

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЕНИЛЭТИЛАМИНА ПРИ  
ЛОКАЛЬНОЙ СУПЕРФУЗИИ НЕОСТРИАТУМА  
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ЖАРИКОВА А. Д., ГОДУХИН О. В., ЖАРИКОВ С. П.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Амфетаминоподобный симпатомиметик  $\beta$ -фенилэтиламин ( $\beta$ -ФЭА) идентифицирован в головном мозгу животных и человека [1], причем основная часть эндогенного  $\beta$ -ФЭА обнаружена во фракции нервных окончаний [2]. Считается, что эффекты экзогенно введенного  $\beta$ -ФЭА на ЦНС преимущественно связаны с его влиянием на моноаминергические системы головного мозга и в особенности на дофаминергическую систему [3]. В исследованиях *in vivo* установлено [4], что  $\beta$ -ФЭА может модулировать эффективность дофаминергической нейротрансмиссии, взаимодействуя с пресинаптической [5] и постсинаптической [6] областью дофаминергического синапса. Кроме того, обнаружено, что региональное распределение эндогенного дофамина (ДА) в головном мозгу крыс совпадает с распределением экзогенно введенного в больших дозах  $\beta$ -ФЭА с максимальным накоплением в неостриатуме [7]. Неостриатум обладает значительной активностью декарбоксилазы ароматических аминокислот—фермента, катализирующего синтез  $\beta$ -ФЭА из L-фенилаланина и занимает одно из первых мест среди структур головного мозга по содержанию эндогенного  $\beta$ -ФЭА [1]. Учитывая вышесказанное, закономерен вопрос, не локализуется ли эндогенный  $\beta$ -ФЭА в дофаминергических, в частности, нигростриатных нейронах, обладающих всеми ферментными системами, необходимыми для синтеза и разрушения  $\beta$ -ФЭА? Одним из подходов к решению этого вопроса является сравнительный анализ высвобождения предварительно апплицированных в неостриатум [ $^3\text{H}$ ] ДА и [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА в ответ на электрическую стимуляцию сомы дофаминергических нейронов в компактной зоне черной субстанции. В данной статье представлены результаты такого сравнительного анализа.

В работе использована методика локальной суперфузии головного мозга с помощью описанной ранее системы нагнетательно-отсасывающей

(push-pull) канюли с одновременной регистрацией электрической активности мозга из области суперфузии [8]. Эксперименты проводили в условиях острого опыта на белых крысах-самцах массой 300—400 г, находящихся под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутривенно). В ходе предварительной операции животным стереотаксически (по атласу Фифковой и Маршалла) в неостриатум вживляли направляющую трубку с регистрирующим электродом ( $AP = -1,5$ ;  $L = 2,5$ ;  $V = 5$ ), а в компактную зону черной субстанции — стимулирующие электроды ( $AP = +4,5$  и  $4,3$ ;  $L = 2$ ;  $V = 8,5$ ). Методика анализа высвобождения в перфузат предварительно апплицированного в неостриатум [ $^3H$ ] ДА подробно приведена ранее [9]. В экспериментах с  $\beta$ -ФЭА в область будущей суперфузии через направляющую трубку с помощью микрошприца вводили [ $^{14}C$ ]  $\beta$ -ФЭА (4 мкл,  $8 \cdot 10^{-9}$  моль, У. А. 50 мКи/ммоль, «Amersham», Англия). По истечении 30-минутного периода накопления [ $^{14}C$ ]  $\beta$ -ФЭА в клеточных элементах в неостриатум до уровня кончика регистрирующего электрода погружалась push-pull канюля. Для суперфузии использовали искусственную цереброспинальную жидкость следующего состава (мМ): NaCl—117; KCl—5,4; CaCl<sub>2</sub>—1,3; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—1,1; NaHCO<sub>3</sub>—25; MgSO<sub>4</sub>—0,6; глюкоза—10 с добавлением ингибитора MAO ниамида (12,5 мкМ). Перед экспериментом перфузионную жидкость насыщали карбогеном (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>=95:5%) до pH 7,4. Скорость тока перфузионной жидкости составляла 50 мкл/мин, общее время суперфузии около 3,5 ч. Сбор перфузата начинали спустя 100 мин от начала суперфузии. Собранные в счетные флаконы 20-минутные фракции перфузата высушивали при 90°. Оценку суммарной радиоактивности производили в толуольном сцинтиляторе на счетчике SL-4000 фирмы «Intertechnique» (Франция). Радиоактивность первой 20-минутной фракции перфузата принимали за 100% и относительно неё оценивали высвобождение [ $^{14}C$ ]  $\beta$ -ФЭА в последующие 20-минутные периоды суперфузии. В течение 2- и 4-го 20-минутных периодов суперфузии проводили электрическую стимуляцию компактной зоны черной субстанции в течение 20 мин серийными импульсами длительностью 0,1 мсек, с частотой серии 0,6, частотой внутри серии 5 Гц, длительностью серии 1 с. Достоверность различия уровней высвобождения [ $^{14}C$ ]  $\beta$ -ФЭА в аналогичные периоды суперфузии у сравниваемых групп животных оценивали по критерию Стьюдента. В конце эксперимента осуществляли морфологический контроль положения канюли и электродов.

