

СВЯЗЫВАНИЕ [³H]ГАМК И [³⁵S]TBPS С СИНАПТИЧЕСКИМИ
МЕМБРАНАМИ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ СУДОРОГ,
ВЫЗВАННЫХ ГАМК-ЛИТИКАМИ

ГОЛОВКО А. И.

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Судороги различного генеза нарушают функциональное состояние рецепторов нейромедиаторных систем мозга [1, 2]. Это касается как плотности рецепторов, так и их средства к лигандам. ГАМК, являющаяся основным тормозным нейромедиатором в головном мозгу млекопитающих [3], вовлечена в процессы инициации и поддержания судорожных приступов [4]. Изменения функционального состояния ГАМК_A-рецепторов при судорогах, вызванных ГАМК-литиками, в частности бихукуллином и пикротоксином, изучены недостаточно. Выяснению этого вопроса посвящено настоящее исследование.

Опыты выполнены на белых крысах-самцах массой 160—220 г. Бихукуллин («Sigma», США) и пикротоксин («Serva», ФРГ) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и вводили внутривенно в дозе 8 мг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентное количество растворителя. Крыс декапитировали на 10-й мин после инъекции бихукуллина (длительность судорог— $7,8 \pm 0,3$ мин) и на 20-й мин после инъекции пикротоксина (длительность судорог— $9,2 \pm 0,7$ мин). Выделение синаптических мембран из ткани головного мозга (исключая мозжечок и ствол) для опытов с [³H]ГАМК осуществляли, как описано в работе Кузнецова и соавт. [5].

Радиолигандный анализ. Инкубационная среда содержала мембранный препарат (320—420 мкг белка), 10 мМ трис-НСl буфер, рН 7,4, [³H]ГАМК («Изотоп», СССР, 1530 ТБк/моль) в концентрациях 1—20 нМ. Общий объем инкубационной среды—1,0 мл. Неспецифическое связывание оценивали в присутствии 10 мМ ГАМК («Reanal», Венгрия). Пробы инкубировали 20 мин при температуре 0—3°. Далее содержимое пробирок переносили на фильтры GF/B («Whatman», Англия) и промывали 10 мл ледяного буфера. Подготовку мембран фронтальной коры, стриатума и мозжечка для изучения специфического связывания [³⁵S] t-бутилбициклофосфотрионата ([³⁵S] TBPS, NEN, ФРГ; 4,8 ТБк/мМ, 2 нМ) и ход анализа проводили по

методу, описанному ранее [6]. Фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы, содержащие сцинтилляционную жидкость ЖС-8. Радиоактивность подсчитывали на счетчике Rackbeta 1217—802. Параметры специфического связывания [^3H] ГАМК определяли по результатам 5—6 отдельных экспериментов. Данные о связывании [^{35}S]TBPS получены в 3—6 экспериментах. Все опыты проведены в двойных параллелях. Содержание белка в пробах оценивали по Lowry [7]. Кинетические характеристики специфического связывания [^3H] ГАМК рассчитывали в координатах Скэтчарда с использованием линейного парного регрессионного анализа методом наименьших квадратов на ЭВМ ЕС-1841.

В табл. 1 представлены данные о специфическом связывании [^3H] ГАМК с синаптическими мембранами головного мозга крыс после судорог, вызванных ГАМК-литиками. Судороги, вызванные пикротокином, не сопровождались достоверными изменениями параметров связывания лиганда. Бикукуллин повышал сродство рецепторов к лиганду. Это выражалось в снижении значения K_d на 31% в сравнении с контролем. Плотность рецепторов ГАМК (B_{max}) в обоих случаях оставалась в пределах исходных значений, что может свидетельствовать об относительной стабильности данного показателя при судорогах, вызванных ГАМК-литиками. Повышение сродства рецепторов к лиганду при воздействии бикукуллина может отражать развитие компенсаторных изменений ГАМК-ергических структур мозга. Не следует также забывать о возможности аллостерической модуляции низкоаффинных мест специфического связывания [^3H] ГАМК бикукуллином. Подобный механизм маловероятен в отношении пикротокина, так как данный ГАМК-литик связывается внутри хлор-ионного канала ГАМК $_A$ -рецептора [8].

В табл. 2 отражены данные экспериментов по изучению специфического связывания [^{35}S]TBPS с синаптическими мембранами различ-

Таблица 1

Кинетические характеристики связывания [^3H] ГАМК с мембранами мозга крыс после судорог, вызванных ГАМК-литиками (n=5)

| Вещество | K_d , нМ | B_{max} , фМ/мг белка |
|-------------------|------------------|--------------------------------|
| Д-метилсульфоксид | $22,0 \pm 1,4$ | $539,5 \pm 44,2$ |
| Пикротокин | $23,3 \pm 4,1$ | $604,9 \pm 59,4$ |
| Бикукуллин | $15,2 \pm 2,0^*$ | $555,8 \pm 62,1$ |

Примечание. * $p < 0,02$.

