

## EFFETTO DELLO STRESS SULLA FUNZIONE DEL CANALE AL CLORO ASSOCIAUTO AL COMPLESSO RECETTORIALE GABAERGICO \*

A. CONCAS, M. SERRA e T. ATSOGGIU

Dipartimento di Biologia Sperimentale, Cattedra di Farmacologia, Università degli Studi, Cagliari

Riassunto. - Lo stress (foot-shock) aumenta la densità dei siti di legame per il  $^{35}\text{S}$ -TBPS, un ligando selettivo per la proteina che costituisce il canale al cloro a livello del complesso recettoriale del GABA. Questo effetto è simile a quello prodotto in vitro dalla bicucullina e dalle  $\beta$ -carboline ansiogeniche DMCM e FG 7142 ed è opposto a quello prodotto dalle benzodiazepine e dalle  $\beta$ -carboline ansiolitiche. Nel loro insieme i risultati suggeriscono che lo stress induce una rapida inibizione funzionale del complesso recettoriale GABAergico.

Summary (Effect of stress on the function of chloride channel associated to the GABA receptor complex). - Foot shock stress increases the total number of  $^{35}\text{S}$ -TBPS binding sites in the rat cerebral cortex. The effect of stress is similar to that produced in vitro by the specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline and by the anxiogenic  $\beta$ -carbolines DMCM and FG 7142. On the contrary the anxiolytic and positive modulators of the GABAergic transmission (diazepam and ZK 93423) decrease the density of  $^{35}\text{S}$ -TBPS recognition sites. All together these data suggest that some emotional state related to stress and anxiety may result from a diminished GABAergic transmission at the level of the GABA/benzodiazepines/chloride ionophore receptor complex.

### Introduzione

Le benzodiazepine esercitano i loro effetti farmacologici e clinici attraverso un potenziamento della trasmissione GABAergica mediato dalla attivazione di recettori specifici localizzati a livello del sistema nervoso centrale [1]. Questi recettori fanno parte del complesso recettoriale macromolecolare GABAergico in cui sono presenti il recettore al GABA e il canale allo ione cloro. A quest'ultimo sono associati i siti di legame dei barbiturici e di composti convulsivanti quali la picrotossina e i derivati organofosforici [2].

Le benzodiazepine provocano un aumento della frequenza di apertura del canale allo ione cloro con conseguente aumento di permeabilità della membrana per que-

sto ione [3]. La scoperta degli eventi molecolari che mediano gli effetti farmacologici di farmaci ansiolitici quali le benzodiazepine ha suggerito che le sinapsi GABAergiche possano avere un ruolo importante nella patogenesi dello stato ansioso. Una conferma di questa ipotesi si è ottenuta di recente con la scoperta che le  $\beta$ -carboline, una nuova classe di ligandi selettivi per i recettori alle benzodiazepine, producono effetti farmacologici opposti (ansia, convulsioni, insonnia) a quella di questi farmaci [4-6], riducendo la funzione delle sinapsi GABAergiche attraverso una inibizione della attività dei canali al cloro GABA dipendenti [7, 8]. Questi dati sperimentali suggeriscono che nella situazione di stress e nella crisi di ansia fisiologica o patologica la trasmissione GABAergica possa essere realmente ridotta. In accordo con questa ipotesi abbiamo recentemente dimostrato che lo stress elettrico o lo stress indotto dalla manipolazione dei ratti prima del sacrificio provocano una diminuzione della densità dei recettori al GABA [9]. Questi risultati suggeriscono che lo stato emotionale dei ratti in relazione a stimoli stressanti sia la conseguenza di una diminuita funzione delle sinapsi GABAergiche. Ci è parso pertanto di estremo interesse studiare l'effetto dello stress sulla funzione del canale allo ione cloro del complesso recettoriale GABAergico.

Il derivato organofosforico t-butilbiciclofosforotionato ( $^{35}\text{S}$ -TBPS) è considerato il ligando più selettivo per marcire i siti di legame associati alla proteina che costituisce il suddetto canale allo ione cloro [10]. Il binding del  $^{35}\text{S}$ -TBPS è inibito competitivamente dalla picrotossina e modulato allostericamente dal GABA, dai GABA-mimetici, barbiturici, benzodiazepine e  $\beta$ -carboline [10-13]. Pertanto misurando il binding del  $^{35}\text{S}$ -TBPS è possibile valutare le modificazioni farmacologiche e fisiologiche nella funzione del canale.

