

УДК 612.822.1

УЧАСТИЕ Ca^{2+} И Cl^- В ДЕЙСТВИИ ГАМК И ПИКРОТОКСИНА НА ВЫЗВАННОЕ K^+ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ^3H -НОРАДРЕНАЛИНА ИЗ СИНАПТОСОМ МЕЗОДИЭНЦЕФАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС

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

Было изучено влияние ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение ^3H -норадреналина (^3H -НА) из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс и влияние пикротоксина на действие ГАМК в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} и Cl^- . Пикротоксин в концентрациях 10^{-5} — 10^{-3} М подавлял вызванное K^+ высвобождение ^3H -НА и не блокировал тормозящий эффект ГАМК на этот процесс. В бескальциевой среде вызванное K^+ высвобождение ^3H -НА ингибировалось. Дальнейших изменений в присутствии пикротоксина не наблюдалось; в этих условиях ГАМК не стимулировала высвобождение ^3H -НА, что происходило в отсутствие пикротоксина. При отсутствии Cl^- вызванное K^+ высвобождение ^3H -НА под действием пикротоксина подавлялось, и стимулирующее действие ГАМК на этот процесс блокировалось. В среде, из которой были удалены Ca^{2+} и Cl^- , вызванное высвобождение ^3H -НА из синапсом ингибировалось. При добавлении к этой среде ГАМК, пикротоксина или ГАМК на фоне пикротоксина ингибирование высвобождения ^3H -НА углублялось.

ГАМК является главным тормозным медиатором в ЦНС млекопитающих. Многие данные свидетельствуют, что в основе тормозящего действия ГАМК, кроме гиперполяризации, в некоторых структурах лежит и деполяризация. Деполяризующее пресинаптическое действие ГАМК показано в различных частях ЦНС (клиновидном ядре, обонятельной коре, спинном мозгу) [1—3], а также периферической НС (в ганглиях дорсальных корешков, верхнем шейном ганглии, синаптических ганглиях) [4—6].

Результаты исследований [7—9], показавшие при действии ГАМК усиление спонтанного высвобождения ^3H -норадреналина (НА) из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс и подавление высвобождения ^3H -НА, вызванное электрической стимуляцией, высокими концентрациями K^+ и протовератрином, указывают, что ГАМК деполяризует норадренергические нервные окончания и дают основание для предположения о ГАМК как возможном медиаторе пресинаптического торможения в этой области мозга. Показано также, что тормозящее действие ГАМК на вызванное деполяризацией высвобождение ^3H -НА из синапсом зависит от Ca^{2+} , и в его отсутствие направленность дей-

ствия ГАМК на этот процесс изменяется [8, 9]. Известно, что специфический блокатор действия ГАМК—пикротоксин антагонизирует как ее постсинаптическое, так и пресинаптическое действие [1, 4, 10—13]. Считается, что пикротоксин ингибирует действие ГАМК неконкурентно, влияя на ионную проницаемость мембраны, особенно на транспорт Cl^- [10, 14]. Для внесения некоторой ясности в понимание механизма действия ГАМК на высвобождение НА из нервных окончаний мезодиэнцефальной области мозга в настоящей работе изучено влияние пикротоксина на вызываемое K^+ высвобождение ^3H —НА из синапсом, выделенных из этой структуры, и на действие ГАМК на данный процесс в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} и Cl^- .

Материалы и методы

Синапсомы из мезодиэнцефальной области мозга крыс получали по методу Hajos [15]. Их инкубировали 10 мин в присутствии $5 \cdot 10^{-8}$ М ^3H —НА. Затем 1 мл инкубированной суспензии переносили в суперфузионные камеры на миллипоровые мембранные фильтры. Высвобождение ^3H —НА из синапсом изучали суперфузионным методом Raiteri и соавт. [16]. Суперфузию проводили со скоростью 1 мл/мин. Пробы брали каждые 30 с. ГАМК добавляли вместе с K^+ , пикротоксин—на 1 мин раньше ГАМК и K^+ . Радиоактивность суперфузионной среды и синапсом измеряли после добавления 0,5—1 мл этанола и 10 мл сцинтилляционной среды Брея на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique-SL-4221» (Франция). Величину высвобождения (i) рассчитывали по отношению радиоактивности суперфузионной среды к оставшейся радиоактивности синапсом (число распадов в мин). Подробности методики исследований описаны в предыдущих работах [7, 8].

