



ОБЗОРЫ

УДК 612.822.1+612.815.1

ЭНДОГЕННЫЕ ИНГИБИТОРЫ ГАМК-РЕЦЕПТОРОВ
ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

ПАРФЕНОВА Е. В.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Из синаптических мембран головного мозга крыс выделены вещества, специфически ингибирующие связывание меченой ГАМК с постсинаптическими рецепторными участками. Обсуждаются противоречивые литературные данные о природе этих ингибиторов и механизме ингибирования. Ставится вопрос о существовании эндогенных ингибиторов постсинаптической рецепции других медиаторов. Высказывается предположение, что эндогенные ингибиторы являются одним из звеньев регуляции синаптической передачи, осуществляющих свою функцию на уровне постсинаптической мембраны.

ГАМК—основной тормозной медиатор в ЦНС позвоночных животных. Эффективность работы ГАМК-ергической синаптической передачи определяется совокупностью процессов, происходящих на уровне как пре-, так и постсинаптической мембран нервных окончаний. Ключевыми моментами постсинаптической регуляции являются число рецепторных участков, их чувствительность к медиатору и степень сопряжения эффектора с Cl^- -ионофором. В последнее время обнаружен новый тип регуляции процессов для ГАМК-ергических синапсов, а именно регуляция постсинаптической рецепции ГАМК эндогенными ингибиторами. Этот вопрос, которому посвящено значительное количество зачастую противоречащих друг другу работ, и является предметом настоящего обзора.

Детальное изучение процесса постсинаптической рецепции ГАМК *in vitro* стало возможным лишь после того, как были определены условия избирательного выявления связывания меченой ГАМК с рецепторными участками и его отграничения от других процессов, в частности обратного захвата медиатора нервными окончаниями и глиальными клетками. Впервые Реск и соавт. в 1973 г. [1] показали, что постсинаптическое рецепторное связывание 3H -ГАМК с синаптосомами коры мозжечка выявляется в отсутствие Na^+ в инкубационной

среде при 0-4°, что отличает его от Na^+ -зависимого процесса обратного захвата медиатора синапсом, а Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК конкурентно ингибируется бикукулином—известным антагонистом ГАМК и не изменяется в присутствии хлорпромазина—ингибитора обратного захвата ГАМК. Детально характеристики Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами различных отделов ЦНС крысы были изучены в работе Zukin и соавт. [2], которые с помощью кинетического и фармакологического подходов показали, что Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами идентично связыванию этого медиатора с постсинаптическими рецепторными участками мембран нервных клеток. Эта работа дала толчок к появлению целой серии исследований, посвященных изучению рецепторного связывания ГАМК радионуклеотидными методами [3-6].

Оказалось, что на свежеполученных препаратах синаптических мембран из различных отделов ЦНС крысы Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК практически не обнаруживается; его выявление становится возможным лишь после одно- или двукратного замораживания-оттаивания мембран, сопровождаемого интенсивными промывками препарата гипотоническим буфером [2-6]. Обработка предварительно подвергнутых замораживанию-оттаиванию мембран низкими концентрациями детергентов, наиболее распространенным из которых является неионный детергент тритон X-100 в концентрации 0,01-0,5%, также способствует выявлению рецепторного связывания медиатора синаптическими мембранами [7-9]. При этом обработанные детергентом мембраны имеют существенно большую рецепторную активность, чем препараты, интенсивно отмытые буфером (в 2-3 раза при концентрации детергента 0,05%).

Эти результаты позволили предположить, что в синаптических мембранах ЦНС крысы присутствуют вещества, ингибирующие связывание ^3H -ГАМК *in vitro*. Было показано, что после обработки мембран низкими концентрациями тритона X-100 и последующего их осаждения в надосадочной жидкости обнаруживаются вещества, дозозависимым образом ингибирующие связывание ^3H -ГАМК постсинаптическими рецепторными участками [7, 10-12].

В настоящее время существование эндогенных ингибиторов постсинаптической рецепции ^3H -ГАМК является неоспоримым фактом. Однако вопрос о природе этих веществ и их физиологической роли в ГАМК-ергической синаптической передаче ещё не разрешён. Работы по изучению эндогенных ингибиторов развиваются в двух основных направлениях: 1) феноменологические исследования, в ходе которых устанавливаются факты изменения активности эндогенных ингибиторов в различных экспериментальных условиях и при некоторых патологических состояниях ЦНС; 2) исследования, задачей которых является выяснение молекулярной природы ингибиторов и механизма ингибирования.

