

УДК 612.822.1:615.214.2

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 НА СВЯЗЫВАНИЕ м-ХОЛИНО- И β -АДРЕНОБЛОКАТОРОВ СИНАПТОСОМАМИ МОЗГА КРЫС

МАНУХИН Б. И., КИЧИКУЛОВА Т. П., МОСКОВКИН Г. Н.

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова АН СССР, Москва

На синаптосомах мозга 15-дневных и взрослых крыс установлено достоверное различие в величине основных параметров V_{max} и K_d , характеризующих связывание специфических блокаторов м-холино- и β -адренорецепторов [3H] хиноклидинилбензилата и [3H] дигидроалprenолола.

Показано, что мембраноактивный компонент из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* — фосфолипаза A_2 в концентрации 1 мкг/мл вызывает, как правило, характерные изменения V_{max} и K_d связывания синаптосомами [3H] хиноклидинилбензилата и [3H] дигидроалprenолола.

Предполагается, что функциональные перестройки мембраны в процессе развития животных или вызванные фосфолипазой A_2 приводят к сдвигам в специфической активности адрено- и холинорецепторов и, как следствие, к изменению адренергической и холинергической реакций.

Процесс морфологического и функционального становления ЦНС у высших животных в онтогенезе не завершается на стадии пренатального развития, а продолжается после рождения [1]. В частности, существенно отличаются по физико-химическим свойствам липиды мембран взрослого и развивающегося мозга крыс в течение трех недель после рождения [2]. Поскольку специфические рецепторы нейротрансмиттеров являются интегральной частью цитоплазматической мембраны, можно ожидать, что способность синапсом связывать нейротрансмиттеры и их антагонисты может меняться по мере созревания мембран нейронов.

Было установлено, что яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и его мембраноактивные компоненты фосфолипаза A_2 , цитотоксин и нейротоксин вызывают достоверные характерные изменения адренергической и м-холинергической реакций изолированных отрезков тонкой кишки крысы [3, 4]. Изолированный отрезок тонкой кишки представляет сложную гетерогенную тканевую систему, изменение реакции которой на нейротрансмиттеры может быть следствием воздействия яда и его компонентов не только на специфические адрено- и холинорецепторы мышечных элементов, но и на клеточную мембрану, нервные сплетения и т. д. Поэтому для уточнения локализации действия мембраноактивных компонентов на медиаторную реакцию необходимо использовать более простую экспериментальную модель, ко-

торая структурно будет однородной системой. Одной из наиболее адекватных моделей для изучения элементарных нейрохимических процессов являются синапсомы. Синапсомы сохраняют ряд основных свойств нервных окончаний и постсинаптических мембран. В частности, способность их рецепторов связывать специфические лиганды, что изменяет трансмембранный транспорт ионов и медиаторов в синапсомы [5].

Ранее было показано, что яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и его мембраноактивный компонент фосфолипаза A_2 тормозят специфическое связывание синапсомами коры мозга крысы блокатора м-холинорецептора хинуклидинилбензилата [6].

Задачей настоящей работы было выяснение особенностей действия мембраноактивного агента фосфолипазы A_2 на способность синапсомом мозга взрослых и 15-дневных крыс связывать радиоактивные блокаторы м-холино- и β -адренорецепторов.