Использовали Кребс-бикарбонатный буфер pH 7,2—7,4 со следующим 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. В буфер добавляли 0,1 мг/мл ипразида и 0,2 мг/мл аскорбиновой кислоты. В усиленной K^+ среде (40 mM) изотоничность раствора достигали изомолярным замещением NaCl на KCl . В бесхлорной среде Cl^- заменяли ионами ацетата и глюконата. В бескальциевую среду CaCl_2 не добавляли. Использовали ^3H —НА с удельной активностью 39 K_u /мМ фирмы «Amersham», ГАМК—фирмы «Reanal», пикротоксин и ипразид—фирмы «Sigma».

Результаты и обсуждение

Влияние ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга. Стимуляция синапсом 40 mM K^+ после 11-минутной преинкубации в Кребс-бикарбонатном буфере приводила к значительному усилению высвобождения ^3H —НА. При добавлении ГАМК вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА подавлялось (рис. 1, а). Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований [8]. Как видно из рис. 1, б, в, г, все использованные концентрации пикротоксина (10^{-5} — 10^{-3}

М) не влияли на спонтанное высвобождение ^3H —НА из синапсом. Изучение действия различных концентраций пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА показало, что при концентрации пикротоксина 10^{-5} — 10^{-3} М вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА подавлялось (рис. 1. б, в, г). Примечательно, что в присутствии пикротоксина (10^{-5} — 10^{-3} М) тормозящее действие ГАМК сохранялось (рис. 1,

