис. 2).

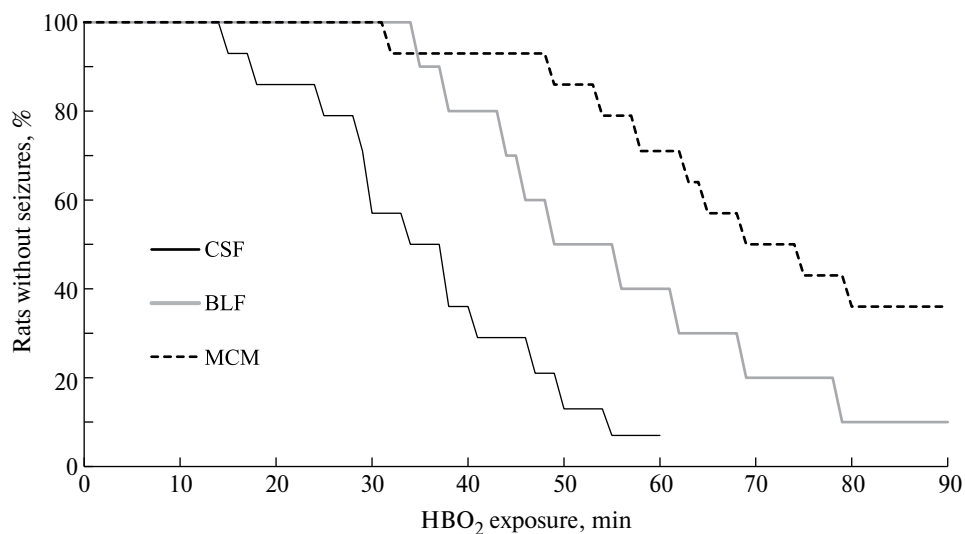


Рис. 1. Время появления генерализованных судорог у крыс под давлением кислорода 5 АТА после введения в мозговой желудочек искусственного ликвора (CSF), мусцимола (MCM) и баклофена (BLF).

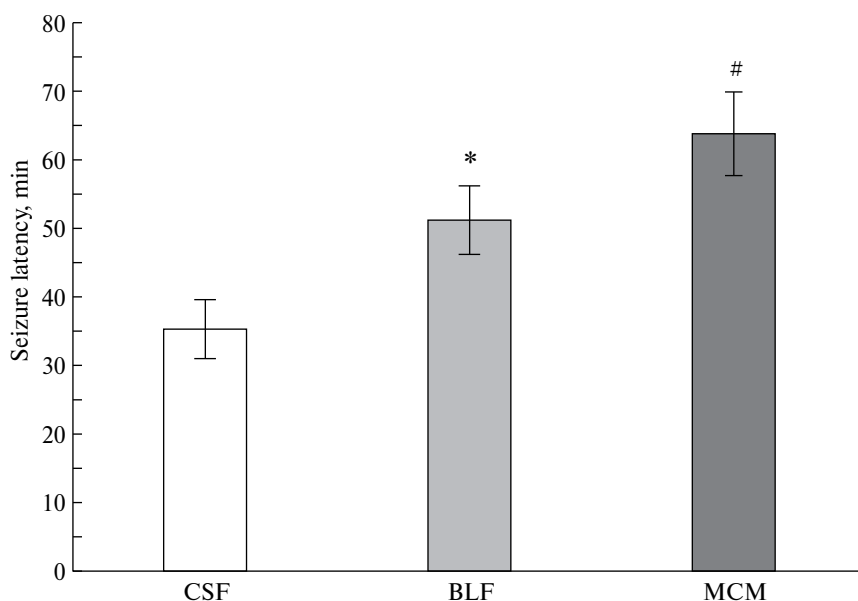


Рис. 2. Латентный период появления судорог у крыс под давлением кислорода 5 АТА после введения в мозговой желудочек искусственного ликвора (CSF), баклофена (BLF) и мусцимола (MCM). * – $p < 0.05$, по сравнению с CSF; # – $p < 0.01$, по сравнению с CSF и BLF.

Противосудорожная активность нипекотовой кислоты оказалась более высокой, чем у баклофена или мусцимола, а введение нипекотовой кислоты с баклофеном или мусцимом приводило к наибольшей временной задержке судорог при совместном использовании ингибитора ГАМК-транспортеров и агониста ГАМК-А-рецепторов (рис. 3).

