

УДК 577. 352. 46 + 577. 352. 335

ТРАНСПОРТ [^3H] ГАМК ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ СИНАПТОСОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИМ АНТИОКСИДАНТОМ ФЕНОЗАНОМ-К

Жарикова А. Д., Жариков С. И.,
Буданцев А. Ю., *Чернявская Л. И.

Институт биологической физики АН СССР, Пуццано

**Институт химической физики АН СССР, Москва*

Исследовали активность высокоаффинного Na^+ -зависимого транспорта [^3H] ГАМК в синапсомы, мембрана которых модифицировалась синтетическим антиоксидантом фенозаном -К (калиевая соль γ -(4-окси-3,5-ди-трет-бутилфенил)-пропионовой кислоты). Показано, что в зависимости от концентрации фенозан-К оказывает противоположные влияния на транспорт [^3H] ГАМК. Низкие концентрации фенозана-К (10^{-7} и 10^{-5}M), добавленные в течение 5-минутной преникубации синапсом, стимулировали мембранный транспорт [^3H] ГАМК. В концентрации 10^{-3} и 10^{-4}M фенозан-К не оказывал эффекта. При использовании высокой концентрации фенозана-К (10^{-1}M) наблюдалось ингибирование транспорта [^3H] ГАМК через мембраны синапсом, которое устранялось при одновременном добавлении в инкубационную среду БСА (1 мг/мл). Анализ собственных результатов и данных литературы позволяет высказать предположение, что эффекты синтетического антиоксиданта фенозана-К на Na^+ -зависимый мембранный транспорт [^3H] ГАМК в синапсомы опосредуются через эндогенные насыщенные жирные кислоты, которые могут осуществлять контроль микровязкости синаптических мембран.

* * *

Установлено, что пресинаптические окончания ГАМК-ергических нейронов способны поглощать ГАМК из синаптической щели с помощью высокоаффинной Na^+ -зависимой транспортной системы захвата [1]. Этот механизм, наряду с поглощением в постсинаптические элементы и глию, по-видимому, служит для удаления ГАМК, высвободившейся из нервного окончания в процессе нейротрансмиссии [2,3]. Основным компонентом системы транспорта ГАМК через синаптические мембраны в головном мозгу крыс является гликопротеин с M_r 80 кД, способный образовывать димеры [3]. К настоящему времени довольно детально исследована зависимость функциональной активности ГАМК-переносчика от градиента концентраций ионов по разные стороны пресинаптической мембраны и установлено, что переносчик катализирует котранспорт Na^+ , Cl^- и ГАМК [4].

Несомненно, что в функционировании ГАМК-переносчика значительная роль должна принадлежать мембранным липидам, которые могут влиять на конформацию и функциональную активность белка-переносчика одновременно с помощью различных механизмов (аллостерического взаимодействия, изменения соотношения липид-белок и микровязкости мембран, изменения заряда липидов и т. д.). Однако имеющиеся в литературе

данные пока не позволяют четко определить роль липидов синаптических мембран в транспорте ГАМК [5, 6]. Одним из эффективных подходов к изучению роли мембранных липидов в функционировании ГАМК-переносчика является химическая модификация липидного биослоя. В последнее время для изучения значения состава и свойств липидов в процессах, происходящих в синаптических мембранах, активно используются синтетические антиоксиданты [7, 8]. В настоящей работе сообщаются результаты исследования транспорта [^3H] ГАМК через мембраны синапсом, модифицированные антиоксидантом фенозаном-К, относящимся к классу экранированных фенолов.

Материалы и методы

В работе использовали: HEPES («Sigma», США), трис («Merck», ФРГ), БСА («Koch-Light Lab», Великобритания), γ -амино [2,3- $^3\text{H}_2$]-масляную кислоту гидрохлорид (У. А. 57,43 Ки/ммоль, Ленинград, СССР), фенозан-К (водорастворимая калиевая соль γ -(4-окси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовой кислоты; синтезирован в Институте химической физики АН СССР). Остальные реактивы отечественного производства квалификации хч и осч.

