НЕЙРОХИМИЯ

т. 5, № 4, 1986

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.19+612.015.6

Na^+-ЗАВИСИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ^{3}H-ГАМК СИНАПТОСОМАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИЖЕЛУДОЧКОВОГО ВВЕДЕНИЯ 6-ОКСИДОФАМИНА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

ГРИГОРЬЕВ И. П., НЕОКЕСАРИЙСКИЙ А. А.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

При изучении медиаторных систем в ЦНС возникает вопрос о характере межмедиаторных взаимодействий, которому посвящается множество исследований. При этом очень редко изучают состояние пресинаптического рецепторного аппарата. Этот недостаток полностью относится и к изучению взаимодействия катехоламинергической и ГАМК-ергической систем в коре больших полушарий. Установлено, что кора больших полушарий богато иннервирована норадренергическими и дофаминергическими волокнами [1], а ГАМК-ергические нейроны, отростки которых заканчиваются в пределах неокортекса, являются одной из основных популяций кортикальных клеток [1]. О взаимодействии этих основных тормозных медиаторных систем коры большого мозга известно лишь то, что выброс ГАМК из коры усиливается после внутрижелудочкового введения норадреналина [2]. В настоящем сообщении приводятся данные о Na^+-зависимом связывании ^{3}H-ГАМК синаптосомами коры больших полушарий мозга крыс после резкого снижения содержания катехоламинов под влиянием 6-оксидофамина (6-ОНДА), избирательного катехоламинергического нейротоксина [3]. Na^+-зависимое связывание ГАМК является преимущественно пресинаптическим [4].

По общепринятой методике для предотвращения окисления 6-ОНДА в растворе в него добавляют аскорбиновую кислоту. Однако в литературе появились данные о действии аскорбата на присоединение меченых лигандов к дофаминовым, мускариновым, опиатным, адренергическим β-рецепторам [5]. Для выявления возможного эффекта аскорбата на Na^+-зависимое связывание ^{3}H-ГАМК нами прове-

дены две параллельные серии экспериментов: 6-ОНДА вводили в желудочки мозга с добавлением аскорбиновой кислоты или в её отсутствие.

Взрослым крысам-самцам линии *Wistar* под эфирным наркозом билатерально инъецировали в боковые желудочки мозга по 125 мкг (в расчёте на свободное основание) 6-ОНДА-гидрохлорида («Serva», ФРГ) в 20 мкл стерильного физиологического раствора с добавлением L-аскорбиновой кислоты (1 мг/мл) или без нее. Повреждение норадренергической системы после введения 6-ОНДА подтверждалось отсутствием постдекапитационных судорог. Контролем служили крысы, которым при тех же условиях вводили раствор-носитель без 6-ОНДА. Через 2, 5, 21—23 суток животных декапитировали, кору больших полушарий 3—4-х животных объединяли и получали грубую митохондриальную фракцию P_2 [6]. По 0,1 мл полученной суспензии в 0,32 М сахарозе (400—600 мкг белка) добавляли в пробирки с 1,9 мл инкубационной среды следующего состава (в мМ): NaCl—117,9; KCl—4,7; $CaCl_2$—2,5; $MgSO_4$—1,2; K_2HPO_4—1,2; трис-HCl буфер (pH 7,4)—50; глюкоза—5,6. После 10 мин преинкубации в пробирки добавляли ГАМК—2,3$^3H_2$ (*У. А.* 1,3 ТБк/ммоль, «Изотоп», Ленинград) для получения конечной концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М. Неспецифическое связывание определяли в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М немеченой ГАМК в инкубационной среде. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Инкубацию при 0—4° прекращали через 10 мин центрифугированием с ускорением 16000*g* при 4° 10 мин и дважды промывали охлаждённым на льду трис-HCl буфером (pH 7,4) с последующим центрифугированием при тех же условиях. Полученный осадок растворяли в 0,4 мл 2,5%-ного раствора ДДС-Na в 0,1%-ном растворе тритона Х-100 в течение 16—24 ч и в 7 мл тритозоля [7] измеряли величину радиоактивности на сцинтилляционном счётчике Isocap-300 («Beckman», США). Белок определяли по Lowry и соавт. [8]. Достоверность различий результатов оценивали по критерию Стьюдента.

Специфическое связывание ^{3}H-ГАМК синаптосомами коры больших полушарий после введения 6-ОНДА с добавлением аскорбиновой кислоты было достоверно выше, чем после введения раствора-носителя через 5 и 21—23 суток (таблица). В серии экспериментов без добавления аскорбиновой кислоты связывание ^{3}H-ГАМК через 5 суток после инъекции 6-ОНДА было значительно ниже, чем после введения физиологического раствора.

