

НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ НОРАДРЕНАЛИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ

А. А. ДЕМИРЧЯН, П. В. ТОЗАЛАКЯН, Н. А. ЕСАЯН

Исследовалось действие гамма-аминомасляной кислоты на спонтанное и K^+ -вызванное высвобождение 3H -норадреналина из срезов гипоталамуса и коры больших полушарий мозга крыс. Изучены некоторые закономерности действия ее на потерю 3H -норадреналина из срезов гипоталамуса в присутствии и в отсутствие метйодида бикикуллина.

Исследования, проведенные ранее в нашей лаборатории [1—3], указывают на усиление высвобождения катехоламинов из мозга и периферических органов крыс под действием гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в условиях *in vivo* и *in vitro*. Полученные результаты позволяют предположить, что ГАМК, кроме известного постсинаптического тормозного действия, оказывает также модуляторное влияние на высвобождение норадреналина (НА) из нервных окончаний.

В последнее время появились физиологические и морфологические работы, данные которых свидетельствуют о возможной пресинаптической регуляции высвобождения нейромедиаторов через аксо-аксональные синапсы [4], и фармакологические исследования [5—8], результаты которых показывают наличие на пресинаптических мембранах рецепторов, чувствительных к различным регуляторам. Нами ранее [9] была отмечена возможность наличия рецепторов ГАМК на норадренэргических нервных окончаниях мозга крыс. Изучение региональной специфичности действия ГАМК выявило усиление потерь 3H -НА из отделов мозга, богатых норадренэргическими нервными окончаниями, в том числе из гипоталамуса и коры больших полушарий [10].

С целью выяснения характера взаимодействия ГАМК с мембранами норадренэргических окончаний в настоящем исследовании нами изучались некоторые закономерности действия ее на потерю 3H -НА из срезов гипоталамуса в присутствии и в отсутствие специфического блокатора ее рецепторов—метйодида бикикуллина (МИБ). Исследовалось также действие ГАМК на спонтанное и K^+ -вызванное высвобождение 3H -НА из срезов гипоталамуса и коры больших полушарий мозга крыс.

Материал и методика. Опыты были поставлены на белых крысах весом 120—150 г. После декапитации мозг быстро извлекали и в холодных условиях готовили срезы весом 15 мг из контрлатеральных частей париетальной коры больших полушарий и гипоталамуса. Инкубацию проводили в Кребс-бикарбонатном буфере, насыщенном O_2 (95%) и CO_2 (5%), pH 7.4, с составом (в mM): NaCl—113; KCl—4.75; KH_2PO_4 —1.2; $MgSO_4$ —1.2; $NaHCO_3$ —25; $CaCl_2$ —2.5; глюкоза—11.5, аскорбиновая кислота—1.14.

После предварительной инкубации срезов в течение 5 мин при 37° в буфере, содержащем ЭДТА (0.05 мг/мл) и ипразид (0.47 мг/мл), в среду добавляли 3H -НА (удельная активность 8.9—9.1 Кюри/ммоль, Амершам) в конечной концентрации 10⁻⁷ М и продолжали инкубацию до 30 мин; затем срезы промывали в течение 6 мин в холодном буфере.

При изучении потери 3H -НА промытые срезы помещали в инкубационные сосудики, содержащие по 2 мл буфера, с ГАМК, метйодидом бикукуллина (3·10⁻⁶ М) или без них и инкубировали 30 мин при 37°. По окончании инкубации срезы переносили в сцинтилляционные пробирки, заливали 1 мл этанола и оставляли на ночь. Радиоактивность измеряли в сцинтилляционном спектрометре «Интертекник» (Франция) после добавления 10 мл сцинтилляционной смеси (нафталин—100 г, PPO—7 г, POROP—300 мг в 1 л диоксана).

С целью изучения высвобождения 3H -НА срезы после промывки помещали в специальные держатели и переносили через каждые 2 мин из одного инкубационного сосудика (с 2 мл буфера при 37°) в другой. Среда содержала ГАМК (10⁻³, 10⁻⁴ и 2·10⁻² М) и (или) K⁺ (20 и 40 мМ) в зависимости от цели опыта. Затем сосудики заливали 0.5 мл этанола и 10 мл сцинтилляционной смеси и измеряли радиоактивность. Получение избытка ионов K достигалось увеличением концентрации KCl и соответствующим уменьшением концентрации NaCl. Бикукуллин метилировали путем его растворения в йодистом метиле и непродолжительного нагревания. Полученный метйодид бикукуллина из раствора экстрагировали водой.

