



УДК 577.352.46

ТРАНСПОРТ [ $^3\text{H}$ ]ДОФАМИНА ЧЕРЕЗ СИНАПТОСОМНУЮ  
МЕМБРАНУ: ВЛИЯНИЕ  $\beta$ -ФЕНИЛЭТИЛАМИНА

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

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

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

Обратный захват дофамина пресинаптическими окончаниями является насыщаемым процессом и опосредуется специальной мембранный транспортной системой [1]. Считается, что споседованный 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  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  и от активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазы [2] предложена модель высокоаффинного транспорта ДА [3], согласно которой градиенты  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  являются движущими силами для активного, то есть против градиента концентраций, накопления ДА в первых терминалях. Поскольку проникающий в нервные окончания и вновь синтезируемый ДА депонируются в синаптических везикулах, концентрация ДА в цитоплазме может быть ниже, чем во внеклеточной среде. Поэтому не исключено, что накопление ДА в синаптосомах может происходить как с помощью вышеуказанного  $\text{Na}^+$ - зависимого механизма, так и  $\text{Na}^+$ -независимого, то есть путем облегченной диффузии через мембрану. Одна из задач нашей работы состояла в проведении оценки скоростей  $\text{Na}^+$ -зависимого и  $\text{Na}^+$ -независимого механизмов транспорта [ $^3\text{H}$ ]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  $\beta$ -фенилэтиламин ( $\beta$ -ФЭА) [6]. В своей работе мы попытались охарактеризовать влияние  $\beta$ -ФЭА на процесс накопления [ $^3\text{H}$ ]ДА в синаптосомах.

### Материалы и методы

Для исследования захвата [ $^3\text{H}$ ]ДА синаптосомами использовали Р<sub>2</sub>-фракцию [7], выделенную из неостриatuma головного мозга крыс линии *Wistar* массой 180—200 г. Осадок Р<sub>2</sub>-фракции ресуспендировали в среде следующего состава (мМ): NaCl—132; KCl—5; MgSO<sub>4</sub>—1,3; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—1,2; CaCl<sub>2</sub>—1,2; глюкоза—10; HEPES-буфер—5 (рН 7,4) с добавлением аскорбиновой кислоты—1 мМ и ниаламида—12,5 мкМ. 50 мкл суспензии синаптосом помещали в инкубационную среду того же состава (конечный объем—1 мл), что и среда для ресуспендирования. Перед добавлением [ $^3\text{H}$ ]ДА («Amersham», Англия, У. А. 3,2 Ки/ммоль) синаптосомы предварительно инкубировали с  $\beta$ -ФЭА или без него в течение 5 мин при 37°. Синаптосомы с добавленным [ $^3\text{H}$ ]ДА инкубировали 5 мин, а для определения начальной скорости захвата [ $^3\text{H}$ ]ДА—2 мин. Захват [ $^3\text{H}$ ]ДА синаптосомами останавливали фильтрованием через мембранные миллипоровые фильтры (0,45 мкм). Осадок синаптосом на фильтрах промывали 3 раза по 5 мл средой инкубации при 20°. Параллельно аналогичные эксперименты проводили при 0°. Количество накопившегося в синаптосомах [ $^3\text{H}$ ]ДА определяли как разность между значениями, полученными при 37° и 0°. Для определения Na<sup>+</sup>-зависимого захвата [ $^3\text{H}$ ]ДА NaCl в инкубационной среде заменяли эквимолярным количеством LiCl. Оценку отношения [ $^3\text{H}$ ]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 [ $^3\text{H}$ ]ДА в ткани и инкубационной среде после инкубации синаптосом с [ $^3\text{H}$ ]ДА в концентрации 0,11 мкМ в течение 15 мин при 37° составляет 51,8. Это свидетельствует о том, что [ $^3\text{H}$ ]ДА накапливается в синаптосомах против градиента концентраций, то есть захват [ $^3\text{H}$ ]ДА в синаптосомы осуществляется в значительной мере путем активного транспорта.

Как видно из таблицы, захват [ $^3\text{H}$ ]ДА в синаптосомы зависит от температуры инкубации и наличия Na<sup>+</sup> в инкубационной среде. Захват [ $^3\text{H}$ ]ДА при 0° составляет 9% от захвата при 37°. В среде Кребса-

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

Таблица

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

Условия инкубации	Процессы, наблюдаемые при инкубации	Количество [ $^3\text{H}$ ] ДА, накопившегося в синаптосомах (пмоль/мг белка/5 мин)
Раствор Кребса-Рингера, 37°	$\text{Na}^+$ -зависимый транспорт, $\text{Na}^+$ -независимый транспорт, связывание с синаптосомными мембранами	71,1±0,4
Раствор Кребса-Рингера $\text{LiCl}$ вместо $\text{NaCl}$ , 37°	$\text{Na}^+$ -независимый транспорт, связывание с синаптосомными мембранами	18,2±2,4
Раствор Кребса-Рингера, 0°	связывание с синаптосомными мембранами	6,6±0,2
Раствор Кребса-Рингера с $\text{LiCl}$ вместо $\text{NaCl}$ , 0°		6,2±1,3

