

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 НА ДЕЙСТВИЕ СВЕРХНИЗКИХ ДОЗ АЦЕТИЛХОЛИНА И ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА ВХОД ^{45}Ca В МОЗГ И СЕЛЕЗЕНКУ КРЫСЫ

И.Ц. Карапетян

*/Медико-биологическая международная высшая государственная школа ЮНЕСКО/
375014 Ереван, ул. Асратяна, 7*

Ключевые слова: ацетилхолин, гамма-аминомасляная кислота, ^{45}Ca , мозг и селезенка крысы, фосфолипаза A_2

Ранее было показано, что низкие дозы ацетилхолина (АХ) и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) (10^{-8} – 10^{-13}), не способные открывать ионные каналы в мембране, модулируют хемочувствительность мембран виноградной улитки и аплизии [2,6]. Также установлено, что указанная модуляция опосредована изменением внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов и стимуляцией Na-Ca обмена [2,7].

Ранее нами исследовался механизм действия сверхнизких концентраций нейромедиаторов (АХ и ГАМК порядка 10^{-16} – 10^{-10} М и ниже) на вход ^{45}Ca в условиях различной активности Na/K насоса и систем вторичных мессенджеров, а также под воздействием фосфолипазы A_2 (ФЛ A_2) с нахождением наименьшей эффективной концентрации (порога) на нейронах окологлоточного нервного кольца ганглиев наземной улитки *Helix pomatia*. Показано, что порог действия медиаторов существенно зависит от активности указанных систем.

В последние годы был исследован также мембранный механизм действия ФЛ A_2 на функциональную активность нейронов виноградной улитки. Было установлено, что подавляющее действие нейромедиаторов АХ (10^{-10} – 10^{-5} М) и ГАМК (10^{-10} – 10^{-5} М) на активность Na-насоса усиливается при предварительной обработке ганглиев виноградной улитки ФЛ A_2 , вызывая увеличение активности Na насоса [4].

В данной работе на более высоком уровне организации исследовано действие сверхнизких концентраций АХ (10^{-16} – 10^{-10} М) и ГАМК (10^{-15} – 10^{-10} М) на вход ^{45}Ca в мозг и селезенку крысы в нормальных условиях и под действием ФЛ A_2 .

Материал и методы

Опыты проведены на белых крысах линии Вистар обоих полов массой 180–200 г. Для экспериментов использовали мозг крыс (возбудимый орган) и селезенку (невозбудимый орган). Крыс декапитировали на льду, извлекали селезенку и мозговую ткань и помещали в охлажденный до 0, -4°C раствор Хенкса следующего состава: NaCl – 8, KCl – 0,4, CaCl_2 – 0,14, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, K_2HPO_4 – 0,06, Na_2HPO_4 – 0,06, глюкоза – 1 г/л, pH – 7,4. Мозговую ткань отмывали от крови раствором Хенкса, после чего гомогенизировали в том же растворе. Затем предварительно взвешенные куски селезенки и гомогената мозга

инкубировали в соответствующих растворах, содержащих 10 мкл изотопа ^{45}Ca (в 1 мкл—388750 имп/мин), с добавкой низких доз АХ и ГАМК без и с ФЛ A_2 (2мг/100мл). Время инкубации — 20 мин. В опытах с ФЛ A_2 производилась предварительная обработка ткани ферментом в течение 10 мин. После двукратной промывки и сушки гомогенат головного мозга и ткань селезенки растворяли в 2н растворе КОН. Подсчет радиоактивности производили в сцинтилляторе Брея на спектрометре СЛ-4221 ("Intertechnique", Франция). Количество вошедшего изотопа рассчитывали в имп/мин/мг влажного веса. Результаты, представленные в таблице и на рисунках, являются усредненными данными пяти одновременно проведенных экспериментов.

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, через 20 мин инкубации все указанные концентрации АХ и ГАМК практически не влияют на вход ^{45}Ca в клетки мозга крысы, хотя наблюдается некоторая тенденция к подавляющему эффекту. Достоверное уменьшение наблюдается лишь под действием АХ в концентрации 10^{-14} М (на $33,9 \pm 6,8$ %). Что касается селезенки, все исследуемые дозы АХ и ГАМК также не влияют на вход ^{45}Ca , хотя здесь, наоборот, наблюдается тенденция к стимулирующему эффекту. Достоверное увеличение входа ^{45}Ca наблюдается лишь в концентрации ГАМК 10^{-15} М на $13,1 \pm 3,04$ %.