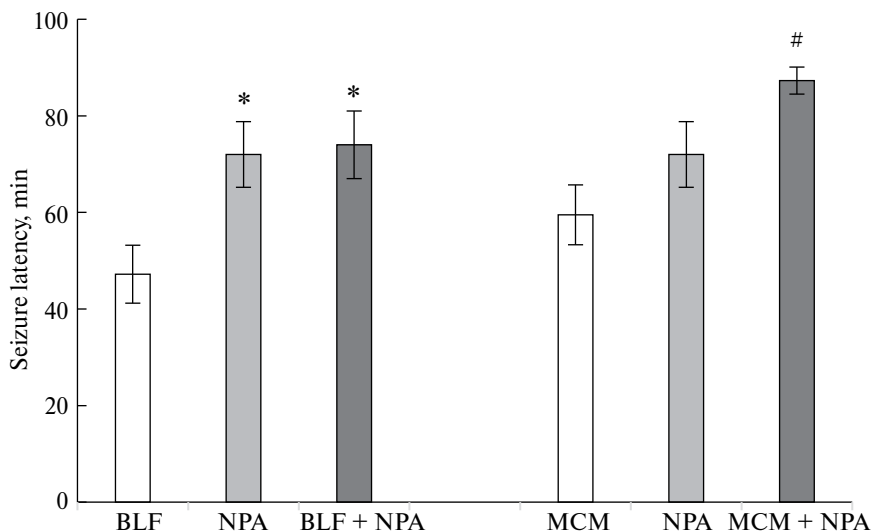


Рис. 3. Латентный период появления судорог у крыс под давлением кислорода 5 АТА после введения в мозговую желудочек раздельно и совместно баклофена (BLF), мусцимола (МСМ) и нипекотовой кислоты (NPA). * – $p < 0.01$, по сравнению с BLF; # – $p < 0.05$ по сравнению с МСМ и NPA.

Содержание ГАМК в стриатуме крыс при дыхании атмосферным воздухом при перфузии микроканюли искусственным ликвором составляло 0.063 ± 0.009 мкмоль/л. Под давлением кислорода 5 АТА уровень ГАМК у контрольной группы животных снижался на $34 \pm 5.4\%$ через 60 мин гипероксической экспозиции (рис. 4). У наркотизированных животных признаков двигательных нарушений в ГБО₂ не наблюдали, но на ЭЭГ через 65 ± 6.4 мин после начала экспозиции под давлением кислорода 5 АТА появлялась эпилептиформная активность, в основном в диапазоне тета-ритма с амплитудой более 100 мкВ. В группе животных, которым вводили в мозговую желудочек мусцимол (0.5 мкг), уровень ГАМК в стриатуме во время ГБО₂ экспозиции понижался, как и в случае введения искусственного ликвора, достигая величины ($-27 \pm 3.6\%$) по отношению к контрольному значению. Эпилептиформная активность у этой группы животных появилась через 69 ± 7.4 мин. Введение нипекотовой кислоты вызывало повышение содержания ГАМК в стриатуме на $72 \pm 7.4\%$ через 15 мин гипербарической экспозиции, а через 60 мин значение медиатора сохранялось на контрольном уровне (рис. 4). У всех животных этой группы на ЭЭГ эпилептиформной судорожной активности не наблюдали в течение всего эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведении исследований получено несколько новых данных: 1) у крыс контрольной группы, находящихся в барокамере под давлением 5 АТА, развивался судорожный синдром, проявляющийся в виде генерализованных тонико-клонических судорог через 39 ± 6.4 мин от начала гипербарической экспозиции; 2) активация ГАМК-А-рецепторов с помощью мусцимола задерживала развитие судорожного синдрома в ГБО₂; 3) агонист ГАМК-В-рецепторов – баклофен, ослаблял развитие кислородных судорог, но его противосудорожный эффект был ниже, чем у мусцимола; 4) противосудорожная эффективность мусцимола и баклофена сохранялась при повышении внеклеточного ГАМК, вызываемого ингибированием ГАМК-транспортеров с помощью нипекотовой кислоты.

