

## ВЛИЯНИЕ ГАМК НА ФОСФОИНОЗИТИДНЫЙ ЦИКЛ И МОДИФИКАЦИИ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ СИНАПТОСОМ МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ГИПОКИНЕЗИИ

В. П. Акопян, К. В. Мелконян, Ю. В. Тадевосян, Т. Б. Батикян<sup>1</sup>

Исследовано влияние 30-дневной гипокинезии (ГК) на инициацию фосфоинозитидного цикла (ФИЦ), а также на процессы включения [<sup>14</sup>C]-арахидоновой кислоты в фосфолипиды мембран синапсом мозга крыс. Полученные данные свидетельствуют о превалировании процессов катаболизма фосфолипидов синапсом мембран на фоне относительной стабильности сигнальной трансдукции на 30-е сутки ГК. Эффекты  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) проявляются в резком усилении функционирования ФИЦ на 5-й секунде его инициации. На относительно позднем этапе (5 мин) стимуляции ФИЦ под влиянием ГАМК в условиях ГК наблюдается тенденция к нормализации активности ФИЦ.

**Ключевые слова:** гипокинезия, синапсомы, ГАМК, липидные модификации, фосфоинозитидный цикл

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных направлений проблемы адаптивных и патологических изменений в организме при различных функциональных состояниях является изучение механизмов нейрохимической реорганизации мозга [1, 3, 4], поскольку структурные изменения могут возникать ранее функциональных или одновременно с ними [5]. При этом изменения реактивности организма не могут не отразиться на структурно-функциональной организации клеточных мембран, а, следовательно, способности нервной ткани адекватно реагировать на стрессорные факторы [9, 15]. В этом аспекте заслуживают внимания исследования механизмов сигнальной трансдукции в клеточных мембранах при гипокинезии (ГК). Как известно, фосфоинозитидный путь транслокации внешних сигналов внутрь клетки приводит к образованию двух вторичных мессенджеров: 1,2-диацилглицерина (1,2-ДГ) и инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ3) [20].

Целью данного исследования являлось выяснение закономерностей включения [<sup>14</sup>C]-арахидоновой кислоты (АК) в различные фракции фосфолипидов, а также изучение функциональной активности фосфоинозитидного цикла (ФИЦ) и кооперативных липидных модификаций в синапсоме крыс в условиях ГК и под влиянием ГАМК. Последняя использована в качестве фармакологического корректора, учитывая участие пресинаптических ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов в сопряженной с ФИЦ регуляции транспорта Ca<sup>2+</sup> с развитием гиперполяризации синапсомембранных мембран [6, 10, 16, 17].

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

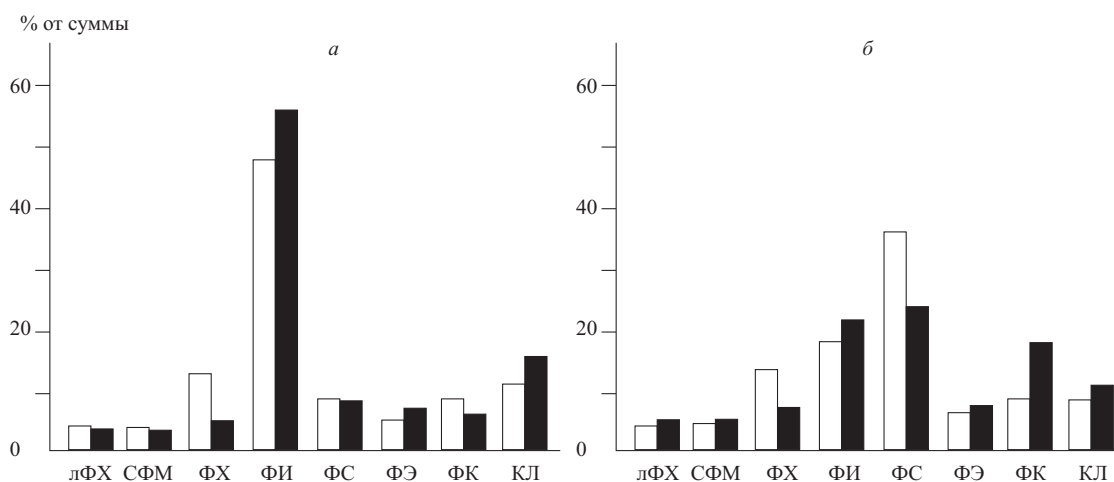
Эксперименты проведены на 78 белых беспородных крысах массой 120 – 160 г. ГК моделировали в индивидуальных узких клетках, где животных содержали в течение 30 дней. В течение последних 3 дней этого срока животным внутрибрюшинно вводили ГАМК (“Sigma”, США) в дозе 5 мг/кг через каждые 24 ч. Последнюю инъекцию проводили за 30 мин до декапитации крыс.