### Materiale e metodi

Per questa ricerca sono stati utilizzati ratti maschi Sprague Dawley (Charles River) del peso di circa 200-250 g. Il foot-shock stress, applicato per 20 min prima

\* Lavoro presentato al 1° Convegno Nazionale "Giovani Cultori delle Neuroscienze" (Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 11-12 dicembre 1987) su invito del Comitato scientifico del convegno.

del sacrificio era costituito da una serie di leggere scosse elettriche (0,2 mA) alle zampe della durata di 500 ms, ottenute ad intervalli regolari (500 ms) mediante uno stimolatore. Il *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS nelle preparazioni di membrane della corteccia cerebrale di ratto è stato determinato come precedentemente descritto [14]. Le proteine sono state determinate utilizzando il metodo di Lowry [15]. Tutte le analisi statistiche sono state compiute utilizzando il test t di Student.

## Risultati

Come mostra la Tab. 1 il *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS aumenta nella corteccia cerebrale degli animali sottoposti al *foot shock*. In particolare l'aumento del *binding* è dovuto ad un incremento del numero dei recettori (30%), piuttosto che ad una modificazione della loro affinità per il ligando.

Per verificare se la trasmissione GABAergiche fosse coinvolta nell'effetto dello stress sul *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS, abbiamo studiato l'effetto di antagonisti del recettore al GABA e di modulatori positivi e negativi della trasmissione GABAergiche sul *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS. L'aggiunta *in vitro* della bicucullina, un antagonista specifico dei recettori GABA<sub>A</sub> alle preparazioni di corteccia cerebrale di ratto produce un effetto simile a quello dello stress, cioè un marcato aumento (89%) della densità dei recettori per il  $^{35}\text{S}$ -TBPS. L'effetto indotto dallo stress e dalla bicucullina è simile a quello indotto dai modulatori della trasmissione GABAergiche. Infatti le  $\beta$ -carboline ansiogeniche DMCM e FG 7142 alla concentrazione 10  $\mu\text{M}$  aumentano così come lo stress il numero dei recettori per il  $^{35}\text{S}$ -TBPS. Al contrario, i modulatori positivi della trasmissione GABAergiche (diazepam e il derivato  $\beta$ -carbolinico ZK 93423) inibiscono il *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS. Infatti l'aggiunta *in vitro* alle prepara-

zioni di corteccia cerebrale di ratto di questi ligandi ansiolitici per i recettori alle benzodiazepine produce una marcata diminuzione del numero dei recettori del  $^{35}\text{S}$ -TBPS (35% + diazepam e 45% + ZK 93423) senza per altro modificarne l'affinità.

## Discussione

I risultati di questo studio indicano che la funzione delle sinapsi GABAergiche a livello dello ionoforo o canale al cloro può essere modificata da stimuli stressanti e quindi da alterazioni dello stato emozionale degli animali. Infatti lo stress dovuto allo shock elettrico aumenta il *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS in preparazione di membrane di corteccia cerebrale di ratto.

Poiché il TBPS inibisce la trasmissione GABAergiche bloccando direttamente l'attività del canale al cloro associato ai recettori al GABA [16-17], l'aumento del numero dei recettori per il TBPS indotto dallo stress potrebbe essere il risultato di una alterata funzione del suddetto canale. La conferma di questa ipotesi è stata ottenuta recentemente con la dimostrazione che il *foot shock* diminuisce nella corteccia cerebrale del ratto il flusso di  $^{36}\text{Cl}^-$  attraverso il canale specifico sulla membrana neuronale [14, 18].

La bicucullina, un antagonista specifico del recettore al GABA, che induce convulsioni [19] e ansia sperimentale nel ratto [20] aumenta, in modo simile allo stress, la densità dei recettori del  $^{35}\text{S}$ -TBPS nel cervello di ratto. Inoltre, l'effetto dello stress e della bicucullina sul *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS è simile a quello indotto dalle  $\beta$ -carboline ansiogeniche e convulsivanti DMCM e FG 7142 che modulano in senso negativo la trasmissione GABAergiche [7, 21-23].

