



УДК 612.822.1+612.815.1

ГАМК-РЕЦЕПТОРЫ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН И ИХ
ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ
КОРЫ МОЗГА КРЫС

ПАРФЕНОВА Е. В.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Изучено Na^+ -независимое связывание $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$ с синаптическими мембранами коры головного мозга крыс в эмбриональном и раннем постнатальном периодах онтогенеза. Показано, что ГАМК-рецепторы в коре больших полушарий появляются на 20-й день эмбрионального развития и имеют высокий уровень специфического связывания $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$, при этом сродство их к лиганду в 5 раз ниже, чем у взрослых животных. Появлению рецептора предшествует появление активатора—вещества полипептидной природы, содержащегося во фракции синаптических мембран 19-суточных эмбрионов, которое в 2—3 раза увеличивает специфическое связывание $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$ с мембранами коры мозга взрослых животных. Сразу же после рождения связывание $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$ падает до 10—20% от взрослого уровня, а затем в течение 1 недели постнатального развития постепенно повышается, достигая к 7-у дню 50% от взрослого уровня. Эндогенные ингибиторы ГАМК-рецепторов впервые обнаруживаются на 20-й день эмбрионального развития, что совпадает по времени с появлением самих рецепторов и, по-видимому, указывает на их тесную структурно-функциональную взаимосвязь. Активность эндогенных ингибиторов, которая может быть оценена по их влиянию на связывание $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$ с синаптическими мембранами коры мозга взрослых крыс, у эмбрионов 20—21 дня развития выше их активности в постнатальном периоде. Обсуждается изменение свойств ГАМК-рецепторов и их эндогенных регуляторов в онтогенезе головного мозга крыс.

В регуляции ГАМК-ергической синаптической передачи в ее постсинаптическом звене участвуют эндогенные ингибиторы—вещества белковой или пептидной природы, содержащиеся во фракции синаптических мембран головного мозга крыс, которые снижают сродство ГАМК-рецепторов к медиатору и уменьшают общее количество рецепторных участков [1—4]. Имеющиеся в литературе данные позволяют предполагать, что эндогенные ингибиторы являются неотъемлемым функциональным компонентом комплекса ГАМК-рецептор—ионофор [5]. Одним из возможных путей для проверки этого предположения является изучение эндогенных ингибиторов в онтогенезе головного мозга. Имеющиеся работы такого рода единичны и касаются лишь постнатального

развития крыс [6—8]. Полученные в них данные противоречивы и основаны лишь на косвенной оценке их активности (по приросту рецепторного связывания [^3H]ГАМК после обработки синаптических мембран тритоном X-100 [7, 8]). Сведений об эндогенных ингибиторах ГАМК-рецепторов передних отделов головного мозга в эмбриогенезе нет. Задачей нашей работы было изучение ГАМК-рецепторов и их эндогенных ингибиторов в коре головного мозга крыс в пре- и ранний постнатальный периоды развития.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах линии *Wistar*. Начало беременности определяли путем идентификации сперматозоидов во влагалищном мазке самок через 10 ч после подсадки самцов*. У 17-суточных зародышей исследовали передний мозг целиком, отделяя его препаровальной иглой под лупой. У 19-, 20- и 21-суточных эмбрионов, а также у животных через 1, 4 и 7 суток после рождения отделяли сформированную кору больших полушарий. Полученный материал хранили в 0,32 М растворе сахарозы при -18° в течение 1—10 суток до использования. Фракцию синаптических мембран получали путем дифференциального центрифугирования гомогената мозговой ткани по методу Дамбиновой, Городнинского [9], позволяющему получить фракцию, практически полностью освобожденную от митохондрий. Для «проявления» ГАМК-рецепторов полученную фракцию подвергали замораживанию-оттаиванию с последующими многократными промывками буфером 50 мМ трис-цитрат pH 7,4 (синаптические мембраны типа А) или же предварительно обрабатывали 0,05% тритоном X-100 (синаптические мембраны типа Б). Такая обработка способствует отделению эндогенных ингибиторов и выявлению ГАМК-рецепторов [2, 10].