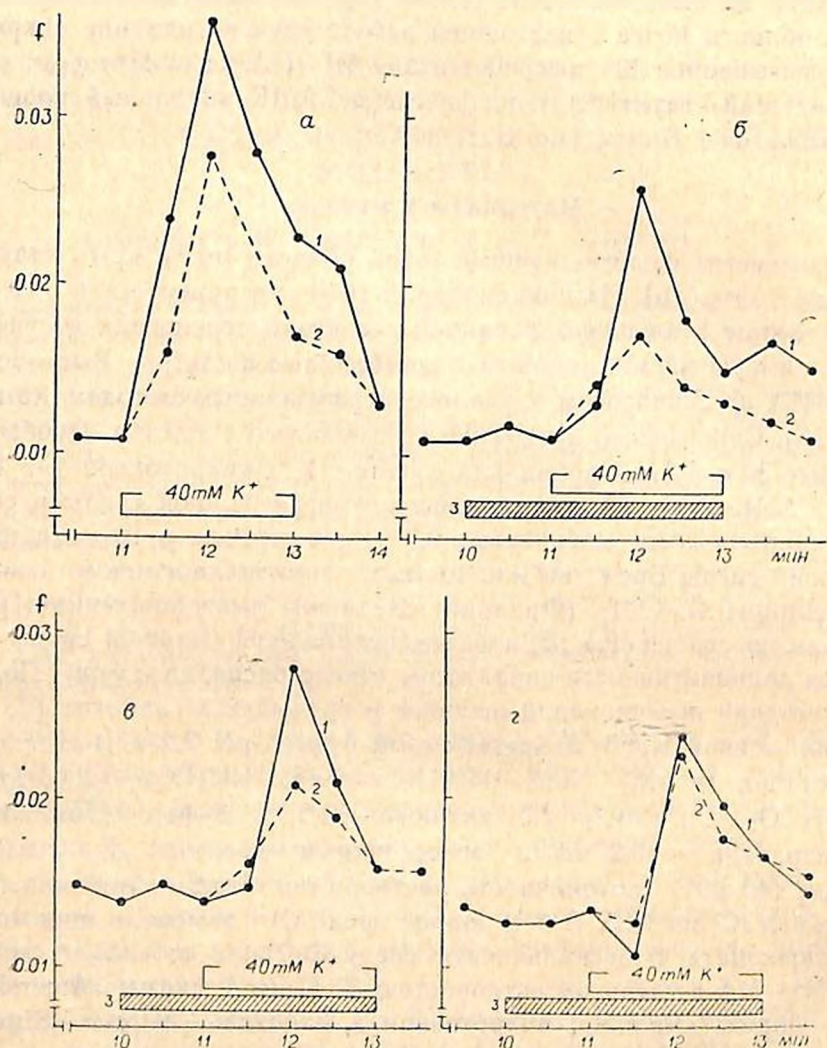


Рис. 1. Действие ГАМК (10^{-3} М) (пунктирная линия) на K^+ -вызванное высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс: а) в отсутствие и в присутствии различных концентраций пикротоксина (заштрихованная область), б) 10^{-5} М, в) 10^{-4} М, г) 10^{-3} М. Стандартное отклонение не более 10%. Средние данные 5–10 опытов

б, в, г). Таким образом, пикротоксин, подобно ГАМК, подавлял вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга и не блокировал действие ГАМК на этот процесс. ГАМК-подобное тормозящее действие пикротоксина (10^{-4} , 10^{-3} М)

описано на клетках Пуркинье [17]. Несмотря на то, что ГАМК и пикротоксин имели одинаковое тормозящее влияние на вызванное K^+ высвобождение 3H —НА из синапсом, в основе их действия, по всей вероятности, лежат разные изменения порадренигической нервной мембраны. Это можно предположить на основании того, что пикротоксин не действовал на спонтанное высвобождение 3H —НА из синапсом, тогда как ГАМК стимулировала этот процесс [7]. Степень ингибирования вызванного высвобождения 3H —НА при разных концентрациях пикротоксина различалась, а под действием ГАМК на фоне разных концентраций пикротоксина почти не изменялась (рис. 1, б, в, г).

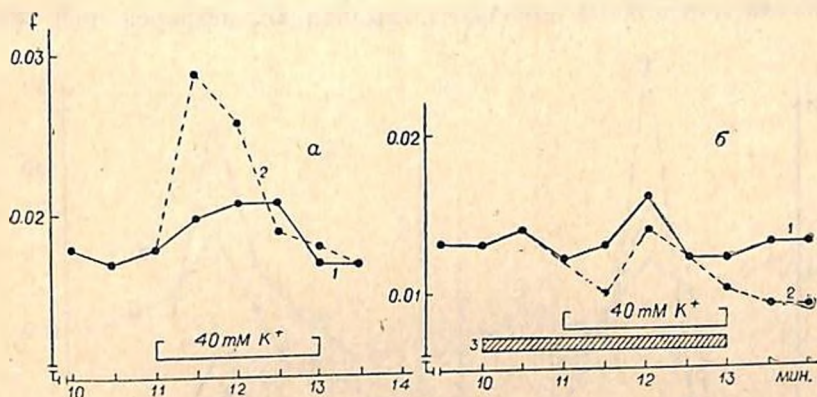


Рис. 2. Действие ГАМК (10^{-3} М) на K^+ -вызванное высвобождение 3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крысы: а) в отсутствие и б) в присутствии пикротоксина (10^{-3} М) в Ca^{2+} -свободной среде. Стандартное отклонение не более 10%. Средние данные 4—8 опытов. Обозначения те же, что и на рис. 1