Материалы и методы

Синапсомы из коры мозга крыс линии *Wistar* выделяли по методу Najos [7]. Суспензию синаптических мембран инкубировали при 37° в течение 5 мин в присутствии фосфолипазы A_2 в концентрации 1 мкг/мл. После быстрого охлаждения в ледяной бане и добавления 15-кратного объема холодного раствора Тирле, суспензию синапсомом дважды центрифугировали при 20 000 g в течение 20 мин. Полученные осадки суспензировали в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 и использовали для радиолигандного анализа. Общий объем инкубационной среды—500 мкл, объем суспензии синапсомом—50 мкл, концентрация радиолигандов от 0,25 до 16 нМ. Для определения неспецифического связывания лигандов использовали атропин или пропранолол в концентрации 10 мкМ. Инкубацию проводили при 25° в течение 60 мин. Связывание останавливали быстрым охлаждением в ледяной бане. Связанный с синапсомами и свободный радиолиганд разделяли центрифугированием при 20000 g или фильтрацией через стеклянные фильтры GF/B («Whatman», Англия) с последующей их промывкой 6—8 объемами фосфатного буфера. Осадки после центрифугирования промывали двукратным объемом фосфатного буфера и инкубировали сутки в 0,5 мл 1%-ного раствора тритона X-100. Растворенный осадок или фильтр (после фильтрации) переносили во флаконы с сцинтилляционной жидкостью ЖС-8. В каждом опыте использовали 4—6 концентраций лиганда, по 3 параллели для каждой концентрации. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике SL-4000 («Intertechnique», Франция). Эффективность счета—37%. Содержание белка определяли по методу Лоури. Для расчета параметров связывания радиолигандов использовали метод наименьших квадратов. Статистическую обработку результатов проводили с применением критериев Стьюдента и непараметрических методов (кластерный анализ и ранговая корреляция).

В работе были использованы: [^3H] хинуклидинилбензилат, У.А. 12,3 Ки/ммоль, [^3H] дигидроалprenолол, У.А. 73 Ки/ммоль («Amersham», Англия), фосфолипаза A_2 из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (Институт биохимии АН Узбекской ССР).

Результаты исследования

Специфическое связывание использованных в работе лигандов холино- и адренорецепторов—это типичный насыщаемый процесс. Неспецифическое связывание на фоне атропина и пропранолола линейно зависит от концентрации лиганда. Фосфолипаза A_2 не изменяет общий характер кривой специфического связывания лигандов, но, как правило, снижает его величину. На неспецифическое связывание лигандов фосфолипаза A_2 достоверного влияния не оказывает. В качестве примера на рис. 1 представлены результаты одного из

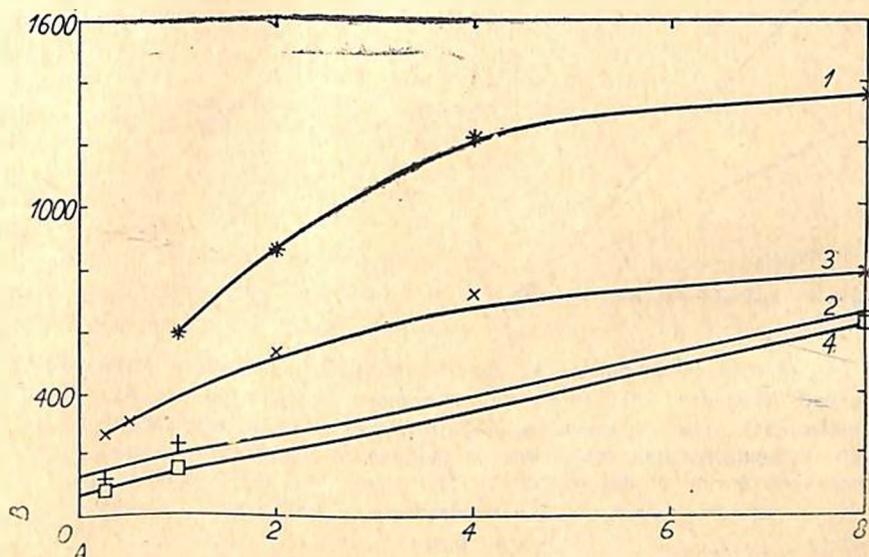


Рис. 1. Действие фосфолипазы A_2 на связывание [^3H]хинуклидинилбензилата синапсосомами головного мозга взрослых крыс. По оси абсцисс—концентрация свободного [^3H]хинуклидинилбензилата, по оси ординат—концентрация связанного [^3H]хинуклидинилбензилата, 1,2—специфическое и неспецифическое связывание лиганда (контроль); 3,4—специфическое и неспецифическое связывание лиганда после обработки фосфолипазой A_2 (1 мкг/мл). А—концентрация свободного лиганда (нМ), В—концентрация связанного лиганда (фмоль/мг белка)