Препараты синапсом получали из коры и подкорковых структур мозга белых крыс-самцов линии *Wistar* массой 140—150 г по методу Hajos [9]. Конечный осадок синапсом ресуспендировали в 0,32 М сахарозе (HEPES-NaOH-буфер, 10 mM, pH 7,4) и хранили на холоде. Аликвоты полученной суспензии синапсом объемом 50 мкл (200 мкг синапсомного белка, определяемого по Lowry и соавт. [10]) добавляли в инкубационные пробирки со средой следующего состава (в mM): NaCl — 132; KCl — 5; MgCl_2 — 1,2; NaH_2PO_4 — 1,2; CaCl_2 — 1,2; HEPES — 10; глюкоза — 10; pH инкубационной среды доводили до 7,4 трисом. Перед добавлением в пробирки [^3H] ГАМК синапсомы преинкубировали в данной среде при 37° в течение 5 мин. Фенозан-К добавляли в пробирки в начале преинкубации, а в некоторых экспериментах за 10 с до добавления [^3H] ГАМК. Конечный объем среды в период инкубации с [^3H] ГАМК составлял 1 мл, а начальная концентрация [^3H] ГАМК — 10^{-5} М. Инкубация синапсом с [^3H] ГАМК продолжалась 5 мин. Транспорт [^3H] ГАМК в синапсомы останавливали методом фильтрования через мембранные фильтры («Millipore», США) с размером пор 0,65 мкм. Количество аккумулязированной в синапсомах [^3H] ГАМК оценивали по радиоактивности фильтров, определяемой в сцинтилляционной смеси на основе толуола. Количество [^3H] ГАМК, накопившейся в синапсомах путем активного Na-зависимого транспорта через синапсомные мембраны, определяли по разности между значениями, полученными в присутствии и в отсутствие Na^+ (в последнем случае NaCl в инкубационной среде заменяли эквимоллярным количеством LiCl). Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных программ на ЭВМ.

Результаты и обсуждение

Полученные нами экспериментальные данные по влиянию различных концентраций фенозана-К на Na-зависимый транспорт [^3H]ГАМК через мембраны синапсом, выделенных из головного мозга крыс, представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, в зависимости от использованной концентрации фенозан-К оказывает противоположные эффекты на захват

Таблица 1

Влияние различных концентраций фенозана-К на Na-зависимый транспорт [^3H] ГАМК в синапсомы

	Накопление [^3H] ГАМК в синапсомы (в пмоль на 1 мг белка за 5 мин)
Контроль	3,08 ± 0,04
Фенозан, 10^{-7}M	3,33 ± 0,13
10 ⁻⁸ M	3,62 ± 0,09*
10 ⁻⁹ M	3,56 ± 0,09*
10 ⁻¹⁰ M	3,23 ± 0,11
10 ⁻¹¹ M	2,22 ± 0,06*
Фенозан 10^{-7}M + БСА (1 мг/мл)	2,88 ± 0,15
БСА (1 мг/мл)	2,94 ± 0,18

Примечание. Представлены данные 4-5 экспериментов в 3-х параллелях. *Различия с контролем достоверны с $p < 0,001$.

[^3H]ГАМК синапсомы. Низкие концентрации фенозана-К (10^{-7} и 10^{-8} M) увеличивают аккумуляирование [^3H]ГАМК в синапсомы на 17,9 и 16,3% соответственно. В концентрациях 10^{-9} и 10^{-10} M фенозан-К не оказывал эффекта. Характерно, что отсутствие эффекта фенозана-К при концентрации 10^{-11} M наблюдалось при разных временах преинкубации

Таблица 2

Влияние разного по времени контакта фенозана-К (10^{-7}M) с мембранами синапсом на Na-зависимый транспорт [^3H]ГАМК

	Захват [^3H] ГАМК синапсомы (в пмоль на 1 мг белка за 5 мин)
Контроль	3,08 ± 0,04
Фенозан 10^{-7}M , 5 мин	3,47 ± 0,15
10 мин	3,23 ± 0,11
15 мин	2,97 ± 0,58

Примечание. Представлены данные 3-4 экспериментов, сделанных в 3-х параллелях.

с синапсомы, или другими словами, при разном времени его контакта с синаптическими мембранами (табл. 2). Высокие концентрации фенозана-К (10^{-3} M) на 27,9% ингибировали Na-зависимый транспорт [^3H]ГАМК в синапсомы. Ингибирующее влияние высокой концентрации фенозана-К устранялось при одновременном добавлении в инкубационную среду БСА (1 мг/мл), который не влиял на мембранный транспорт [^3H]ГАМК. Анализ концентрационной зависимости эффектов фенозана-К на синапсомный транспорт [^3H]ГАМК позволяет высказать ряд предпо-

