



УДК 612.892.1+612.815.1

ДЕЙСТВИЕ 6-ОКСИДОФАМИНА НА ГАМК-РЕЦЕПТОРЫ
КОРЫ МОЗГА КРЫС

ПАРФЕНОВА Е. В.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Синаптические мембраны, выделенные из коры головного мозга крыс через 5 суток после интрацеребрального введения 6-оксидофамина (300 мкг), имеют повышенную способность к Na^+ -независимому связыванию ^3H -ГАМК. Это обусловлено 2—3-кратным снижением общего числа рецепторных участков и не связано с изменением активности эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов. Функционирующие рецепторы проявляют повышенное сродство к лиганду. Полученные данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи между ГАМК- и катехоламинергическими системами в коре головного мозга крыс.

6-оксидофамин (6-ОН-ДОФА), являясь природным неметаболизируемым аналогом дофамина, широко используется в нейроморфологических и нейрохимических исследованиях как нейротоксин специфического действия («ложный медиатор»), вызывающий повреждения катехоламинергической системы головного мозга [1]. Введение 6-ОН-ДОФА в желудочки мозга приводит к снижению содержания норадреналина и дофамина [2, 3], потере способности нервного волокна к возбуждению [4] и дегенеративным перестройкам терминалей катехоламинергических (КА-ергических) нейронов [5—7]. При этом содержание в мозгу других нейромедиаторов (АХ, ГАМК, глутамат) практически не изменяется [8]. Обнаруженные отклонения касаются как основных КА-ергических центров (черная субстанция, голубое пятно) и сопряженных с ними образований стриопаллидарной системы, так и коры головного мозга [6, 7]. Известно, что в коре осуществляется контакт КА-ергической системы с системами иной медиаторной природы, в частности, тормозной ГАМК-ергической, что создаёт структурный базис для межмедиаторных взаимодействий, с помощью которых интегрируется деятельность ЦНС. Задачей нашего исследования было изучение изменений, возникающих в рецепторном звене ГАМК-ергической системы коры головного мозга крыс в результате селективного повреждения КА-ергической системы 6-ОН-ДОФА.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 180—200 г. Крысам под эфирным наркозом интрацеребрально вводили 300 мкг 6-ОН-ДОФА в 20 мкл физиологического раствора. Контрольным животным вводили по 20 мкл физиологического раствора. В опытах использовали также интактных животных. Через 5 суток крыс декапитировали, отделяли кору больших полушарий и замораживали её на 1—2 суток при -18° .

Фракцию синаптических мембран из коры головного мозга получали с помощью дифференциального центрифугирования клеточного гомогената по методу Zukin и соавт. [9], используя модификацию, предложенную Дамбиновой и Городишским [10]. Чистоту полученной фракции контролировали электронномикроскопически. Для фиксации предварительно осажденных центрифугированием мембран использовали 2,5%-ный глютаральдегид и 1%-ный раствор четырехоксида осмия. Проводку и заливку материала выполняли общепринятыми методами.

Полученные синаптические мембраны замораживали на 1—2 суток при -18° . После оттаивания их промывали 5—6 раз 50 мМ трис-цитратным буфером pH 7,4 с последующим осаждением при 45000g в течение 20 мин или же предварительно обрабатывали 0,05%-ным тритоном X-100 в течение 30 мин при 37° .

Для определения Na^{+} -независимого связывания ^3H -ГАМК 10—40 мкг (по белку) синаптических мембран инкубировали в течение 10 мин при $0-4^{\circ}$ с 5—200 нМ ^3H -ГАМК (32 Ки/ммоль, Ленинград) в 1 мл трис-цитратного буфера pH 7,4 [9, 11]. Неспецифическое связывание определяли при наличии в инкубационной среде 1 мМ немеченой ГАМК («Fluka», Швейцария). В наших опытах оно составляло менее 30% от общего связывания метки. Специфическое связывание получали путем вычитания значений неспецифического связывания из величины общего связывания. Реакцию останавливали быстрой фильтрацией проб под вакуумом через целлюлозные фильтры с диаметром пор 0,42 мкм («Synpro», СССР) [11]. Осажденные на фильтрах синаптические мембраны промывали 10-кратным объемом холодного буфера. После высушивания фильтры помещали в вials, заливали сцинтилляционной жидкостью (5 г PPO и 50 мг POPOP в 1 л толуола) и измеряли радиоактивность на счетчике Mark II («Nuclear Chicago», США).