Для определения Na^+ -независимого связывания [^3H]ГАМК, которое идентично связыванию медиатора с рецепторными участками [10, 11], 20—50 мкг белка синаптических мембран инкубировали в течение 10 мин при $0-4^\circ$ в 1 мл вышеуказанного буфера в присутствии 50—200 нМ [^3H]ГАМК 32 Ки/ммоль («Изотоп», СССР): неспецифическое связывание определяли в той же среде в присутствии 1 мМ немеченой ГАМК («Fluka», Швейцария). Для синаптических мембран коры мозга взрослых животных оно составляло менее 30% от общего связывания метки. Специфическое связывание получали путем вычитания значений неспецифического связывания из величин общего связывания. Связанную с мембранами метку отделяли от свободной фазы с помощью фильтрации проб под вакуумом через целлюлозные фильтры диаметром пор 0,42 мкм («Synpro», СССР). Фильтры быстро промывали под вакуумом 5-кратным объемом буфера, после высушивания на воздухе переносили вials, заливали сцинтилляционной жидкостью

* Автор приносит благодарность П. А. Дыбану за помощь в этой части работы.

(5 г РРО и 50 мг РОРОР в 1 л толуола) и измеряли радиоактивность на счетчике «Mark II», США).

Содержание белка во фракции синаптических мембран оценивали по методу Lowry после их предварительного гидролиза в NaOH [12].

В качестве источника эндогенных ингибиторов использовали супернатант, полученный после осаждения предварительно замороженных в буфере 50 мМ трис-цитрат pH 7,4 и оттаявших синаптических мембран коры мозга животных разных стадий развития. Ранее нами было показано, что при замораживании-оттаивании от фракции синаптических мембран отделяются окрашивающиеся реактивом Фолина вещества, которые дозозависимым образом ингибируют рецепторное связывание [^3H] ГАМК и, следовательно, могут быть отнесены к эндогенным ингибиторам [13]. Активность полученного ингибиторсодержащего супернатанта тестировали на предварительно обработанных 0,05%-ным триптоном X-100 синаптических мембранах коры мозга взрослых крыс.

Результаты исследований

В передних отделах головного мозга 17-суточных эмбрионов и коры больших полушарий 19-суточных зародышей специфического Na^+ -независимого связывания [^3H] ГАМК не обнаруживается (табл. 1).

Таблица 1

Na^+ -независимое специфическое связывание [^3H] ГАМК с синаптическими мембранами коры головного мозга крыс на различных стадиях онтогенетического развития*

Объект	Na^+ -независимое специфическое связывание [^3H] ГАМК с синаптическими мембранами (СМ)			Эндогенные модуляторы		
	СМ типа А	СМ типа Б		активатор	ингибитор	
	(нмг мин мг белка)	(нмг мин мг белка)	K_d (нМ)		% ингибирования	ID_{50} (мкг белка/мл)
Эмбрионы:						
17 суток	нет	нет			не определяли	
19 суток	нет	нет		+		
20 суток	21000	59000	200	нет	90	0,7
21 сутки	3900	11000	250	нет	90	2,0
После рождения:						
1 сутки	нет	2300	260	нет	60	1,9
6 суток	2700	7100	не определ.	нет	50	1,5
7 суток	3100	6000	не определ.	нет	50	2,0
Взрослые	7000	17000	40	нет	50	2,0

* Примечание. Концентрация [^3H] ГАМК в пробках составляла 50 нМ.

Вместе с тем оказалось, что замораживание-оттаивание синаптических мембран коры мозга 19-суточных эмбрионов приводит к отделению от них веществ, которые увеличивают рецепторное связывание [^3H] ГАМК с мембранами коры мозга взрослых крыс (рис. 1). Уровень активации

в различных опытах несколько варьировал (в среднем в 2,8 раза) при концентрации белка супернатанта 20 мкг/мл. Активатор был стабилен при хранении при -17° в течение 4 суток, однако повторное его замораживание-оттаивание приводило к потере активирующего эффекта. В дополнительных опытах было показано, что активация ГАМК-рецепторов синаптических мембран коры мозга взрослых крыс в присутствии фактора из мембран 19-суточных зародышей происходит за счет увеличения общего количества рецепторных участков без заметного изменения их сродства к лиганду.