При феноменологических исследованиях активность ингибиторов идентифицируется двумя методами: а) по приросту Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК препаратами синаптических мембран после их обработки низкими концентрациями детергента; б) по способности очищенной фракции супернатанта, полученного после осаждения мембран, обработанных замораживанием-оттаиванием и детергентом, ингибировать Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами. В ходе таких исследований установлен ряд интересных фактов. Продемонстрировано, например, что феномен гиперчувствительности рецепторов ГАМК в стриатуме крыс после местной дегенерации нейронов, вызванной введением в мозг канновой кислоты, сопровождается снижением активности эндогенных ингибиторов в той части мозга, где отмечается массовая дегенерация нейронов; в то же время активность эндогенных ингибиторов в интактной части мозга не претерпевает изменений [11]. Оказалось также, что у больных хореей Геттингтона, у которых в стриатуме и коре мозжечка наблюдается значительная потеря ГАМК-ергических нейронов, функционирующие нейроны также обладают гиперчувствительностью рецепторов к ГАМК, и это сопровождается практически полным отсутствием в синаптических мембранах из коры мозжечка таких больших эндогенных ингибиторов [13]. Интересны данные об изменении активности эндогенных ингибиторов в онтогенезе. Показано, что их активность в передних отделах головного мозга крыс снижается в ряду 1-дневные—10-дневные—взрослые животные, что сопровождается возрастанием рецепторного связывания ^3H -ГАМК [14]. В то же время в работе других авторов показано, что активность ингибиторов в мембранах из передних отделов головного мозга минимальна у новорожденных крысят и достигает нормальных значений ко 2—3 дню после рождения, что происходит параллельно с «созреванием» ГАМК-рецепторов в этих отделах мозга [15]. Таким образом, полученные при феноменологических исследованиях данные позволяют предположить, что эндогенные ингибиторы ГАМК-рецепторов являются участниками механизма постсинаптической регуляции ГАМК-ергической синаптической передачи, а изменению их активности принадлежит важная роль в некоторых физиологических и патологических процессах в ЦНС.

Хотя факт существования эндогенных ингибиторов постсинаптической рецепции ГАМК в настоящее время не вызывает сомнений, вопрос о химической природе этих веществ пока еще не решен. Поскольку эндогенные ингибиторы солибилизируются из синапсомных мембран при замораживании-оттаивании и промывках буфером или обработке детергентами, их присутствие в супернатанте после осаждения таких мембран легко обнаруживается. Различными авторами было показано, что ингибирующим влиянием на рецепторное связывание ^3H -ГАМК обладают различные вещества, солибилизирующиеся из мембран после указанных обработок: эндогенная ГАМК [16—19], фосфолипиды [20], белки [21, 22], пептиды [23], пурины [24] и низкомоле-

кулярные вещества [11]. Необходимо проанализировать имеющиеся данные, чтобы попытаться ответить на вопрос, какие же из перечисленных кандидатов на роль ингибиторов действительно являются эндогенными ингибиторами Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК.

ГАМК. Показано, что в препаратах синаптических мембран различных отделов ЦНС животных в значительном количестве обнаруживается эндогенная ГАМК, которая исходно была заключена в синаптических окончаниях. По данным Toiffano и соавт. [8], её содержание в таких препаратах вполне достаточно для того, чтобы успешно конкурировать с меченой ГАМК, используемой для радиорецепторного исследования и, таким образом, занижать величины связывания ^3H -ГАМК и создавать эффект ингибирования рецепторного связывания *in vitro*. Замораживание-оттаивание синаптических мембран, сопровождаемое их промывками гипотоническим буфером, приводит к разрушению мембранных везикулярных структур и вымыванию эндогенной ГАМК из препарата. Эффект замораживания-оттаивания усиливается дополнительной обработкой детергентами, также способствующими нарушению целостности мембранных структур. После 2—3-кратной последовательной обработки 0,05%-ным тритоном X-100 в препаратах синаптических мембран из коры головного мозга крыс эндогенной ГАМК практически не обнаруживается [8]. Кроме того, указанная обработка снижает содержание в препаратах синаптических мембран и других аминокислот—таурина, аргинина и глутаминовой кислоты [8], которые, по данным некоторых авторов, уменьшают связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами [25]. Это сопровождается увеличением связывания меченой ГАМК с препаратами синаптических мембран. Таким образом, эндогенная ГАМК является не истинным, а кажущимся ингибитором рецепторного связывания ^3H -ГАМК, с присутствием которого в интактных препаратах мембран необходимо считаться [16—19].

