

УДК 612.822.1

ДЕЙСТВИЕ ГАМК И БИКУКУЛЛИНА НА ВЫЗВАННОЕ ИОНАМИ КАЛИЯ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ 3H -НОРАДРЕНАЛИНА ИЗ СИНАПТОСОМ МЕЗОДИЭНЦЕФАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС

ЧИФЛИКЯН М. Д., АРМЕНИЯН А. Р., БУНЯТЯН Г. Х.

Было изучено действие ГАМК и ее антагониста—бикукуллина на вызванное K^+ высвобождение 3H -норадреналина (3H —НА) из синапсосом, выделенных из мезодиэнцефальной области мозга крыс в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} . На фоне бикукуллина в концентрации 10^{-5} и 10^{-4} М в присутствии Ca^{2+} наблюдали уменьшение высвобождения 3H —НА; в этих условиях тормозящее действие ГАМК сохранялось. На фоне 10^{-6} М бикукуллина высвобождение 3H —НА не изменялось, а ГАМК при этом усиливала этот процесс. В бескальциевой среде на фоне 10^{-5} и 10^{-4} М бикукуллина высвобождение 3H —НА значительно уменьшалось; добавление ГАМК в этих условиях не приводило к изменениям вызванного K^+ высвобождения 3H —НА. При отсутствии Ca^{2+} на фоне 10^{-6} М бикукуллина высвобождение 3H —НА сохранялось, однако ГАМК его подавляла. Установлено, что в зависимости от условий опыта высвобождение 3H —НА в присутствии бикукуллина было неодинаковым; при этом ГАМК оказывала противоположные эффекты на вызванное K^+ высвобождение 3H —НА.

В настоящее время, несмотря на большое количество исследований взаимодействия нейромедиаторов, механизмы, лежащие в основе этих процессов, еще далеко не ясны. В частности, для выяснения механизма действия ГАМК на высвобождение норадреналина (НА) в соответствующих синапсах весьма важным является изучение как действия блокаторов ГАМК, так и участия Ca^{2+} в этом процессе; кальцию придается важное значение в процессе высвобождения нейромедиаторов. Многочисленные экспериментальные данные показывают, что величина Ca^{2+} -зависимого высвобождения нейромедиаторов связана с концентрацией кальция в клетке.

В предыдущих работах [1—4] нами было показано, что ГАМК оказывала тормозящее действие на вызванное 40 мМ K^+ , электростимуляцией и проточератрином высвобождение 3H —НА из синапсосом мезодиэнцефальной области мозга крыс. Было отмечено, что действие ГАМК на спонтанное высвобождение 3H —НА блокируется общепринятым блокатором ГАМК-рецепторов—бикукуллином. На основании этих исследований и электрофизиологических данных [5, 6] было высказано предположение о том, что ГАМК, вызывая свое характерное постсинаптическое действие, является и пресинаптическим модулятором высвобождения НА через ее рецепторы. В настоящей работе была предпринята попытка показать наличие ГАМК-рецепторов на НА-ер-

гических нервных окончаниях с помощью бикикуллина, а также изучить роль Ca^{2+} в действии ГАМК и бикикуллина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА.