Под термином «потери» в настоящей работе следует понимать уменьшение количества 3H -НА в срезах после их 30-минутной инкубации, а «высвобождение» — количество 3H -НА, обнаруженное в среде после инкубации срезов, предварительно аккумуляировавших 3H -НА.

Результаты и обсуждение. Во избежание затруднений и для удобства при анализе сложной картины взаимодействия ГАМК с возбужденными мембранами сначала изучалось действие ГАМК на нервные окончания в отсутствие стимула. При изучении зависимости эффекта кислоты на потери 3H -НА из срезов гипоталамической области мозга крыс от ее концентрации получена кривая, имеющая форму гиперболы. Половина максимального эффекта наблюдалась при концентрации 10⁻⁶ М (полумаксимальная концентрация), она не намного меньше полумаксимальной концентрации, деполяризующей мембраны верхних шейных ганглиев [11] и связывающейся с рецепторами из коры больших полушарий мозга крыс [12].

Для получения представления о механизме взаимодействия ГАМК с ее рецепторами на норадренергических окончаниях из уравнения

$$n = \frac{d \lg \frac{Y_s}{1 - Y_s}}{d \lg [S]},$$

где n—число Хилла, Y_s —степень насыщения, [S]—концентрация ГАМК,

ми графически рассчитали число Хилла в пределах полумаксимальной концентрации. Оно равно 1, что указывает на отсутствие кооперативности во взаимодействии ГАМК с ее рецепторами и относительную простоту механизма этого процесса. И хотя эта величина отличается от числа Хилла, полученного ранее в экспериментах по изучению деполаризации мембран нейронов беспозвоночных посредством ГАМК [13], она, однако, соответствует характеру взаимодействия последней с мембранами верхних шейных ганглиев [11] и связывания с рецепторами, выделенными из коры больших полушарий [12] и мозжечка [14].

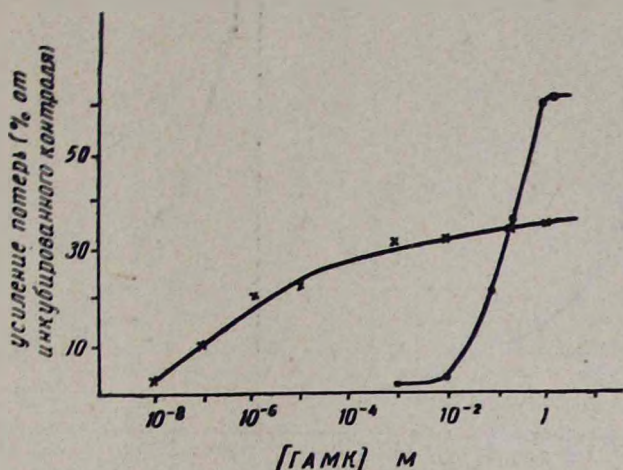


Рис. 1. Действие различных концентраций ГАМК на потери ^3H -НА из гипоталамических срезов мозга крыс в присутствии (—) и в отсутствие (х—х) МИБ. Результаты представлены в процентах изменения от инкубированного контроля (2100 пк. Кюри/мг ткани).

В настоящей работе в качестве блокатора рецепторов ГАМК был использован МИБ, который в нейтральной среде при 37° отличается большей стабильностью по сравнению с бикакуллином и в отличие от него хорошо растворяется в воде [15]. Кроме того, он обладает более мощным блокирующим действием на рецепторы ГАМК [16]. Как видно из рис. 1, МИБ значительно смещает кривую вправо. Однако если он ингибирует эффект низких концентраций ГАМК на потери ^3H -НА, то при высоких концентрациях вызывает выраженное потенцирование этих сдвигов (средние данные 6-ти опытов). Аналогичная картина наблюдалась и при изучении действия метохлорида бикакуллина на деполаризацию спинных нейронов, вызванную ГАМК [17]. Это потенцирование, вместе с числом Хилла, равным 2,5, осложняет анализ взаимодействия ГАМК—МИБ—рецептор при высоких концентрациях ГАМК.

В дальнейшем для выявления непосредственного действия ГАМК на процесс высвобождения НА мы определяли количество ^3H -НА в инкубационной среде.