опытов по влиянию фосфолипазы A_2 (1 мкг/мл) на специфическое и неспецифическое связывание синапсосомами головного мозга взрослых крыс [^3H] хинуклидинилбензилата. На рис. 2а приведены результаты того же опыта в координатах Хофсти-Скетчарда. В использованной системе координат экспериментальные точки удовлетворительно укладываются на одну прямую линию, что позволяет говорить о гомогенности пулов холинорецепторов. Под влиянием фосфолипазы

A_2 снижается концентрация мест связывания и величина K_d . Как видно из данных, приведенных в табл. 1, происходит достоверное снижение плотности мест связывания лиганда на 42% и значительное (на 46%), но статистически недостоверное (по Стьюденту) снижение величины K_d . Однако непараметрическая статистическая обработка результатов показывает достоверное различие между контрольной и опытной группами. Такое одностороннее снижение двух основных параметров связывания лиганда приводит к тому, что величина эффективности связывания $E = V_{max}/K_d$ [8] изменяется значительно меньше, чем основные параметры.

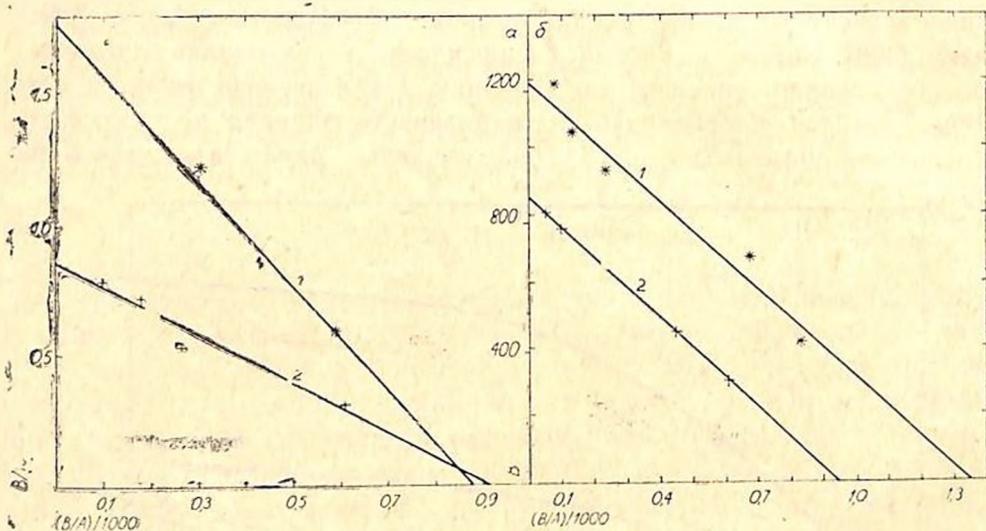


Рис. 2. Действие фосфолипазы A_2 на специфическое связывание [3H]хинуклидинилбензилата синапсосомами головного мозга взрослых (а) и 15-дневных (б) крыс (координаты Хофсти-Скетчарда). По оси абсцисс—отношение концентраций связанного и свободного лиганда. 1—контроль, 2—после обработки фосфолипазой A_2 (1 мкг/мл). А—концентрация свободного лиганда (нМ), В—концентрация связанного лиганда (фмоль/мг белка)

На рис. 2, б показан график связывания [3H]хинуклидинила синапсосомами мозга 15-дневных крыс. Также как у взрослых крыс места связывания лиганда представлены одним пулом. Видно, что способность синапсосом мозга молодых крыс связывать [3H]хинуклидинил отличается от взрослых только количественно. У них достоверно меньше мест связывания лиганда (V_{max}) и выше к нему сродство (табл. 1). Фосфолипаза A_2 в концентрации 1 мкг/мл вызывает достоверное снижение плотности мест связывания и не оказывает существенного влияния на величину K_d . Величина эффективности связывания лиганда E уменьшается на 27%, а V_{max} на 20%, то есть примерно в равной степени.