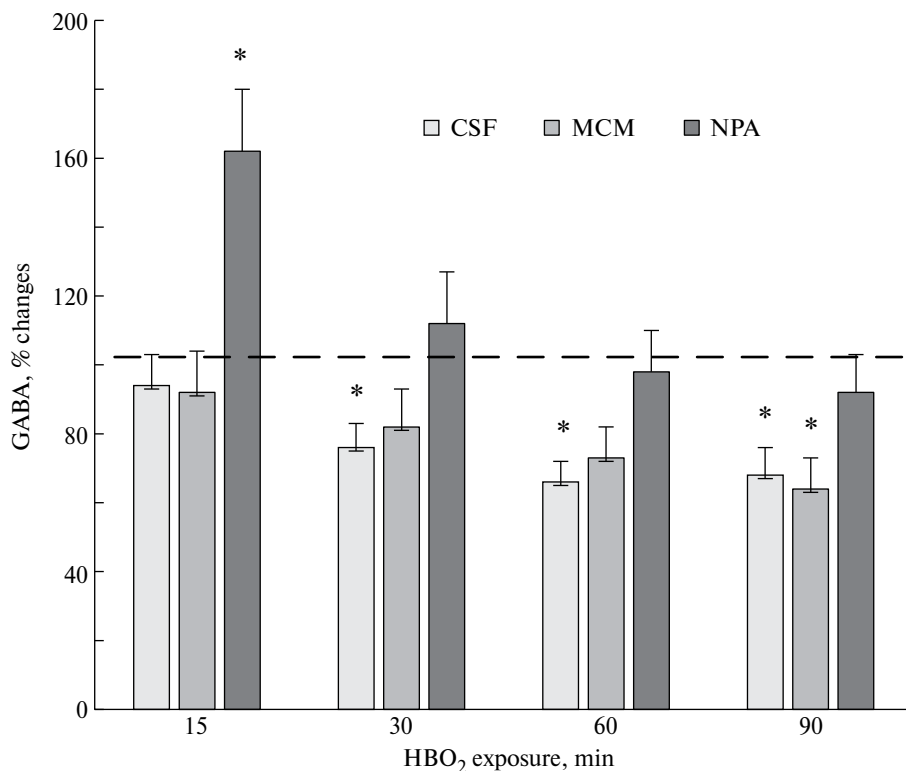


Рис. 4. Динамика уровня ГАМК в стриатуме крыс при дыхании кислородом под давлением 5 АТА после введения в мозговой желудочек искусственного ликвора (CSF), муцимола (MCM) или нипекотовой кислоты (NPA). Пунктирная линия: уровень ГАМК в стриатуме контрольной группы животных (дыхание атмосферным воздухом); * – $p < 0.05$ по отношению к контрольному уровню.

У крыс при дыхании кислородом под давлением 5 АТА развивался судорожный синдром, который характеризовался спонтанными приступами мышечных сокращений, начиная от локальных миоклоний до генерализованных конвульсий. Хотя последовательность появления двигательных расстройств у животных варьировала, локальные миоклонические судороги мышц головы, шеи, передних конечностей, а также отдельные вздрагивания или встряхивания всем телом в полном или в сокращенном перечне наблюдались у каждого животного и всегда предшествовали появлению генерализованных конвульсий.

Моторные судорожные припадки в гипербарической гипоксии известны давно, и латентное время их появления обычно используется для оценки нейротоксического действия ГБО₂ и эффективности противосудорожных препаратов [16, 19]. Используемые в работе фармакологические вещества, активирующие ГАМК-рецепторы, в разной степени задерживали развитие судорожного припадка. Баклофен является конкурентным агонистом ГАМК-В-рецепторов, сопряженных с G-белками, которые опосредуют медленное и длительное ингибирующее действие медиатора. Баклофен используется для детоксикации от алкогольной, никотиновой, кокаиновой и героиновой зависимости [20–23]. Баклофен при передозировке, а также совместно с этанолом может приводить к летальному исходу у человека и животных в эксперименте [24].