В наших предыдущих исследованиях моделью для исследования механизма действия указанных сверхнизких доз медиаторов являлись нейроны улиток [1]. Было показано, что на эффект действия медиаторов на нейроны значительно влияет текучесть мембран [5], а улитки — объекты, подверженные существенным изменениям фосфолипидного состава в зависимости от сезона [8]. Представляло интерес исследовать, как влияет ФЛ A_2 на чувствительность входа ^{45}Ca к этим сверхмалым дозам АХ и ГАМК. На нейронах улитки было показано, что ФЛ A_2 незначительно снижает базальный уровень ^{45}Ca в нейронах. Эффекты же АХ и ГАМК, незначительные в контроле, заметно возрастали под действием ФЛ A_2 . Так как нейроны улитки являлись лишь моделью, как было отмечено выше, дальнейшие эксперименты проводились на крысах.

На рис. 1—2 показано действие низких доз АХ и ГАМК на вход ^{45}Ca в мозг и селезенку крысы под действием ФЛ A_2 . Как видно из рис. 1, ФЛ A_2 по-разному действует на чувствительность входа ^{45}Ca в клетки мозговой ткани крысы к исследуемым концентрациям АХ и ГАМК. Так, под действием ФЛ A_2 АХ 10^{-10} М стимулирует вход ^{45}Ca на $70,4 \pm 17,1$ %, далее стимулирующий эффект несколько ослабевает и в концентрации АХ 10^{-12} М составляет $39,8 \pm 13,1$ %, АХ 10^{-14} М — $25,4 \pm 9,6$ %, а в концентрации 10^{-16} М АХ стимулирует вход ^{45}Ca на $23,2 \pm 2,6$ %. Следовательно, порог действия АХ на вход ^{45}Ca в данном случае лежит ниже исследуемых концентраций (рис. 1, А). Что касается ГАМК, все исследуемые концентрации не имели эффекта на вход ^{45}Ca в клетки мозга в присутствии ФЛ A_2 аналогично контролю (рис. 1, Б).

Обратная картина наблюдается в клетках селезенки (рис. 2). ФЛ A_2 не оказывала существенного действия на эффект АХ на вход ^{45}Ca в клетки селезенки, за исключением концентрации АХ 10^{-14} М, которая стимулировала вход ^{45}Ca на $184 \pm 40,5$ % (рис. 2А). ГАМК же, наоборот, во всех исследуемых концентрациях стимулировала вход ^{45}Ca : в дозах 10^{-10} — на $55,3 \pm 8,5$ %, 10^{-14} М — на $22,9 \pm 12,5$ %, 10^{-15} М продолжала стимулировать вход ^{45}Ca на $36,7 \pm 9,5$ %. Следовательно, порог действия ГАМК на вход ^{45}Ca в данном случае лежит ниже исследуемых концентраций (рис. 2Б).

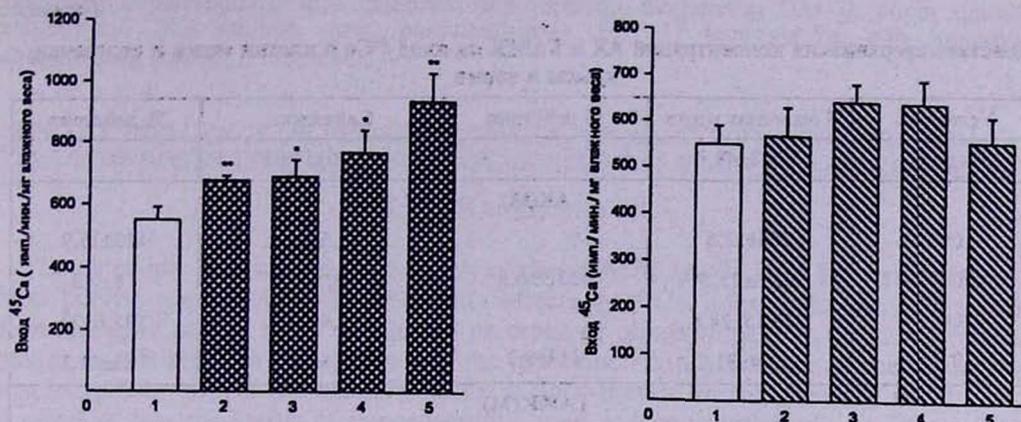


Рис. 1. Действие низких концентраций АХ и ГАМК на вход ⁴⁵Са в клетки мозга крысы под действием ФЛ A₂:
 А. 1 – контроль (ФЛ A₂); 2–5 – дозы АХ (10⁻¹⁶, 10⁻¹⁴, 10⁻¹², 10⁻¹⁰ М соответственно); *P<0,05, ** P< 0,01 (относительно контроля);
 Б. 1 – контроль (ФЛ A₂); 2–5 – дозы ГАМК (10⁻¹⁵, 10⁻¹⁴, 10⁻¹², 10⁻¹⁰ М соответственно).