Активность эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов оценивали по приросту Na^{+} -независимого связывания ^3H -ГАМК после обработки синаптических мембран 0,05%-ным тритоном X-100 и способности ингибиторсодержащего экстракта, полученного после осаждения замороженных-оттаявших синаптических мембран, снижать Na^{+} -независимое связывание ^3H -ГАМК с обработанными 0,05%-ным тритоном X-100 синаптическими мембранами коры мозга интактных животных.

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. после предварительного гидролиза синаптических мембран в NaOH [12].

Результаты и обсуждение

Электронномикроскопическое исследование фракции синаптических мембран из коры головного мозга крыс. Электронномикроскопическое исследование позволило показать, что полученный нами препарат представляет собой совокупность разрушенных осмотическим шоком мембранных структур. Выявляются области синаптических контактов и постсинаптические уплотнения. Некоторые структуры образуют замкнутые везикулы, заполненные пузырьками, по строению и размерам сходными с синаптическими. Вместе с тем часть синаптических пузырьков в результате осмотического шока высвобождается из мемб-

ранных везикул. Полученный препарат оказался практически полностью лишен митохондриальных примесей, в поле зрения лишь изредка попадаются единичные митохондрии. Это представляется принципиально важным, так как митохондрии содержат ГАМК-утилизующие ферменты и согласно приводимым в литературе [13] и нашим неопубликованным данным, способны к связыванию ^3H -ГАМК, что искажает получаемые результаты и затрудняет оценку ГАМК-рецепторов синаптических мембран.

Na⁺-независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга крыс через 5 суток после введения 6-ОН-ДОФА. Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами, которое идентично связыванию ГАМК с постсинаптическими рецепторными участками [9], может быть выявлено только после замораживания-оттаивания мембран с последующими их промывками гипотоническим буфером [9, 14]. Такая обработка способствует вымыванию из мембранной фракции эндогенной ГАМК, конкурирующей с меченым лигандом за участки связывания [15, 16]. Кроме того, согласно полученным нами данным, при замораживании-оттаивании от синаптических мембран отделяются Фолли-положительные соединения полипептидной природы с максимумом поглощения при 280 нм. Они снижают Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК и поэтому могут быть отнесены к эндогенным ингибиторам, роль которых в функционировании ГАМК-рецепторов интенсивно обсуждается [15, 17—19]. Ещё большего увеличения специфического связывания ^3H -ГАМК можно достичь с помощью обработки предварительно замороженных и оттаявших мембран тритоном X-100, который в концентрациях 0,01—0,1% также способствует отделению от мембран эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов [15].

Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК изучалось как на многократно промытых гипотоническим буфером, так и на предварительно обработанных 0,05%-ным тритоном синаптических мембранах из коры мозга подопытных и контрольных крыс. Исследуемые пробы содержали 100 нМ ^3H -ГАМК. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что синаптические мембраны, выделенные из коры мозга подопытных крыс через 5 суток после введения им 6-ОН-ДОФА, имеют пониженную способность к рецепторному связыванию ^3H -ГАМК. Это наблюдается как на промытых буфером, так и на обработанных детергентом мембранах.

Кинетический анализ связывания ^3H -ГАМК при различных концентрациях меченого лиганда в среде инкубации, проведенный по методу Скэтчарда [20], показал, что синаптические мембраны, выделенные из коры мозга подопытных животных, имеют в 2—3 раза меньшее общее число участков связывания ($B_{\text{макс}}$) по сравнению с мембранами коры мозга контрольных животных (рис. 1, табл. 2). Вместе с тем K_d у подопытных крыс в 1,5—4 раза ниже, чем у контрольных, что

свидетельствует о повышении срoдства рецепторных участков к лиганду у подопытных животных (табл. 2).