Al contrario i modulatori positivi della trasmissione GABAergiche, come le benzodiazepine e le  $\beta$ -carboline

Tabella 1. - Effetto dello stress e di farmaci ansiolitici e ansiogenici sul *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS nella corteccia cerebrale di ratto

		Binding di $^{35}\text{S}$ -TBPS	
		$B_{\max}$ (a)	$K_D$ (b)
Controllo		$1,84 \pm 0,12$	$89 \pm 6,5$
Stress ( <i>foot shock</i> )		$2,39 \pm 0,11^*$	$99 \pm 8,7$
Bicucullina	10 $\mu\text{M}$	$3,48 \pm 0,19^*$	$62 \pm 5,2^*$
Diazepam	1 $\mu\text{M}$	$1,21 \pm 0,09^*$	$101 \pm 9,3$
ZK 93423	1 $\mu\text{M}$	$1,02 \pm 0,07^*$	$103 \pm 10,1$
DMCM	10 $\mu\text{M}$	$2,24 \pm 0,15^*$	$88 \pm 7,0$
FG 7142	10 $\mu\text{M}$	$2,35 \pm 0,17^*$	$91 \pm 6,5$

\*  $p < 0,01$  rispetto ai valori di controllo; (a)  $B_{\max}$  = pmol/mg proteine; (b)  $K_D$  = nM  
Ogni valore rappresenta la media  $\pm$  SE di 4 separati esperimenti eseguiti in triplicato

ansiolitiche producono sul *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS un effetto opposto a quello dello stress, della bicucullina e delle  $\beta$ -carboline ansiogeniche. Infatti, il diazepam e la  $\beta$ -carbolina ansiolitica e anticonvulsivante ZK 93423 [24] diminuiscono il numero totale dei recettori per il TBPS nella corteccia cerebrale di ratto.

In conclusione, la dimostrazione che lo stress e i farmaci ansiogenici aumentano il *binding* del  $^{35}\text{S}$ -TBPS a livello del canale al  $\text{Cl}^-$  associato al recettore al GABA, suggerisce che lo stress esercita un'azione negativa sulla

funzione del complesso recettoriale GABA/benzodiazepine/canale al  $\text{Cl}^-$  e confermano quanto da noi suggerito sulla plasticità delle sinapsi GABAergiche in relazione allo stato emozionale dell'animale. In particolare una diminuita funzione del canale allo ione  $\text{Cl}^-$  associato ai recettori al GABA potrebbe costituire un evento molecolare importante coinvolto nella fisiopatologia dell'ansia.

Ricevuto il 7 aprile 1988.

Accettato il 22 aprile 1988.