Однако маскирующим эффектом эндогенной ГАМК на рецепторное связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами не объясняются все наблюдаемые эффекты. Так, обнаружены вещества, неконкурентно ингибирующие Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК [7, 10, 11], в то время как эндогенная ГАМК, естественно, находится в конкурентных отношениях с меченой ГАМК.

Фосфолипиды. Обработка клеточных мембран детергентами приводит к удалению из них значительной части фосфолипидов. При стандартной обработке синаптических мембран головного мозга крыс тритоном X-100 (0,05%-ным в течение 30 мин при 37°), используемой при радиорецепторном исследовании связывания ГАМК, содержание фосфолипидов в мембранах снижается на 50% [8]. Естественно было проверить, не являются ли фосфолипиды, экстрагируемые из мембран детергентами, теми эндогенными ингибиторами, которые препятствуют проявлению активности ГАМК-рецепторов в интактных препаратах мембран. Эта возможность привлекла внимание исследователей ещё и потому, что существует гипотеза Watkins, базирующаяся на сходстве

структуры и распределения заряда в молекулах ГАМК и фосфатидилэтанолamina [26]. Сущность этой гипотезы состоит в том, что мембрана содержит комплексы между этим типом фосфолипидов и рецепторными белками, диссоциирующими в присутствии ГАМК. Это приводит к изменению проницаемости постсинаптических мембран для ионов. Следуя этой гипотезе, фосфолипиды, в частности фосфатидилэтанолamin, являются теми веществами, которые конкурируют с ГАМК за связывание с рецепторными участками.

Для решения вопроса о роли фосфолипидов в постсинаптической рецепции ГАМК было использовано 2 экспериментальных подхода. Прежде всего было изучено влияние экзогенных фосфолипидов (как суммарной фракции, так и отдельных типов) на рецепторное связывание ^3H -ГАМК с предварительно обработанными детергентом синаптическими мембранами головного мозга крыс. Оказалось, что фосфолипиды действительно снижают связывание меченого медиатора с рецепторными участками синаптических мембран, причём наибольшей ингибирующей активностью обладает именно фосфатидилэтанолamin [8, 20]. Однако полученные величины ингибирования оказались не очень значительными (10—30% по данным Toffano и соавт. [8]) и не вполне объясняли факт 2—3-кратного увеличения рецепторного связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами после их обработки детергентом.

Другим экспериментальным подходом, использованным для выяснения роли фосфолипидов в процессе постсинаптической рецепции ГАМК, было изучение связывания ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами после их обработки фосфолипазами. Если фосфолипиды действительно являются эндогенными ингибиторами ГАМК-рецепторов, то разрушение их фосфолипазами должно привести к возрастанию Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами. Однако полученные результаты достаточно противоречивы. Так, было показано, что обработка синаптических мембран фосфолипазой A_2 , катализирующей отщепление жирной кислоты в β -положении, приводит не к ожидаемому увеличению рецепторного связывания ^3H -ГАМК, а, напротив, к его снижению в 1,5—2 раза [8, 20]. Полученные результаты авторы связывают с действием продуктов гидролиза—лизосомальных фосфолипидов, которые, как известно, токсичны и вызывают разрушение мембран. Обработка синаптических мембран фосфолипазой C , отщепляющей фосфорилированные азотсодержащие спирты от молекул фосфолипидов, приводит к увеличению рецепторного связывания ^3H -ГАМК мембранами в 1,5—2 раза [8, 20]. В то же время аналогичная обработка не оказывает влияния на активность солибилизованного ГАМК-рецептора [27]. Фосфолипаза D , отщепляющая от молекул фосфолипидов азотсодержащие спирты, не влияет на Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами [8].

Таким образом, результаты работ, касающихся роли фосфолипидов в процессе постсинаптической рецепции ГАМК, неоднозначны.

Большинство авторов придерживается мнения, что фосфолипиды не являются ингибиторами, действующими непосредственно на участок связывания медиатора. Вероятнее всего, фосфолипиды косвенным образом регулируют доступность гидрофильных молекул ГАМК и её аналогов к участкам связывания за счёт увеличения их липидного окружения [8, 13, 28]. Не исключается также возможность, что ГАМК-связывающий компонент рецепторного участка является липопротеидом или липидзависимым белком [8], или сопрягающим фактором между рецептором и молекулой Cl^- -ионофора [29].