Таблица 1

Na⁺-независимое связывание ³H-ГАМК синаптическими мембранами коры мозга крыс через 5 суток после интрацеребрального введения 6-ОН-ДОФА (300 мкг на крысу)

Условия получения синаптических мембран	Специфическое Na ⁺ -независимое связывание ³ H-ГАМК		
	контроль	опыт	
		пмп/м-п/ мг белка	пмп/мпи/ мг белка
Промывка буфером	10,300±2,500 (5)	4,200±1,100*	40
Обработка триптоном	22,500±3,600 (7)	14,200±2,800*	60

Примечание. В скобках указано количество опытов. *p<0.05 по сравнению с контролем

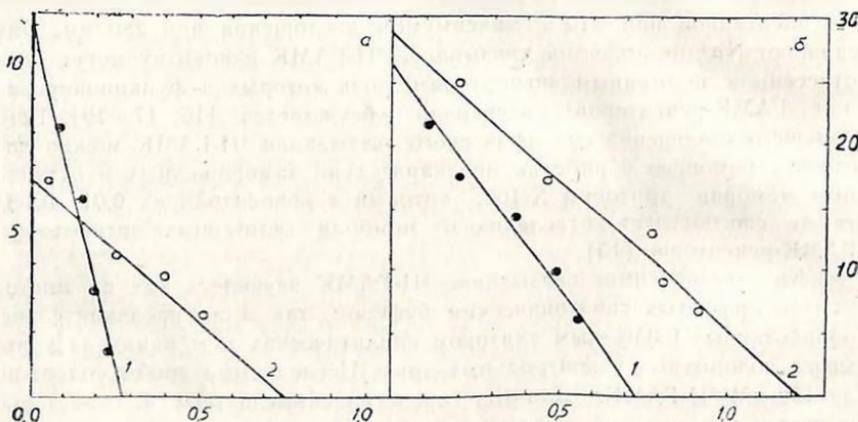


Рис. 1. Графики Скэтчарда для связывания ³H-ГАМК синаптическими мембранами коры мозга подопытных и контрольных крыс. а—промытые буфером мембраны; б—обработанные 0,05% триптоном X-100 мембраны. 1—мембраны из коры мозга подопытных крыс, 2—мембраны из коры мозга контрольных крыс. По оси абсцисс—связанная ³H-ГАМК (пмоль/мг белка), по оси ординат—связанная ³H-ГАМК/свободная ³H-ГАМК (фмоль/мг белка/нМ)

Обнаруженное уменьшение числа ГАМК-связывающих участков в коре мозга подопытных животных может быть обусловлено как утратой рецепторов, так и, вероятно, изменением активности эндогенных ингибиторов. Эти вещества, согласно приводимым в литературе данным, участвуют в регуляции ГАМК-ергической синаптической передачи на

уровне постсинаптической мембраны, обратимо уменьшая число высокочувствительных ГАМК-рецепторов и изменяя их сродство к лиганду [15—18]. Для проверки этого предположения была проанализирована активность эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов в коре мозга подопытных и контрольных крыс.

Таблица 2

Кинетические параметры Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга крыс через 5 суток после интрацеребрального введения 6-ОН-ДОФА (300 мкг на крысу)

Условия получения синаптических мембран	Специфическое Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК			
	контроль		опыт	
	K_d (нМ)	$B_{\text{макс}}$ (пмоль/мг)	K_d (нМ)	$B_{\text{макс}}$ (пмоль/мг)
Промывка буфером Обработка тритоном	100±10	0,70±0,10	22±5*	0,28±0,04*
	40±5	1,25±0,2	24±6*	0,70±0,05*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

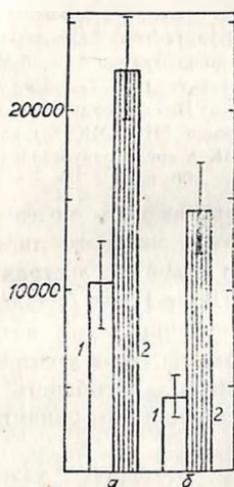


Рис. 2. Изменение Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга контрольных (а) и подопытных (б) крыс после их обработки 0,05%-ным тритоном X-100. 1—мембраны, промытые буфером. 2—мембраны, обработанные тритоном X-100. По оси ординат—специфическое связывание ^3H -ГАМК с мембранами (пмоль/мг белка), концентрация ^3H -ГАМК в среде инкубации равна 100 нМ

Активность эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов в коре мозга крыс через 5 суток после введения 6-ОН-ДОФА. Обработка синаптических мембран коры мозга 0,05%-ным тритоном X-100 приводит к повышению уровня Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК как у контрольных животных, так и у крыс, подвергшихся воздействию нейротоксина (рис. 2). Это указывает на присутствие эндогенных ингибиторов в синаптических мембранах животных обеих групп. Следует от-