Материалы и методы

Исследования были проведены на синапсоммах, выделенных из мезодиаэнцефальной области мозга крыс по методу Hajós [7]. Осадок синаптосомальной фракции ресуспендировали в 0,32 М холодной сахарозе. Далее синаптосомальную суспензию переносили в Кребс-бикарбонатный буфер, в мМ: NaCl —113; KCl —4,75; KH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; NaHCO_3 —25; CaCl_2 —2,5; глюкоза—11,5 (pH 7,2—7,4). После 5-минутной преникубации синапсом при 37° под непрерывной струей O_2 с CO_2 (95:5%) в среду добавляли ^3H —НА (10^{-7} М) и инкубацию продолжали 10 мин. С целью предотвращения распада НА в буфер добавляли шпризид (0,1 мг/мл) и аскорбиновую кислоту (0,2 мг/мл). Синаптосомальную суспензию переносили на мембранные миллипоровые фильтры (с порами 0,65 мкм, тип ДА) и промывали 0,15 М NaCl . Высвобождение ^3H —НА из синапсом изучали суперфузионным методом Raiteri и др. [8]. Скорость суперфузии составляла 1 мл/мин. Динамику процесса высвобождения ^3H —НА прослеживали последовательно каждые 30 с в течение 13—16 мин. Вызванное высвобождение ^3H —НА изучали в присутствии 40 мМ K^+ ; изотопичность раствора поддерживали при этом изомолярным замещением NaCl на KCl . Действие бикикуллина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА изучали как при предварительном введении бикикуллина в различных концентрациях за 1,5—2 мин до введения K^+ и ГАМК, так и при добавлении его одновременно с этими веществами. Высвобождение ^3H —НА (по радиоактивности суперфузионной среды) измеряли после добавления 10 мл сцинтилляционной жидкости Брея на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция). Величину высвобождения (i) рассчитывали по отношению радиоактивности суперфузионной среды (распады/мин) к оставшейся радиоактивности синапсом (распады/мин). Данные вызванного высвобождения ^3H —НА выражали в процентах относительно его спонтанного высвобождения. Использовали ^3H —НА с удельной активностью 23 $\text{K}_\mu/\text{мМ}$ фирмы «Amersham Radiochemical Centre», ГАМК—фирмы «Reanal», бикикуллин—фирмы «Sigma».

Результаты и обсуждение

Действие ГАМК на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА на фоне бикикуллина в различной концентрации. В этой серии опытов синаптосомальную фракцию суперфузировали в течение 11 мин Кребс-бикарбонатным буфером; далее суперфузию продолжали средой, содержащей бикикуллин в концентрации 10^{-6} — 10^{-4} М. Как видно из рис. 1, спонтанное высвобождение ^3H —НА увеличивалось соответственно уменьшению концентрации бикикуллина. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты [1] о ГАМК-подобном действии бики-

куллина на спонтанное высвобождение 3H —НА благодаря его деноляризирующей активности. Далее изучали динамику высвобождения 3H —НА, вызванного 40 мМ K^+ на фоне бикукуллина в указанных выше концентрациях. При повышении концентрации бикукуллина от 10^{-6} до 10^{-4} М вызванное K^+ высвобождение 3H —НА подавлялось. В то же время следует отметить, что вызванное 40 мМ K^+ высвобождение 3H —НА в отсутствие бикукуллина усиливалось [2]. При сравнении этих данных очевидно, что бикукуллин в концентрации 10^{-5} и 10^{-4} М