## BIBLIOGRAFIA

- COSTA, E. & GUIDOTTI, A. 1979. Molecular mechanism in the receptor action of benzodiazepines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19:** 531-545.
- SIGEL, E. & BARNARD, E.A. 1984. A  $\gamma$ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* **259:** 7219-7223.
- STUDY, R.E. & BARKER, J.L. 1981. Diazepam and (-) pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanism for potentiation of  $\gamma$ -aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78:** 7180-7184.
- BRAESTRUP, C., SCHMIECHEN, R., NEEF, G., NIELSEN, M. & PETERSEN, E.N. 1982. Interaction of convulsive ligands with benzodiazepine receptors. *Science* **216:** 1241-1243.
- CORDA, M.G., BLAKER, W.D., MELDENSON, W.S., GUIDOTTI, A. & COSTA, E. 1983.  $\beta$ -carbolines enhanced shock induced suppression of drinking in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80:** 2072-2076.
- DOROW, R., HOROSWKI, R., PASCHELKE, G., AMIN, M. & BRAESTRUP, C. 1983. Severe anxiety induced by FG 7142, a  $\beta$ -carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* **2:** 98-99.
- BORMAN, J. 1988. Electrophysiology of  $\text{GABA}_A$  and  $\text{GABA}_B$  receptor subtypes. *Trends NeuroSci. (Pers. Ed.)* **11:** 112-116.
- OBATA, T. & YAMAMURA, H.I. 1986. The effect of benzodiazepines and  $\beta$ -carbolines on GABA-stimulated chloride influx by membrane vesicles from the rat cerebral cortex. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **141:** 1-6.
- BIGGIO, G., CONCAS, A., SERRA, M., SALIS, M., CORDA, M.G., NURCHI, V., CRISPONI, C. & GEZZA, G.L. 1984. Stress and  $\beta$ -carbolines decrease the density of low affinity GABA binding sites: an effect reverse by diazepam. *Brain Res.* **305:** 13-18.
- SQUIRES, R.F., CASIDA, J.E., RICHARDSON, M. & SAEDERUP, E. 1983.  $^{35}\text{S}$ -t-butylbicyclicphosphorotionate binds with high affinity to brain-specific sites coupled to  $\gamma$ -aminobutyric acid-A and ion recognition sites. *Mol. Pharmacol.* **23:** 326-336.
- SUPAVILAI, P. & KAROBATH, M. 1984.  $^{35}\text{S}$ -t-butylbicyclicphosphorotionate binding sites are constituents of the  $\gamma$ -aminobutyric acid benzodiazepine receptor complex. *J. Neurosci.* **4:** 1193-1200.
- CONCAS, A., GEHLERT, D.R., WAMSLEY, J.K. & YAMAMURA, H.I. 1986. Effect of benzodiazepine site ligands on  $^{35}\text{S}$ -t-butylbicyclicphosphorotionate ( $^{35}\text{S}$ -TBPS) binding to rat brain: an autoradiographic study. In: *GABAergic transmission and anxiety*. G. Biggio & E. Costa (Eds). Raven Press, New York. pp. 227-238.
- GEE, K.W., LAWRENCE, L.J. & YAMAMURA, H.I. 1986. Modulation of the chloride ionophore by benzodiazepine receptor ligands: influence of  $\gamma$ -aminobutyric acid and ligand efficacy. *Mol. Pharmacol.* **30:** 218-225.
- CONCAS, A., SERRA, M., CORDA, M.G. & BIGGIO, G. 1988. Changes of  $^{36}\text{Cl}^-$  flux and  $^{35}\text{S}$ -TBPS binding induced by stress and GABAergic drugs. In: *Cl. Channels and their modulation by neurotransmitters and drugs*. G. Biggio & E. Costa (Eds). Raven Press, New York (in corso di stampa).
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:** 265-275.
- VAN RENTERGHEM, C., BILBE, G., MOSS, S., SMART, T.G., CONSTANTI, A., BROWN, D.A. & BARNARD, E.A. 1987. GABA receptors induced in *xenopus* oocytes by chick brain mRNA: evaluation of TBPS as a use-dependent channel blocker. *Mol. Brain Res.* **2:** 21-31.
- TEHRANI, M.H.J., VAIDYANATHASWAMY, R., VERKADE, J.G. & BARNES, E.M. Jr. 1986. Interaction of t-butylbicyclicphosphorotionate with  $\gamma$ -aminobutyric acid-gated chloride channels in cultured cerebral neurons. *J. Neurochem.* **46:** 1542-1548.

18. CONCAS, A., MELE, S. & BIGGIO, G. 1987. Foot shock stress decreases chloride efflux from rat brain synaptoneuroosomes. *Eur. J. Pharmacol.* **135**: 423-427.
19. NUTT, D.J., COWEN, P.J. & GREEN, A.R. 1980. On the measurement in rats of the convulsant effect of drugs and the changes which follow electroconvulsive shock. *Neuropharmacology* **19**: 1017-1023.
20. PETERSEN, E.N. & JENSEN, L.H. 1984. Proconflict effect of benzodiazepine receptor inverse agonist and other inhibitors of GABA function. *Eur. J. Pharmacol.* **103**: 91-97.
21. BRAESTRUP, C., NIELSEN, M., HONORE', T., JENSEN, L.H. & PETERSEN, E.N. 1983. Benzodiazepine receptor ligands with positive and negative efficacy. *Neuropharmacology* **22**: 1451-1457.
22. CHAN, C.Y. & FARB, D.H. 1985. Modulation of neurotransmitter action: control of the  $\gamma$ -aminobutyric acid response through the benzodiazepine receptor. *J. Neurosci.* **5**: 2365-2373.
23. CONCAS, A., SALIS, M., SERRA, M., CORDA, M.G. & BIGGIO, G. 1983. Ethyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate decreases  $^3$ H-GABA binding in membrane preparations of the rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **89**: 179-181.
24. JENSEN, L.H., PETERSEN, E.N., HONORE', T. & DREJER, J. 1986. Bidirectional modulation of GABA function by  $\beta$ -carbolines. In: *GABAergic transmission and anxiety*. G. Biggio & E. Costa (Eds). Raven Press, New York. pp. 79-90.