Синапсомы коры большого мозга выделяли согласно стандартной методике F. Najos [12] в 50 мМ трис-НС1 буфере (рН 7,4), содержащем 0,32 М сахаразы. Предварительное включение 1 мкКю АК (специфическая активность 55 мКи/ммоль “Amersham”, UK) в фосфолипидные (ФЛ) фракции синапсомом проводили ранее описанным методом [7]. После 60 мин инкубации остатки не включенной АК были удалены промыванием синапсомом 15 мл 0,2 % водного раствора альбумина свободного от жирных кислот.

Инициацию ФИЦ в синапсоме вызывали путем K<sup>+</sup>-индуцированной стимуляции. K<sup>+</sup>-деполяризацию синапсомембранных мембран проводили в среде выделения клеток, содержащей 20 мМ Na<sup>+</sup>, 120 мМ K<sup>+</sup>. Контрольные пробы содержали 20 мМ K<sup>+</sup>, 120 мМ Na<sup>+</sup>. На ранних (5 с) этапах и в более поздние сроки (5 мин) инкубаций проб в качающейся водяной бане реакции останавливали добавлением 2 мл холодной смеси хлороформ — метанол (1:2 объем/объем). Экстракцию, фракционирование и идентификацию липидов осуществляли ранее описанными методами [9].

Распределение радиоактивности в идентифицированных соответствующими стандартами фосфолипидных (ФЛ) фракциях (“Sigma”) определяли сканированием пластинок с помощью радиосканирующего прибора (“Berthold”, ФРГ). Степень радиоактивности липидных фракций определяли на сцинтилляционном

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии (зав. — акад. НАН РА, проф. В. П. Акопян) Ереванского государственного медицинского университета, Ереван, 375025, ул. Корюна, 2.



**Рис. 1.** Включение [ $^{14}\text{C}$ ]арахидоновой кислоты в фосфолипидные фракции синапсом в норме и при 30-дневной гипокинезии в отсутствие (*a*) и под влиянием (*б*) ГАМК.

Здесь и на рис. 2 и 3: светлые столбики — норма; темные — гипокинезия.

спектрометре “Roche - Bioelectronique Kontron” (Модель SL-4221, Франция).

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При добавлении в среду инкубации лизоФИ в качестве акцептора свободной жирной кислоты обнаружено (рис. 1, *a*) преимущественное (более 50 % от суммы включенной радиоактивности) накопление [ $1 - ^{14}\text{C}$ ]АК во фракции ФИ синапсом крыс как в норме, так и при ГК. В остальных фракциях фосфолипидов уровень [ $1 - ^{14}\text{C}$ ]АК колебался в пределах 10 – 15 %. В условиях ГК выявлено некоторое усиление (по сравнению с нормой) процессов ацилирования во фракциях фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) и кардиолипинов (КЛ) на фоне достоверного снижения уровней меченых фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидных кислот (ФК). При этом обнаруживается незначительное снижение уровня лизофосфатидилхолина (ЛФХ).

Не исключено, что одной из причин угнетения синтеза ФЛ в мозговой ткани на 30-е сутки ГК является снижение энергетического обмена за счет уменьшения перфузии мозговой ткани [13, 14] и притока глюкозы с кровью, угнетения утилизации глюкозы мозговой тканью [2], истощения запасов гликогена, повышенного окисления углеводов анаэробным путем [1, 2].

Полученные данные позволяют предположить нарушение равновесия между ферментативными системами деацилирования-реацилирования ФЛ в мембранах синапсом крыс в условиях ГК.

Таким образом, обнаружены изменения метаболического статуса покоя в липопротеиновом бислое синапсомальных мембран при 30-дневной ГК.