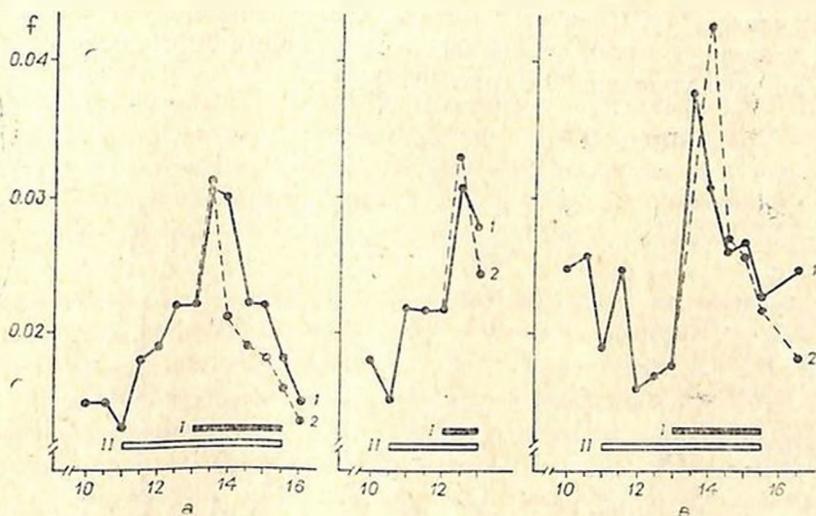


Рис. 1. Действие ГАМК на вызванное K^+ высвобождение 3H —НА из синапсом мезодienceфальной области мозга крыс на фоне бикукуллина: а— 10^{-4} М, б— 10^{-5} М, в— 10^{-6} М; I—при добавлении 40 мМ K^+ , II—при добавлении бикукуллина. По оси абсцисс—время суперфузии в мин; по оси ординат—величина высвобождения 3H —НА (f); 1—контроль, 2— 10^{-3} М ГАМК. Средние данные 3—6 опытов; стандартное отклонение—не более 10%

тормозил вызванное K^+ высвобождение 3H —НА (рис. 1, а, б). Однако при концентрации бикукуллина 10^{-6} М изменений в вызванном K^+ высвобождении 3H —НА не наблюдалось (рис. 1, в). Добавление ГАМК (10^{-3} М) одновременно с K^+ в суперфузионную среду на фоне действия бикукуллина в сравнительно высоких концентрациях (10^{-5} , 10^{-4} М) не изменяло высвобождения 3H —НА в первые 30 с. В следующие же 30 с имело место торможение высвобождения 3H —НА (рис. 1, а, б). Эти результаты свидетельствуют о том, что тормозящее действие ГАМК на вызванное K^+ высвобождение 3H —НА в таких условиях сохранялось, то есть бикукуллин в данных концентрациях оказался неэффективным в отношении влияния ГАМК на этот процесс. На фоне же 10^{-6} М бикукуллина ГАМК увеличивала вызванное K^+ высвобождение 3H —НА, то есть ГАМК в этом случае не вызывала свойственного ей тормозящего действия на высвобождение 3H —НА из синапсом. Фактически в этих условиях бикукуллин проявлял антагонистическое действие по отношению к ГАМК—блокировал ее действие.

Несмотря на разноречивые данные относительно характера действия биккуллина и его производных, биккуллин обсуждается в литературе как антагонист ГАМК, который ингибирует ее связывание с рецепторами; в связи с этим его используют для изучения свойств ГАМК-рецепторов *in vitro* [9, 10]. Можно думать, что рецепторы ГАМК, ответственные за исследованные ее пресинаптические эффекты (рис. 1, в), по-видимому, могут быть сходными с биккуллин-чувствительными рецепторами ГАМК, обнаруженными на немцелинизированных аксонах крыс [11]. Следует отметить, что разнонаправленное действие ГАМК в наших опытах проявлялось не в первые 30 с после ее добавления, а в последующие 30 с (рис. 1).

