

ДЕЙСТВИЕ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И ДРУГИХ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ НА СПОНТАННЫЙ ВЫХОД НОРАДРЕНАЛИНА ИЗ СРЕЗОВ МЕЗО-ДИЭНЦЕФАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС

Л. Н. АРАКЕЛЯН, Н. А. ЕСАЯН

Исследовалось действие нейроактивных аминокислот— γ -аминомасляной, γ -оксимасляной, глутаминовой, аспарагиновой, глицина, β -аланина и таурина на спонтанный выход эндогенного и экзогенного норадреналина из срезов мезо-диэнцефальной области мозга крыс. Результаты приводят к предположению о непосредственном воздействии на этот процесс γ -аминомасляной, γ -оксимасляной и дикарбонных аминокислот путем связывания с рецепторами γ -аминомасляной кислоты на норадренэргических нервных окончаниях.

Установлено, что некоторые нейроактивные аминокислоты наряду с участием в процессах обмена играют также роль нейромедиаторов как в периферических, так и в центральных синапсах. В центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих γ -аминомасляная кислота (ГАМК), γ -оксимасляная кислота (ГОМК), глицин, β -аланин, таурин считаются тормозными, а глутаминовая и аспарагиновая кислоты возбуждающими нейромедиаторами [1—4]. Электрофизиологические данные последних лет свидетельствуют о том, что ГАМК кроме тормозного эффекта оказывает также деполяризующее действие на нейрональную мембрану, в том числе и на норадренэргические нейроны определенных участков ЦНС и периферии [5—10].

Нами установлено, что ГАМК может играть также определенную роль в пресинаптической регуляции высвобождения нейромедиаторов. Было показано, что при внутрибрюшинном (5 мг/кг) и внутрикаротидном (0,5 мг/кг) введении ГАМК содержание норадреналина (НА) статистически достоверно уменьшается в определенных отделах мозга и в периферических органах, богатых норадренэргическими нервными окончаниями [11], увеличивается содержание норметанефрина в мозге [12] и снижается количество НА в неочищенной митохондриальной [11] и синаптосомальной [13] фракциях мозга. Исследованиями *in vitro* [14] установлено усиление потерь НА из срезов коры и мезо-диэнцефальной области мозга, инкубированных в присутствии ГАМК (10^{-3} — $3 \cdot 10^{-3}$ М). Эти данные, а также отсутствие эффекта ГАМК на синтез и захват НА [11, 14] приводят к предположению о ее воздействии именно на высвобождение НА. Блокирование эффекта ГАМК на потери НА из срезов под действием биккуллина [15] предполагает

наличие рецепторов ГАМК на норадренергических нервных окончаниях. Эти данные, указывающие на прямое действие ГАМК на норадренергические нервные окончания, свидетельствуют об ее участии в пресинаптической регуляции высвобождения НА.

В свете возрастающей роли определенных нейроактивных аминокислот в нейрональной функции интересно было изучить действие этих соединений на пресинаптическую регуляцию высвобождения НА мозговой ткани. Нами исследовалось действие ГАМК, ГОМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот, глицина, β -аланина и таурина на спонтанный выход эндогенного и меченого НА из срезов мезо-диэнцефальной области мозговой ткани крыс.

Материал и методика. В работе использовали ГАМК фирмы Reanal; ГОМК, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, глицин, β -аланин, таурин, ипрониазид фосфат, аскорбиновую кислоту, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) и бикуккуллин фирмы Sigma Chemical Co; меченый 1-[7- ^3H]-норадреналин (^3H -НА) с удельной активностью 8,9—10,8 Кюри/ммоль фирмы Amersham Radiochemical Centre, Англия. Метилйодид бикуккуллина получали растворением бикуккуллина в йодистом метиле с последующей экстракцией водой.