ложений о возможных механизмах его действия на этот процесс. Известно, что включение антиоксидантов в синаптические мембраны сопровождается повышением устойчивости мембранных липидов к окислению, а также неспецифическим модифицирующим действием антиоксидантов на структуру мембран [11—13]. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что в зависимости от концентрации в действии антиоксидантов, в том числе и фенозана-К, может преобладать тот или иной эффект. Так, Хохлов, Бурлакова [7] установили, что в наномолярных и миллимолярных концентрациях фенозан-К по-разному влияет на физико-химические свойства синаптических мембран, что коррелирует с разнонаправленными изменениями активности М-холинергической системы головного мозга крыс. По мнению авторов, эффективность низких концентраций фенозана-К не обусловлена структурными изменениями мембранных липидов, а, вероятно, связана с наличием специфических мест связывания для фенозана-К на синаптической мембране. С другой стороны, эффекты фенозана-К в концентрациях выше 10^{-5} М авторы объясняют его неспецифическим взаимодействием с синаптическими мембранами и обнаруженными изменениями физико-химического состояния мембранных липидов. Концентрационная зависимость влияния на свойства модельных и биологических мембран установлена также для дибунола [13] и α -токоферола [14,15]. Показано, например, что α -токоферол в концентрации 10^{-4} М оказывает стабилизирующее действие на синапсосомы, обработанные олеиновой кислотой или фосфолипазами A_2 и C , которое проявляется в снижении отрицательного поверхностного потенциала, повышении трансмембранного потенциала и увеличения микровязкости синаптических мембран [15]. Стабилизирующее действие α -токоферола на биологические мембраны связывают с его прямым взаимодействием со свободными жирными кислотами, образующимися при гидролизе мембранных фосфолипидов под действием фосфолипаз [16]. Более высокие концентрации α -токоферола порядка 10^{-3} М вызывают значительное увеличение подвижности модельных мембран из дипальмитоил- α - α -фосфатидилхолина и линолевой кислоты [14] и генерацию супероксидного анион-радикала в синаптических мембранах [20]. Учитывая вышеизложенное, можно предполагать, что в проведенных нами экспериментах в низких концентрациях (10^{-7} и 10^{-5} М) фенозан-К взаимодействует с эндогенными свободными жирными кислотами, присутствие которых показано в препаратах синапсосом [17]. В результате взаимодействия может устраняться ингибирующий эффект эндогенных ненасыщенных жирных кислот на обратный захват нейромедиаторов, обнаруженный ранее рядом исследователей [17, 18], а в проведенных нами экспериментах наблюдается увеличение Na-зависимого транспорта [3 H] ГАМК в синапсосомы. В свою очередь действие высоких концентраций фенозана-К (10^{-3} М) на мембранный транспорт [3 H] ГАМК, вероятно, связано с дестабилизацией синаптических мембран за счет собственного (или опосредованного другими механизмами) хаотропного эффекта. При использовании промежуточной концентрации фенозана-К (10^{-4} М) его хаотропный эффект не проявляется, так как компенсируется стабилизирующим действием. По этой причине мы и не наблюдали измене-

ний синаптосомного транспорта [^3H] ГАМК под действием 10^{-4} М фенозана-К.

Полученный нами факт, что БСА предотвращает ингибирующий эффект фенозана-К (10^{-3} М) на Na-зависимый транспорт [^3H] ГАМК, можно объяснить либо связыванием БСА с высвобождающимися под действием фенозана-К ненасыщенными жирными кислотами (если такое высвобождение действительно имеет место), либо непосредственным взаимодействием БСА с фенозаном-К и устранением хаотропного эффекта последнего. Для уточнения действительно происходящих процессов необходимы дополнительные исследования. Однако мы склонны предполагать, что эффекты синтетического антиоксиданта фенозана-К на Na-зависимый мембранный транспорт [^3H] ГАМК в синаптосомы опосредуются через эндогенные свободные ненасыщенные жирные кислоты, которые контролируют микровязкость синаптических мембран.

Высказанное нами предположение относительно механизма действия различных концентраций фенозана-К на Na-зависимый мембранный транспорт [^3H] ГАМК в синаптосомы находит подтверждение в работах других исследователей. Так, например, способность фенозана-К снижать микровязкость клеточных мембран обнаружена на плазматических мембранах печени [8] и синаптических мембранах головного мозга крыс [7]. Однако следует отметить, что, по данным Мальцевой и Бурлаковой [8], фенозан-К в концентрации 10^{-4} М не изменяет микровязкость синаптических мембран, что согласуется с наблюдавшимся нами отсутствием эффекта этой концентрации на синаптосомный захват [^3H] ГАМК.

Наша трактовка полученных в данной работе экспериментальных данных согласуется с результатами исследований Ковалевой и соавт. [19], в которых изучалось действие антиоксидантов на захват и высвобождение [^3H] серотонина синаптосомами мозга крыс и одновременно с этим определялось содержание продуктов перекисного окисления липидов. Указанными авторами установлено, что антиоксиданты α -токоферол, 7-оксипаминазин, аминазин, пегинол и 2-метил-6-этил-3-оксипиридин в достаточно высоких концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ М) тормозят захват и стимулируют высвобождение [^3H] серотонина синаптосомами с помощью механизмов, не связанных с ингибированием перекисного окисления фосфолипидов. И это еще раз дает нам основание объяснять ингибирующее действие 10^{-3} М фенозана-К не антиокислительными свойствами, а его действием на структуру синаптических мембран.