метить, что удаление ингибиторов обработкой мембран детергентом хотя и приводит к 3-кратному возрастанию рецепторного связывания ^3H -ГАМК в коре мозга опытных животных, однако не поднимает его до уровня связывания с обработанными детергентом мембранами контрольных животных (рис. 2). Определение величины прироста связывания ^3H -ГАМК после обработки мембран низкими концентрациями детергента в стандартных условиях—косвенный метод оценки активности эндогенных ингибиторов, широко используемый в литературе [21, 22].

Эндогенные ингибиторы могут быть отделены от синаптических мембран не только в результате их обработки детергентами, но и при замораживании-оттаивании разрушенных осмотическим шоком и промытых гипотоническими буферными растворами мембран. Надосаочные жидкости, полученные после осаждения замороженных-оттаявших синаптических мембран коры больших полушарий подопытных и контрольных крыс, дозозависимым образом ингибируют связывание ^3H -ГАМК с обработанными детергентом мембранами коры мозга интактных крыс (рис. 3). Кривые ингибирования имеют характер насы-

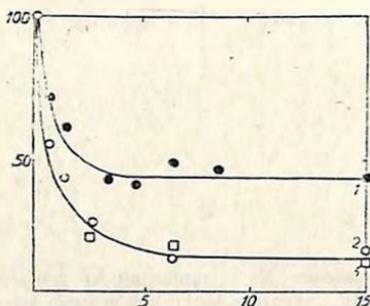


Рис. 3. Влияние эндогенных ингибиторов из коры мозга подопытных и контрольных крыс на Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга интактных животных. 1—ингибитор из коры мозга подопытных, 2—контрольных, 3—интактных животных. По оси абсцисс—концентрация ингибиторсодержащего экстракта (мкг белка/мл инкубационной среды). По оси ординат—специфическое связывание ^3H -ГАМК (%). Концентрация ^3H -ГАМК в среде инкубации равна 100 нМ.

щения. При этом содержащий ингибитор экстракт из коры мозга подопытных крыс снижает специфическое связывание меченого лиганда не более чем на 50% (ИД₅₀=5 мкг белка/мл), а такой же экстракт из коры мозга контрольных животных—на 85% (ИД₅₀=1 мкг белка/мл), что совпадает с характеристиками ингибитора из коры мозга интактных крыс. Таким образом, эндогенные ингибиторы из коры мозга подопытных крыс имеют пониженную ингибирующую способность, что свидетельствует об относительно меньшем их содержании в синаптических мембранах.

Полученные в этом разделе работы данные позволяют утверждать, что наблюдаемое в коре мозга подопытных животных снижение числа ГАМК-связывающих участков не является следствием изменения активности эндогенных ингибиторов. Напротив, количество ингибиторов в коре мозга подопытных животных снижается. Это согласуется с приводимыми в литературе данными о том, что эндогенные ингибиторы тесно сопряжены с ГАМК-рецепторами и, возможно, составляют с ними в функциональном отношении единое целое [18].

Таким образом, через 5 суток после интрацестерналиального введения 6-ОН-ДОФА в коре головного мозга крыс, наряду с выраженными дегенеративными изменениями терминалей КА-ергических нейронов и снижением уровня катехоламинов [7], наблюдаются значительные перестройки в рецепторном звене ГАМК-ергической системы. Отмечено 2—3-кратное снижение числа ГАМК-рецепторных участков, не связанное с увеличением активности эндогенных ингибиторов и, вероятно, обусловленное утратой более половины ГАМК-рецепторов под влиянием нейротоксина. Функционирующие ГАМК-рецепторы проявляют повышенное сродство к медиатору, что можно рассматривать как компенсаторное явление, обеспечивающее гиперчувствительность нейронов. Аналогичные изменения (снижение общего числа рецепторных участков и увеличение их сродства к лиганду) были обнаружены в бензодиазепиновых рецепторах коры головного мозга крыс после внутривентрикулярного введения им 6-ОН-ДОФА [23]. Известно, что эти рецепторы функционально тесно взаимосвязаны с ГАМК-рецепторами и, возможно, составляют с ними единый комплекс [18]. Если считать твердо установленным факт строгой специфичности действия 6-ОН-ДОФА на КА-ергическую систему, то полученные в нашей работе данные свидетельствуют о тесной структурно-функциональной связи между КА- и ГАМК-ергическими системами в коре головного мозга крыс. Вместе с тем значительная выраженность обнаруженных нами изменений выдвигает вопрос о возможности непосредственного влияния 6-ОН-ДОФА на ГАМК-рецепторы.