Опыты проводили на белых крысах весом 120—150 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Мозг быстро извлекали в холодных условиях. В экспериментах, поставленных с целью определения сдвигов в содержании эндогенного НА, 200 мг срезов мезо-диэнцефальной области мозга крыс инкубировали в 3 мл среды при 37° в течение 30 мин в Krebs-бикарбонатном буфере, насыщенном O_2 —95% и CO_2 —5% со следующим солевым составом, в ммслях: NaCl —113; KCl —4,7; KH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; NaHCO_3 —25; CaCl_2 —2,5 и глюкоза—11,5, pH 7,4. После инкубации содержимое каждого сосудика центрифугировали 5 мин при 9000 g, осадок гомогенизировали в 3 мл 0,4 N перхлорной кислоты и снова центрифугировали 10 мин при 9000 g. Содержание эндогенного НА определяли по методу Бертлера и др. [16] на спектрофотометре фирмы Farrand Optical Co.

В опытах с определением спонтанного выхода меченого НА Krebs-бикарбонатный буфер содержал также аскорбиновую кислоту (0,2 мг/мл). Для определения потерь ^3H -НА из ткани срезы мезо-диэнцефальной области мозга (15 мг) помещали в нейлоновые мешочки и после предварительного 5-минутного инкубирования при 37° в буфере, содержащем ЭДТА (0,05 мг/мл) и ипрониазид фосфат (0,47 мг/мл), добавляли меченый НА в конечной концентрации 10^{-7} M. Инкубацию продолжали еще 30 мин, после чего срезы промывали 3 раза по 2 мин холодной инкубационной средой. Затем вновь инкубировали в течение 30 мин при 37° в сосудах, содержащих по 2 мл буфера с нейрорастворимыми аминокислотами. По окончании инкубации их помещали в кюветы с 1 мл абсолютного этанола и через 18—24 час. добавляли по 10 мл сцинтилляционной жидкости следующего состава: нафталина—100 г, PPO—7 г, POPOP—300 мг в 1 л диоксана. Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре SL—30, фирмы Intertechnique, Франция.

При изучении спонтанного выхода ^3H -НА в среду срезы после промывки помещали в специально приготовленные держатели и через каждые 2 мин переносили из одной инкубационной кюветы в другую. В кюветы, содержащие по 2 мл буфера, при необходимости добавляли также исследуемую аминокислоту—аспарагиновую или глутаминовую. Затем в них наливали по 0,5 мл абсолютного этанола, через час добавляли 10 мл сцинтилляционной смеси и измеряли радиоактивность.

Результаты и обсуждение. Результаты опытов *in vitro*, в которых определяли потери эндогенного НА под действием ГАМК, глутаминовой, аспарагиновой кислот, глицина, таурина и β -аланина показали,

что эквивалентные концентрации дикарбоновых аминокислот (10^{-3}), подобно ГАМК, приводят к усилению потерь НА из срезов. Спонтанный выход последней под действием ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот составлял соответственно 14, 17, и 11%. Прибавление нейтральных аминокислот в тех же концентрациях не оказывало заметного действия на изученный процесс (рис. 1, А). Потери эндогенного НА