Главной мишенью для баклофена являются ГАМК-В рецепторы, которые реализуют ингибирующее действие через активацию калиевых ионных каналов, инактивацию

потенциал-зависимых кальциевых каналов и ингибирование аденилатциклазы [25]. ГАМК-В-рецепторы имеют как синаптическую, так и внесинаптическую локализацию [26], поэтому выполняют ингибиторную функцию в полном объеме только при очень интенсивном высвобождении ГАМК, когда медиатор диффундирует за пределы синаптической щели. Это хорошо согласуется с назначением ГАМК-В-рецепторов как одного из механизмов долговременной медленной модуляции синаптического торможения. Вероятно, при введении баклофена не достигается необходимый уровень ингибирования, достаточный для сдерживания возбуждающей нейротрансмиссии, и не обеспечивается эффективная противосудорожная защита. В то же время существуют данные о том, что баклофен оказывает дозозависимое противосудорожное действие при аудиогенной эпилепсии у мышей [27].

Мусцимол является мощным селективным агонистом ГАМК-А-рецепторов в мозге млекопитающих, имитирующим действие тормозного медиатора. ГАМК-А-рецепторы имеют преимущественно постсинаптическую локализацию и при активации приводят к быстрой гиперполяризации мембраны из-за увеличения проводимости хлорных каналов, что имеет решающее значение для поддержания баланса между процессами возбуждения и торможения в ЦНС.

Противосудорожные эффекты мусцимола изучались на разных экспериментальных моделях эпилепсии. При системном применении мусцимол блокировал локальные пенициллиновые судороги и задерживал начало генерализованных судорог, вызванных введением метразола у крыс [28]. Он не действовал на генерализованные судороги, вызванные пикротоксином или стрихнином [29]. В эксперименте *in vitro* на срезах мозга крыс мусцимол действовал как сильный агонист ГАМК-А-рецепторов (IC₅₀ 0.03 мМ), что примерно в 10 раз превышает величину действия самой ГАМК [30]. В опытах на бодрствующих животных концентрация мусцимола корректировалась с целью учета распределения препарата во внеслеточном пространстве мозга. Так, после внутримозговой инъекции крысам мусцимола (1 мкг/мкл физраствора) в течение первых 20 мин препарат распределялся в объеме ткани с радиусом 1.7 мм, и его уровень оставался относительно постоянным в течение 2 ч [31]. В наших опытах внутрижелудочковое введение мусцимола приводило к его распределению по мозговым структурам и времени нахождения в них, сопоставимом с периодом гипероксической экспозиции.

Фокальная эпилептическая активность моторной коры головного мозга приматов подавлялась путем прямой внутримозговой инъекции мусцимола в количестве 30 мкг на 1 мкл [32]. У грызунов периодичность появления судорог снижалась двусторонним внутримозговым введением мусцимола 0.01 мкг (88 пмоль) у мышей [33] и 0.06 мкг у крыс [34]. Мусцимол быстро выводился из крови крыс после внутривенного введения 8 ммоль/кг [35]. К факторам, влияющим на распределение мусцимола, относят связывание с рецепторами ГАМК и другими молекулярными структурами, клеточное поглощение, метаболизм в мозге и проницаемость капилляров.

В наших исследованиях впервые выявлена высокая противосудорожная активность мусцимола при действии на животных кислорода под повышенным давлением. При введении агониста ГАМК-А-рецепторов в мозговой желудочек латентный период появления судорожного припадка у крыс в ГБО₂ увеличивался более чем в 2 раза по отношению к аналогичному у контрольных животных. При этом у 40% крыс судороги не проявлялись в течение 90 мин – максимального срока экспозиции под давлением кислорода 5 АТА.

Мы также сравнивали противосудорожную активность баклофена и мусцимола с действием нипекотовой кислоты – неселективного ингибитора ГАМК-транспортеров. Важно заметить, что внутрибрюшинное введение нипекотовой кислоты не оказывало влияния на развитие судорог [36]. Данный факт свидетельствует о необходимости прямой доставки этого препарата в головной мозг, минуя гематоэнцефалический барьер, при этом исключается также развитие побочных реакций со стороны висцеральных

систем [18]. Как оказалось, противосудорожная активность нипекотовой кислоты была в 2.5 раза выше, чем у баклофена, и в 1.5 раза выше, чем у мусцимола. Введение в мозговую желудочек нипекотовой кислоты совместно с баклофеном или мусцимолом вызывало аддитивный противосудорожный эффект. Последнее указывает не только на разные мишени действия этих трех препаратов, но и демонстрирует сохранность аффинитета ГАМК-А- и ГАМК-В-рецепторов в гипероксической гипероксии. В противном случае используемые в работе агонисты не должны были оказывать защитного действия на развитие гипероксических судорог.

