



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1

ДЕЙСТВИЕ ПИКРОТОКСИНА И ГАМК НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ
 ^3H -НОРАДРЕНАЛИНА И ^{14}C -ГАМК ИЗ СИНАПСОМ КОРЫ
БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС

ТОЗАЛАКЯН П. В., АРАКЕЛЯН Л. Н., ГЕВОРКЯН Г. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Результаты исследований последних лет позволили предположить возможность пресинаптической регуляции высвобождения норадреналина (НА) со стороны ГАМК [1—4] и ауторегуляции высвобождения ГАМК [5, 6]. Однако истинные механизмы, лежащие в основе этих процессов, во многом остаются неясными. Показано, что важную роль в действии ГАМК на высвобождение НА и ГАМК играет Ca^{2+} , и оно тормозится или имитируется биккуллином в зависимости от концентрации последнего [1, 2, 6, 7]. Были получены также данные о том, что ГАМК влияет на транспорт K^+ через мембрану синапсом [8] и для реализации ее постсинаптического действия необходим Cl^- [9]. В литературе встречаются единичные сообщения о том, что Cl^- участвует и в пресинаптическом действии ГАМК [10]. Пикротоксин является неконкурентным ингибитором действия ГАМК [9] и в определенных концентрациях имитирует ее эффект на спонтанное высвобождение НА из срезов мезодienceфальной области мозга [2], при увеличении его концентрации тормозит электрически вызванное высвобождение ГАМК из срезов коры больших полушарий мозга [11].

Учитывая взаимосвязь НА- и ГАМК-ергической систем и возможность существования различных механизмов высвобождения НА и ГАМК, представлялось целесообразным сравнительное изучение высвобождения этих медиаторов в одинаковых условиях. В настоящей работе было изучено высвобождение ^3H -НА и ^{14}C -ГАМК из синапсом коры больших полушарий мозга крыс под действием 40 мМ K^+ и ГАМК. С помощью блокатора хлорных каналов—пикротоксина была сделана попытка выяснить значение Cl^- в регулирующем действии ГАМК.

В работе использовали ГАМК («Reanal», Венгрия), аминокснуксусную кислоту (АОУК), ипразид, аскорбиновую кислоту и пикротоксин («Sigma», США), меченые 1-[7- ^3H]-норадреналин-гидрохлорид (^3H -НА)

с У. А. 555 ГБк/ммоль и 4-амино-п-[U- ^{14}C]-масляную кислоту (^{14}C -ГАМК) с У. А. 8,288 ГБк/ммоль («Amersham Radiochemical Centre», Англия).

Синапсомы выделяли по методу Hajos [12] из коры больших полушарий мозга крыс массой 120—150 г. Полученную после центрифугирования в градиенте сахарозы синапсомную фракцию (в слое 0,8 М сахарозы) осторожно наполовину разбавляли холодной водой, и синапсомы осаждали центрифугированием 15 мин при 15000 g. Осадок ресуспендировали в 0,32 М сахарозе. Для инкубации и перфузии использовали Krebs-бикарбонатный буфер, pH 7,4, с составом (в мМ): NaCl—113; KCl—4; KH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; NaHCO_3 —25; CaCl_2 —2,5; глюкоза—11,5. С целью предотвращения распада ^3H -НА в буфер добавляли ипразид (0,1 мг/мл) и аскорбиновую кислоту (0,2 мг/мл). В случае 40 мМ K^+ в буфере часть NaCl заменяли соответствующим количеством KCl.

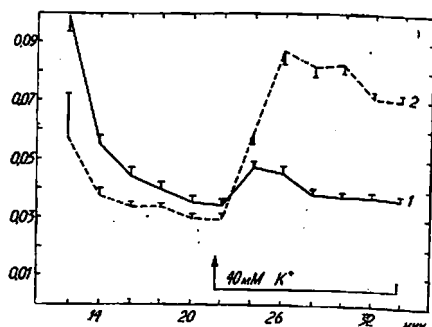


Рис. 1. Высвобождение ^3H -НА (1) и ^{14}C -ГАМК (2) из синапсом коры больших полушарий. По оси абсцисс — время суперфузии; по оси ординат — величина высвобождения ^3H -НА и ^{14}C -ГАМК. Представлены средние данные 6 опытов

Буфер постоянно насыщался смесью O_2/CO_2 (95 : 5). Суспензию вводили в буфер (примерно 1 мг белка/мл) и инкубировали 5 мин, после чего добавляли ^{14}C -ГАМК и ^3H -НА (в конечной концентрации 10^{-7} М). Инкубацию продолжали еще 10 мин. Затем по 1 мл инкубационной смеси вводили в суперфузионную камеру на MF-миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,65 мкм («Millipore Inc», США), промывали 0,15 М раствором NaCl, добавляли буфер и суперфузию проводили со скоростью 0,5 мл/мин. Там, где это было необходимо, среда содержала ГАМК (10^{-3} М), пикротоксин (10^{-3} М) и АОУК (10^{-3} и 10^{-4} М). Пробы отбирали по 1 мл после 10-й мин, когда устанавливалась относительно постоянная скорость высвобождения радиоактивности. Затем перфузаты и фильтр заливали 0,5 мл этанола и 10 мл сцинтиллятора Брея и считали радиоактивность ^{14}C и ^3H по программе двойной метки на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Intertechnique SL-4221», Франция. Величину высвобождения (f) рассчитывали по отношению радиоактивности в перфузате в данный момент к ее количеству в этот же момент в синапсоме на фильтре. Белок определяли по Lowry и соавт. [13].