С целью выяснения времени освобождения от неспецифически связанного ^3H -НА было изучено спонтанное высвобождение его в отсут-

ствие ГАМК. Как видно из рис. 2 (средние данные 5-ти опытов), спустя примерно 24 мин наклон кривой выхода ^3H -НА из срезов гипоталамуса и коры больших полушарий мозга крыс резко уменьшается, что

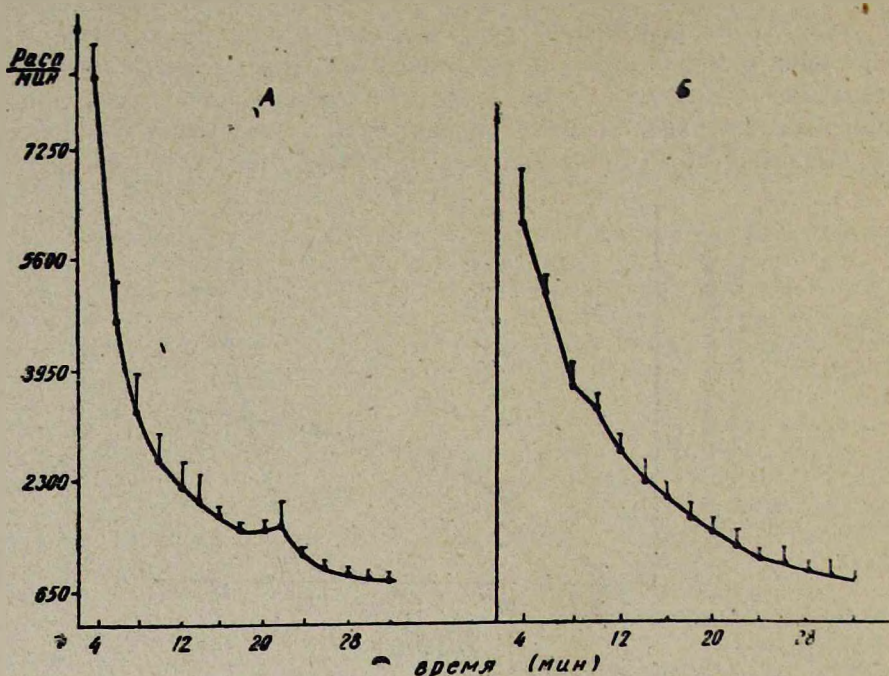


Рис. 2. Спонтанное высвобождение ^3H -НА из срезов гипоталамуса (А) и коры больших полушарий мозга крыс (Б).

указывает на спонтанное высвобождение специфически захваченного ^3H -НА. Учитывая это, мы начали отбирать пробы для определения три-тия с 26-й минуты инкубации.

В следующей серии опытов изучалось действие различных концентраций ГАМК на высвобождение ^3H -НА из гипоталамуса (рис. 3, средние данные 6-ти опытов). Увеличение радиоактивности в среде под действием концентраций 10^{-3} и 10^{-4} М согласуется с кривой, представленной на рис. 1, и подтверждает ранее сделанное нами заключение о непосредственном действии ГАМК на процесс высвобождения ^3H -НА. Показано [10], что ГАМК в концентрации 10^{-3} М также усиливает потери ^3H -НА из срезов коры больших полушарий. В настоящей работе, как и ранее, установлено активирование спонтанного высвобождения ^3H -НА из срезов коры больших полушарий мозга под действием 10^{-3} и 10^{-4} М ГАМК (рис. 3). Примечательно, что высокие концентрации ее ($2 \cdot 10^{-2}$ М) приводят к реверсии эффекта, т. е. к торможению спонтанного высвобождения ^3H -НА (рис. 3, Б).

С физиологической точки зрения интересно было изучить действие ГАМК на вызванное высвобождение ^3H -НА. В этих целях использовали 20 и 40 мМ K^+ . Кривая, представленная на рис. 4 (средние данные

8-ми опытов), показывает, что добавление 10^{-5} М ГАМК в инкубационную среду, содержащую 20 мМ K^+ , не влияет на процесс высвобождения 3H -НА из гипоталамуса, в то время как высвобождение 3H -НА из

