



УДК 577.352.46

ТРАНСПОРТ [^3H]ДОФАМИНА ЧЕРЕЗ СИНАПТОСОМНУЮ
МЕМБРАНУ: ВЛИЯНИЕ β -ФЕНИЛЭТИЛАМИНА

ЖАРИКОВ С. И., ЖАРИКОВА А. Д., ЮРИНСКАЯ М. М.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Оценены скорости Na^+ -зависимого и Na^+ -независимого транспорта [^3H] дофамина (ДА) через мембраны синапсом неостриатума головного мозга крыс. Установлено, что при начальной концентрации в инкубационной среде $1,1 \cdot 10^{-7}$ М накопление [^3H] ДА в синапсоммах за счет активного Na^+ -зависимого механизма транспорта составляет 52,9 пмоль/мг белка/5 мин, Na^+ -независимой облегченной диффузии — 12 пмоль/мг белка/5 мин, а величина связывания [^3H] ДА с синапсомными мембранами — 6,2 пмоль/мг белка/5 мин. Показано, что в присутствии β -фенилэтиламина транспорт [^3H] ДА через синапсомную мембрану ингибируется по конкурентному типу. Обсуждается, что ингибирующий эффект β -фенилэтиламина на транспорт [^3H] ДА опосредован через эндогенный ДА, высвобождающийся из синапсом под действием β -фенилэтиламина.

Обратный захват дофамина пресинаптическими окончаниями является насыщаемым процессом и опосредуется специальной мембранной транспортной системой [1]. Считается, что опосредованный переносчиком транспорт включает временное связывание нейромедиатора со специфическими участками переносчика и транслокацию образованного комплекса через пресинаптическую мембрану. На основании данных о зависимости процесса обратного захвата ДА от концентрации Na^+ и K^+ и от активности Na^+ , K^+ -АТФазы [2] предложена модель высокоаффинного транспорта ДА [3], согласно которой градиенты Na^+ и K^+ являются движущими силами для активного, то есть против градиента концентрации, накопления ДА в нервных терминалях. Поскольку проникающий в нервные окончания и вновь синтезируемый ДА депонируется в синаптических везикулах, концентрация ДА в цитоплазме может быть ниже, чем во внеклеточной среде. Поэтому не исключено, что накопление ДА в синапсоммах может происходить как с помощью вышеуказанного Na^+ -зависимого механизма, так и Na^+ -независимого, то есть путем облегченной диффузии через мембрану. Одна из задач нашей работы состояла в проведении оценки скоростей Na^+ -зависимого и Na^+ -независимого механизмов транспорта [^3H] ДА в синап-

тосомы. Несмотря на имеющиеся данные о факторах, влияющих на обратный захват ДА [4], относительно мало известно о регуляции этого процесса. Важную роль в регуляторных механизмах активного транспорта ДА могут играть эндогенные нейромодуляторы синаптической передачи [5], одним из которых является β -фенилэтиламин (β -ФЭА) [6]. В своей работе мы попытались охарактеризовать влияние β -ФЭА на процесс накопления [^3H]ДА в синапсосомах.

Материалы и методы

Для исследования захвата [^3H]ДА синапсосомами использовали P_2 -фракцию [7], выделенную из неостриатума головного мозга крыс линии Wistar массой 180–200 г. Осадок P_2 -фракции ресуспендировали в среде следующего состава (мМ): NaCl —132; KCl —5; MgSO_4 —1,3; NaH_2PO_4 —1,2; CaCl_2 —1,2; глюкоза—10; HEPES-буфер—5 (pH 7,4) с добавлением аскорбиновой кислоты—1 мМ и ниаламида—12,5 мкМ. 50 мкл суспензии синапсосом помещали в инкубационную среду того же состава (конечный объем—1 мл), что и среда для ресуспендирования. Перед добавлением [^3H]ДА («Amersham», Англия, У. А. 3,2 Ки/ммоль) синапсосомы предварительно инкубировали с β -ФЭА или без него в течение 5 мин при 37°. Синапсосомы с добавленным [^3H]ДА инкубировали 5 мин, а для определения начальной скорости захвата [^3H]ДА—2 мин. Захват [^3H]ДА синапсосомами останавливали фильтрованием через мембранные миллиметровые фильтры (0,45 мкм). Осадок синапсосом на фильтрах промывали 3 раза по 5 мл средой инкубации при 20°. Параллельно аналогичные эксперименты проводили при 0°. Количество накопившегося в синапсосомах [^3H]ДА определяли как разность между значениями, полученными при 37° и 0°. Для определения Na^+ -зависимого захвата [^3H]ДА NaCl в инкубационной среде заменяли эквивалентным количеством LiCl . Оценку отношения [^3H]ДА в ткани и инкубационной среде проводили на гомогенате неостриатума, разбавленном в 200 раз. Радиоактивность с фильтров подсчитывали на счетчике «Intertechnique-SL 4000» (Франция). Достоверность экспериментальных данных оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Соотношение распределения [^3H]ДА в ткани и инкубационной среде после инкубации синапсосом с [^3H]ДА в концентрации 0,11 мкМ в течение 15 мин при 37° составляет 51,8. Это свидетельствует о том, что [^3H]ДА накапливается в синапсосомах против градиента концентраций, то есть захват [^3H]ДА в синапсосомы осуществляется в значительной мере путем активного транспорта.