Таким образом, внутрижелудочковое введение 6-ОНДА как с аскорбиновой кислотой, так и без неё существенно изменяло Na^+-зависимое связывание ^{3}H-ГАМК синаптосомами коры мозга через 5 и 21 сутки. Как показано нами ранее, инъекция 6-ОНДА с аскорбиновой кислотой в боковые желудочки в 2,5—3 раза снижала содержание норадреналина в коре мозга через 2 и 5 суток [9], количество дофамина также резко снижалось [10]. В условиях дефицита катехоламинов в коре мозга связывание ^{3}H-ГАМК было значительно выше после введения 6-ОНДА с аскорбиновой кислотой. В отсутствие последней 6-ОНДА снижал Na^+-зависимое связывание ^{3}H-ГАМК. В любом случае изменение синаптосомного связывания ^{3}H-ГАМК в коре мозга после повреждения катехоламинергической системы с помощью 6-ОНДА указывает на возможность прямого или опосредованного действия катехоламинов на пресинаптическое присоединение медиатора в ГАМК-ергической системе неокортекса.

Таблица

Специфическое Na^+-зависимое связывание ^{3}H-ГАМК синаптосомами коры больших полушарий мозга крыс в разные сроки после внутрижелудочкового введения 6-оксидофамина (6-ОНДА) с добавлением или в отсутствие L-аскорбиновой кислоты (в тыс. расп./мин/мг белка)

	2 суток			5 суток			21–23 суток		
	6-ОНДА на физиологическом растворе	Достоверность различий	физиологический раствор	6-ОНДА на физиологическом растворе	достоверность различий	физиологический раствор	6-ОНДА на физиологическом растворе	достоверность различий	физиологический раствор
С аскорбиновой кислотой	118,5±26,0 (3)	$p>0,05$	83,5±23,9 (3)	93,8±8,9 (5)	$p<0,001$	53,5±13,1 (4)	101,1±13,4 (5)	$p<0,05$	69,4±12,0 (4)
Достоверность различий	$p>0,05$		$p>0,05$	$p>0,05$		$p<0,001$	—		—
Без аскорбиновой кислоты	127,2±37,1 (4)	$p>0,05$	95,0±28,6 (3)	83,4±31,4 (5)	$p<0,05$	143,2±30,1 (5)	—		—

Примечание. В скобках указано число опытов. Специфическое Na^+-зависимое связывание ^{3}H-ГАМК синаптосомами коры больших полушарий мозга интактных крыс составляло 118,4±28,5 тыс. расп/мин/мг белка (9 опытов).

Вместе с тем, в полученных данных отчетливо проявился эффект аскорбиновой кислоты на Na^+-зависимое связывание ^{3}H-ГАМК. Так, на 5-е сутки после внутрижелудочкового введения 0,1%-ного раствора L-аскорбиновой кислоты на физиологическом растворе связывание ^{3}H-ГАМК было в 2 с лишним раза ниже, чем после введения физиологического раствора (таблица). На таком же низком уровне связывание ^{3}H-ГАМК оставалось и через 3 недели после введения раствора аскорбиновой кислоты. Обращает на себя внимание то, что одновременное введение 6-ОНДА и аскорбиновой кислоты снижало ингибирующий эффект на связывание ^{3}H-ГАМК, который проявляли оба соединения порознь после внутрижелудочкового введения.

Как уже отмечалось, в литературе описано действие аскорбиновой кислоты на центральные моноаминовые, мускариновые, опиатные рецепторы [5, 11], но эффект аскорбата на связывание ^{3}H-ГАМК ранее не наблюдали. Модулирующее действие аскорбиновой кислоты на рецепторное связывание объясняют её влиянием на интенсивность перекисного окисления мембранных липидов [11], играющих важную роль в регуляции Na^+-зависимого связывания ^{3}H-ГАМК [12]. Вместе с тем, нельзя исключить и другие механизмы влияния аскорбата на рецепторы, возможно, связанные с прямым восстановительным действием этого соединения.