В первой серии опытов нами было изучено высвобождение ^3H -НА и ^{14}C -ГАМК. Как видно из рис. 1, в случае ГАМК высвобождалась зна-

чительно большая часть захваченного медиатора, чем в случае ^3H -НА. Возможно, что это различие—следствие неодинакового ответа мембран НА- и ГАМК-ергических синапсом на действие K^+ или же обусловлено наличием в инкубационной среде ингибитора МАО-ипразида.

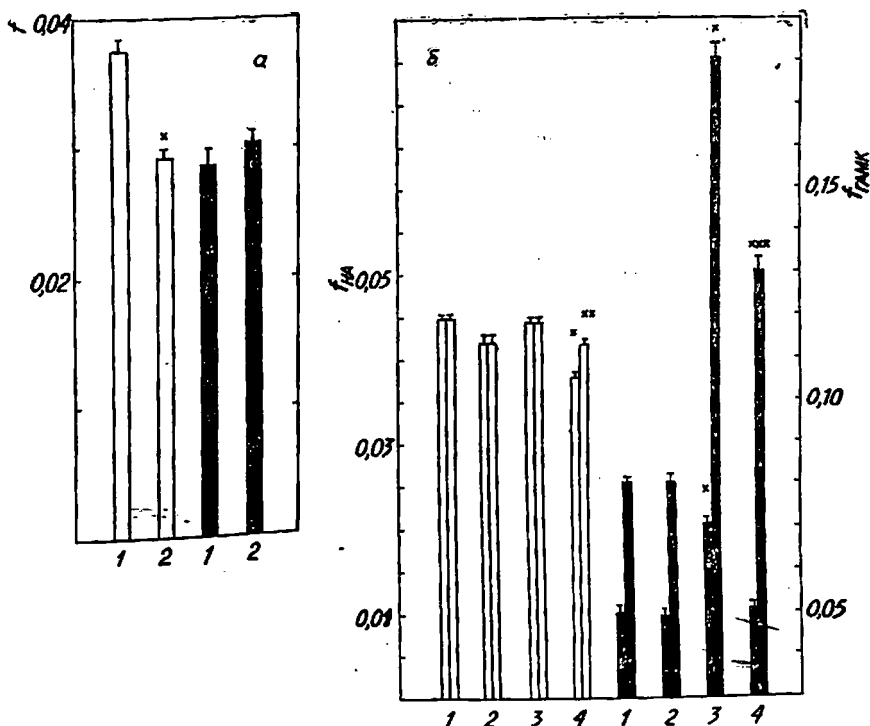


Рис. 2. Действие пикротоксина и ГАМК на высвобождение ^3H -НА□ и ^{14}C -ГАМК■ а—эффект пикротоксина на спонтанное высвобождение; б—эффект пикротоксина и ГАМК на высвобождение, вызванное 40 мМ K^+ . 1—контроль; 2—пикротоксин; 3—ГАМК; 4—пикротоксин+ГАМК.

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0.05$ по сравнению со смежным столбцом в данной паре; *** $p < 0.05$ по сравнению с ГАМК. Представлены средние данные 4—8 опытов

Привлекает внимание то обстоятельство, что максимум высвобождения ^{14}C -ГАМК выявлялся позже, чем у ^3H -НА. Согласно литературным данным [14], высвобождение биогенных аминов из нервных окончаний происходит из везикул, возможно, путем экзоцитоза, тогда как аминокислоты высвобождаются из цитоплазмы, сохраняя постоянным количество везикулярного медиатора. Различие, наблюдаемое в скорости этого процесса для ^3H -НА и ^{14}C -ГАМК, согласуется с предположением о различных механизмах их высвобождения. Следует отметить, что АОУК (10^{-3} и 10^{-4} М) в наших экспериментах практически не изменяла высвобождение ^{14}C -ГАМК, что указывает на то, что при стимуляции, в ос-

новном, высвобождается ГАМК, а не ее метаболиты. В литературе встречаются данные о том, что некоторые карбонильные агенты могут влиять на высвобождение катехоламинов [15]. Однако АОУК в примененных нами концентрациях не влияла на выход ^3H -НА.

При перфузии синапсом буфером, содержащим пикротоксин (10^{-3} М), наблюдалось статистически достоверное торможение спонтанного высвобождения ^3H -НА (рис. 2, а). Это действие имело, по всей вероятности, избирательный характер, так как выход ^{14}C -ГАМК при этом не изменялся.