Общая закономерность связывания синапсосомами мозга крысы блокатора β -адренорецепторов [3H]дигидроалпренолола сходна со связыванием [3H]хинуклидинила. Наблюдается типичная кривая на-

сыщения с выходом на плато. Однако в координатах Хофсти-Скетчарда обнаруживается четко выраженный кооперативный эффект [9] с коэффициентом Хилла, равным 2. На рис. 3, а представлены результаты опыта по действию фосфолипазы A_2 на связывание $[^3H]$ дигидроалprenолола синапсосомами мозга взрослых крыс. Из графика следует, что места связывания лиганда представлены одним пулом, а равный двум коэффициент Хилла позволяет предположить, что к одному месту связывания присоединяются две молекулы лиганда.

Таблица 1

Влияние фосфолипазы A_2 (ФЛ- A_2) на связывание $[^3H]$ хинуклидинилбензилата синапсосомами мозга взрослых и 15-дневных крыс

Крысы		Контроль	ФЛ- A_2 , 1 мкг/мл
Взрослые (6 опытов)	K_d нМ	$1,91 \pm 0,29$	$1,93 \pm 0,12$
	V_{max} фмоль/мг	1730 ± 120	$897 \pm 43^*$
	$E = V_{max}/2K_d$	453	435
15-дневные (6 опытов)	K_d нМ	$0,91 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,09$
	V_{max} фмоль/мг	1129 ± 17	$912 \pm 34^*$
	$E = V_{max}/2K_d$	620	451

Примечание. * $p < 0,05$ (по Стьуденту).

Общий характер связывания лиганда синапсосомами 15-дневных крыс такой же, как и у взрослых. Существенно отличается плотность мест связывания. У взрослых она выше почти в 7 раз, выше у них также K_d —более, чем в 8 раз (табл. 2).

Таблица 2

Влияние фосфолипазы A_2 (ФЛ- A_2) на связывание $[^3H]$ дигидроалprenолола синапсосомами мозга взрослых и 15-дневных крыс

Крысы		Контроль	ФЛ- A_2
Взрослые (6 опытов)	K_d нМ	$8,81 \pm 5,43$	$9,53 \pm 0,97$
	V_{max} фмоль/мг	1928 ± 97	$1640 \pm 12^*$
	$E = V_{max}/2K_d$	109	86
15-дневные (6 опытов)	K_d нМ	$1,05 \pm 0,32$	$1,3 \pm 0,57$
	V_{max} фмоль/мг	276 ± 40	392 ± 54
	$E = V_{max}/2K_d$	131	152

Примечание. * $p < 0,05$ (по Стьуденту).

В синапсосомах взрослых крыс фосфолипаза A_2 в концентрации 1 мкг/мл вызывает (рис. 3, а) сдвиг прямой влево параллельно контрольной. Это указывает на снижение концентрации мест связывания лиганда без изменения сродства. Из средних данных, приведенных в табл. 2, видно, что фосфолипаза A_2 достоверно снижает плотность мест связывания $[^3H]$ дигидроалprenолола. Величина K_d в этих условиях практически остается неизменной.

Несколько другие результаты получены при действии фосфолипазы A_2 на синапсомы мозга 15-дневных крыс. На рис. 3, б видно, что в этих условиях происходит увеличение угла наклона прямой. Это указывает на повышение концентрации мест связывания лиганда. Фосфолипаза A_2 в синапсомы 15-дневных крыс не вызывает достоверных (по Стьюденту) изменений в параметрах, характеризующих связывание лиганда (табл. 2). Однако наблюдается четкая тенденция к увеличению мест связывания лиганда. По данным непараметрической статистики, эти изменения достоверны.