Исходя из этого, наиболее вероятным механизмом вовлечения ГАМК-ергической системы головного мозга в развитие кислородных судорог является снижение ферментативной активности ГДК с последующим появлением дефицита медиатора в синапсах и отсутствия полноценной активации постсинаптических рецепторов. Этот механизм участия ГАМК-ергической системы в нейротоксическом действии кислорода под давлением был высказан еще в 60-х годах прошлого столетия [6, 37], и понадобилось более 50 лет, чтобы понять молекулярный механизм инактивации фермента синтеза ГАМК в головном мозге. ГДК присутствует в мозге в виде двух изоформ, ГДК65 и ГДК67, и обе они участвуют в синтезе тормозного медиатора, используя глутамат в качестве субстрата. Как нами показано, в ГБО₂ инактивируется изоформа ГДК65, локализованная в нервных терминалях аксонов, и механизмом инактивации является ее S-нитрозилирование, приводящее к изменению структуры и функции белка [9]. В этих же исследованиях установлено, что ГБО₂ не меняет ферментативной активности изоформы ГДК67, находящейся в цитозоле нейронов, и ее S-нитрозилирование при гипербарической гипероксии не происходит [9]. Последнее предполагает, что снижение синтеза тормозного нейромедиатора в ГБО₂ происходит в терминалях аксонов ГАМК-ергических нейронов, где локализован фермент, и осуществляется его выброс в синаптическую щель. Дефицит нейротрансмиттера в мозге, образующийся за счет угнетения его синтеза при действии ГБО₂, может быть преодолен путем удержания медиатора в синапсах. Тестирование этого предположения показало, что введенные в боковой желудочек мозга препараты – ингибиторы ГАМК-транспортеров (тиагабин, SNAP 5114), повышают уровень ГАМК в мозге и значительно задерживают или предотвращают развитие кислородных судорог [38], вероятно, за счет блокирования механизмов его обратного захвата. Справедливость этого подтверждается также данными, полученными в настоящей работе. Так, доставка нипекотовой кислоты в мозговую желудочек крыс в наших опытах почти в 2 раза повышала экстраклеточный уровень ГАМК через 15 мин экспозиции в ГБО₂, а через 60 мин уровень медиатора достигал значений, измеренных при дыхании атмосферным воздухом, тогда как у контрольной группы крыс внеклеточная ГАМК за этот период достоверно понижалась на $34 \pm 5.4\%$ (рис. 4). Следовательно, блокирование механизмов удаления синаптической ГАМК может полноценно компенсировать ингибирование синтеза тормозного медиатора в ГБО₂, увеличить содержание ГАМК в синаптической щели до уровня, достаточного для обеспечения тормозной нейромедиации, и таким способом ослабить или предотвратить развитие судорожного синдрома. Результаты исследований подтверждают гипотезу о том, что ГАМК-ергическая нейротрансмиссия в головном мозге является важной мишенью для нейротоксического действия ГБО₂. Понижение ГАМК в синаптической щели из-за драматического снижения ее синтеза является ключевой причиной развития кислородных судорог.

В заключение следует отметить, что использованные в работе препараты, усиливающие ГАМК-опосредованное торможение, продемонстрировали значительную противосудорожную активность в модели гипербарических кислородных судорог. Эти препараты могут использоваться также в качестве исследовательских зондов для выяснения механизмов гипероксических судорог. Их высокая противосудорожная эффективность базируется на прямом действии на ионные каналы нейрональных мембран или на устранении дефицита синаптической ГАМК, демонстрируя, что функция калиевых, натриевых