Синаптические мембраны, полученные из коры мозга 20-суточных эмбрионов крыс, обнаруживают Na^{+} -независимое специфическое связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, которое выявляется как на прсмывтых буфером (тип А мембран), так и на обработанных 0.05%-ным тритоном (тип Б мембран) препаратах (табл. 1). При этом рецепторное связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ у эмбрионов этого срока развития превышает связывание с мембранами коры мозга взрослых крыс, что обусловлено высоким числом рецепторных участков B_{max} наряду с пониженным сродством их к лиганду (200 нМ). Синаптические мембраны из коры мозга 21-суточных эмбрионов крыс (как типа А, так и типа Б) также обнаруживают способность к Na^{+} -независимому специфическому связыванию $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, которое ниже, чем у 20-суточных эмбрионов и сопоставимо по величине со связыванием с мембранами коры мозга взрослых крыс (табл. 1). Как и у 20-суточных зародышей, сродство ГАМК-рецепторов к лиганду на 21 сутки эмбрионального развития ниже, чем в коре мозга взрослых крыс ($K_d=250$ нМ).

Эндогенные ингибиторы обнаруживаются в препаратах синаптических мембран коры больших полушарий на 20 и 21-е сутки эмбрионального развития. Косвенным указанием на их существование является факт увеличения рецепторного связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ после обработки синаптических мембран эмбрионов этих сроков развития 0.05% тритоном в 2—3 раза, что сопоставимо с приростом связывания после аналогичной обработки мембран коры мозга взрослых крыс (табл. 1). Кроме того, показано, что супернатант, полученный после осаждения предварительно замороженных и оттаявших синаптических мембран из коры мозга зародышей дозозависимым образом ингибировал Na^{+} -независимое связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ с синаптическими мембранами из коры мозга взрослых крыс (ID_{50} составляет 0.7 и 2 мкг белка/мл для 20- и 21-суточных эмбрионов соответственно, табл. 1). Максимальный уровень ингибирования составлял 90%, в то время как аналогичным образом выделенная из мембран коры мозга взрослых крыс фракция ингибировала связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ не более чем на 50% (рис. 2).

У новорожденных животных через сутки после рождения синаптические мембраны типа А не обнаруживают рецепторного связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, в то время как их обработка детергентом «проявляет» рецепторные участки (табл. 1). Уровень специфического связывания

ГАМК с мембранами типа Б из коры мозга 1-дневных крыс существенно ниже, чем у взрослых животных, что сопровождается и пониженным сродством рецепторных участков к лиганду ($K_d=260$ нМ). В дальнейшем постнатальном периоде наблюдается постепенное увеличение рецепторного связывания $[^3H]$ ГАМК, которое к концу 1 недели достигает 50% от взрослого уровня (табл. 1).

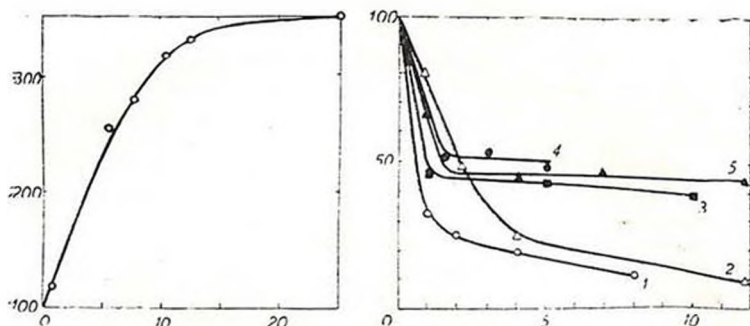


Рис. 1. Влияние активаторсодержащей фракции коры мозга 19-суточных эмбрионов крыс на Na^+ -независимое связывание $[^3H]$ ГАМК с синаптическими мембранами из коры мозга взрослых крыс; по оси абсцисс—концентрация белка фракции в пробе (мкг/мл); по оси ординат—специфическое связывание $[^3H]$ ГАМК (% к контролю)