Влияние ГАМК в норме не приводило (рис. 1, *б*) к достоверным изменениям процессов включения и перераспределения АК в большинстве ФЛ фракций. Низкий уровень фракции ФИ, более чем двухкратное повышение количества ФК и ФС, а также тенденция к нормализации процессов реацилирования фракции ФХ под влиянием ГАМК в условиях ГК свидетельствуют в пользу подавления катаболических процессов фосфолипидных фракций в синапсоматах в этих условиях.

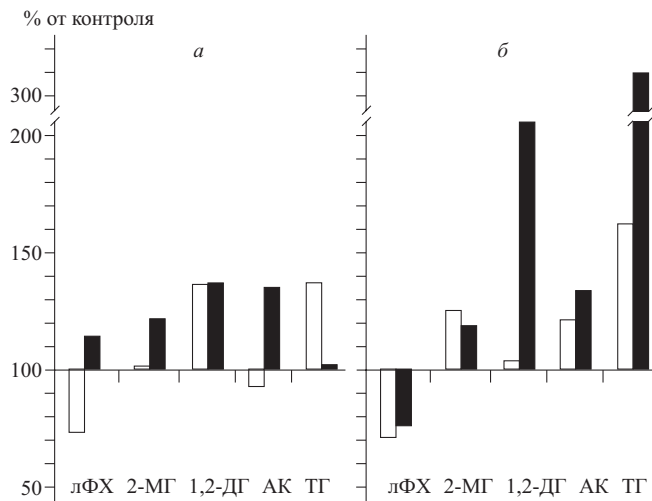
Ранее полученные данные [7 – 9, 18] свидетельствуют о существовании тесной связи между количественными изменениями отдельных фракций мембранных фосфолипидов и их метаболитов на мембраносвязанной фазе (5 с) активации фосфоинозитид — специфичной фосфодиэстеразы (ФИ-ФДЭ).

Исходя из вышеизложенного, в норме и при ГК были исследованы закономерности эффектов ГАМК на изменение уровней различных биологически активных липидных метаболитов на 5-й секунде  $\text{K}^+$ -индуцированной инициации ФИЦ синапсом крыс.

В соответствии с условиями нашего эксперимента, когда большая часть (более 50 %) от суммы включенной в мембранные фосфолипиды радиоактивности [ $1 - ^{14}\text{C}$ ]АК была локализована во фракции ФИ, можно утверждать, что более чем 30 % повышение (по сравнению с контролем) уровня 1,2-ДГ (рис. 2, *a*) на 5-й секунде  $\text{K}^+$ -инициации ФИ-цикла синапсом нормальных крыс является результатом активации ФИ-ФДЭ.

Примечательно, что параллельно со стимуляцией ФИЦ в норме отмечается некоторое усиление процессов утилизации ЛФХ, МГ и свободной АК, а также накопления последней во фракции триацилглицеринов (ТГ), выступающей в роли временного депо для данной жирной кислоты.

Следовательно, активация ФИЦ в норме сопровождается кооперативной стимуляцией механизмов ней-



**Рис. 2.** Уровни метаболитов фосфоинозитидного цикла и процессов липидных модификаций на 5-й секунде  $K^+$ -индуцированной стимуляции синапсом крыс в норме и при гипокинезии в отсутствии (*a*) и под влиянием (*б*) ГАМК.

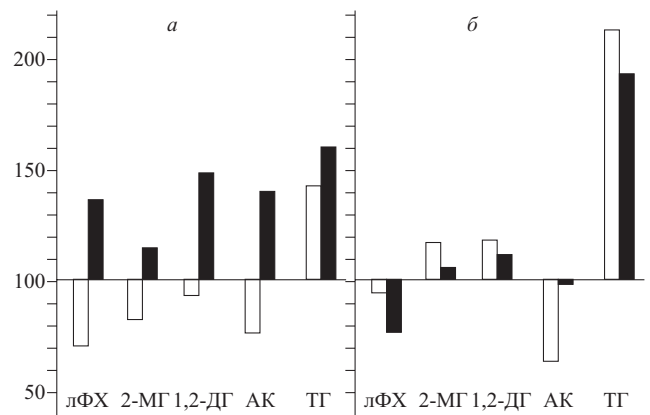
Здесь и на рис. 3 за контрольные значения приняты исходные уровни включения  $[^{14}C]$ -арахидоновой кислоты в липидные фракции. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

трализации как свободной АК, так и ЛФХ, обладающего мембранолитическими свойствами.