и кальциевых каналов, а также синтез ГАМК являются критическими мишенями для токсического действия гипербарического кислорода на ЦНС. Поскольку нарушения функции ионных каналов и ГАМК-опосредованное ингибирование причастны и к другим патологическим расстройствам, полученные нами данные могут быть полезны за пределами традиционной области гипербарической физиологии и медицины. Модель гипербарических кислородных судорог адекватна для проверки гипотезы о том, что окислительный стресс является фактором, способствующим развитию различных форм эпилепсии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и дизайн эксперимента (И. Т. Д.), постановка экспериментов (И. Т. Д., Т. Ф. П., О. С. А.), сбор данных (Т. Ф. П., О. С. А.), обработка данных (И. Т. Д., Т. Ф. П., О. С. А.), написание и редактирование текста (И. Т. Д., О. С. А.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (регистрационный номер 075-00263-25-00).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 1-10/2023 от 26.01.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dean JB, Mulkey DK, Garcia AJ, Putnam RW, Henderson RA* (2003) Neuronal sensitivity to hyperoxia, hypercapnia, and inert gases at hyperbaric pressures. *J Appl Physiol* (1985) 95(3): 883–909.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00920.2002>
2. *D'Agostino DP, Putnam RW, Dean JB* (2007) Superoxide (*O₂⁻) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. *J Neurophysiol* 98(2): 1030–1041.
<https://doi.org/10.1152/jn.01003.2006>
3. *Demchenko IT, Boso AE, Whorton AR, Piantadosi CA* (2001) Nitric oxide production is enhanced in rat brain before oxygen-induced convulsions. *Brain Res* 917(2): 253–261.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03057-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03057-8)
4. *Zhang S, Takeda Y, Hagioka S, Takata K, Aoe H, Nakatsuka H, Yokoyama M, Morita K* (2005) Measurement of GABA and glutamate in vivo levels with high sensitivity and frequency. *Brain Res Brain Res Protoc* 14(2): 61–66.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2004.03.005>
5. *Кричевская АА, Шугалей ВС, Щербина ЛА, Ермоленко ГГ* (1974) Содержание γ -аминомасляной кислоты и активность глутаматдекарбоксилазы в мозге крыс при гипербарической оксигенации и защитном действии мочевины. *Вопр мед хим* 20(3): 294–298. [*Krichevskaya AA, Shugaley VS, Shcherbina LA, Ermolenko GG* (1974) The content of γ -aminobutyric acid and the activity of glutamate decarboxylase in the brain of rats under hyperbaric oxygen and the protective action of urea. *Vopr Med Chem* 20(3): 294–298. (In Russ)].