Влияние ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение 3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга в отсутствие Ca^{2+} . Полученные данные о подавлении под действием ГАМК высвобождения 3H —НА, вызванного электрической стимуляцией, добавлением 40 мМ K^+ или протовератрином [7—9] можно объяснить деполяризацией норадренигических нервных окончаний, при которой высвобождение медиатора является Ca^{2+} -зависимым процессом. Исследования показали, что вызванное K^+ и протовератрином высвобождение 3H —НА из синапсом блокируется в бескальциевой среде, но в присутствии ГАМК эффект деполяризующих веществ частично восстанавливается [8, 9], и стимулирующее действие ГАМК на спонтанное высвобождение 3H —НА из синапсом в бескальциевой среде сохраняется [9]. Это приводит к предположению, что под действием ГАМК, по всей вероятности, высвобождается Ca^{2+} из его внутриклеточных запасов. Исходя из этих данных, для выяснения участия Ca^{2+} в действии пикротоксина было изучено вызванное K^+ высвобождение 3H —НА в бескальциевой среде в присутствии пикротоксина. Как видно из рис. 2, а, вызванное K^+ высвобождение 3H —НА из синапсом в

бескальциевой среде ингибировалось, что было показано ранее [8]. Добавление пикротоксина не вносило ничего нового (рис. 2, б). В бескальциевой среде при добавлении ГАМК на фоне пикротоксина вызванное высвобождение ^3H —НА не стимулировалось (рис. 2, б), как это имело место в его отсутствие (рис. 2, а). В бескальциевой среде пикротоксин не проявляет ГАМК-подобного действия на вызванное высвобождение ^3H —НА из синапсом, следовательно, ГАМК и пикротоксин вызывают разные ионные изменения, и Ca^{2+} , вероятно, не вовлечен в действие пикротоксина. Есть данные, что пикротоксин влияет на K^+ -проводимость мембраны. Подавление под действием пикротоксина потенциалов дорсальных корешков, вызванных афферентной стимуля-

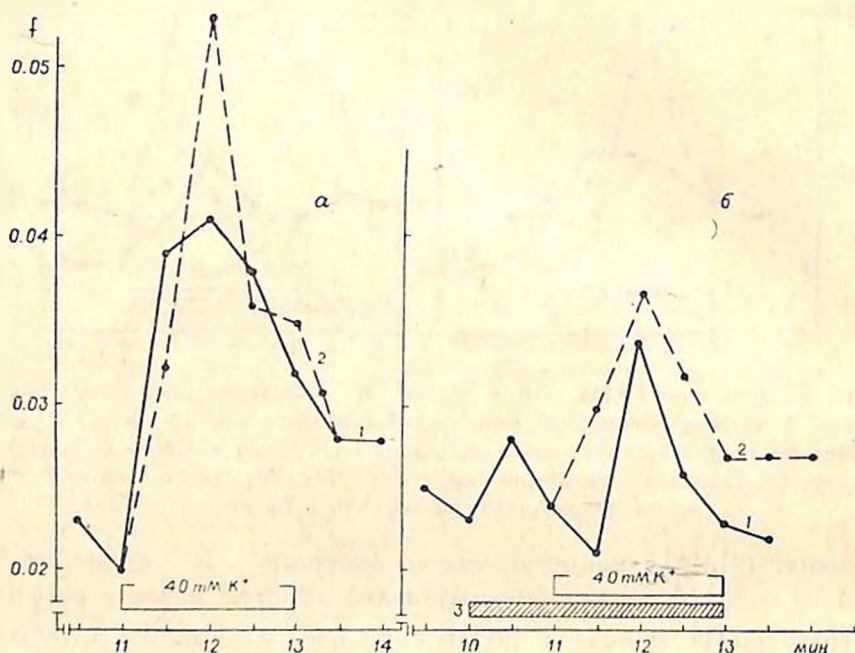


Рис. 3. Действие ГАМК (10^{-3} М) на K^+ -вызванное высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс: а) в отсутствие и б) в присутствии пикротоксина (10^{-3} М) в Cl^- -свободной среде. Средние данные 4—8 опытов. Стандартное отклонение не более 10%. Обозначения те же, что и на рис. 1

цией (при которой медиатором является ГАМК) и непосредственной аппликацией ГАМК, некоторые исследователи объясняли блокированием пикротоксином K^+ транспорта [18—20]. Возможно, в наших исследованиях подавление вызванного K^+ высвобождения ^3H —НА из синапсом пикротоксином, а также отсутствие стимулирующего действия ГАМК на высвобождение ^3H —НА в бескальциевой среде в присутствии пикротоксина были обусловлены изменением транспорта K^+ в синаптической мембране.