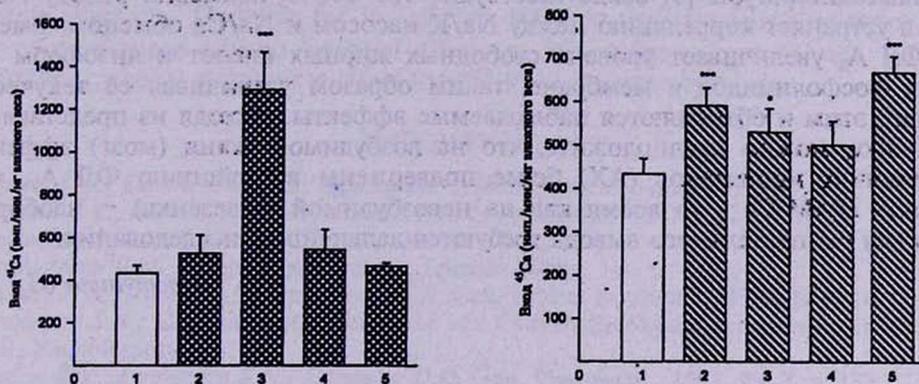


Рис. 2. Действие низких концентраций АХ и ГАМК на вход ⁴⁵Са в клетки селезенки крысы в присутствии ФЛ A₂:
 А. 1 – контроль (ФЛ A₂); 2–5 – дозы АХ аналогичны дозам рис. 1; ***P<0,001 (относительно контроля);
 Б. 1 – контроль (ФЛ A₂); 2–5 – дозы ГАМК аналогичны дозам рис. 1; *P<0,05, ***P<0,001 (относительно контроля)

Таким образом, представленные данные показывают, что если на мозговой ткани эффекты низких доз АХ на вход ⁴⁵Са оказались чувствительными к действию ФЛ A₂, то на клетках селезенки подобный эффект наблюдался в отношении ГАМК. Представленные результаты коррелируют с данными, полученными ранее на нейронах улитки, где ФЛ A₂ усиливала стимулирующий эффект низких доз АХ на вход ⁴⁵Са.

Действие сверхнизких концентраций АХ и ГАМК на вход ^{45}Ca в клетки мозга и селезенки крысы в норме

Условия	Гомогенат мозга	% действия	Селезенка	% действия
Контроль	374,8±48,7		177,6±14,03	
АХ(М)				
10^{-16}	366±22,6		154,5±28,2	↓13±15,9
10^{-14}	251,5±25,5*	↓33,9±6,8	188,7±1,4	↑6±0,8
10^{-12}	349,15±24,8		235,4±35,5	↑32,6±20
10^{-10}	312,4±31,2	↓17±8,3	232,6±37,8	↑31±21,3
ГАМК(М)				
10^{-15}	323,7±37,6	↓14±10,3	200,9±5,4*	↑13,1±3,04
10^{-14}	340,2±23,1	↓9±6,2	171,3±2,4	↓3±1,35
10^{-12}	324,8±35,4	↓13±9,5	232,2±36,7	↑30,7±20,7
10^{-10}	334,7±5,5	↓11±1,5	220,2±27,01	↑24±15,2

Данные литературы [3] свидетельствуют, что ФЛ A_2 подавляет работу Na/K насоса и устраняет корреляцию между Na/K насосом и Na/Ca обменом. Вместе с тем ФЛ A_2 увеличивает уровень свободных жирных кислот и лизоформ отдельных фосфолипидов в мембране, таким образом увеличивая ее текучесть. Очевидно, этим и объясняются наблюдаемые эффекты. Исходя из представленных данных, можно предположить, что на возбудимой ткани (мозг) эффекты возбуждающих медиаторов (АХ) более подвержены воздействию ФЛ A_2 , чем тормозных (ГАМК), в то время как на невозбудимой (селезенка) — наоборот. Однако для окончательного вывода требуются дальнейшие исследования.