В проведенных экспериментах установлено, что спустя 100 мин от начала локальной суперфузии неостриатума головного мозга спонтанное высвобождение предварительно апплицированного [ $^{14}C$ ]  $\beta$ -ФЭА постепенно уменьшается в течение пяти последовательных 20-минутных периодов суперфузии. Результаты экспериментов по анализу высвобождения [ $^{14}C$ ]  $\beta$ -ФЭА при электрической стимуляции черной субстанции приведены на рисунке. Для сравнения на этом же рисунке представлены данные по высвобождению в перфузат предварительно апплицированного в неостриатум [ $^3H$ ] ДА, полученные нами ранее [9]. При элек-

трической стимуляции компактной зоны черной субстанции с частотой 5 Гц в течение 2-го 20-минутного периода суперфузии наблюдали достоверное 20%-ное увеличение ( $p < 0.05$ ) высвобождения в перфузат предварительно апплицированного в неостриатум [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА. При электрической стимуляции, производимой в течение 4-го 20-минутного периода суперфузии проявлялась лишь тенденция к росту высвобождения [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА. Эффекты электрической стимуляции на высвобождение [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА зависели от расположения канюли в неостриатуме и стимулирующих электродов в черной субстанции. Как и в слу-

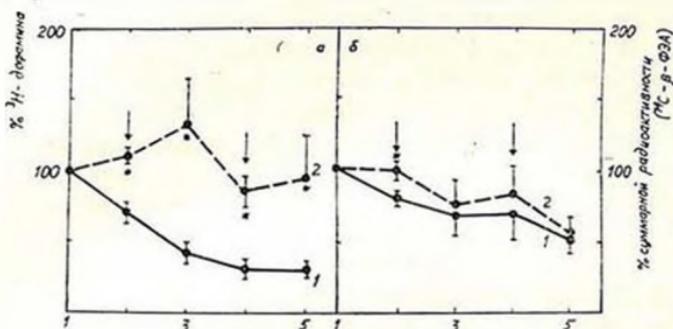


Рис. Влияние электрической стимуляции (частота 5 Гц) компактной зоны черной субстанции головного мозга крыс на высвобождение в перфузат предварительно апплицированных в неостриатум [ $^3\text{H}$ ] ДА (а) и [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА (б) 1, 2, 3, 4, 5—20-минутные фракции перфузата, собранные спустя 100 мин от начала перфузии неостриатума; электрическая стимуляция производилась в течение 2-го и 4-го 20-минутных периодов (указано стрелками); \*—достоверно различающиеся средние значения уровней высвобождения [ $^3\text{H}$ ] ДА и [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА в аналогичные периоды перфузии 2-х сравниваемых групп экспериментов (3—4 опыта,  $M \pm m$ ;  $p < 0.05$ ); прямой линией обозначено спонтанное высвобождение, пунктирной—индуцируемое электрической стимуляцией

чае с [ $^3\text{H}$ ] ДА, наибольшее повышение высвобождения в перфузат [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА обнаружено при вживлении электродов в ростромедиальную или центральную часть черной субстанции и погружении push-pull канюли в центральную часть головки хвостатого ядра. В том случае, если стимулирующие электроды находились в вентрокаудальной части черной субстанции, а push-pull канюля—в росто-центральной части хвостатого ядра, стимулируемое высвобождение [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА было меньше. Хотя предварительно апплицированный в неостриатум [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА высвобождается в перфузат при тех же параметрах электрической стимуляции компактной зоны черной субстанции, что и [ $^3\text{H}$ ] ДА, динамика высвобождения у них различна. В экспериментах с [ $^3\text{H}$ ] ДА в последующий после электрической стимуляции 20-минутный период суперфузии происходит еще большее увеличение высвобождения в перфузат [ $^3\text{H}$ ] ДА, тогда как для [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА этого не наблюдается. Причины такого различия могут быть связаны как с разным механизмом поступления апплицированного [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА внутрь