ных участков головного мозга крыс после судорог, вызванных бикукуллином. Во фронтальной коре и стриатуме изменений связывания лиганда не выявлено. В мозжечке отмечалось достоверное повышение данного показателя после введения бикукуллина. Эти изменения могут быть обусловлены функциональной перестройкой хлор-ионофора в

процессе развития судорожного синдрома. По-видимому, места связывания [^{35}S]TBPS во фронтальной коре и стриатуме, с одной стороны, и мозжечке, с другой, функционально различаются. Маловероятно, что изменения связывания лиганда обусловлены влиянием следовых количеств ГАМК-литиков, так как перед радиолигандным анализом мембраны подвергались интенсивному отмыванию, а бикикуллин не относится к алкилирующим агентам [9].

Таблица 2

Специфическое связывание [^{35}S]TBPS (2 нМ) с синаптическими мембранами различных структур головного мозга крыс после судорожного воздействия ГАМК-литиков (n=6)

| Вещество | Связывание [^{35}S]TBPS, ф.м/мг белка | | |
|-------------------|--|----------------|-----------------|
| | фронтальная кора | стриатум | мозжечок |
| Диметилсульфоксид | 101,6 \pm 7,1 | 66,2 \pm 6,2 | 71,1 \pm 4,2 |
| Бикикуллин | 95,2 \pm 12,6 | 61,5 \pm 4,5 | 82,6 \pm 1,8* |

Примечание. * $p < 0,05$.

Состояние ГАМК-рецепторного комплекса мозга при судорогах, вызванных ГАМК-литиками, остается недостаточно изученным. Вместе с тем, получены данные о возможности модуляции различных участков этого комплекса ГАМК-тропными препаратами. Так, антагонист бензодиазепиновых рецепторов FG-7142, вызывавший при хроническом введении киндлинг у мышей, понижал специфическое связывание [^{35}S]TBPS в коре больших полушарий. При этом в мозжечке и гиппокампе такой эффект отсутствовал [10]. Длительное введение блокатора хлор-ионного канала ГАМК $_A$ -рецептора пикротоксина (в течение 10 дней) сопровождалось снижением числа мест связывания [^{35}S]TBPS на мембранах мозга крыс. При однократном введении яда, напротив, отмечали повышение связывания лиганда [11]. ГАМК-рецепторный комплекс ретикулярной части черной субстанции мозга крыс оказался достаточно устойчивым к хроническим кортикальным судорогам, вызываемым электрошоком. В указанной области не отмечалось нарушений специфического связывания [^3H]мусцимола и [^3H]флуниразепама [1]. Бикикуллин повышал сродство рецепторов к лиганду. Судороги, вызванные бикикуллином, сопровождалось усилением специфического связывания [^{35}S]TBPS с синаптическими мембранами мозжечка. Во фронтальной коре и стриатуме изменений этого показателя не отмечалось. Выявленные нарушения могут отражать компенсаторные изменения ГАМК-ионотропного комплекса в процессе развития судорог, вызванных бикикуллином.

THE BINDING OF [³H]GABA AND [³⁵S]TBPS TO RAT BRAIN SYNAPTOSOMAL MEMBRANES AFTER GABA ANTAGONISTS-INDUCED SEIZURES

GOLOVKO A. I.

Medical Military Academy, Leningrad

We studied changes in high affinity [³H]GABA and [³⁵S]TBPS binding by preparations of rat brain synaptosomes after seizures induced in rats by administration of picrotoxin and bicuculline. No alterations in the maximal binding capacity (B_{max}) of [³H]GABA in rat brain synaptosomal membranes was detected after picrotoxin induced seizures. However, bicuculline administration led to a 31% decrease in K_d . The binding of [³⁵S]TBPS increased after bicuculline administration in cerebellum but not in striatum or frontal cortex. The [³⁵S]TBPS binding sites in cerebellum probably are functionally different from those in the frontal cortex and striatum.

ЛИТЕРАТУРА

1. Santori E. M., Collins R. C. *Brain Res.*, v. 442, № 2, p. 261—269, 1983.
2. Schneider P., Girardi E., Rodriguez de Georgina, Lores A. *Commun. Biol.*, v. 7, № 2, p. 105—112, 1989.
3. Павский К. С., Георгиев В. П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты, М., Медицина, 1986.
4. Lazarova M., Roussinov K. *Acta physiol. et pharmacol. bulg.*, v. 8, № 1—2, p. 78—83, 1982.
5. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О. Н., Асланов Х. А. *Укр. биохим. журн.*, т. 54, № 4, с. 428—431, 1982.
6. Wong D. T., Threlkeld P. G., Bymaster F. P., Squires R. F. *Life Sci.*, v. 34, № 9, p. 853—860, 1984.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
8. Inoue M., Akaike N. *Neurosci. Res.*, v. 5, № 5, p. 380—394, 1988.
9. Levin A. H., de Costa B. R., Rice K. C., Skolnick P. *Mol. pharmacol.*, v. 35, № 2, p. 189—191, 1989.
10. Levin E., Paris J., Bleck V., Za'niser N. R., Harris R. A. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 160, № 1, p. 101—106, 1989.
11. Ho Y., Lim D. K., Nabeshima T., Ho J. K. *J. Neurochem.*, v. 52, № 4, p. 1064—1070, 1989.

Поступила 5. VI. 1990