Влияние ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга в отсут-

ствие Cl^- . Полагают, что пикротоксин ингибирует действие ГАМК посредством блокирования хлорных каналов [10, 14]. Есть сведения, что в пресинаптическом действии ГАМК Cl^- играет важную роль [6]. И так как мы предполагаем, что ГАМК в мезодienceфальной области мозга является медиатором пресинаптического торможения, в следующей серии опытов было изучено влияние ГАМК на вызванное высвобождение 3H -НА из синапсом в бесхлорной среде в отсутствие и в присутствии пикротоксина. Результаты исследований показали, что в бесхлорной среде 40 мМ K^+ стимулировали высвобождение 3H -НА из синапсом, и ГАМК усиливала этот процесс (рис. 3, а), то есть в отсутствие Cl^- происходила реверсия действия ГАМК на вызванное K^+

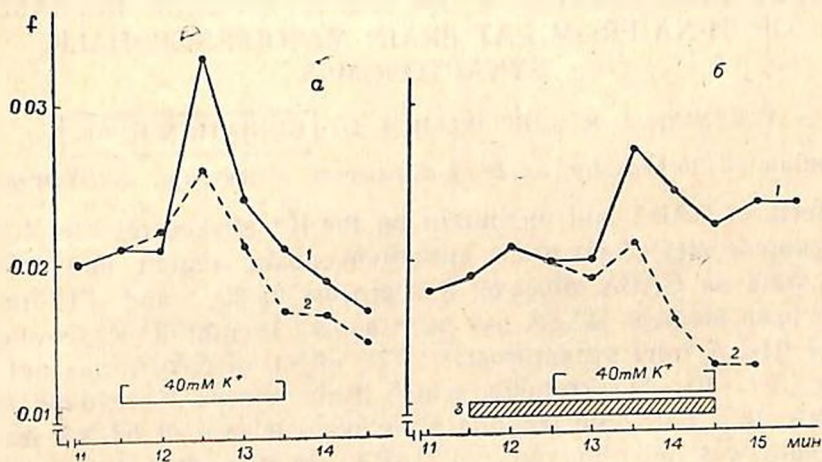


Рис. 4. Действие ГАМК (10^{-3} М) на K^+ -вызванное высвобождение 3H -НА из синапсом мезодienceфальной области мозга крыс: а) в отсутствие и б) в присутствии пикротоксина (10^{-3} М) в Ca^{2+} и Cl^- -свободной среде. Средние данные 3–6 опытов. Стандартное отклонение не более 10%. Обозначения те же, что и на рис. 1

высвобождение 3H -НА. В бесхлорной среде в присутствии пикротоксина вызванное высвобождение 3H -НА из синапсом подавлялось. В этих условиях в присутствии пикротоксина ГАМК не вызывала изменений (рис. 3, б). Примечательно, что в отсутствие Cl^- пикротоксин стимулировал спонтанное высвобождение 3H -НА из синапсом (рис. 3, б). Эти данные указывают на то, что Cl^- вовлечен как в действие ГАМК, так и пикротоксина, и, по всей вероятности, сдвиги транспорта Cl^- , вызванные ГАМК и пикротоксином, имеют противоположные направления, вследствие чего в бесхлорной среде пикротоксин подавлял вызванное высвобождение 3H -НА, а ГАМК, наоборот, стимулировала этот процесс. Более того, в этой среде пикротоксин блокировал стимулирующее действие ГАМК на вызванное высвобождение 3H -НА.

Когда из суперфузионной среды удаляли Ca^{2+} и Cl^- , вызванное высвобождение 3H -НА из синапсом подавлялось и имело место тормозящее действие ГАМК на этот процесс (рис. 4, а). При этом пикро-

токсин ингибировал вызванное высвобождение ^3H —НА, и добавление ГАМК на фоне пикротоксина приводило к дальнейшему ингибированию процесса (рис. 4, б).