ACTION OF 6-HYDROXYDOPAMINE ON GABA-RECEPTORS IN RAT BRAIN CORTEX

PARFENOVA E. V.

Department of Morphology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Synaptic membranes isolated from rat brain cortex 5 days after intracisternal injection of 6-hydroxydopamine (300 μ g) exert a decreased ability for Na^+ -independent binding of H^3 -GABA. These changes are due to a 2—3 fold decrease in the total number of binding sites for H^3 -GABA* and have nothing to do with the change of activity of GABA endogenous inhibitors. Functioning GABA-receptors show an increased affinity for the ligand. Data presented point to a close interrelation between GABA-ergic and catecholaminergic systems in rat brain cortex.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Breese J. B.—In: Handbook of Psychopharmacology (Iversen L. L., Iversen S. B., Snyder S. H., eds.), v. 1, p. 137—189, N. Y. Plenum Press, 1975.
2. Uretsky N. J., Iversen L. L. J. Neurochem, v. 17, № 2, p. 269—278, 1970.
3. Sachs C., Jonsson G. Biochem. Pharmacol., v. 24, № 1, p. 1—8, 1975.

4. *Jonsson G.* Med. Biol., v. 54, № 4, p. 406—420, 1976.
5. *Hedreen J. C., Chalmers J. P.* Brain Res., v. 37, № 1, p. 1—36, 1972.
6. *Отеллин В. А., Гилерович Е. Г., Усова Н. П.* Архив анатомии гистол. и эмбриол., т. 86, № 3, с. 14—22, 1984.
7. *Отеллин В. А., Кучеренко Р. П., Гилерович Е. Г., Усова Н. П., Федосихина Л. А., Григорьев И. П., Неокесарийский А. А.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 7, с. 978—981, 1984.
8. *Jacks B., De Champlain J., Cordeau J.—P.* Eur. J. Pharmacol., v. 18, № 3, p. 353—360, 1972.
9. *Zukin S. R., Young A. B., Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 71, № 14, p. 4802—4807, 1974.
10. *Дамбинова С. А., Горюдинский А. И.* Биохимия, т. 49, № 1, с. 67—75, 1984.
11. *Patel S. C., Peck E. J.* J. Neurosci. Res., v. 8, № 5, p. 603—611, 1982.
12. *Lowry O. H., Rosenbrough W. J., Farr A. L., Randell R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
13. *Varga V., De Feudis F. Y., Ossola L., Geffard M., Mandel P.* Biochem. Pharmacol., v. 29, № 7, 1077—1079, 1980.
14. *Lester B. L., Peck E. J.* Brain Res., v. 161, № 1, p. 79—87, 1979.
15. *Massotti M., Guidotti A., Costa E.* J. Neurosci., v. 1, № 4, p. 409—418, 1981.
16. *Gardner C. R., Klein J., Grove J.* Eur. J. Pharmacol., v. 75, № 1, p. 83—92, 1981.
17. *Guidotti A., Konkel D. R., Ebstein B., Corda M. G., Wise B. C., Krutzsch H., Meek J. L., Costa E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 69, № 19, p. 6084—6088, 1982.
18. *Costa E.*—In: Receptor as supramolecular entities (Biggio G., Costa E., eds.), p. 213—235, Pergamon Press, 1983.
19. *Парфёнова Е. В.* Цитология, т. 26, № 9, с. 1076, 1984.
20. *Scatchard E. G.* Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 51, № 6, p. 660—672, 1949.
21. *Scerritt J. H., Johnston G. A.* Devel. Neurosci., v. 5, № 2, p. 189—197, 1982.
22. *Palacios J., Nichoff D. L., Kuhar M. J.,* Brain Res., v. 179, № 2, p. 390—395, 1979.
23. *Sabato U. C., Novas M. L., Lowenstein P., Zieher L. M., De Robertis E.* Eur. J.

Поступила 28. III 1985