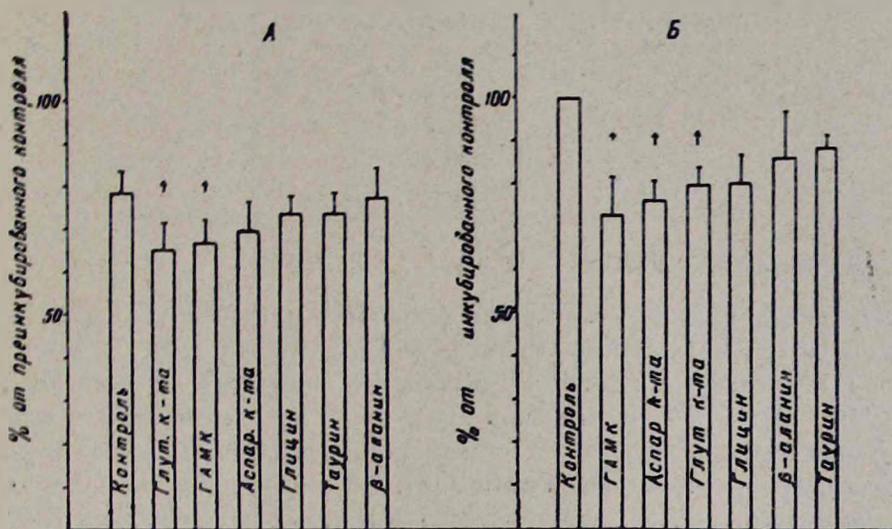


Рис. 1. Действие нейрозактивных аминокислот (10^{-3} М) на потери эндогенного—А и экзогенного—Б НА из мезо-диэнцефальных срезов мозговой ткани крыс. Достоверность: $\pm P < 0,05$.

(рис. 1 А) выражали в процентах от преинкубированного контролл, который равен $0,613 \pm 0,019$ мкг/г свежей ткани (средние данные 10—17 опытов).

Усиление потерь вновь аккумулированного меченого НА из срезов наблюдалось только под действием кислых аминокислот. Статистически достоверное усиление потерь ^3H -НА из срезов отмечено при добавлении ГАМК—27%, глутаминовой—16% и аспарагиновой—23% кислот. Глицин вызывал заметное усиление потерь ^3H -НА, однако этот эффект сильно варьирующий, поэтому не поддается статистической обработке. β-аланин и таурин не оказали сколько-нибудь заметного действия на изученные явления (рис. 1, Б). Потери ^3H -НА выражали в процентах от инкубированного контролл, который равен 1680 ± 141 пкКюри/мг ткани (средние данные 9—19 опытов). Таким образом, из полученных результатов видно, что действие ГАМК имитируется только дикарбоновыми аминокислотами.

Изучение концентрационной кривой эффекта ГАМК на потери ^3H -НА (таблица) показало, что статистически достоверный эффект действия ГАМК обнаруживается при концентрациях 10^{-6} — 10^{-3} М. При концентрации же 10^{-2} , 10^{-7} и 10^{-8} М ГАМК почти не влияет на потери меченого НА из мезо-диэнцефальных срезов. Эти данные хорошо

Таблица
 Действие различных концентраций ГАМК и ГОМК на
 потери ^3H -НА из мезо-диэнцефальных срезов

Концентрация, моль	ГАМК	ГОМК
Контроль	100±6,4	100±6,43
10 ⁻⁸	92,4±13,6	-----
10 ⁻⁷	89,3±3,6	-----
10 ⁻⁶	80,4±5,8*	-----
10 ⁻⁵	77,7±4,5**	91,38±7,1
10 ⁻⁴	77,4±4,9**	86,34±5,94
10 ⁻³	71,0±4,5***	77,45±7,58*
10 ⁻²	92,6±12	-----

Достоверность: * P<0,05; ** P<0,025; *** P<0,005.

согласуются с результатами ранее поставленных экспериментов по изучению воздействия ГАМК на потери эндогенного НА [11].

Из литературных данных известно, что природный продукт обмена ГАМК—ГОМК, обнаруженный в мозге крыс, кролика и морской свинки, обладает центральным действием [17] через прямое или не прямое активирование рецепторов ГАМК [18]. Об этом свидетельствуют также результаты наших экспериментов, в которых под действием ГОМК только в концентрации 10⁻³ М был обнаружен достоверный эффект на потери ^3H -НА из мозговых срезов (таблица). Данные таблицы выражены в процентах от инкубированного контроля, который равен соответственно для ГАМК 1542,4±99 и для ГОМК—501±28,2 пкКюри/мг ткани (средние данные 9—13 опытов).