6. *Щербакoвa ГВ* (1962) Активность глутаматдекарбоксилазы и содержание γ -аминомасляной кислоты в мозге крыс при разных функциональных состояниях, вызванных повышенным давлением кислорода. Докл АН СССР 146(5): 1213–1215. [*Shcherbakova GV* (1962) Glutamate decarboxylase activity and γ -aminobutyric acid content in rat brain at different functional states caused by high oxygen pressure. Dokl AN USSR 146(5): 1213–1215. (In Russ)].
7. *Mialon P, Gibey R, Bigot JC, Barthelemy L* (1992) Changes in striatal and cortical amino acid and ammonia levels of rat brain after one hyperbaric oxygen-induced seizures. *Aviat Space Environ Med* 63(4): 287–291.
8. *Singh AK, Banister EW* (1978) Effect of 6-hydroxydopamine on brain and blood catecholamine, ammonia, and amino acid metabolism in rats subjected to high pressure oxygen induced convulsions. *Can J Physiol Pharmacol* 56(2): 334–336.
<https://doi.org/10.1139/y78-051>
9. *Gasier HG, Demchenko IT, Tatro LG, Piantadosi CA* (2017) S-nitrosylation of GAD65 is implicated in decreased GAD activity and oxygen-induced seizures. *Neurosci Lett* 653: 283–287.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.067>
10. *Beltrán González AN, López Pazos MI, Calvo DJ* (2020) Reactive Oxygen Species in the Regulation of the GABA Mediated Inhibitory Neurotransmission. *Neuroscience* 15(439): 137–145.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.064>
11. *Paxinos G, Watson C* (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic coordinates*. Boston, MA. Elsevier.
12. *Moskvin AN, Platonova TP, Zhilyaev SY, Alekseeva OS, Nikitina ER, Demchenko IT* (2020) Blockade Of γ -Aminobutyric Acid Transporters in Brain Synapses Protects Against Hyperbaric Oxygen-Induced Convulsions. *Neurosci Behav Physiol* 50: 505–510.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00930-1>
13. *Gernert M, Löscher W* (2001) Lack of robust anticonvulsant effects of muscimol microinfusions in the anterior substantia nigra of kindled rats. *Eur J Pharm* 432: 35–41.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01458-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01458-3)
14. *Mares P, Lindovský J, Slamberová R, Kubová H* (2007) Effects of a GABA-B receptor agonist baclofen on cortical epileptic afterdischarges in rats. *Epileptic Disord* 1: S44–S51.
<https://doi.org/10.1684/epd.2007.0151>
15. *Racine RJ* (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephal Clin Neurophysiol* 32 (3): 281–294.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
16. *Зальцман ГЛ* (1968) Стадии развития кислородной эпилепсии и функциональное состояние нервной системы. В кн: Гипербарические эпилепсия и наркоз. *ГЛ Зальцман* (ред) Л. Наука. [*GL Zaltsman* (1968) Stages of formation of oxygen epilepsy and the functional state of the centres of the nervous system. In: *Hyperbaric epilepsy and narcosis. Zaltsman GL* (ed) Leningrad. Nauka. (In Russ)].
17. *Demchenko IT, Piantadosi CA* (2006) Nitric oxide amplifies the excitatory to inhibitory neurotransmitter imbalance accelerating oxygen seizures. *Undersea Hyperb Med* 33(3): 169–174.
18. *Demchenko IT, Suliman HB, Zhilyaev SY, Alekseeva OS, Platonova TF, Makowski MS, Piantadosi CA, Gasier HG* (2023) GAT inhibition preserves cerebral blood flow and reduces oxidant damage to mitochondria in rodents exposed to extreme hyperbaric oxygen. *Front Mol Neurosci* 15: 1062410.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1062410>
19. *Bean JW, Zee D, Thom B* (1966) Pulmonary changes with convulsions induced by drugs and oxygen at high pressure. *J Appl Physiol* 21(3): 865–872.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1966.21.3.865>
20. *Fattore L, Cossu G, Martellotta MC, Deiana S, Fratta W* (2001) Baclofen antagonises intravenous self-administration of gamma-hydroxybutyric acid in mice. *Neuroreport* 12(10): 2243–2246.
<https://doi.org/10.1097/00001756-200107200-00039>
21. *Fattore L, Cossu G, Martellotta MC, Fratta W* (2002) Baclofen antagonizes intravenous self-administration of nicotine in mice and rats. *Alcohol Alcohol* 37(5): 495–498.
<https://doi.org/10.1093/alcac/37.5.495>
22. *Spano MS, Fattore L, Fratta W, Fadda P* (2007) The GABAB receptor agonist baclofen prevents heroin-induced reinstatement of heroin-seeking behavior in rats. *Neuropharmacology* 52(7): 1555–1562.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.02.012>
23. *Gorsane MA, Kebir O, Hache G, Blecha L, Aubin HJ, Reynaud M, Benyamina A* (2012) Is baclofen a revolutionary medication in alcohol addiction management? Review and recent updates. *Subst Abus* 33(4): 336–349.
<https://doi.org/10.1080/08897077.2012.663326>