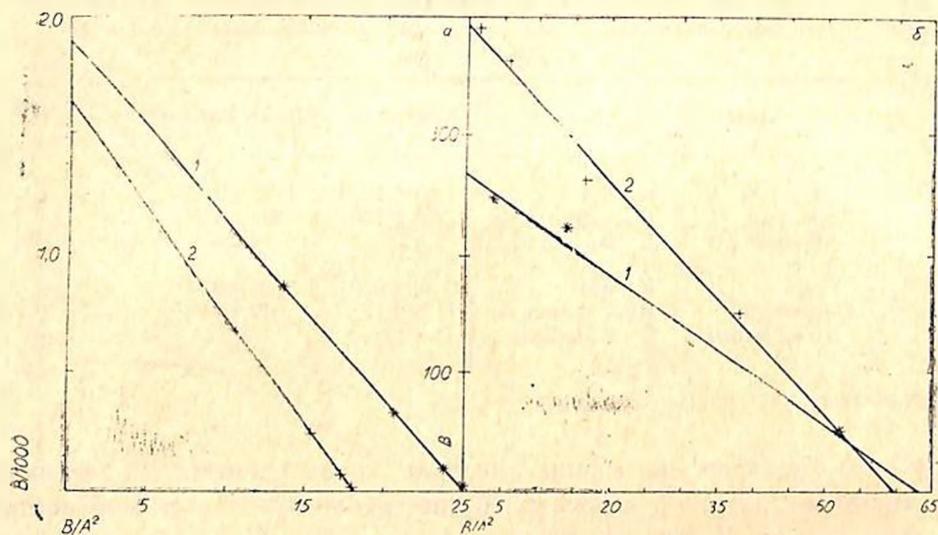


Рис. 3. Действие фосфолипазы A_2 на специфическое связывание $[^3H]$ дигидроалпrenoла синапсомы головного мозга взрослых (а) и 15-дневных (б) крыс (координаты Хофсти-Скетчарда)

Обсуждение результатов

По количественным характеристикам места связывания специфических лигандов синапсомы коры мозга взрослых и 15-дневных крыс достоверно отличаются. При этом концентрация мест связывания $[^3H]$ дигидроалпrenoла у взрослых крыс больше в 7 раз, а $[^3H]$ хинуклидинила в 1,5 раза. Величина K_d больше в 8 и 2 раза соответственно. Общий интегральный показатель связывания лигандов—эффективность (Е) у взрослых и молодых крыс отличается меньше. Эффективность связывания $[^3H]$ дигидроалпrenoла у 15-дневных крыс выше в 1,2 раза, а $[^3H]$ хинуклидинила в 1,4 раза.

Приведенные данные показывают, что по использованным характеристикам места связывания специфических адрено- и холиноблокаторов у взрослых и молодых крыс достоверно различаются по своим функциональным свойствам, что позволяет говорить о возрастной динамике функциональных свойств мембран нервных клеток.

По характеру действия на способность синапсом связывать радиолиганды фосфолипаза A_2 напоминает бесконкурентные ингиби-

торы [9]. Из данных табл. 1 и 2 видно, что достоверно под влиянием фосфолипазы A_2 снижается концентрация мест связывания лигандов. Однонаправленное изменение величины K_d не всегда выявляется по параметрическому критерию Стьюдента, но достоверно по непараметрической ранговой корреляции и кластерному анализу. Действие фосфолипазы A_2 на синапсомы 15-дневных крыс вызывает менее выраженные изменения в способности связывать [3H] дигидроалprenолол (табл. 2). Величина ингибиторной константы (K_i) при действии на связывание [3H] хиноклидинила составляет 4,20 и 2,08 мкг/мл для 15-дневных и взрослых крыс соответственно. Ингибиторное действие фосфолипазы A_2 на связывание [3H] дигидроалprenолола слабее величины K_i для взрослых крыс 5,69 мкг/мл, а на синапсомы 15-дневных крыс получена вместо ингибирования связывания небольшая его активация (табл. 2).

Нет никаких оснований связывать эффект фосфолипазы A_2 с прямым действием на специфические адрено- и холинорецепторы мембраны мозга крыс. Более вероятным можно считать ее действие на липидный слой мембраны, что вызывает конформационные перестройки мембраны, следствием которых являются полученные изменения параметров кинетики связывания лигандов. Представленные данные хорошо согласуются с работой Кээмбрэ и соавт. [10], в которой показана способность не измененной фосфолипазы A_2 ингибировать связывание [3H] хиноклидинила микросомной фракцией мозга крыс. Ранее были получены данные о нарушении фосфолипазой A_2 физиологических адренергической и холинергической реакций [3, 4]. На связь этого эффекта с действием фосфолипазы A_2 на фосфолипиды мембраны прямо или косвенно указывает ряд данных литературы. Считается, что фосфолипидный бислой в значительной степени определяет функциональное состояние мембраны нервных клеток [11], а фосфолипиды участвуют в трансмембранной передаче медиаторного воздействия [12]. Фосфолипаза A_2 снижает микровязкость мембран синапсом мозга крысы и вызывает деполяризацию мембран [13]. Продукт гидролиза фосфолипидов лизолецитин обладает холинолитическими свойствами [14]. От состава, текучести и окисляемости липидов мембраны мозга зависит чувствительность ЦНС крыс к раздражающим факторам [15].