Как видно из таблицы, захват [^3H]ДА в синапсосомы зависит от температуры инкубации и наличия Na^+ в инкубационной среде. Захват [^3H]ДА при 0° составляет 9% от захвата при 37°. В среде Кребса—

Рингера при 37° радиоактивность, связанная с синапсомными мембранами, является показателем 3-х процессов: активного Na^+ -зависимого транспорта $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомные мембраны, Na^+ -независимой облегченной диффузии $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомные мембраны и связывания $[^3\text{H}]$ ДА с синапсомными мембранами. При замене в инкубационной среде Na^+ на Li^+ при 37° должны наблюдаться только облегченная диффузия $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомные мембраны и его связывание с синапсомными мембранами, так как для функционирования мембранного переносчика, осуществляющего активный транспорт $[^3\text{H}]$ ДА, необходимо наличие Na^+ в инкубационной среде. Независимо от наличия Na^+ в среде при 0° определяемая в синапсомных мембранах радиоактивность обусловлена, главным образом, $[^3\text{H}]$ ДА, связавшимся с внешней поверхностью синапсомных мембран, так как при этой температуре активный захват и облегченная диффузия $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомные мембраны незначительны и ими, вероятно, можно пренебречь. Исходя из этого, доля накопления $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомных мембранах за счет активного Na^+ -зависимого механизма транспорта составляет 74%, Na^+ -независимой облегченной диффузии—18%, а величина связывания $[^3\text{H}]$ ДА с синапсомными мембранами—9%.

Таблица

Накопление $[^3\text{H}]$ дофамина в синапсомных мембранах при различных условиях инкубации* (n=12)

Условия инкубации	Процессы, наблюдаемые при инкубации	Количество $[^3\text{H}]$ ДА, накопившегося в синапсомных мембранах (пмоль/5 мин)
Раствор Кребса-Рингера, 37°	Na^+ -зависимый транспорт, Na^+ -независимый транспорт, связывание с синапсомными мембранами	71.1 ± 0.4
Раствор Кребса-Рингера LiCl вместо NaCl , 37°	Na^+ -независимый транспорт, связывание с синапсомными мембранами	18.2 ± 2.4
Раствор Кребса-Рингера, 0°	связывание с синапсомными мембранами	6.6 ± 0.2
Раствор Кребса-Рингера с LiCl вместо NaCl , 0°		6.2 ± 1.3

Примечание. *Концентрация $[^3\text{H}]$ дофамина в среде в начале инкубации составляла 0,11 мкМ.

Исследование кинетики Na^+ -зависимого синапсомного захвата $[^3\text{H}]$ ДА показало, что этот процесс является насыщаемым и подчиняется ферментативной кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 1) с $K_m = 0,25$ мкМ и $V = 27,7$ пмоль/мг белка/мин, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [8, 9]. Известно, что одним из ингибиторов захвата ДА в соответствующие нервные окончания является эндогенный симпатомиметический амин— β -ФЭА, механизм ингибирующего действия которого недостаточно изучен и понятен [6]. Показано, что β -ФЭА вызывает торможение захвата $[^3\text{H}]$ ДА в