Поскольку только кислые аминокислоты—глутаминовая и аспарагиновая—имитировали эффект ГАМК на потери меченого НА (рис. 1, А и Б), было интересно вывести концентрационные кривые воздействия этих кислот на спонтанный выход ^3H -НА в инкубационную среду. Полученные результаты (средние данные 5—8 опытов) показали, что усиление спонтанного выхода ^3H -НА проявляется только при применении аспарагиновой кислоты в концентрации 10⁻³ М (16%) (рис. 2), а глутаминовой уже при 10⁻³ М (14%) (рис. 3) и особенно сильно при концентрации 3·10⁻³ М (30%). Данное явление под действием ГАМК, ГОМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот указывает на деполяризацию норадренэргических нервных окончаний.

Давидофф [5], Баркер и Николл [6], Дэвидсон и др. [7] в своих работах показали деполяризацию первичных афферентных волокон изолированного ганглия заднего корешка спинного мозга лягушки не только от ГАМК, но и от дикарбоновых аминокислот и глицина. Для интерпретации результатов, полученных нами, следует сослаться на интересные исследования Де Гроут и др. [8, 9], Бавери и Браун [10], которые обнаружили эффект деполяризации ганглионарных клеток верх-

них симпатических узлов при тех же концентрациях ГАМК, которые использовались в наших опытах *in vivo* и *in vitro*.

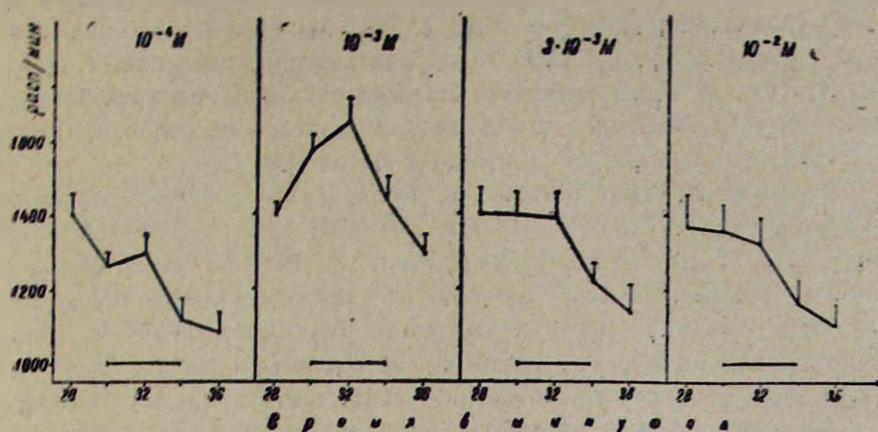


Рис. 2. Спонтанный выход ^3H -НА из мезо-диэнцефальных срезов, инкубированных в присутствии разных концентраций аспарагиновой кислоты. — аспарагиновая кислота. На оси абсцисс время в мин; на оси ординат содержание ^3H -НА в 2-х мл среды, расп/мин.

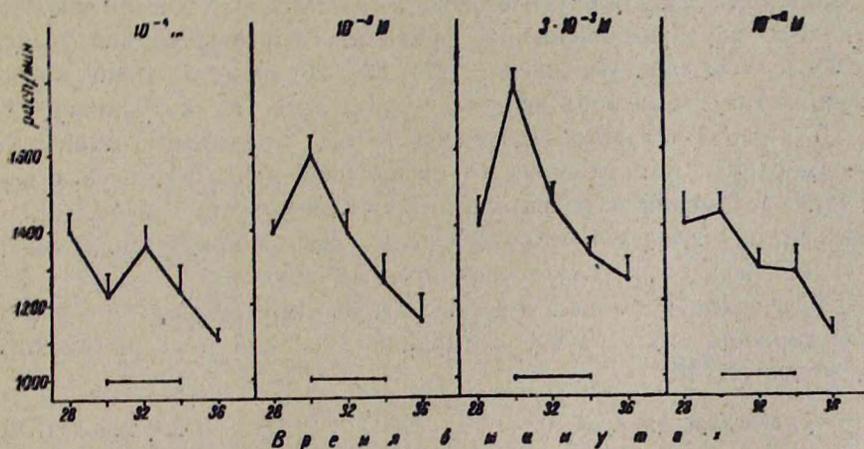


Рис. 3. Спонтанный выход ^3H -НА из мезо-диэнцефальных срезов, инкубированных в присутствии разных концентраций глутаминовой кислоты. — глутаминовая кислота. Обозначения те же, что на рис. 2.