Пурины. В работе Ticku, Burch [24] было показано, что различные пурины (инозин, дезоксиинозин, гуаноксантин, теофиллин и аденозин) в концентрации 0,2—1 мМ дозозависимым образом ингибируют Na^+ -независимое связывание 3H -ГАМК с клеточными мембранами мозга крысы, в то время как тимин, сАМР и АТР не изменяют параметров связывания. Этим данным противоречат результаты, полученные Asano, Spector, которые не обнаружили влияния пуринов на связывание 3H -ГАМК с синаптическими мембранами [30].

Пептиды. В 1979 г. были опубликованы тезисы австралийских исследователей Johnston и Kennedy, где сообщалось о выделенном ими эндогенном ингибиторе связывания 3H -ГАМК с синаптическими мембранами мозга крысы, который являлся пептидом с M_r менее 1 кД, был анализируем, термостабилен (98°, 30 мин) и имел основной характер [23].

В 1983 г. Kuroda сообщил о выделении из супернатанта, полученного после обработки синаптических мембран мозга крысы 0,05%-ным тритоном X-100, эндогенного ингибитора рецепторного связывания 3H -ГАМК, который окрашивался реактивом Фоллина [12]. Гель-фильтрация супернатанта на сефадексе G-75 позволила установить, что вся ингибирующая активность элюировалась в общем объёме колонки, то есть её M_r составляла менее 3 кД. Дальнейшая очистка ингибитора и идентификация его природы не проводилась. Изучение кинетики ингибирования привело авторов к заключению, что данный ингибитор не идентичен эндогенной ГАМК, хотя кинетика ингибирования имеет конкурентный характер.

Низкомолекулярные факторы. В 1980 г. японскими исследователями Yoneda и Kuriyama из супернатанта, полученного после обработки синаптических мембран мозга крысы 0,01%-ным тритоном X-100, был выделен и частично очищен низкомолекулярный ингибитор Na^+ -независимого связывания 3H -ГАМК [11]. По данным ультрафильтрации, M_r этого ингибитора составила менее 0,5 кД. Было показано, что добавление его к препаратам синаптических мембран дозозависимым образом снижает Na^+ -независимое связывание 3H -ГАМК за счёт уменьшения чувствительности рецептора к медиатору и его агонистам без изменения числа участков связывания (то есть, ингибирование имеет некокурентный характер). Это вещество, названное авторами GRIF (GABA-receptor inhibiting factor), термостабильно (95°, 10 мин),

нечувствительно к трипсину, коллагеназе, проназе и фосфолипазе С, имеет основной характер и не идентично ГАМК и фосфатидилэтаноламину. Его содержание в мозгу крысы изменяется при экспериментальных воздействиях на ЦНС. Дегенерация нейронов стриатума через 7 дней после инъекции каннтовой кислоты в эту структуру мозга сопровождалась снижением ингибирующей активности GRIF, выделенного из стриатума. Этот факт авторы полагают ведущим в феномене денервационной чувствительности ГАМК-рецепторов, который развивается после введения каннтовой кислоты в данную структуру [11].

Обнадёживающее начало по очистке и идентификации природы этого ингибирующего фактора не нашло пока своего продолжения— в 1982 г. была опубликована статья той же группы авторов, в которой по-прежнему лишь констатировалось существование термостабильного и диализуемого ингибитора в супернатанте после осаждения мембран, обработанных солюбилизирующими концентрациями тритона X-100 (1%), который не осаждался при 40%-ном насыщении сульфатом аммония [27]. Интересно, что малые количества этого неочищенного вещества после диализа, напротив, в 1,7—2 раза увеличивали связывание агониста ГАМК ^3H -мусцимола с солюбилизованным ГАМК-рецептором. Это, по-видимому, указывает на присутствие в супернатанте после обработки мембран детергентом недиализуемых веществ, стимулирующих рецепцию агонистов ГАМК солюбилизованным рецепторным комплексом.

Белки. В 1978 г. появились первые работы группы американских исследователей во главе с Costa E., в которых сообщалось о выделенном эндогенном белковом ингибиторе Na^+ -независимого связывания ГАМК, неконкурентно блокировавшем высокоаффинные рецепторные участки: он был назван авторами ГАМК-модулином [7,21]. В дальнейшем этот белок был полностью очищен и получены следующие критерии его гомогенности: 1) при электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС- Na выявлялась 1 полоса, соответствующая величине M_r 17 кД; 2) жидкостная хроматография высокого давления обнаруживала только 1 пик; 3) анализ С-концевых групп показал присутствие только гистидина, причём его карбоксильная группа была свободна [22].