Принципиально иная картина наблюдалась при инициации ФИ-цикла и липидных модификаций на 5-й секунде  $K^+$ -деполяризации синапсом мозга гипокинезированных крыс (рис. 2, *a*). Достоверные сдвиги в содержании 1,2-ДГ (по сравнению с нормой) не обнаружены, что указывает на отсутствие значительных изменений в активности ФИ-ФДЭ при ГК. Повышение же уровней фракций лизоФХ, МГ и АК на фоне подавления процессов накопления в мембранах синапсом фракции ТГ однозначно свидетельствовало в пользу превалирования мембраносвязанных процессов катаболизма липидов в условиях ГК, что было отмечено выше.

В условиях ГК под влиянием ГАМК на 5-й секунде стимуляции ФИЦ уровни фракций ЛФХ, 2-МГ и АК в мембранах синапсом не претерпевают статистически значимых изменений (рис. 2, *б*), по сравнению с идентичными данными, полученными при изучении влияния ГАМК на те же параметры в норме. В то же время многократно увеличивается содержание фракций 1,2-ДГ и ТГ. Характерно, что если ГАМК в норме не вызывает достоверных изменений в содержании фракции ЛФХ, по сравнению с данными, полученными в норме без введения ГАМК, то при ГК она резко стимулирует процессы утилизации данного фосфолипида.

Таким образом, введение ГАМК животным, подверженным 30-дневной ГК, приводит к активации как ФИ-ФДЭ, так и процессов синтеза фракции ТГ на быстрой фазе (5 с)  $K^+$ -индуцированной инициации ФИ сигнальной системы.



**Рис. 3.** Уровни метаболитов фосфоинозитидного цикла и процессов липидных модификаций на 5-й минуте  $K^+$ -индуцированной стимуляции синапсом крыс в норме и при гипокинезии в отсутствии (*a*) и под влиянием (*б*) ГАМК.

Обозначение те же, что на рис. 1 и 2.

На 5-й минуте  $K^+$ -деполяризации синапсом крыс в норме обнаружено (рис. 3, *a*) понижение уровня всех метаболитов катаболизма мембранных фосфолипидов ниже контрольного. Эти сдвиги, как и при краткосрочной стимуляции ФИЦ (рис. 2, *a*), коррелируют с повышением уровня фракции ТГ.

На более поздних этапах (5 мин) стимуляции ФИ-системы в формирование клеточных ответов могут быть вовлечены как мембранные липид — модифицирующие системы, так и различные внутриклеточные регуляторные механизмы. Наши результаты подтверждаются литературными данными [8, 19], свидетельствующими о подавлении активности ФИ-ФДЭ на поздних этапах агонист-рецепторного взаимодействия, что, по всей вероятности, связано с ретроингибированием этого фермента метаболитами АК — простагландинов [12].

Нами обнаружено (рис. 3, *a*) повышение (по сравнению с нормой) уровней меченого ЛФХ и других продуктов исследуемых реакций на 5-й минуте  $K^+$ -деполяризации синапсом крыс при ГК. Эти результаты свидетельствуют об интенсификации процессов катаболизма ФХ как деацилазным, так и деэстеразным путями с накоплением образованной свободной АК во фракции ТГ.

Эффекты ГАМК на фоне длительного содержания животных в условиях ГК проявляются также (рис. 3, *б*) в коррекции обнаруженных нами изменений в процессах липидных модификаций на 5-й минуте  $K^+$ -индуцированной активации ФИ-цикла. Характерно, что при ГК по сравнению с нормой не обнаруживаются достоверные различия в направленности и интенсивности липид-модифицирующих процессов.

Таким образом, полученные данные расширяют представления о роли ГАМК как стресс-протектора для повышения адаптивной резистентности мозга к экстремальным условиям.

## ВЫВОДЫ

1. 30-дневная гипокинезия у крыс приводит к превалированию процессов катаболизма фосфолипидов в мембранах синапсом на фоне относительной стабильности сигнальной трансдукции.