Сопоставляя полученные данные, можно полагать, что пикротоксин не блокирует пресинаптическое тормозящее действие ГАМК на высвобождение НА из норадренергических нервных окончаний мезодиэнцефальной области мозга. Это, по всей вероятности, обусловлено тем, что, кроме действия на транспорт Cl^- , ГАМК и пикротоксин вызывают и другие более существенные, но разные сдвиги в ионной проницаемости мембран норадренергических нервных окончаний.

INVOLVEMENT OF Ca^{2+} AND Cl^- IONS IN THE EFFECTS OF GABA AND PICROTOXIN ON THE K^+ -EVOKED RELEASE OF ^3H -NA FROM RAT BRAIN MESODIENCEPHALIC SYNAPTOSOMES

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

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Arm. SSR, Yerevan

Effects of GABA and picrotoxin on the K^+ -evoked release of ^3H -NA from synaptosomes of rat brain mesodiencephalic region and influence of picrotoxin on GABA effect on this process in Ca^{2+} and Cl^- -free media has been studied. GABA has been shown to inhibit K^+ -evoked release of ^3H -NA from synaptosomes. The effect of GABA was not blocked by 10^{-5} — 10^{-3} M picrotoxin, which itself reduced K^+ -evoked release of ^3H -NA. In a Ca^{2+} -free medium K^+ -evoked release of ^3H -NA from synaptosomes was not observed and GABA has stimulated K^+ -evoked release. This effect of GABA was blocked by picrotoxin. In a Cl^- -free medium K^+ -evoked release of ^3H -NA from synaptosomes was not altered. Under these conditions GABA stimulated K^+ -evoked release of ^3H -NA while picrotoxin reduced this process. In the presence of picrotoxin the effect of GABA on the K^+ -evoked release was reversed. The results obtained indicate that picrotoxin does not block the presynaptic inhibitory effect of GABA in the brain mesodiencephalic region.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Davidson N., Southwick A. B. J. Physiol. Lond., 210, 172P, 1970.
2. De Groat W. C. J. Pharmacol., 172, 384—396, 1970.
3. Galvan M., Scholfield C. N. J. Physiol., 284, 129—130, 1978.
4. De Groat W. C., Lalley P. H., Saum W. P. Brain Res., 44, 273—277, 1972.
5. Bowery N. G., Brown D. A. Br. J. Pharmacol. 50, 205—213, 1974.
6. Adams P., Brown D. A. J. Physiol. Lond., 250, 85—120, 1975.
7. Армянян А. Р., Чифликян М. Д., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 14, 135—142, 1980.
8. Чифликян М. Д., Армянян А. Р., Бунятян Г. Х. Физиол. ж. СССР, 67, 1001—1006, 1981.
9. Армянян А. Р., Чифликян М. Д. Физиол. ж. СССР, 67, 1265—1268, 1981.
10. Takeuchi A., Takeuchi N. J. Physiol., 205, 377—391, 1969.
11. Galindo A. Brain Res., 14, 763—767, 1965.

12. *Barker J. L., Nicoll R. A.* Science, 176, 1043—1057, 1972.
13. *Kelly J. S., Renaud L. P.* Nature, New Biology, 232, 25—26, 1971.
14. *Takeuchi A., Takeuchi N. J.* Physiol., 212, 337—351, 1971.
15. *Hajos F.* Brain Res., 93, 485—489, 1975.
16. *Ralteri M., Angelini F., Levi G.* Eur. J. Pharmacol., 25, 411—414, 1974.
17. *Gahwiler B. H.* Brain Res., 99, 85—95, 1975.
18. *Krnjević K., Morris M. E.*—In: Drugs and Central Synaptic Transmission (eds. Bradley P. B., Dhawan B. N.), McMillan, London, p. 273—282, 1976.
19. *Freeman A. R. J.* Neurobiol., 4, 567—582, 1973.
20. *Stková E., Vyklíček L.* Neuroscience, 3, 1001—1007, 1978.

Институт биохимии
АН АрмССР, Ереван

Поступила 16. XI 1981