24. Romanova OL, Chauhan M, Blagonravov ML, Kislov MA, Ershov AV, Krupin KN (2022) Baclofen (fun drug) and ethanol combined poisoning in humans: A histopathology and morphometry model. *J Forensic Leg Med* 90: 102373.
<https://doi.org/10.1016/j.jflm.2022.102373>
25. Shaye H, Stauch B, Gati C, Cherezov V (2021) Molecular mechanisms of metabotropic GABAB receptor function. *Sci Adv* 7(22): 1–15.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abg3362>
26. Gassmann M, Bettler B (2012) Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nat Rev Neurosci* 13(6): 380–394.
<https://doi.org/10.1038/nrn3249>
27. Brown JW, Moeller A, Schmidt M, Turner SC, Nimmrich V, Ma J, Rueter LE, van der Kam E, Zhang M (2016) Anticonvulsant effects of structurally diverse GABA(B) positive allosteric modulators in the DBA/2J audiogenic seizure test: Comparison to baclofen and utility as a pharmacodynamic screening model. *Neuropharmacology* 101: 358–369.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.009>
28. Collins RC (1980) Anticonvulsant effects of muscimol. *Neurology* 30(6): 575–581.
<https://doi.org/10.1212/wnl.30.6.575>
29. Sawamura A, Hashizume K, Yoshida K, Tanaka T (2001) Kainic acid-induced substantia nigra seizure in rats: Behavior, EEG and metabolism. *Brain Res* 911(1): 89–95.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02732-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02732-9)
30. Enna SJ, Collins JF, Snyder SH (1977) Stereospecificity and structure-activity requirements of GABA receptor binding in rat brain. *Brain Res* 124(1): 185–190.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90878-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90878-2)
31. Martin JH (1991) Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 127(2): 160–164.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90784-q](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90784-q)
32. Kubota K (1996) Motor cortical muscimol injection disrupts forelimb movement in freely moving monkeys. *Neuroreport* 7(14): 2379–2384.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199610020-00020>
33. Hosford DA, Wang Y, Cao Z (1997) Differential effects mediated by GABAA receptors in thalamic nuclei in lh/lh model of absence seizures. *Epilepsy Res* 27(1): 55–65.
[https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(97\)01023-1](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(97)01023-1)
34. Shehab S, Simkins M, Dean P, Redgrave P (1996) Regional distribution of the anticonvulsant and behavioural effects of muscimol injected into the substantia nigra of rats. *Eur J Neurosci* 8(4): 749–757.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01260.x>
35. Baraldi M, Grandison L, Guidotti A (1979) Distribution and metabolism of muscimol in the brain and other tissues of the rat. *Neuropharmacology* 18(1): 57–62.
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(79\)90009-1](https://doi.org/10.1016/0028-3908(79)90009-1)
36. Singh K, Kumar P, Bhatia R, Mehta V, Kumar B, Akhtar MJ (2022) Nipecotic acid as potential lead molecule for the development of GABA uptake inhibitors; structural insights and design strategies. *Eur J Med Chem* 234(15): 114269.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114269>
37. Wood JD, Watson WJ (1962) Protective action of gamma-aminobutyric acid against oxygen toxicity. *Nature* 195: 296.
38. Alekseeva OS, Gerda BA, Zhilyaeva AS, Demchenko IT (2023) Anticonvulsant Efficacy of Inhibition of Synaptic and Extrasynaptic GABA-Transporters in the Prevention of Hyperbaric Oxygen Seizures. *J Evol Biochem Phys* 59: 709–718.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023030055>

The Role of GABA Receptors in Seizure Development When Breathing Hyperbaric Oxygen

O. S. Alekseeva^{a, *}, T. F. Platonova^a, and I. T. Demchenko^a

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

**e-mail: osa72@inbox.ru*

The use of hyperbaric oxygen (HBO₂) in medicine and in underwater diving is associated with the risk of its toxic (convulsant) effect on the central nervous system, the pathophysiological mechanisms of which have not been sufficiently studied. A common hypothesis about the mechanism of HBO₂-induced convulsions is the idea that extreme hyperoxia suppresses GABAergic function with subsequent increase in CNS excitation, leading to convulsions. The deficit of GABAergic function in HBO₂ is due to a decrease in the synthesis of the mediator, while the involvement of other components of inhibitory neurotransmission, in particular, GABA receptors, remains unclear. The aim of this work was to study the involvement of GABA receptors in the development of hyperbaric oxygen convulsions. In the course of the work, motor convulsions in HBO₂ were assessed in rats that were injected with GABA receptor agonists: muscimol or baclofen into the lateral ventricle of the brain before hyperoxic exposure. The affinity of GABA receptors to these drugs was also assessed against the background of an increased level of cerebral GABA caused by intraventricular administration of nipecotic acid. New data from the studies are: (a) activation of GABA-A receptors with muscimol delayed the onset of seizures in HBO₂, (b) the GABA-B receptor agonist baclofen weakened the development of hyperbaric oxygen seizures, but its anticonvulsant effect was reliably lower than that of muscimol, (c) the anticonvulsant efficacy of muscimol and baclofen was preserved with an increase in extracellular GABA caused by inhibition of GABA transporters with nipecotic acid. The affinity of GABA-A and GABA-B receptors to the inhibitory neurotransmitter did not change under conditions of hyperbaric hyperoxia.

Keywords: hyperbaric oxygen, seizures, gamma-aminobutyric acid, GABA receptors, baclofen, muscimol, nipecotic acid