синапсомы (рис. 2). Ингибирование захвата $[^3\text{H}]\text{ДА}$ составляет 1,4; 21,4 и 68% при концентрациях $\beta\text{-ФЭА}$ в инкубационной среде, равных соответственно 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М. Константа ингибирования K_i для $\beta\text{-ФЭА}$, рассчитанная по методу Job и соавт. [10], составляет $7,4 \pm 0,4$ мкМ. Для определения типа ингибирования было исследовано влияние $\beta\text{-ФЭА}$ на кинетику захвата $[^3\text{H}]\text{ДА}$ синапсомы (рис. 1). Так как величина K_m возрастает, а V остается неизменной, можно было бы предположить, что $\beta\text{-ФЭА}$ конкурирует с $[^3\text{H}]\text{ДА}$ за места связывания на мембранном переносчике, транспортирующем ДА через синаптическую мембрану. Однако нами было показано [11], что ДА (10 мкМ) не влияет на процесс накопления $[^{14}\text{C}]\beta\text{-ФЭА}$ в синапсомы, который происходит путем облегченной диффузии ($K_m = 8,6$ мкМ; $V = 211$ пмоль/мг белка/мин). Из этого следует, что транспорт $[^3\text{H}]\text{ДА}$ и $[^{14}\text{C}]\beta\text{-ФЭА}$ через синапсомные мембраны, вероятно, осуществляется различными транспортными системами, и $\beta\text{-ФЭА}$ не является непосредственным конкурентным ингибитором захвата $[^3\text{H}]\text{ДА}$ в синапсомы. Очевидно, в основе ингибирующего действия $\beta\text{-ФЭА}$ на захват $[^3\text{H}]\text{ДА}$ в синапсомы лежит другой механизм.

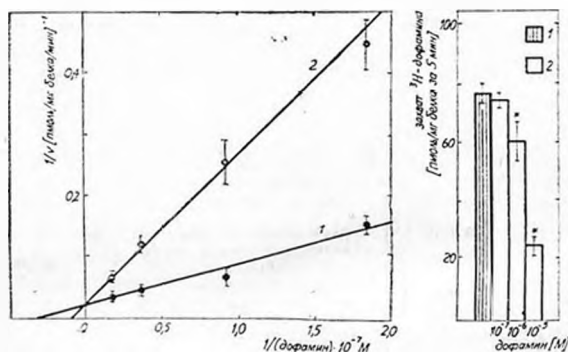


Рис. 1. Кинетика захвата $[^3\text{H}]\text{дофамина}$ синапсомы, выделенными из неостриатума головного мозга крыс, в координатах Лайнуивера-Берга в контроле (1) и в присутствии 10 мкМ $\beta\text{-фенилэтиламина}$ (2)

Рис. 2. Влияние $\beta\text{-фенилэтиламина}$ на захват $[^3\text{H}]\text{дофамина}$ синапсомы, выделенными из неостриатума головного мозга крыс. Начальная концентрация $[^3\text{H}]\text{дофамина}$ в инкубационной среде 0,11 мкМ; $p < 0,05$; 1—контроль, 2— $\beta\text{-фенилэтиламин}$

Известно, что кроме влияния на нейронный захват моноаминов, $\beta\text{-ФЭА}$ в большей степени усиливает высвобождение их из соответствующих нервных окончаний [12—14]. Нарушение захвата и высвобождения может наблюдаться и в том случае, если нарушено депонирование моноаминов в везикулах [15]. Несмотря на то, что транспорт моноаминов через нейронные мембраны и депонирование их в везику-

лах являются самостоятельными процессами, несомненно их тесная связь. Нейронный захват является самонасыщающимся процессом, что, по мнению Альтшулера и Граника [15], можно представить как постепенное заполнение моноаминами свободных мест в везикулярных депо. Поэтому предотвращение возможности депонирования должно приводить как к угнетению нейронного захвата, так и к увеличению концентрации моноаминов в цитоплазме. Проникая в синапсосомы путем облегченной диффузии [11], β -ФЭА, вероятно, нарушает депонирование эндогенного ДА. Предпосылкой такого предположения может служить тот факт, что *D*-амфетамин, метильное производное β -ФЭА, имеющее сходные с ним стимулирующие эффекты на ЦНС, связывается с везикулярной мембраной, создавая «катионный барьер», мешающий переносу нейромедиатора внутрь везикул [15]. В результате нарушения депонирования эндогенного ДА в везикулах возрастает концентрация цитоплазматического ДА, который, вероятно, связывается с мембранным переносчиком и по своему концентрационному градиенту начинает транспортироваться из синапсосом. Высвободившийся под действием β -ФЭА эндогенный ДА может конкурировать с [^3H] ДА за места связывания на мембранном переносчике, что приводит к ингибированию синапсосомного захвата [^3H] ДА.