Таким образом, анализ полученных нами данных по влиянию различных концентраций фенозана-К на высокоаффинный транспорт [^3H] ГАМК через синаптические мембраны подтверждает высказанное нами ранее [21] положение о том, что функциональная активность систем мембранного транспорта нейромедиаторов зависит от микровязкости синаптических мембран.

Авторы выражают свою признательность проф. Е. Б. Бурлаковой за поддержку в проведении работы и полезные обсуждения полученных результатов.

TRANSPORT OF [3 H]- γ -AMINO BUTIRIC ACID THROUGH SYNAPTOSOMAL MEMBRANES MODIFIED BY SYNTHETIC ANTIOXIDANT — PHENOZANE-K

Zharikova A. D., Zharikov S. I.,
Budantsev Yu. A.,*Chernyavskaya L. A.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Pushchino

**Institute of Chemical Physics,*

USSR Academy of Sciences, Moscow

Activity of high affinity Na^+ -dependent transport of [3 H]- γ -aminobutyric acid ([3 H]-GABA) was studied in synaptosomal membranes modified with synthetic antioxidant—phenozane-K (potassium salt of γ -(4-oxy-3,5-di-tert-butylphenyl)propionic acid). It was shown that the effects of phenozane-K on [3 H]-GABA transport are opposite depending on its concentration. When added in low concentrations (10^{-7} and 10^{-5} M) during 5 min preincubation of synaptosomes, phenozane-K stimulated membrane transport of [3 H]-GABA, while in concentration 10^{-9} and 10^{-4} M phenozane-K was ineffective. Used in high concentrations (10^{-3} M) phenozane-K inhibited [3 H]-GABA transport through synaptosomal membranes; this inhibition could be eliminated with simultaneous addition of bovine serum albumin (1 mg/ml) to the incubation medium. Analysis of the results obtained and literary data allows us to suppose that the effects of synthetic antioxidant, phenozane-K, on Na^+ -dependent membrane transport of [3 H]-GABA into synaptosomes is mediated by endogenous nonsaturated fatty acids which, probably, regulates microviscosity of synaptic membranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iversen L. L. Brit. J. Pharmacol., v. 41, p. 571—591, 1971.
2. Cupello A., Huden H. Cell and Mol. Neurobiol., v. 6., p. 1—16, 1986.
3. Radin R., Bendahan A., Kanner B. I. J. Biol. Chem., v. 261, p. 15437—15441, 1986.
4. Radian R., Kanner B. I. J. Biol. Chem., v. 260, p. 11859—11865, 1985.
5. De Medio G. E., Trovarelli G., Hamberger A., Porcellati G. Neurochem. Res., v. 5, p. 171—197, 1980.
6. Chweh A. Y., Leslie S. W. J. Neurochem., v. 38, p. 691—695, 1982.
7. Бурлакова Е. Б., Хохлов А. П. Биол. мембраны, т. 1, с. 117—121, 1984.
8. Мальцева Е. Л., Бурлакова Е. Б. Биол. мембраны, т. 3, с. 773—780, 1986.
9. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
11. Бурлакова Е. Б., Джалябова М. И., Гавахария В. О., Глуценко Н. Н., Молочкина Е. М., Штолько Б. Н. — В кн.: Биодантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии, М., Наука, с. 113—140, 1982.
12. Ерин А. Н., Горбунов Н. В., Брусованик В. И., Тюрин В. А., Прилипко Л. Л. Биохимия, т. 50, с. 998—1004, 1985.
13. Иванов И. И., Королев Н. П., Семин Б. К., Лап В., Вундерлих Э., Пликет Ф. Биол. науки, № 5, с. 35—40, 1986.
14. Скрыпин В. И., Ерин А. Н., Братковская Л. Б., Казан В. Е. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 97, с. 673—675, 1984.

15. Брусованик В. И., Ерин А. Н., Селищева А. А., Горбунов Н. В., Тюрин В. А., Прилипко Л. Л., Казан В. Е. Нейрохимия, т. 5, с. 3—10, 1986.
16. Ерин А. Н., Спириг М. М., Табидзе Л. В., Казан В. Е. Биохимия, т. 48, с. 1855—1861, 1983.
17. Rhoads D. E., Ocker R. K., Peterson N. A., Raghupathy E. Biochemistry, v. 22, p. 1965—1970, 1983.
18. Rhoads D. E., Kaplan M. A., Peterson N. A., Raghupathy E. J. Neurochem., v. 38, p. 1255—1260, 1982.
19. Ковалева Е. С., Прилипко Л. Л., Муранов К. О., Казан В. Е. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 95, с. 55—57, 1983.
20. Takahashi M., Yoneda Y., Kurijama K. Brain Res., v. 296, p. 164—167, 1984.
21. Жарикова А. Д., Жарикова С. И. Нейрохимия т. 6, N 4, с. 581—585, 1987.

Поступила 15.10.1988