2. Действие ГАМК в условиях гипокинезии проявляется усилением начальной фазы (5 с) функционирования фосфоинозитидного цикла и в коррекцией обнаруженных нарушений в кооперативных процессах модификации липидного компонента мембран синапсом.

3. Обнаруженные церебропротективные эффекты ГАМК имеют более выраженный характер на относительно позднем (5 мин) этапе стимуляции фосфоинозитидного цикла.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Акопян, *Гипокинезия и мозговое кровообращение*, Медицина, Москва (1999).
2. В. П. Акопян, А. С. Канаян, Г. А. Геворкян, К. В. Мелконян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **56**(5), 8 – 11 (1993).
3. О. Ю. Атьков, В. С. Бедненко, *Гипокинезия. Невесомость. Клинические и физические аспекты*, Наука, Москва (1989).
4. Е. А. Коваленко, Н. Н. Гуровский, *Гипокинезия*, Медицина, Москва (1980).
5. *Руководство АМН СССР по структурным основам адаптации и компенсации нарушенных функций*, Д. С. Саркисов (ред.), Москва (1987).
6. П. В. Сергеев, Л. А. Валева, Н. Л. Шимановский, *Экспер. и клин. фармакол.*, **61**(3), 81 – 85 (1998).
7. Ю. В. Тадевосян, К. Г. Карагезян, Т. Б. Батикян, *Докл. АН СССР*, **295**(5), 1254 – 1257 (1987).
8. Ю. В. Тадевосян, Л. Ю. Асатрян, К. Г. Карагезян, *Нейрохимия*, **11**(2), 194 – 202 (1992).
9. Ю. В. Тадевосян, Л. Ю. Асатрян, Т. Б. Батикян и др., *Биохимия*, **61**(8), 1414 – 1421 (1996).
10. S. Alford and S. Grillner, *J. Neuro. Sci.*, **11**(12), 3718 – 3726 (1991).
11. B. A. Breshnahan, D. Kelefiotis, I. Stratidakis, and E. A. Lianos, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **212**(20), 165 – 173 (1996).
12. F. Hajos, *Brain Research*, **93**(3), 485 – 489 (1975).
13. V. P. Hakopian, K. V. Melkonian, and A. S. Kanayan, *Med. J. of the Islamic Republic of Iran*, **10**(2), 153 – 158 (1996).
14. V. P. Hakopian, K. V. Melkonian, A. S. Kanayan, G. A. Kevorgian, A. S. Kanayan, (eds.), *Neurochemsitry*, Plenum Press, New York, 1083 – 1088 (1997).
15. V. P. Hakobyan and K. V. Melkonyan, *The Int. J. of Neuropsychopharm.*, **3**(1), P. 19.28 (2000).
16. C. J. Klapstein and W. F. Colmers, *Brit. J. Pharmacol.*, **105**(2), 470 – 474 (1992).
17. N. Ogata, *Gen. Pharmacol.*, **21**(4), 395 – 402 (1990).
18. N. V. Prokazova, N. D. Zvezdina and A. A. Korotaeva, *Biochemistry*, **63**(1), 31 – 37 (1998).
19. M. V. Rapallino, A. Cupello, P. Mainardi, et al., *Neurochem. Res.*, **15**(6), 593 – 596 (1990).
20. M. Szamel, N. Bartels, and K. Resch, *Europ. J. Immunol.*, **23**(12), 3072 – 3081 (1993).

Поступила 08.10.02

## THE EFFECT OF GABA ON THE PHOSPHOINOSITIDE CYCLE INITIATION AND THE CEREBRAL SYNAPTOSOME LIPID MODIFICATION UNDER HYPOKINESIA CONDITIONS IN RATS

V. P. Akopyan, K. V. Melkonyan, Yu. V. Tadevosyan, and T. B. Batikyan

Department of Pharmacology, Yerevan State Medical University, ul. Koryuna 2, Erevan, 375025 Armenia

The influence of a 30-day hypokinesia on the phosphoinositide cycle (PIC) initiation and on the inclusion of [<sup>14</sup>C]-arachidonic acid into cerebral synaptosome phospholipids was studied in rats. The results show that the catabolism of phospholipids prevails on the background of signal transduction in synaptosomes on the 30th day of hypokinesia. The effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is manifested by a sharp increase in the PIC activity 5 sec upon initiation and leads to normalization of the PIC activity in the late stage (5 min).