Сопоставление литературных данных с результатами наших исследований приводит к предположению о деполаризующем эффекте ГАМК не только в отношении норадренэргических нейронов, но и норадренэргических нервных окончаний, вследствие чего усиливается выход НА. Полученные результаты наводят на мысль о прямом действии ГАМК, ГОМК и дикарбоновых аминокислот на норадренэргические нервные окончания и говорят о модуляторной роли этих аминокислот в пресинаптической регуляции спонтанного выхода НА.

Установлено, что тормозящий эффект ГАМК ингибируется пикротоксином и биккуллином [3, 19]. Подобное явление на спонтанный выход НА и ^3H -НА из мозговых срезов было обнаружено нами при малых концентрациях биккуллина ($3 \cdot 10^{-6}$ М) [15, 20], что указывает на наличие рецепторов ГАМК на норадренэргических нервных окончаниях. Исходя из этого, интересно было изучить блокирование биккуллином эффекта аминокислот, оказывающих, по нашим данным, (подобно ГАМК) воздействие на спонтанный выход НА.

В следующей серии опытов мы исследовали действие глутаминовой, аспарагиновой кислот и ГОМК (10^{-3} М) на потери ^3H -НА из срезов в присутствии метйодид биккуллина ($3 \cdot 10^{-6}$ М). Полученные результаты показали полное торможение эффектов ГОМК—102%, аспарагиновой кислоты—102% и частичное—глутаминовой—87%. Неполное блокирование эффекта глутаминовой кислоты метйодид биккуллином, по всей вероятности, можно объяснить тем, что часть ее действует на процесс высвобождения либо опосредовано, после предварительного превращения в ГАМК, либо же благодаря связыванию глутаминовой кислоты с рецепторами ГАМК. В связи с этим можно предположить также существование рецепторов глутаминовой кислоты (наряду с рецепторами ГАМК) на норадренэргических нервных окончаниях. В литературе есть данные, указывающие на наличие в мышцах ракообразных двух различных белковых фракций, специфически связывающих ГАМК и глутаминовую кислоту [21, 22]. В мозговой ткани млекопитающих этим же автором не удалось разделить эти две фракции [23].

Для окончательного заключения о том, что действие вышеуказанных нейроактивных аминокислот на высвобождение НА осуществляется через связывание с рецепторами ГАМК, необходимо проведение специальных исследований их конкурентного связывания, а также изучение роли специфических блокаторов этих аминокислот.

За оказанную помощь в работе с мечеными препаратами приносим благодарность мл. научн. сотруднику лаборатории радиоизотопов Геворкяну Г. А.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 20.11 1978 г.

**ԳԱՄԱ-ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹՔՎԻ ԵՎ ԱՅԼ ԵՑՐՈԱԿՏԻՎ
ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ
ՄԵԶՈԴԻԷՑԵՑԱԼԻԿ ՀԱՏՎԱԾԻ ԿՏՐՎԱԾՔՆԵՐԻՑ
ՆՐԱԴՐԵՆԱԼԻՆԻ ՍՊՈՆՏԱՆ ԱՆՋԱՄԱՆ ՎՐԱ**

Լ. Ե ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ, Ե. Հ. ՆՍԱՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է առնետի ուղեղի մեզոգլիէնցեֆալիկ հատվածի կտրր-վածքներից էնդոգեն և էկզոգեն նորադրենալինի (ՆԱ) սպոնտան անջատման վրա ԳԱԿԹ-ի, Գ-Հիդրոքսիկարազաթթվի, գլուտամինաթթվի, ասպարազինա-