Результаты проведенных экспериментов и анализ литературных данных показывает, что специфическая активность адрено- и холинорецепторов и мест связывания их блокаторов в значительной степени определяется функциональным состоянием цитоплазматической мембраны, в которой они расположены. Функциональные перестройки мембраны в процессе развития животных или вызванные мембраноактивной фосфолипазой A_2 приводят к сдвигам в специфической активности адрено- и холинорецепторов и, как следствие, к изменению в адренергической и холинергической медиаторных реакциях.

THE EFFECT OF PHOSPHOLIPASE A₂ ON m-CHOLINO- AND BETA-ADRENOBLOCKER BINDING BY RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

MANUKHIN B. N., KICHEKULOVA T. P., MOSKOVKIN G. N.

Koltzov Institute of Developmental Biology, USSR Academy of Sciences,
Moscow

Significant differences between brain synaptosomes of 15-day old and adult rats were detected in B_{max} and K_d for the binding of [³H]quinuclidinyl benzylate and [³H]dihydroalprenolol, specific blockers of m-cholino- and beta-adrenoreceptors.

Phospholipase A₂ (1 μg/ml), a membrane-active component of the Middle Asian cobra (*Naja Naja oxiana*) venom, reduced A_{max} and K_d for the [³H]quinuclidinyl benzylate and [³H]dihydroalprenolol binding by synaptosomes.

Our data suggest that functional modifications of membranes taking place during development or induced by phospholipase A₂ modulate the specific activity of adreno- and cholinoreceptors and as a result adrenergic and cholinergic responses are disturbed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Угрюмов М. В. Нейроэндокринная регуляция в онтогенезе, М., Наука, 1989.
2. Jacobson M. Developmental neurobiology, N. Y., Plenum Press, 1978.
3. Манухин Б. Н., Кичикулова Т. П., Бердыева А. Т. Физиол. журн. СССР, т. 73, № 9, с. 1175—1181, 1987.
4. Кичикулова Т. П., Бердыева А. Т., Манухин Б. Н. Физиол. журн. СССР, т. 74, № 6, с. 791—797, 1988.
5. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
6. Московкин Г. Н., Кичикулова Т. П., Манухин Б. Н. Нейрохимия, т. 8, № 3, с. 346—351, 1989.
7. Hajos F. Brain Res., v. 93, № 2, p. 435—451, 1975.
8. Манухин Б. Н. Физиология адренорецепторов (под ред. Т. М. Турпаева), М., Наука, 1968.
9. Диксон М., Узбб Э. Ферменты (под ред. В. К. Антонова, А. Е. Браунштейна), М., Мир, 1982.
10. Кээмбрэ Т. А., Лангел Ю. Л., Ринкен А. А., Тяхепылд Л. Я., Ярв Я. Л. Действие протеаз и фосфолипазы A₂ на мембраносвязанный холинорецептор мозга крыс, Нейрохимия, т. 3, № 2, с. 107—115, 1984.
11. Крепс Е. М. Липиды биологических мембран, Л., Наука, 1981.
12. Hirata F., Axelrod J. Phospholipid Methylation and Signal Transmission, Science, v. 209, № 4461, p. 1082—1090, 1980.
13. Брусованик В. И., Ерин А. И., Селищева А. А., Горбунов Н. В., Тюрин В. А., Прилипко Л. Л., Каган В. Е. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 3—10, 1986.
14. Звездина И. Д., Проказова Н. В., Вавер В. А., Турпаев Т. М. Физиол. журн. СССР, т. 56, № 11, с. 1600—1605, 1970.
15. Черныаская Л. И., Архипова Г. В., Бурлакови Е. Б. Нейрохимия, 1989, 6, № 2, с. 249—258, 1989.

Поступила 12. IX. 1990