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

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

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

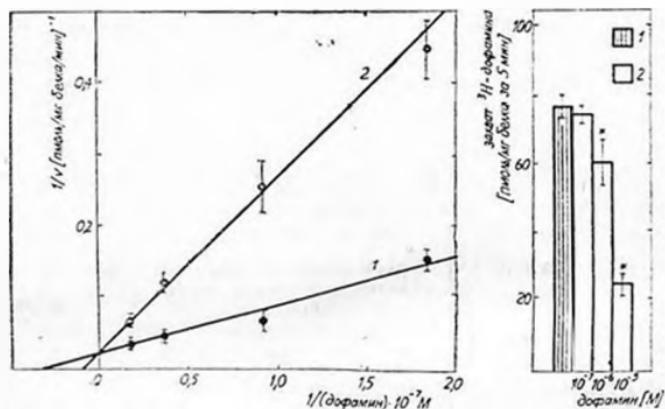


Рис. 1. Кинетика захвата  $[^3\text{H}]$ дэфамина синаптосомами, выделенными из неостриatumа головного мозга крыс, в координатах Лайнинчера-Берка — контрол (1) и в присутствии 10 мкМ  $\beta$ -фенилэтиламина (2).

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

Известно, что кроме влияния на нейронный захватmonoаминов,  $\beta$ -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 monoаминов в везикулах [15]. Несмотря на то, что транспорт monoаминов через нейронные мембранны и депонирование их в везику-

лах являются самостоятельными процессами, несомненна их тесная связь. Нейронный захват является самонасыщающимся процессом, что, по мнению Альтшулера и Граника [15], можно представить как постепенное заполнениеmonoаминами свободных мест в везикулярных депо. Поэтому предотвращение возможности депонирования должно приводить как к угнетению нейронного захвата, так и к увеличению концентрации monoаминов в цитоплазме. Проникая в синаптосомы путем облегченной диффузии [11],  $\beta$ -ФЭА, вероятно, нарушает депонирование эндогенного ДА. Предпосылкой такого предположения может служить тот факт, что  $\alpha$ -амфетамин, метильное производное  $\beta$ -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 синаптосом. Высвободившийся под действием  $\beta$ -ФЭА эндогенный ДА может конкурировать с  $[^3\text{H}]$  ДА за места связывания на мембранием переносчике, что приводит к ингибированию синаптосомного захвата  $[^3\text{H}]$  ДА.

Таким образом, учитывая вышеприведенное, можно предположить, что ингибирующий эффект  $\beta$ -ФЭА на транспорт  $[^3\text{H}]$  ДА через синаптосомную мембрану опосредован эндогенным ДА, высвобождающимся из синаптосом под действием  $\beta$ -ФЭА.

## TRANSPORT OF $[^3\text{H}]$ -DOPAMINE THROUGH THE MEMBRANES OF SYNAPTOSOMES. EFFECT OF $\beta$ -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  $\text{Na}^+$ -dependent and  $\text{Na}^+$ -independent transport of  $[^3\text{H}]$ -dopamine through the membranes of synaptosomes isolated from rat neostriatum. It was found that at initial concentration of  $1.1 \cdot 10^{-7}$  M  $[^3\text{H}]$ -dopamine accumulation by synaptosomes due to the active  $\text{Na}^+$ -dependent transport is equal to 52.9 pmol/mg protein/5 min, whereas due to  $\text{Na}^+$ -independent facilitated diffusion it equals 12 pmol/mg protein/5 min, and the binding of  $[^3\text{H}]$ -dopamine to synaptosomal membranes accounts for 6.2 pmol/mg protein/5 min. We tried to characterize the effect of  $\beta$ -phenylethylamine as an endogenous neuromodulator on the process of  $[^3\text{H}]$ -dopamine uptake by synaptosomes. It was shown that in the presence of  $\beta$ -phenylethylamine  $[^3\text{H}]$ -dopamine transport through the membranes of synaptosomes is inhibited in a competitive manner. It is suggested that an inhibitory effect of  $\beta$ -phenylethylamine on  $[^3\text{H}]$ -dopamine transport is mediated by release of endogenous dopamine from synaptosomes induced by  $\beta$ -phenylethylamine.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bogdanski D. P.—In: *Transport Phenomena in the Nervous System* (eds. G. Levi, L. Battistini, 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, 1975.
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., Haudala H. S.—In: *Noncatecholic Phenylethylamines. Part I. 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, 1975.
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., Буданус 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., Bertolini 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., Годухин О. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., вып. 11, с. 574—576, 1984.
15. Альгушев 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