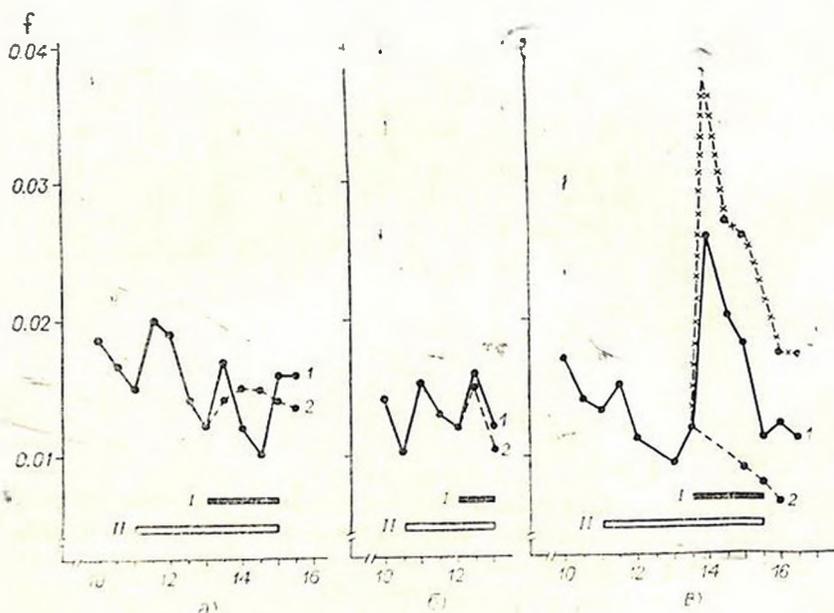


Рис. 2. Действие ГАМК на вызванное K^+ высвобождение 3H -НА из синапсом мезодienceфальной области мозга крыс на фоне биккуллина в бескальциевой среде: обозначения см. на рис. 1; в, 3—добавление $2,5$ мМ Ca^{2+} . Средние данные 6—12 опытов; стандартное отклонение—не более 10%

Действие ГАМК на вызванное K^+ высвобождение 3H -НА на фоне биккуллина в различной концентрации в отсутствие Ca^{2+} . В этой серии опытов предварительную суперфузию синапсом проводили бескальциевыми растворами. Как видно из рис. 2, при добавлении биккуллина в среду тенденция к повышению спонтанного высвобождения 3H -НА сохранялась, однако оно было ниже относительно контроля (рис. 1). При этом вызванное K^+ высвобождение 3H -НА на фоне биккуллина (10^{-5} и 10^{-4} М) значительно снижалось. Добавление ГАМК в этих условиях не приводило к существенным изменениям вызванного высвобождения 3H -НА (рис. 2, а, б).

Заслуживает внимания факт, что на фоне 10^{-6} М бикукуллина в отсутствие Ca^{2+} наблюдалось усиление вызванного K^+ высвобождения ^3H —НА (рис. 2, в). При сравнении данных на рис. 1, в и 2, в отчетливо видно, что вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА при наличии и в отсутствие Ca^{2+} на фоне действия 10^{-6} М бикукуллина не изменялось. При этом в бескальциевой среде ГАМК подавляла вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА (рис. 2, в); таким образом в данных условиях происходила реверсия действия ГАМК.

В серии опытов после предварительной суперфузии синапсом бескальциевой средой на фоне 10^{-6} М бикукуллина одновременно с K^+ добавляли и Ca^{2+} (2,5 мМ). Как видно из рис. 2, в, при этом наблюдался значительный выброс ^3H —НА. Усиление высвобождения ^3H —НА из синапсом в ответ на введение Ca^{2+} и в его отсутствие [2] говорит в пользу предположения о том, что существуют пулы НА, высвобождаемые наружными ионами кальция, и пулы НА, не зависящие от них. Аналогичные данные и предположения были приведены Cotman и др. [12].

Одновременное действие ГАМК и бикукуллина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} . Как было отмечено выше, высвобождение ^3H —НА, вызванное 40 мМ K^+ , на 123% превышало уровень его спонтанного высвобождения (рис. 3, а). Добавленная одновременно с K^+ ГАМК оказывала тормозящее действие на этот процесс. Определенный интерес вызвало изучение одновременного действия K^+ , ГАМК и бикукуллина на процесс высвобождения ^3H —НА. Как видно из рис. 3, а, 10^{-6} М бикукуллин подавлял вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА, то есть оказывал ГАМК-подобное действие. Одновременное присутствие в среде ГАМК и бикукуллина также приводило к уменьшению высвобождения ^3H —НА. Тормозящее действие ГАМК в этих условиях фактически сохранялось. Аналогичные данные были получены нами относительно высвобождения ^3H —НА, вызванного электрической стимуляцией [1]. Однако при сравнении этих результатов с данными, полученными на фоне действия бикукуллина, следует отметить существенные различия относительно вызванного K^+ высвобождения ^3H —НА и действия ГАМК на этот процесс. Из рис. 3, а видно, что бикукуллин, оказывая влияние на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА, не изменял действия ГАМК (столбики 3, 4); наоборот, если бикукуллин не влиял на вызванное высвобождение ^3H —НА, то он выступал в роли антагониста ГАМК, усиливая высвобождение ^3H —НА (столбики 6, 7). Полученные результаты согласуются с данными об отсутствии блокирующего действия бикукуллина на вызванную K^+ деполяризацию первичных афферентов лягушки [13].