нервных окончаний, так и разными возможными механизмами высвобождения соединений из нервных окончаний. Согласно нашим данным [10],  $\beta$ -ФЭА накапливается в нервных окончаниях путем облегченной диффузии. Поэтому доля поступающего в окончания [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА из общего количества апплицированного внутрь неостриатума [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА невелика и зависит только от разности концентраций [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА снаружи и внутри нервных окончаний. В свою очередь [ $^3\text{H}$ ] ДА накапливается в нервных окончаниях с помощью  $\text{Na}^+$ -зависимого активного транспорта, осуществляемого мембранным переносчиком [11]. Этот механизм транспорта позволяет апплицированному в неостриатум [ $^3\text{H}$ ] ДА накапливаться в дофаминергических нервных окончаниях за короткий промежуток времени в больших количествах. Таким образом, разный исходный уровень [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА и [ $^3\text{H}$ ] ДА, аккумулированных в неостриатуме перед суперфузией, может объяснить различную динамику высвобождения [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА и [ $^3\text{H}$ ] ДА при одних и тех же параметрах электрической стимуляции. Кроме того, при длительной электрической стимуляции внутри нервных окончаний возрастает концентрация  $\text{Na}^+$ , что может инициировать  $\text{Na}^+$ -зависимое высвобождение ДА, опосредованное мембранным переносчиком. По-видимому, увеличение высвобождения [ $^3\text{H}$ ] ДА в последующий после электрической стимуляции период суперфузии связано также с высвобождением [ $^3\text{H}$ ] ДА посредством переносчика. В случае [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА  $\text{Na}^+$ -зависимый компонент высвобождения, вероятно, отсутствует; было установлено, что функционирование мембранного переносчика для  $\beta$ -ФЭА не зависит от  $\text{Na}^+$  [10].

Таким образом, полученные нами данные показывают, что предварительно апплицированный в неостриатум [ $^{14}\text{C}$ ]  $\beta$ -ФЭА высвобождается в перфузат при тех же параметрах электрической стимуляции компактной зоны черной субстанции, что и [ $^3\text{H}$ ] ДА. Это подтверждает предположение о локализации эндогенного  $\beta$ -ФЭА в дофаминергических nigrostriatalных нейронах головного мозга крысы.

## RELEASE OF $^{14}\text{C}$ - $\beta$ -PHENYLETHYLAMINE DURING LOCAL SUPERFUSION OF RAT BRAIN NEOSTRIATUM

ZHARIKOVA A. D., GODUKHIN O. V., ZHARIKOV S. I.

Institute of Biological Physics, USSR Acad. Sci., Poustchino

Using local superfusion technique of rat brain neostriatum with push-pull cannulae it was demonstrated that preliminary applied [ $^{14}\text{C}$ ]- $\beta$ -phenylethylamine is released into perfusate under the same conditions of electric stimulation of substantia nigra (5 Hz) as [ $^3\text{H}$ ] dopamine. Data obtained confirm the suggestion about localization of endogenous  $\beta$ -phenylethylamine in the dopaminergic nigro-striatal neurons of rat brain.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nakajima T., Kukimoto Y., Sano J. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 143, № 3, p. 319—325, 1964.
2. Boulton A. A., Baker G. B. *J. Neurochem.*, v. 25, № 2, p. 477—481, 1975.
3. Sabelli H. C., Borison R. L., Diamond B. J., May J., Haudala H. S.—In: *Noncatecholic phenylethylamines. Part I. Phenylethylamine: biological and clinical aspects* (eds. A. D. Mosnaim, M. Wolf), p. 345—376. Dekker, New York, Basel, 1978.
4. Жарикова А. Д., Годухин О. В. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 10, с. 395—398, 1979.
5. Fixe K., Grubecker H., Jonsson J. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 2, № 3, p. 202—207, 1967.
6. Antelman S. M., Edwards D. J., Lin M. *Brain Res.*, v. 127, № 2, p. 317—322, 1977.
7. Jackson D. M., Smythe D. B. *Neuropharmacology*, v. 12, № 7, p. 663—668, 1973.
8. Годухин О. В., Жарикова А. Д. *Физиол. журн. СССР*, т. 65, № 10, с. 141—143, 1979.
9. Жарикова А. Д., Годухин О. В. *Физиол. журн. СССР*, т. 71, № 1, с. 105—112, 1985.
10. Жарикова С. Н., Жарикова А. Д., Буланцева А. Ю. *Докл. АН СССР*, т. 292, № 6, с. 1494—1497, 1987.
11. Жарикова С. Н., Жарикова А. Д., Юричская М. М. *Нейрохимия*, т. 6, № 3, с. 311—316, 1987.

Поступила 25. III 1987