Рис. 2. Влияние ингибиторсодержащей фракции из коры мозга крыс на Na^+ -независимое связывание $[^3H]$ ГАМК с синаптическими мембранами из коры мозга взрослых крыс. Фракции из коры мозга эмбрионов крыс: 1—20-суточных; 2—21-суточных. Фракции из коры мозга крыс после рождения: 3—1-суточных; 4—4-суточных; 5—взрослых. Обозначения по осям координат те же, что и на рис. 1

В синаптических мембранах, выделенных из коры мозга крысы через 1—7 суток после рождения, обнаруживается существование эндогенных ингибиторов. Оно выявляется как косвенно по приросту рецепторного связывания ГАМК после обработки мембран детергентом (табл. 1), так и непосредственно по влиянию ингибиторсодержащего супернатанта после осаждения замороженных-оттаявших мембран на рецепторное связывание $[^3H]$ ГАМК с синаптическими мембранами коры мозга взрослых крыс (рис. 2). Следует отметить, что по своим характеристикам (ID_{50} , максимальная глубина ингибирования) эндогенные ингибиторы коры мозга 1—7-дневных крыс сходны с ингибиторами взрослых животных (табл. 1, рис. 2).

Обсуждение результатов

Как следует из представленных нами данных, ГАМК-рецепторы в передних отделах головного мозга крыс не обнаруживаются до 19 суток

эмбрионального развития включительно. Появлению рецептора в онтогенезе предшествует появление активатора—вещества, которое отделяется в супернатант при замораживании-оттаивании синаптических мембран коры мозга 19-суточных зародышей и в 2—3 раза увеличивает рецепторное связывание [^3H]ГАМК с предварительно обработанными детергентом мембранами коры мозга взрослых крыс преимущественно за счет проявления латентных участков. Механизм действия и природа активатора неизвестны. Этим веществом не может быть эндогенная ГАМК, которая появляется в передних отделах головного мозга крыс уже на ранних стадиях эмбрионального развития [14], поскольку единственным ее эффектом может быть лишь занижение величин рецепторного связывания, получаемым с помощью радиоизотопного метода (эффект разбавления метки). Можно полагать, что активатор имеет белковую или пептидную природу, так как окрашивается реактивом Фолина и, вероятно, является слабосвязанным с мембранами или примембранным белком.

ГАМК-рецепторы в коре головного мозга крыс обнаруживаются на 20-й день эмбрионального развития; их возникновение имеет скачкообразный характер, а способность связывать [^3H]ГАМК значительно превышает таковую у взрослых крыс. К 21 дню эмбрионального развития связывание [^3H]ГАМК с рецепторами понижается до уровня, характерного для рецепторов коры головного мозга взрослых крыс. Одновременно с появлением ГАМК-рецептора обнаруживаются и эндогенные ингибиторы, об активности которых мы могли судить не только на основании косвенных данных (величины прироста рецепторного связывания после обработки синаптических мембран тритоном X-100), но и непосредственно по их влиянию на связывание [^3H]ГАМК с мембранами коры мозга взрослых крыс. Таким образом, появление эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов в онтогенезе коры головного мозга крыс совпадает по времени с появлением самих рецепторов, что указывает на их тесную структурно-функциональную взаимосвязь.

Согласно данным Coyle, Еппа [6], наличие ГАМК-рецепторов в мозгу крыс отмечается уже на 15-й день эмбрионального развития (их уровень не превышает 5% от содержания ГАМК-рецепторов у взрослых крыс), а к моменту рождения рецепторное связывание [^3H]ГАМК увеличивается до 25%. Такое расхождение с полученными нами данными, видимо, объясняется тем, что в цитированной работе авторы работали с целым мозгом, выделяя из него суммарную фракцию всех субклеточных частиц (включая неразрушенные клетки, ядра, митохондрии и синапсомы), которые могут иметь нереперторные ГАМК-связывающие участки, что затрудняет интерпретацию данных.