Ранее нами было уже показано [2], что в бескальциевой среде не наблюдалось вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА, а ГАМК в этих условиях оказывала усиливающее (на 65%) действие на этот процесс (рис. 3, б). Необходимо отметить, что бикукуллин, добавленный одновременно с K^+ в бескальциевую среду, также вызвал усиление высвобож-

дения 3H —НА (на 164%). Присутствие ГАМК вместе с бикикуллином и K^+ приводило к более слабому высвобождению 3H —НА (на 80%). Следует отметить, что в этих условиях опыта наблюдалось усиление высвобождения 3H —НА, несмотря на то, что в среде не было Ca^{2+} .

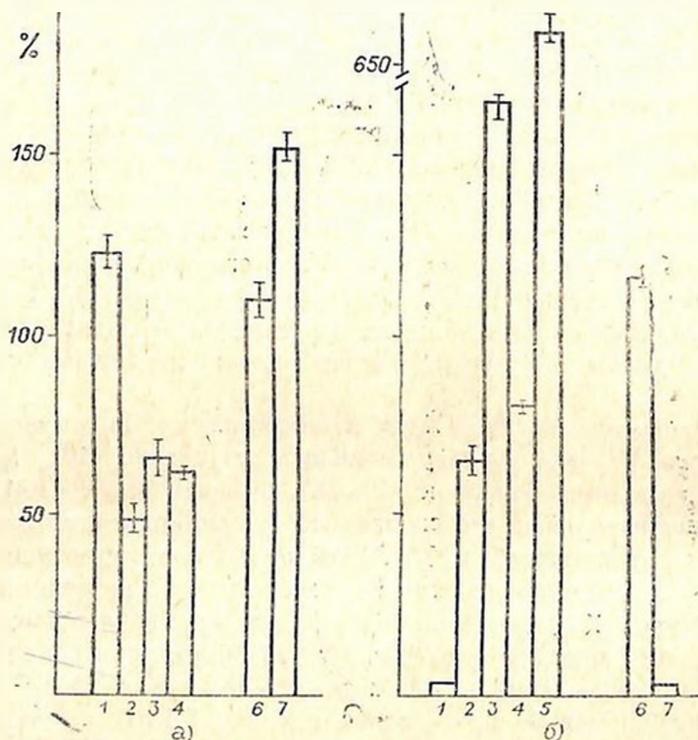


Рис. 3. Действие ГАМК (10^{-3} М) и бикикуллина (10^{-6} М) на вызванное K^+ высвобождение 3H —НА из синапсом мезодлинсфальной области мозга крыс: а—в Кребс-бикарбонатном буфере, б—в бескальциевой среде; 1—40 мМ K^+ , 2—40 мМ K^+ + ГАМК, 3—40 мМ K^+ + бикикуллин, 4—40 мМ K^+ + ГАМК + бикикуллин, 5—40 мМ K^+ + бикикуллин + 2,5 мМ Ca^{2+} , 6—40 мМ K^+ на фоне бикикуллина, 7—40 мМ K^+ + ГАМК на фоне бикикуллина. По оси ординат—высвобождение 3H —НА в %. Средние данные 4—7 опытов; стандартное отклонение—на более 10%

Рассматривая эти данные, едва ли можно допустить абсолютную необходимость наружного Ca^{2+} для наблюдаемого усиления высвобождения НА. В бескальциевой среде в процессе стимуляции увеличивается вход Na^+ , в результате чего происходит усиление высвобождения медиатора. Предполагается, что увеличение высвобождения 3H —НА под действием ГАМК и бикикуллина в отсутствие Ca^{2+} происходит из пула, независящего от наружного Ca^{2+} , вероятно, в результате либо увеличения входа Na^+ , либо активации внутриклеточных запасов Ca^{2+} .