В качестве исходного материала для получения ГАМК-модулина был использован гомогенат цельного мозга крысы. Первые этапы очистки основаны на термостабильности и кислотоустойчивости ингибитора: гомогенизация мозга в горячей (80°) 1 М уксусной кислоте денатурирует значительное количество примесных белков. Растворенный в 1 М уксусной кислоте ингибитор далее был фракционирован путём ступенчатого насыщения сульфатом аммония (осаждался при 60%-ном насыщении). Последующая гель-фильтрация на сефадексах G-75 и G-100, уравновешенных 0.1 М уксусной кислотой, позволила получить 500-кратную очистку ингибитора. Полученный на этой стадии очистки

ингибитор содержал ещё 30—40% примесных компонентов. Окончательная очистка ГАМК-модулина (800-кратная по отношению к исходному гомогенату) была достигнута с помощью жидкостной хроматографии высокого давления [22].

Аминокислотный анализ ГАМК-модулина выявил отсутствие цистеина и высокое содержание гидрофильных остатков основных аминокислот, так что белок в целом имел основной характер. Ингибирующая активность ГАМК-модулина полностью терялась после его обработки протеолитическими ферментами трипсином и химотрипсином.

Изучение кинетики влияния очищенного ГАМК-модулина на Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами мозга крысы показало, что в концентрации более 0,5 мкМ он неконкурентно, за счёт, вероятно, аллостерических взаимодействий, снижает число высокоаффинных участков связывания ^3H -ГАМК, не влияя на низкоаффинное связывание этого лиганда. Кривая ингибирующего влияния ГАМК-модулина имеет характер насыщения, при этом максимальное ингибирование, составляющее не более 50% от исходных значений, достигается в присутствии 1—5 мкМ ГАМК-модулина. Оказалось, что действие этого ингибитора специфично для Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК и её аналогов, но не распространяется на связывание ^3H -диазепама, ^3H -эторфина, ^3H -имипрамина и ^3H -аденозина с синаптическими мембранами. В то же время ГАМК-стимулируемое связывание ^3H -диазепама снижалось под влиянием ГАМК-модулина [22].

Авторы провели тщательную проверку способности ГАМК-модулина связывать ГАМК. Оказалось, что даже в высоких концентрациях (100 мкг) этот белок не связывает сколько-нибудь значительное количество меченого медиатора.

Изучение влияния других основных белков, сходных по величине M_r с ГАМК-модулином, на способность изменять связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами, показало, что ни альбумин (до 5 мг/мл), ни лизоцим (до 100 мкг/мл), ни гистоны (до 100 мкг/мл), ни низкомолекулярный миелиновый основной белок не изменяют величину связывания этого медиатора [22].

Существование ГАМК-модулина было продемонстрировано также в мембранах клонируемых клеток нейробластомы NB_{2a} и глиомы C_6 , причём его относительная активность в культурах этих клеток в 2—2,5 раза выше, чем в головном мозгу крыс [32]. Как на культурах клеток, так и на синаптических мембранах из мозга было показано, что ингибирующее действие ГАМК-модулина на рецепторное связывание ^3H -ГАМК полностью устраняется диазепамом (10^{-6} М)—веществом из класса бензодиазепинов, которые, как известно, усиливают связывание ГАМК с рецептором и имеют вследствие этого широкое фармакологическое применение [32]. Авторы высказывают предположение, что механизм потенцирующего влияния бензодиазепинов на связывание ГАМК с рецептором осуществляется посредством их влияния на активность ГАМК-модулина.

С помощью очищенного и помеченного ^{125}J ГАМК-модулина было рассчитано, что концентрация этого ингибитора в мозгу крысы составляет около 6 мкМ, то есть его физиологические концентрации более чем достаточны для ингибирования постсинаптических ГАМК-рецепторов [22]. Распределение ГАМК-модулина в различных отделах мозга неравномерно: наиболее высоко его содержание в мозжечке [22], где отмечается и наибольшее содержание ГАМК-рецепторов [2]. Интересно, что ГАМК-модулин обнаружен и в печени крыс [7, 22], несмотря на отсутствие там ГАМК-рецепторов, хотя содержание его в этом органе значительно ниже, чем в мозгу [22].