Таким образом, учитывая вышесказанное, можно предположить, что ингибирующий эффект β -ФЭА на транспорт [^3H] ДА через синапсосомную мембрану опосредован эндогенным ДА, высвобождающимся из синапсосом под действием β -ФЭА.

TRANSPORT OF ^3H -DOPAMINE THROUGH THE MEMBRANES OF SYNAPTOSOMES. EFFECT OF β -PHENYLETHYLAMINE

ZHARIKOV S. I., ZHARIKOVA A. D., YURINSKAYA M. M.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Poustchino

The aim of the present study was to estimate the rates of Na^+ -dependent and Na^+ -independent transport of ^3H -dopamine through the membranes of synaptosomes isolated from rat neostriatum. It was found that at initial concentration of $1.1 \cdot 10^{-7}$ M ^3H -dopamine accumulation by synaptosomes due to the active Na^+ -dependent transport is equal to 52.9 pmol/mg protein/5 min, whereas due to Na^+ -independent facilitated diffusion it equals 12 pmol/mg protein/5 min, and the binding of ^3H -dopamine to synaptosomal membranes accounts for 6.2 pmol/mg protein/5 min. We tried to characterize the effect of β -phenylethylamine as an endogenous neuromodulator on the process of ^3H -dopamine uptake by synaptosomes. It was shown that in the presence of β -phenyl-ethylamine ^3H -dopamine transport through the membranes of synaptosomes is inhibited in a competitive manner. It is suggested that an inhibitory effect of β -phenylethylamine on ^3H -dopamine transport is mediated by release of endogenous dopamine from synaptosomes induced by β -phenylethylamine.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bogdanski D. P.*—In: *Transport Phenomena in the Nervous System* (eds. G. Levi, L. Battistin, A. Lajtha), p. 291–305, N. Y., Plenum Press, 1976.
2. *Holz R. W., Coyle J. T.* *Mol. Pharmacol.*, v. 10, № 5, p. 746–758, 1974.
3. *White T. D.*—In: *The Mechanism of Neuronal and Extraneuronal Transport of Catecholamines* (ed. D. Paton), p. 175–193, N. Y., Raven Press, 1976.
4. *Horn A. S.*—In: *Advances in Biochemical Psychopharmacology* (eds. P. J. Roberts, E. Costa, P. Greengard), v. 19, p. 25–33, N. Y., Raven Press, 1978.
5. *Elliott G. R., Barchas J. D.*—In: *Hormones and the Brain* (ed. D. de Wied), p. 43–52, N. Y., Raven Press, 1980.
6. *Sabelli H. C., Borison R. L., Diamond B. J., May J., Hovdala H. S.*—In: *Noncatecholic Phenylethylamines. Part 1. Phenylethylamine: Biological mechanisms and clinical aspects* (eds. A. D. Mosnaim, P. Wolf), p. 345–376, N. Y., Dekker, 1978.
7. *Gray E. G., Whittaker V. P.* *J. Anat. (Lond.)*, v. 96, № 1, p. 79–88, 1962.
8. *Snyder S. H., Coyle J. J.* *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 165, № 1, p. 78–86, 1969.
9. *Horn A. S.*—In: *The Mechanism of Neuronal and Extraneuronal Transport of Catecholamines* (ed. D. Paton), p. 195–214, N. Y., Raven Press, 1976.
10. *Job D., Cochet C., Dhien A., Chamboz E. M.* *Anal. Biochem.*, v. 84, № 1, p. 68–77, 1978.
11. *Жариков С. И., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю.* Докл. АН СССР, т. 292, № 6, с. 1494–1497, 1987.
12. *Fuxe K., Grobecker H., Jonsson J.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 2, № 3, p. 202–207, 1967.
13. *Baker G. B., Raiteri M., Bertollini A., del Carmine R., Keane P. E., Martin J. L.* *J. Pharm. and Pharmacol.*, v. 28, № 5, p. 456–457, 1976.
14. *Жарикова А. Д., Годушкин О. В.* Бюл. эксперим. биол. и мед. зып. 11, с. 574–576, 1984.
15. *Альтшулер Р. А., Граник В. Г.* Журн. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, т. 21, № 2, с. 171–181, 1976.

Поступила 5. II 1986