Сразу же после рождения отмечается дальнейшее снижение рецепторного связывания [^3H]ГАМК до 15—20% от уровня у взрослых животных, а затем его постепенное повышение, так что к концу I недели постнатального развития специфическое Na^+ -независимое связывание [^3H]ГАМК составляет около 50% от этой величины. Это согласуется

с приводимыми в литературе данными о том, что в постнатальном периоде развития головного мозга активность ГАМК-рецепторов постепенно возрастает [7, 8]. Эндогенные ингибиторы обнаруживаются в мозгу на всех исследованных сроках постнатального развития (1—7-сутки), однако, в отличие от ингибиторов из мозга 20—21-суточных эмбрионов, они ингибируют связывание [^3H]ГАМК не более чем на 50—60% и в этом отношении сходны с ингибиторами, выделенными из коры мозга взрослых животных.

Полученные нами данные позволяют предположить, что ГАМК-рецепторы и их эндогенные ингибиторы в онтогенезе коры головного мозга крыс претерпевают следующие изменения, которые можно обозначить термином «созревание» рецептора и системы его регуляции: а) ГАМК-рецепторы, появляясь на последних стадиях эмбрионального развития, в постнатальном периоде приобретают значительно большую чувствительность к лиганду; б) первым эндогенным модулятором ГАМК-рецепторов в онтогенезе коры головного мозга является активатор ГАМК-рецептора, появление которого предшествует появлению рецептора; в) эндогенные ингибиторы появляются в онтогенезе одновременно с ГАМК-рецепторами, что свидетельствует об их тесной структурно-функциональной связи; г) в процессе постнатального развития коры мозга эндогенные ингибиторы снижают свою активность и уменьшают максимальную глубину ингибирования ГАМК-рецепторов, что может быть связано с укрупнением молекулы ингибитора и снижением доступности для нее рецептора.

GABA RECEPTORS AND THEIR ENDOGENOUS REGULATION IN RAT BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES IN ONTOGENESIS

PARFENOVA E. V.

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

Na^+ -independent binding of ^3H -GABA with brain synaptic membranes has been studied in embryonic and in the early postnatal periods. GABA receptors in the cortex of brain big hemispheres appear at the 20th day of embryonic development with high level of ^3H -GABA specific binding, their affinity to the ligand being 5-fold lower than in adult animals. Appearance of receptor is preceded by that of an activator (19th day of embryonic development) that enhances 2—3-fold specific binding of ^3H -GABA and is a polypeptide. Immediately after birth binding of ^3H -GABA drops to 10—20% of the adults' levels, reaching 50% level to the end of the 7th day. Endogenous GABA inhibitors are detected on the 20th day of embryonic development as the receptors themselves pointing to their intimate structure-function relationship. The potency of these inhibitors is higher in 20—21-day embryos than in postnatal period.

A possible role of GABA receptors and regulators in rat brain in ontogenesis is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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. Biol. Sci., v. 79, p. 6034—6088, 1982.
2. Mussotti M., Mazzari S., Schmid R., Guidotti A., Costa E. Neurochem. Res., v. 6, p. 551—565, 1981.
3. Yoneda Y., Kurtyama K. Nature, v. 285, p. 670—673, 1980.
4. Johnston G. A. R., Kennedy S. M. R. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., v. 6, p. 686—687, 1979.
5. Costa E.—In: Receptor as supramolecular entities (eds. G. Biggio, E. Costa), p. 213—235, N. Y., Pergamon Press, 1983.
6. Coyle J. T., Enna S. J. Brain Res., v. 111, p. 119—133, 1976.
7. Palacios J. M., Niehoff D. L., Kuhar M. J. Brain Res., v. 179, p. 390—395, 1979.
8. Skerritt J. H., Johnston G. A. R. Dev. Neurosci., v. 5, p. 189—197, 1982.
9. Дамбинова С. А., Городинский А. И. Биохимия, т. 49, № 1, с. 67—75, 1984.
10. Lester B. L., Peck E. J. Brain Res., v. 161, p. 79—97, 1979.
11. Greenlee D. V., Van Ness P. C., Olsen R. W. J. Neurochem., v. 31, p. 933—938, 1978.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
13. Парфенова Е. В. Цитология, т. 26, № 9, с. 1076—1077, 1984.
14. Pradhan S. N., Pradhan S.—In: Biogenic Amines in Development (eds. H. Parvez, S. Parvez), p. 275—284, Bo Biomedical Press, Elsevier North-Holland, 1981.

Поступила 14. VI 1986