Предварительные опыты показали, что введение очищенного ГАМК-модулина в желудочки мозга крыс усиливает судороги, вызванные действием изониазида, что, вероятно, обусловлено снижением действия эндогенной ГАМК, освобождаемой нервным импульсом [22].

В последующей работе Costa и соавт. было показано, что ингибирующая активность ГАМК-модулина исчезает после фосфорилирования этого белка сАМР-зависимой протенинкиназой *in vitro* [31]. Кальмодулинчувствительная протенинкиназа *in vitro* также фосфорилирует ингибитор, однако при этом его активность не изменяется, то есть различные протенинкиназы фосфорилируют функционально различные участки ГАМК-модулина. Эндогенные протенинкиназы, активируемые сАМР, Ca^{2+} и кальмодулином, также оказались способны фосфорилировать ингибитор. На основании полученных данных высказано предположение, что *in vivo* фосфорилированию ГАМК-модулина принадлежит важная роль в регуляции числа участков связывания ГАМК на постсинаптической мембране [31].

Завершением работ цитированной группы авторов явилась гипотеза, согласно которой ГАМК-модулин является интегральным компонентом постсинаптического рецептора ГАМК, который *in vivo* с помощью аллостерического механизма регулирует сродство рецептора к его эндогенному эффектору, опосредует потенцирующее действие бензодиазепинов на связывание ГАМК и, возможно, является посредником между участком связывания медиатора и Cl^- -ионофором [33].

Хотя работы группы Costa E. по изучению эндогенных белковых ингибиторов постсинаптических ГАМК-рецепторов производят впечатление наиболее последовательных, детальных и логически привлекательных, их теория пока не получила всеобщего признания. Попытка воспроизвести результаты их работ в других лабораториях пока не удалась [19]. Одним из вероятных объяснений этого может быть возможность разрушения высокомолекулярного белкового ингибитора под воздействием эндогенных протеаз на низкомолекулярные компоненты, которые, в свою очередь, способны изменять Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК. В частности, в одной из работ тех же авторов было продемонстрировано существование диализуемого низкомолекулярного ингибитора неидентифицированной природы, который неконкурентно блокировал рецепторное связывание ^3H -ГАМК с синаптиче-

скими мембранами коры мозга, не разрушался протеолитическими ферментами и обладал способностью связывать ГАМК [10]. Кроме того, нельзя исключить и другую возможность, а именно агрегацию низкомолекулярных ингибиторов ГАМК-рецепторов в высокомолекулярные комплексы в ходе выделения и последующей очистки.

Обобщая имеющиеся в литературе данные, можно заключить, что в ЦНС животных в качестве интегрального компонента синаптических мембран или примембранных слоев присутствуют вещества, ингибирующие связывание ^3H -ГАМК с постсинаптическими рецепторами, однако вопросы о природе этих ингибиторов, механизме ингибирования и их роли в функционировании рецепторов *in vivo* до сих пор остаются неясными. Несомненно, что одним из таких веществ является эндогенная ГАМК, конкурентно блокирующая связывание ^3H -ГАМК с рецепторными участками (её можно назвать ложным или кажущимся ингибитором). Обнаружены также вещества, способные к некокурентному ингибированию Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК. Различные группы авторов считают, что этими веществами могут быть фосфолипиды, пурины, пептиды, белки и низкомолекулярные факторы неидентифицированной природы. Однако наиболее вероятно, что фосфолипиды модифицируют работу ГАМК-рецепторов постсинаптических мембран, регулируя доступность молекул медиатора к участкам связывания и не являются истинными эндогенными ингибиторами. Вопрос о роли пуринов в работе ГАМК-ергических нейронов весьма проблематичен; вероятно, пурины являются эндогенными лигандами безодназелинового рецептора, функционально сопряженного с ГАМК-рецептором, и таким образом могут оказывать косвенное влияние на связывание ГАМК с рецепторными участками. Предположение о роли низкомолекулярных веществ в регуляции постсинаптической рецепции ГАМК пока не получило окончательного экспериментального подтверждения. Наиболее убедительны в настоящее время данные о том, что эндогенным ингибитором ГАМК-рецептора является ГАМК-модулин—термо- и кислотоустойчивый белок с величиной M_r 17 кД, в концентрации более 0,5 мкМ некокурентно ингибирующей Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами. Активность ГАМК-модулина изменяется за счёт его фосфорилирования cAMP-зависимой протеинкиназой. Не исключается возможность того, что этот белок является предшественником низкомолекулярных эндогенных ингибиторов постсинаптической рецепции ГАМК.