Введение аскорбиновой кислоты в желудочки мозга (в обход ГЭБ), по-видимому, увеличивает её концентрацию в межклеточной жидкости головного мозга, где она строго поддерживается на постоянном уровне [13, 14], что приводит к изменению структуры нервных мембран. Действительно, на ультраструктурном уровне через 2—10 суток после внутрижелудочковой инъекции аскорбиновой кислоты в коре больших полушарий и подкорковых структурах мозга наблюдали характерные перестройки в мембранах аксонов и дендритов, в том числе и в синаптических мембранах [15]. Полученные нами данные свидетельствуют, что как введение аскорбиновой кислоты в мозговые желудочки, так, возможно, и увеличение концентрации аскорбата в ткани головного мозга вследствие каких-либо причин, может вести к продолжительному (не менее 3 недель) снижению интенсивности Na^+-зависимого связывания ГАМК и, таким образом, изменять синаптическую активность в ГАМК-ергических нейронах коры мозга.

Na^+-DEPENDENT ^{3}H-GABA BINDING TO RAT BRAIN CORTICAL SYNAPTOSOMES AFTER THE INTRAVENTRICULAR INJECTION OF 6-HYDROXYDOPAMINE AND ASCORBIC ACID

GRIGOREV I. P., NEOKESARIYSKIY A. A.

Institute of Experimental Medicine, USSR Acad. Med. Sci., Leningrad

Na^+-dependent ^{3}H-GABA binding to rat brain cortical synaptosomes 5 and 21 days after the bilateral intraventricular injection of 125 ug of 6-hydroxydopamine with 20 ug of L-ascorbic acid in 20 ul saline

was significantly higher than after the injection of saline. Administration of 6-hydroxydopamine or ascorbic acid alone has a strong inhibitory effect on ^{3}H-GABA binding 5 days later. The inhibitory effect of ascorbic acid as well as the possibility of the catecholaminergic influence on Na^+-dependent (presumably presynaptic) GABA binding in the neocortex are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Emson P. C., Lindvall O.* Neuroscience, v. 4, p. 1—30, 1979.
2. *Moroni F., Bianchi C., Moneti G., Tanganelli S., Spidalieri G., Guandalini P., Beani L.* Brain Res., v. 232, p. 216—221, 1982.
3. *Kostrzewa R. M., Jacobowitz D. M.* Pharmacol. Rev., v. 26, p. 199—288, 1974.
4. *Zukin S. R., Young A. B., Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 71, p. 4802—4807, 1974.
5. *Hadjiconstantinou M., Neff N. H.* Neuropharmacol., v. 22, p. 939—943, 1983.
6. *Hogebum G. H., Schneider W. C., Pallade G. E. J.* Biol. Chem., v. 172, p. 619—635, 1948
7. *Fricke U.* Anal. Biochem., v. 63, p. 555—558, 1975.
8. *Lowry O. H., Rosebrough W. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
9. *Отеллин В. А., Кучеренко Р. П., Гилерович Е. Г., Усова И. П., Федосихина Л. А., Туровский В. С., Григорьев И. П., Неокесарийский А. А.*—В кн.: Теоретические вопросы строения и деятельности мозга (под ред. О. С. Адрианова), вып. 12, с. 51—55. М., Ин-т мозга ВНЦПЗ, 1983.
10. *Reader T. A.* Brain Res. Bull., v. 8, p. 527—534, 1982.
11. *Heikkila R. E., Cabbat F. S., Manzino L. J.* Neurochem., v. 38, p. 1000—1006, 1982.
12. *Chweh A. Y., Leslie S. W. J.* Neurochem., v. 38, p. 691—695, 1982.
13. *Spector R., Lorenzo A. V.* Amer. J. Physiol., v. 226, p. 1468—1473, 1974.
14. *Schenk J. O., Miller E., Gaddis R., Adams R. N.* Brain Res., v. 253, p. 353—356, 1982.
15. *Григорьев И. П., Неокесарийский А. А., Отеллин В. А.* Докл. АН СССР, т. 281, № 3, с. 748—750, 1985.

Поступила 20. II 1986

УДК 612.822.1

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗ И СОДЕРЖАНИЕ ГИСТАМИНА В МОЗГУ И КРОВИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

КРИЧЕВСКАЯ А. А., БОНДАРЕНКО Т. И., ГОРОШИНСКАЯ И. А., ХОДАКОВА Л. А., *МИХАЛЕВА И. И., КРУПЕННИКОВА Е. Ю.

Кафедра биохимии и биотехнологии Ростовского госуниверситета им. М. А. Суслова, *Институт биоорганической химии АН СССР им. М. М. Шемякина, Москва

Пептид дельта-сна (ПДС) первоначально был выделен как фактор, регулирующий дельта-волновую стадию сна, откуда он получил