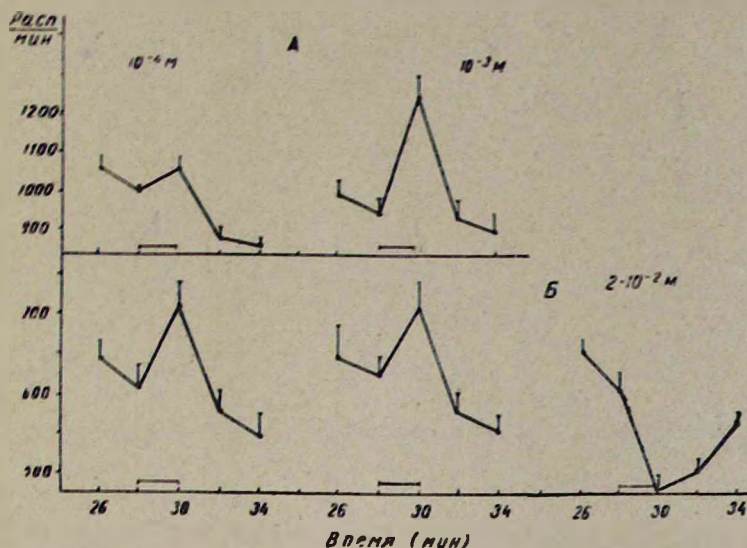


Рис. 3. Действие ГАМК на спонтанное высвобождение 3H -НА из срезов гипоталамуса (А) и коры больших полушарий (Б).

срезов коры больших полушарий и гипоталамуса, вызванное 40 мМ K^+ , под действием ГАМК усиливается примерно на 30%. Этот факт позволяет сделать вывод о деполаризующем действии этой кислоты на мембраны норадренергических окончаний, что, по-видимому, должно подавлять вызванное высвобождение 3H -НА, так как под действием эндогенной ГАМК имел место аналогичный эффект, как было нами показано ранее (неопубликованные данные). На основании этих двух фактов усиление K^+ —вызванного высвобождения 3H -НА (рис. 4) почти на 1000 расп/мин (ср. с 300 расп/мин в случае спонтанного высвобождения—рис. 3) из срезов гипоталамуса и коры больших полушарий мы склонны интерпретировать как результат суммарного действия эндогенной и экзогенной ГАМК.

Реверсия эффекта ГАМК на спонтанное высвобождение 3H -НА из срезов коры больших полушарий, потенцирование действия ее высоких концентраций на потери 3H -НА из гипоталамических срезов МИБ (вместо ожидаемого торможения ее эффекта) и высвобождение 3H -НА в ответ на действие 40 мМ K^+ из срезов коры больших полушарий и гипоталамуса при суммарном действии экзогенной и эндогенной ГАМК (в отличие от подавляющего действия одной только эндогенной) поз-

воляют сделать заключение о зависимости эффектов ГАМК на мембраны норадренэргических окончаний от концентрации и о возможном изменении механизма действия ее при использовании высоких концентраций.

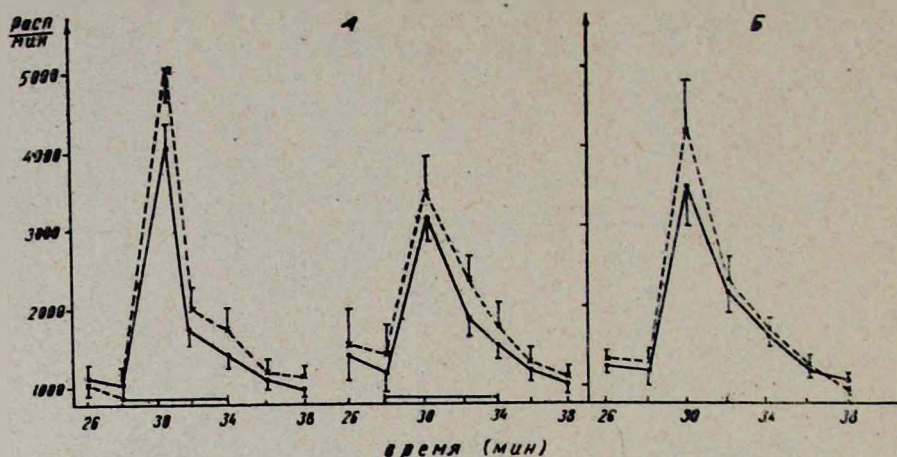


Рис. 4. Действие ГАМК на K^+ —вызванное высвобождение 3H -НА из срезов гипоталамуса (А) и коры больших полушарий (Б).

Отсутствие эффекта ГАМК на вызванное 20 мМ K^+ высвобождение 3H -НА из срезов гипоталамуса можно объяснить более слабой стимуляцией и норадренэргических, и ГАМК-эргических окончаний. Выяснение этих вопросов требует проведения дальнейших исследований.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 13.II 1978 г.