Эндогенные ингибиторы других рецепторов. Вопрос о существовании эндогенных ингибиторов и их роли в функционировании постсинаптических рецепторов впервые был поставлен при изучении ГАМК-рецепторов. Однако в последнее время появились работы, в которых указывается на существование эндогенных ингибиторов и для других рецепторов. Так, Zashke и соавт. сообщили о выделении из мозга крыс вещества, специфически ингибирующего связывание L^3H -глутамата с синаптическими мембранами [34]. Это вещество было полностью

очищено с помощью методов ионообменной хроматографии на Dowex и жидкостной хроматографии высокого давления. Им оказался пептид с блокированной аминной группой—N-ацетиласпартилглутамат. Этот пептид связывается только с глутаматными рецепторами и не оказывает влияния на специфическое связывание других нейромедиаторов с ГАМК-, мускариновыми и дофаминовыми рецепторами. При ионофоретическом введении он оказывает действие на кортикальные нейроны. Обсуждая физиологическую роль N-ацетиласпартилглутамата в функционировании глутаматных рецепторов, авторы высказывают предположение, что эндогенными возбуждающими нейромедиаторами являются не непосредственно аспартат и глутамат, а NH_2 -блокированные пептиды, обогащенные этими кислыми аминокислотами [34]. Однако, возможно, эти пептиды являются эндогенными ингибиторами глутаматных рецепторов.

Недавно было обнаружено, что супернатант, полученный при высокоскоростном центрифугировании гомогената мозга крыс, обладает ингибирующим влиянием на связывание α -бунгаротоксина с синаптическими мембранами [35]. Вместе с тем, эта неочищенная фракция не влияла на связывание меченых медиаторов или их аналогов с дофаминовыми, α_1 -адренергическими и мускариновыми холинергическими рецепторами. Полученные данные авторы обсуждают в плане существования эндогенных лигандов для α -бунгаротоксиновых рецепторов.

Показано также существование эндогенного ингибитора рецепторного связывания бензодиазепинов в ЦНС крыс. Полагают, что им является термостабильное вещество с величиной M_r от 2 до 10 кД (по данным ультрафильтрации), которое увеличивает K_d и снижает общее число мест связывания ^3H -дiazепама с синаптическими мембранами [36]. Эндогенный ингибитор бензодиазепиновых рецепторов, полученный в очищенном виде Guidotti и соавт. представляет собой полипептид с величиной M_r 11 кД, чувствительный к протеолитическим ферментам, с высоким содержанием кислых аминокислот, концевая аминная группа которого блокирована. Этот полипептид конкурентно ингибирует связывание меченых лигандов бензодиазепиновых рецепторов и не влияет на связывание ГАМК, аденозина и эторфина. Исходя из конкурентного характера ингибирующего действия, авторы заключают, что обнаруженное вещество является эндогенным лигандом бензодиазепиновых рецепторов и может играть модулирующую роль в тонкой настройке ГАМК-рецептора [37].

Таким образом, в последние годы показано, что в мозгу крыс присутствуют вещества, ингибирующие связывание меченых медиаторов, их агонистов или антагонистов с ГАМК-рецепторами, глутаматными рецепторами, рецепторами α -бунгаротоксина, бензодиазепиновыми рецепторами. Эти вещества могут быть как эндоген-

ными липандами перечисленных рецепторов (тогда кинетика ингибирования имеет конкурентный характер), так и эндогенными ингибиторами рецепторов (кинетика ингибирования в этом случае может иметь как конкурентный, так и неконкурентный характер). В настоящее время вопрос о роли этих веществ в функционировании постсинаптических рецепторов нейромедиаторов и их природе только поставлен. Решение его будет способствовать пониманию регуляции синаптической передачи на уровне постсинаптических мембран и, возможно, откроет новые пути направленных фармакологических воздействий на ЦНС.

ENDOGENOUS INHIBITORS OF POST-SYNAPTIC GABA RECEPTORS IN MAMMALIAN BRAIN

PARFENOVA E. V.