Высвобождение ГАМК, вызванное 40 мМ K^+ , также не изменялось под действием пикротоксина (рис. 2, б). Однако «гомогенный обмен» (homöexchange) ГАМК в присутствии пикротоксина тормозился. При «гомогенном обмене» захват экзогенной ГАМК сопровождался вытеснением эндогенной. Поскольку пикротоксин в наших опытах не влиял на высвобождение ^{14}C -ГАМК, можно сделать вывод о том, что он тормозит захват ГАМК, тем более известно, что Cl^- вместе с Na^+ играет определенную роль в транспорте ГАМК [16], возможно, в качестве кофактора [17].

Привлекают внимание данные о действии пикротоксина на ГАМК на высвобождение ^3H -НА. Вызванное 40 мМ K^+ высвобождение ^3H -НА из синапсом не изменялось под действием ГАМК (10^{-3} М) и пикротоксина (10^{-3} М) (рис. 2, б). Совместное добавление ГАМК и пикротоксина в первые 4 мин уменьшало выход метки, затем вместо ожидаемого понижения и образования плато на кривой наблюдалось перманентное увеличение выхода ^3H -НА. Важно, что в это же время величина высвобождения ^{14}C -ГАМК уменьшалась, что указывает на специфичность действия пикротоксина на ГАМК в отношении НА-ергических синапсом. Для объяснения механизма обнаруженного эффекта необходимо детальное исследование действия пикротоксина на транспорт Cl^- . В качестве рабочей гипотезы для дальнейших исследований можно предположить следующий возможный механизм. Ранее было показано, что в суспензии деполяризованных синапсом коры больших полушарий ГАМК приводит к усилению входа K^+ [10]. Если предположить, что вход K^+ в этом случае сопровождается и входом Cl^- , то, возможно, блокирование пикротоксином его каналов может привести к перераспределению ионов и изменению динамики высвобождения НА. Это один из возможных механизмов, опровергнуть или подтвердить который помогут лишь дальнейшие эксперименты. Однако литературные данные о специфичности действия пикротоксина на каналы Cl^- [11] и результаты представленной работы позволяют утверждать, что Cl^- играет важную роль в пресинаптическом действии ГАМК на НА- и ГАМК-ергические окончания.

EFFECTS OF PICROTOXIN AND GABA ON THE RELEASE OF ^3H -NORADRENALINE AND ^{14}C -GABA FROM RAT BRAIN CORTICAL SYNAPTOSOMES

TOZALAKIAN P. V., ARAKELIAN L. N., GEVORKIAN G. A.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenian SSR, Yerevan

The release of ^3H -noradrenaline (^3H -NA) and ^{14}C -GABA from cortical synaptosomes has been studied. The maximum of potassium evoked ^{14}C -GABA release was reached later than that of ^3H -NA. K^+ -evoked increase of fractional rate constant was much more pronounced in the case of GABA than in the case of NA. These data are in agreement with finding that mechanisms of release of monoamine and amino acid transmitters are different. Picrotoxin (10^{-3}M) inhibited spontaneous efflux of ^3H -NA without effect on that of ^{14}C -GABA. Picrotoxin itself did not change the K^+ -evoked release of GABA, but decreased "homoexchange" of this transmitter possibly by the inhibition of GABA uptake. The potassium evoked release of ^3H -NA was not affected neither by GABA (10^{-3}M) nor by picrotoxin, but joint addition of these substances significantly changed the profile of the release. Data obtained show that Cl^- ions can play an important role in the presynaptic effect of GABA.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Тозалакян П. В., Есаян Н. А. Докл. АН АрмССР, 66, 168—171, 1978.
2. Yessatan N. H., Demirjian A. H., Tozalakian P. V. J. Neurochem., 28, 1151—1153, 1977.
3. Biswas B., Carlsson H. Naunyn-Schmiedelberg's Arch. Pharmacol., 299, 47—51, 1977.
4. Stars M. S., Tanner T. J. Neurochem., 25, 573—577, 1975.
5. Mitchell P. R., Martin I. L. Nature, 274, 904, 1978.
6. Тозалакян П. В., Аракелян Л. Н., Геворкян Г. А. Вopr. биохимии мозга, 14, 127—134, 1980.
7. Tozalakian P. V., Arakelian L. N., Buniatian H. Ch. In: Synaptic constituents in health and disease (eds. Brzin M., Sket D., Bachelard H.), p. 108, Ljubljana-Oxford, 1980.
8. Tozalakian P. V., Csillag A. Exp. Brain Res., 46, 24—28, 1982.
9. Takeuchi A., Takeuchi N. J. Physiol., 205, 377—391, 1969.
10. Adams P. R., Brown D. A. J. Physiol., 250, 85—120, 1975.
11. Johnston G. A. R., Mitchell J. F. J. Neurochem., 18, 2441—2446, 1971.
12. Hajos F. Brain Res., 93, 485—489, 1975.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. G. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
14. De Bellertiche J. S., Bradford H. F. J. Neurochem., 29, 335—344, 1977.
15. Dembiec D., Cohen G. J. Neurochem., 28, 1125—1128, 1977.
16. Kuhar M. J., Zarbin M. A. J. Neurochem., 31, 251—256, 1978.
17. Marchbanks R. M. J. Neurochem., 25, 463—470, 1975.

Поступила 14. VI 1983