ԳԱՄԱ-ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹՔՎԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈ ՆՈՐԱԴՐԵՆԱԼԻՆԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՈՐՈՇ ՕՐԻՆԱԶԱՓՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Ա. Հ. ԴԵՄԻՐՃՅԱՆ, Պ. Վ. ԹՈԶԱԼՔՅԱՆ, Ն. Հ. ՆՍԱՅԱՆ

Գամա-ամինակարագաթքվի՝ (ԳԱԿԹ) նորադրենէրգիկ ներվային վերջույթի թաղանթի հետ փոխազդման բնույթի պարզաբանման նպատակով ուսումնասիրվել է առնետի ուղեղի հիպոթալամիկ շրջանի կտրվածքներից 3H -նորադրենալինի (ՆԱ) կորուստի վրա ԳԱԿԹ-ի ազդեցության որոշ օրինաչափություններ նրա ռեցեպտորի հատուկ արգելակիչ՝ մեթյոդիդրիկուկոլինի ներկայությամբ և բացակայությամբ: Պարզվել է, որ առնետի հիպոթալամիկ կտրվածքներից 3H -ՆԱ-ի կորուստի վրա ԳԱԿԹ-ի ազդեցության կախվա-

ծության կորը հիպերբոլիկ ձև ունի և որ այդ կորը տեղաշարժվում է աջ մեթ-
իլդիդրիկոկուլինի ներկայությամբ ու ստանում սիգմոիդ տեսք՝ զգալիորեն
ավելի բարձր հաղեցման կետով:

Ուսումնասիրվել է նաև ԳԱԿԹ-ի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցու-
թյունը ուղեղի հիպոթալամիկ և մեծ կիսագնդերի կեղևի կտրվածքներից ^3H -
նԱ-ի սպոնտան անջատման վրա: Պարզվել է, որ 10^{-3} և 10^{-4} մոլ ԳԱԿԹ-ը
ուժեղացնում է այդ երկու հատվածի կտրվածքներից ^3H -նԱ-ի սպոնտան
անջատումը, մինչդեռ ավելի մեծ կոնցենտրացիան ուղեղի կտրվածքներում
արդելակում է ^3H -նԱ-ի սպոնտան անջատումը:

CERTAIN ASPECTS OF THE REGULATION OF NORADRENALINE RELEASE BY GABA

A. H. DEMIRJIAN, P. V. TOZALAKIAN, N. H. YESSAIA

The effect of gamma aminobutyric acid on the spontaneous and K^+ -evoked release of ^3H -NA from hypothalamus and cerebral cortical slices of rat has been studied. Some regularities of the influence of this acid on the loss of ^3H -NA from hypothalamic slices have been studied in the presence and absence of bicuculline methiodide.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Есаян Н. А. Вопросы биохимии мозга, 2, 96, Ереван, 1966.
2. Есаян Н. А., Арменян А. Р., Аракелян Л. Н. Вопросы биохимии мозга, 3, 313, Ереван, 1967.
3. Yessaian N. H., Armentan A. R. and Bunlattan H. Ch. J. Neurochem., 16, 1425, 1969.
4. Davidson N. In: Amino Acid Neurotransmitters, 126, Academic Press, London, 1976.
5. Langer S. Z. Biochem. Pharmac., 23, 1793, 1974.
6. Langer S. Z. Br. J. Pharmac., 60, 481, 1977.
7. Stjarne L. In: Handbook of Psychopharmacology (Iversen L. L., Iversen S. D. and Snyder S. H. eds.), 6, 179, Plenum Press, New York, 1976.
8. Starke K., Taube H. D. and Borowski E. Biochem. Pharmac., 26, 259, 1977.
9. Yessaian N. H., Demirjian A. H. and Tozalakian P. V. J. Neurochem., 28, 1151, 1977.
10. Тошалакян П. В., Демирчян А. А., Есаян Н. А. Вопросы биохимии мозга. Ереван, 12, 127, 1977.
11. Bowery N. G. and Brown D. A. Br. J. Pharmac., 50, 205, 1974.
12. Fiszer De Plazas S. and De Robertis E. J. Neurochem., 25, 547, 1975.
13. Takeuchi A. and Takeuchi N. Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 26, 1633, 1967.

14. *Peck E. J., Schaeffer Jr. J. M. and Clark J. H.* In: GABA in Nervous System Function (Roberts E., Chase T. N. and Tower D. B. eds.), 319, Raven Press New York, 1976.
15. *Olsen R. W., Ban M., Miller T. and Johnston G. A. R.* Brain Res., 98, 383, 1975.
16. *Olsen R. W.* In: GABA in Nervous System Function (Roberts E., Chase T. N. Tower D. B. eds.), 287, Raven Press, New York, 1976.
17. *Krnjevic K., Pull E. and Werman R.* Can. J. Physiol. Pharmacol., 55, 670, 1977.