Department of Morphology, Institute of Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Modern controversial data on the nature of endogenous modulators inhibiting specific Na^+ -independent ^3H -GABA binding to its post-synaptic receptors in mammalian brain is discussed. The existence of endogenous inhibitors of the post-synaptic receptors of some neurotransmitters other than GABA is considered. It is proposed that in vivo endogenous inhibitors affect the synaptic transmission on the post-synaptic membrane level.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peck E. I., Schaeffer I. M., Clark J. H. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 52, p. 394—400, 1973.
2. Zukin S. R., Young A. B., Snyder S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 71, p. 4802—4807, 1974.
3. Greenlee D. V., Van Ness P. C., Olsen R. W. *J. Neurochem.*, v. 31, p. 933—933, 1978.
4. Lester B. L., Peck E. J. *Brain Res.*, v. 161, p. 79—97, 1979.
5. Van Ness P. C., Olsen R. W. *J. Neurochem.*, v. 33, p. 593—596, 1979.
6. Olsen R. W., Bergman M. O., Van Ness P. C., Lummis S. C., Watkins A. E., Naptas C., Greenlee D. V. *Mol. Pharmacol.*, v. 19, p. 217—227, 1981.
7. Toffano G., Guidotti A., Costa E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 75, p. 4024—4028, 1978.
8. Toffano G., Aldinio C., Batzano M., Leon A., Savoini G. *Brain Res.*, v. 222, p. 95—102, 1981.
9. Bowery N. G., Hill D. R., Hudson A. L. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 78, p. 191—206, 1983.
10. Massotti M., Mazzari S., Schmid R., Guidotti A., Costa E. *Neurochem. Res.*, v. 6, p. 551—565, 1981.
11. Yoneda Y., Kuriyama K. *Nature*, v. 285, p. 670—673, 1980.
12. Kuroda H. *Acta Med. Okayama*, v. 37, p. 93—106, 1983.
13. Lloyd K., Davidson L. *Science*, v. 205, p. 1147—1149, 1979.
14. Skerritt J. H., Johnson G. A. *Dev. Neurosci.*, v. 5, p. 189—197, 1982.

15. *Palacios J. M., Nichoff D. L., Kuhar M. J. Brain. Res.*, v. 179, p. 390—395, 1979.
16. *Greenlee D. V., Van Ness P. C., Olsen R. W. Life Sci.*, v. 22, p. 1653—1662, 1978.
17. *Napias C., Bergman M. O., Van Ness P. C., Greentee D. V., Olsen R. W. Life Sci.*, v. 27, p. 1001—1011, 1980.
18. *Gardner C. R., Klein J., Grove J. Eur. J. Pharmacol.*, v. 75, p. 83—92, 1981.
19. *Lagoś N., Valdes F., Orrego F. Neurochem. Int.*, v. 5, p. 325—331, 1983.
20. *Giambalvo C. T., Rosenberg F. J. Biochim. et biophys. acta*, v. 436, p. 741—756, 1976.
21. *Guidotti A., Toffano G., Costa E. Nature*, v. 275, p. 553—555, 1978.
22. *Guidotti A., Konkel D. R., Ebstein R., Corda M. G., Wise B. C., Krutzsch H., Meek J. L., Costa E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 6084—6088, 1982.
23. *Johnston G. A., Kennedy S. M. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 6, p. 686—687, 1979.
24. *Ticku M. K., Burch T. Biochem. Pharmacol.*, v. 29, p. 1217—1220, 1980.
25. *Koide B., Florey E. Comp. Biochem. and Physiol.*, v. 51 C, p. 13—23, 1975.
26. *Watkins J. C. J. Theor. Biol.*, v. 9, p. 37—49, 1965.
27. *Ito Y., Kuriyama K. Brain. Res.*, v. 236, p. 351—363, 1982.
28. *Nishimura C., Ohkuma S., Tamura J., Kuriyama K. Neurochem. Inten.*, v. 4, p. 413—418, 1982.
29. *Fujimoto M., Okabayashi T. Life Sci.*, v. 32, p. 2393—2400, 1983.
30. *Asano T., Spector G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 977—989, 1979.
31. *Wise B. C., Guidotti A., Costa E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 886—890, 1983.
32. *Baraldi M., Guidotti A., Schwartz J. P., Costa E. Science*, v. 205, p. 821—823, 1979.
33. *Costa E.*—In: *Receptor as supramolecular entities* (eds. G. Biggio, E. Costa), p. 213—235, Pergamon Press, 1983.
34. *Zaczek R., Koller K., Cotter R., Heller D., Coyle J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 1116—1119, 1982.
35. *Quik M. Brain Res.*, v. 245, p. 57—65, 1982.
36. *Корнеев А. Я., Фактор М. И. Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 7, с. 64—65, 1983.
37. *Guidotti A., Forchetti C. M., Corda M. G., Konkel D., Bennett C. D., Costa E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 3531—3535, 1983.

Поступила 27. VIII 1985