ՔՔՎԻ, զլիցինի, β -ալանինի, տաուրինի ազդեցությունը: Ստացված արդյունքները հանդեսնում են այն ենթադրության, որ ԳԱԿԹ-ը, γ -հիդրօքսիկարագաթթուն և դիկարբոնային ամինաթթուներն ազդում են նԱ-ի անջատման վրա՝ անմիջականորեն կապվելով նորադրենէրգիկ ներվային վերջույթների վրա գտնվող ԳԱԿԹ-ի ռեցևյատորների հետ, որը վկայում է նԱ-ի սպոնտան անջատման վրա նրանց ունեցած մոդուլատոր դերի մասին:

THE EFFECT OF GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID AND OTHER NEUROACTIVE AMINO-ACIDS ON THE SPONTANEOUS RELEASE OF NORADRENALINE FROM SLICES OF RAT BRAIN MESODIENCEPHALIC REGION

L. N. ARAKELIAN, N. H. YESSAIAN

The effect of γ -aminobutyric acid (GABA), γ -hydroxybutyric acid, glutamic acid, aspartic acid, glycine, β -alanine and taurine on the spontaneous release of endogenous and exogenous noradrenaline from slices of rat brain mesodiencephalic region has been studied.

The obtained results indicate that GABA, γ -hydroxybutyric acid and the dicarboxylic aminoacids affect the spontaneous release of noradrenaline by binding to GABA receptors on noradrenergic nerve endings and thus may have a modulatory role in the release of noradrenaline.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Aprison M. N., Shank R. P., Davidoff R. A., Werman R. Abstr. XXIV, Int. Congr Physiol., 7, 47, 1968. |
2. Curtiss D. R., Hostil L., Johnston G. A. R., Johnston I. H. Expl. Brain Res., 2, 235, 1968.
3. Curtiss D. R., Duggan A. W., Felix D., Johnston G. A. R. Nature, Lond. 226, 1222, 1970.
4. Curtiss D. R., Duggan A. W., Felix D., Johnston G. A. R., Tebecis A. K. Brain Res., 33, 57, 1971.
5. Davidoff R. A. Science, N. Y., 175, 331, 1972.
6. Barker J. L., Nicoll R. A. Science, N. Y., 176, 1043, 1972.
7. Davidson N., Southwick C. A. R. J. Physiol., L. 210, 172 P, 1970.
8. De Groat W. C. J. Pharmac. Exp. Ther., 172, 384, 1970.
9. De Groat W. C., Lalley P. M., Saum W. R. Brain Res., 44, 273, 1972.
10. Bowers N. G., Brown D. A. Br. J. Pharmacol., 50, 205, 1974.
11. Есаян Н. А. Докт. дисс., Ереван, 1971.
12. Yessaian N. H., Arakelian L. N. J. Neurochem., 17, 1689, 1970.
13. Аракелян Л. Н., Демирчян А. А., Петросян А. М., Казарова Е. К., Есаян Н. А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 9, 197, 1974.
14. Есаян Н. А., Армениян А. Р., Казарова Е. К., Аракелян Л. Н. 6-ая Всесоюзн. конф. по нейрохим. Успехи нейрохимии, 188, Л., 1974.
15. Yessaian N. H., Demirjtan A. H., Tozalaklan B. V. J. Neurochem., 28, 1151, 1977.
16. Bertler A., Carlsson A., Rosengren E. Acta Physiol. Scand., 44, 278, 1958.

17. Бунятын Г. Х. Журн. Всесоюзн. хим. общества им. Д. И. Менделеева, 21, 2, 130, 1976.
18. Bismas B., Carlsson A. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 299, 41, 1977.
19. Barker J. L., Nicoll R. A., Padjen A. J. Physiol., L., 245, 521, 1975.
20. Демирчян А. А., Тозалакян П. В., Есаян Н. А. Биологический журнал Армении, 31, 5, 1978.
21. Fiszler de Plazas S., De Robertis E. J. Neurochem., 23, 1115, 1974.
22. De Robertis E., Fiszler de Plazas S. J. Neurochem., 23, 1121, 1974.
23. Fiszler de Plazas S., De Robertis E. J. Neurochem., 25, 547, 1975.