Следует отметить, что если на фоне 10^{-6} М бикикуллина в бескальциевой среде вызванное K^+ высвобождение 3H —НА составляло 117%, то в присутствии ГАМК оно подавлялось (рис. 2, в; 3, б). На основании результатов этих экспериментов можно заключить, что и

ГАМК, и биккуллин в зависимости от условий опыта могут проявлять разнонаправленное действие на вызванное K^+ высвобождение 3H -НА. Можно думать, что отмеченная выше реверсия действия ГАМК и биккуллина происходит в зависимости от функционального состояния клетки.

GABA, BICUCULLINE AND K^+ -EVOKED Ca^{2+} -DEPENDENT H^3 -NORADRENALINE RELEASE FROM RAT MESODIENCEPHALIC REGION SYNAPTOSOMES

CHIFLIKIAN M. D., ARMENIAN A. R., BUNATIAN H. Ch.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

Effects of GABA and bicuculline on K^+ -evoked release of total tritium has been studied in rat mesodiencephalic region synaptosomes preincubated with H^3 -noradrenaline (H^3 -NA) and superfused with solutions containing Ca^{2+} or without it. The data obtained indicate that bicuculline (10^{-5} , 10^{-4} M) reduces K^+ -evoked release of H^3 -NA. Under these conditions inhibitory effect of GABA was retained. In small concentrations (10^{-6} M) bicuculline did not alter K^+ -evoked release of H^3 -NA, but GABA facilitated this process. When synaptosomes were superfused with a Ca^{2+} -free buffer, bicuculline (10^{-5} , 10^{-4} M) markedly decreased K^+ -evoked release of H^3 -NA. The addition of GABA did not affect K^+ -evoked release of H^3 -NA. Bicuculline (10^{-6} M) added to the superfusion Ca^{2+} -free fluid exerted no effect on K^+ -evoked release of H^3 -NA. However, GABA inhibited this process. These results indicated that K^+ -evoked release of H^3 -NA depends on the experimental conditions. Furthermore, the effect of GABA on K^+ -evoked release of H^3 -NA is reversed by the alteration of these conditions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Армениян А. Р., Чифликян М. Д., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 14, 135—142, 1980.
2. Чифликян М. Д., Армениян А. Р., Бунятян Г. Х. Физиол. ж. СССР, 67, 1001—1006, 1981.
3. Армениян А. Р., Чифликян М. Д. Физиол. ж. СССР, 67, 1265—1268, 1981.
4. Armenian A. R., Chiflikian M. D., Bunatian H. Ch.—In: Synaptic constituents in health and disease. (Eds. Brzin M., Sket D., Bachelard H.), Ljubljana-Oxford, 107, 1980.
5. Adams P. R., Brown D. A. J. *Physiol.*, 250, 85—120, 1975.
6. Galvan M., Grafe P., ten Bruggencate G. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 314, 141—147, 1980.
7. Hajós F. *Brain Res.*, 93, 485—489, 1975.
8. Raiteri M., Angelini F., Levt G. *Eur. J. Pharmacol.*, 25, 411—414, 1974.
9. De Feudis F. V. *Prog. Neurobiol.* 9, 123—145, 1977.
10. Johnston G. A. R. *Ann. Rev. Pharmac. Toxicol.*, 18, 269—289, 1978.
11. Brown D. A., Marsh S. *Brain Res.* 156, 187—191, 1978.
12. Cotman C. W., Haycock J. W., White W. F. *J. Physiol.*, 254, 475—505, 1976.
13. Davidoff R. A., Hackman J. C., Osorio I. *Neuroscience*, 5, 117—126, 1980.

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Поступила 16. XI 1981