Поступила 01.11.99

ԱՅԵՏԻԼԵՈՒԼԻՆԻ ԵՎ ԳԱՄԱ-ԱՍԻՆՈԿԱՐԱԳԱԹԹՎԻ ԳԵՐՑԱԾՐ ԳՈՉԱՆԵՐԻ ԱՉԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ^{45}Ca ՄՈՒՏՔԻ ՎՐԱ ԱՈՆԵՏԻ ՈՂԵՂԻ ԵՎ ՓԱՅՏԱՐԻ ԲՁԻՋՆԵՐՈՒՄ ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴ A₂ ՆԵՐԿԱՅՈՒԹՅԱՐԸ

Ի.Յ. Կարապետյան

Ուսումնասիրվել է ացետիլխոլինի (Ախ) և գամա-ամինոկարաբաթթվի (ԳԱԿԹ) գերցածր դոզաների (10^{-10} – 10^{-16} Մ) ազդեցությունը ^{45}Ca մուտքի վրա առնետների գլխուղեղի նեյրոններում և փայծաղի հյուսվածքային բջիջներում նորմալ պայմաններում և ֆուֆոլիպազ U_2 ներկայությամբ (ՖԼ U_2 , 2մգ/100մլ). Յույց է արված, որ նորմալ պայմաններում մեդիատորների նշված դոզաները չունեն զգալի ազդեցություն ^{45}Ca մուտքի վրա ինչպես գլխուղեղային նեյրոններում, այնպես էլ փայծաղի հյուսվածքային բջիջներում: ՖԼ U_2 ներկայությամբ մեդիատորների նշված խտությունները ունեն հակառակ ազդեցություն կազմումի զգայնության վրա: Ախ-ի բոլոր հետազոտվող քանակները խթանում են ^{45}Ca մուտքը գլխուղեղի բջիջներում այն ժամանակ երբ ԳԱԿԹ-ի ոչ մի խտություն չի բողմում զգալի ազդեցություն: Ինչ վերաբերում է փայծաղի հյուսվածքային բջիջներին, ապա խթանիչ ազդեցություն են ցուցաբերում արգելակող մեդիատոր ԳԱԿԹ-ի բոլոր

հետազոտվող քանակները այն դեպքում, երբ խթանիչ մեդիատոր ԱՆ չի բողել զգալի ազդեցություն ^{45}Ca մուտքի վրա, բացառությամբ 10^{-14} Մ խտությունը, որի խթանիչ ազդեցությունը կազմել է $183,9 \pm 40,5\%$:

ON THE INFLUENCE OF PHOSPHOLIPASE A_2 ON ACETYLCHOLINE AND GABA EXTRA-LOW DOSES EFFECT ON ^{45}Ca INFLUX INTO RAT BRAIN AND SPLEEN CELLS

I.Tz. Karapetyan

The extra-low concentrations of acetylcholine (Ach) (10^{-10} – 10^{-16} M) and gamma-amino butyric acid (GABA 10^{-10} – 10^{-15} M) effects on ^{45}Ca influx into the brain and spleen tissues of rats in norm and in the presence of phospholipase A_2 (PhL A_2) in the medium were studied. It was shown that the mentioned concentrations of mediators do not substantially impact the calcium influx in both tissues. In the presence of PhL A_2 the effect of two mediators at concentrations used in our experiments on ^{45}Ca influx was the opposite. Particularly Ach at all investigated concentrations stimulated calcium influx into the brain tissue cells and Ach even in the concentration of 10^{-16} M still increases the ^{45}Ca influx into the cell for $23 \pm 2,6\%$. Whereas GABA has no substantial effect on ^{45}Ca influx in the concentrations used in our experiments and the influx of the ^{45}Ca isotope into the brain tissue cells is similar to the control. As for the spleen cells, a stimulating effect was detected under the influence of all concentrations of the inhibitory mediator GABA (at the concentration of 10^{-15} M GABA still has a stimulating effect on ^{45}Ca influx for $36,7 \pm 9,5\%$). Whereas the stimulating mediator Ach in any concentrations has no essential effect on ^{45}Ca influx except for the 10^{-14} M concentration, when a stimulating effect for $183,9 \pm 40,5\%$ was observed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азатян К.В., Карапetyan И.Ц., Айрапetyan С.Н. Биол. мембраны, 1993, 10, с. 317.
2. Дадалян С.С., Азатян К.В., Айрапetyan С.Н. Нейрохимия, 1988, 7, 1, с. 18.
3. Дворецкий А.И., Айрапetyan С.Н. и др. Киев. 1990.
4. Мартиросян Д.М. Автореф. канд. дисс. Ереван, 1989.
5. Arvanov V.L., Takenaka T., Ayrapetyan S.N. Cell. Molec. Neurobiol., 1986, 6, p. 16.
6. Ayrapetyan S.N., Carpenter D.O. Membrane and Cellular Biophysics and Biochemistry, 1991, NeuroReport 2, p. 563.
7. Azatian K.V., Ayrapetyan S.N., Carpenter D.O. Gen. Pharmacol., 1997, 29, 2, p. 185.
8. Saghyan A.A., Takenaka T., Ayrapetyan S. N. Cell. Molec. Neurobiol., 1986, 6, p. 397.