

УДК 612.453.018+612.822.1

## ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДА ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ И КАТАБОЛИЗМ $^3\text{H}$ -ДОФАМИНА В ХВОСТАТОМ ЯДРЕ КРЫСЫ

ХАЙДАРЛИУ С. Х., ГОДУХИН О. В., БУДАНЦЕВ А. Ю.

Изучено влияние дексаметазона (Д) на высвобождение  $^3\text{H}$ -дофамина и количество его метаболитов при локальной перфузии неостриатума *in vivo*. В головку хвостатого ядра стереотаксически вводили 4 мкл раствора, содержащего 4 мкКл  $^3\text{H}$ -дофамина, а затем перфузировали ее посредством «пуш-пул»-каноды. Добавление в перфузионную жидкость Д в концентрации  $10^{-4}$  или  $10^{-5}$  М оказало дозозависимое действие на высвобождение  $^3\text{H}$ -дофамина в головке хвостатого ядра. Д в концентрации  $10^{-5}$  М повышал фоновое и угнетал вызванное калем (60 мМ) возрастание высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина. Эффект Д был отставленным и длительным, с максимальным проявлением через 5—25 мин после прекращения поступления Д к неостриатуму. Предполагается, что повышение уровня содержания глюкокортикоидов при стрессе может играть существенную роль в регуляции медиаторных систем и состояния неспецифических механизмов адаптации.

В осуществлении приспособительных реакций организма ведущая роль принадлежит ЦНС, которая обеспечивает активацию как специфических, так и неспецифических механизмов адаптации. Важнейшим проявлением неспецифической реакции является активация гипоталамо-гипофизарно-кортикоадреналовой системы, ведущая к значительному возрастанию концентрации глюкокортикоидов в крови и различных органах. Существенная роль в вовлечении в реакцию неспецифических механизмов адаптации принадлежит нейрональным системам, имеющим разную медиаторную специфичность [1], в частности холин- и моноаминергическим [2].

Ряд нарушений моторной функции у человека (паркинсонизм и др.) и патологических реакций на действие стрессовых факторов у человека и животных (злокачественная гипертермия, аффективные состояния и т. д.) тесно связаны с функцией катехоламинергических структур, в частности дофаминергических нейронов [3—5]. Оказалось, что низкое содержание дофамина в неостриатуме и сниженное его выделение с мочой коррелируют с высокой восприимчивостью к стрессу [6, 7].

Чрезмерная активация неспецифических механизмов адаптации может вести к возникновению ряда расстройств в организме, рассматриваемых как вредные последствия стресса (язвы желудка и кишечника, гипертония, злокачественная гипертермия и др.). Поэтому представляет интерес выяснить, какие авторегуляторные механизмы могут обеспе-

чить регуляцию уровня активации неспецифических механизмов. Одним из таких механизмов может явиться взаимодействие глюкокортикоидов с определенными образованиями мозга, свидетельствующее о том, что в головном мозгу содержатся рецепторы глюкокортикоидов [8, 9]. При нонофоретическом подведении глюкокортикоидов к определенным областям ЦНС или их добавлении в перфузионный раствор при перфузии срезов головного мозга частота спайковых разрядов значительного числа нейронов изменяется [10, 11]. Есть данные и об участии глюкокортикоидов в специфической регуляции активности некоторых ферментов в ЦНС [12].

Поэтому представляет интерес выяснить, какое влияние оказывают глюкокортикоиды на высвобождение и метаболизм дофамина, который может оказывать регулирующее влияние на активность других медиаторных систем неостриатума.

### Материалы и методы

Эксперименты были проведены на беспородных белых крысах-самцах массой 260—300 г. Для локальной перфузии головного мозга *in vivo* была использована система нагнетательно-отсасывающей канюли [13]. Животным предварительно стереотаксически (по атласу Фифкова и Маршала) вживляли и фиксировали к черепу самотвердеющим пластиком направляющую трубку (AP=—1,5; L=2,5) таким образом, чтобы нижний ее конец прилегал к твердой мозговой оболочке. Во время опыта крысы находились под нембуталовым наркозом (40 мг/кг). Через направляющую трубку микрошприцем в неостриатум на глубину 4,3 мм вводили 4 мкКл  $^3\text{H}$ -дофамина («Amersham», Англия; удельная радиоактивность 48 К<sub>в</sub>ммоль) в 4 мкл раствора равномерно в течение 5 мин. После 30-минутного периода, необходимого для захвата клеточными структурами экзогенно введенного  $^3\text{H}$ -дофамина, через направляющую трубку в головной мозг на ту же глубину погружали нагнетательно-отсасывающую канюлю и начинали перфузию, для которой использовали искусственную СМЖ следующего состава (в мМ): NaCl—126,5; NaHCO<sub>3</sub>—27,5; KCl—2,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—0,5; CaCl<sub>2</sub>—1,1; MgCl<sub>2</sub>—1,1; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>—0,5; глюкоза—5,9. Для ингибирования MAO использовали инналамид (12,5 мкМ). В случае K<sup>+</sup>-деполяризации концентрацию KCl в перфузируемой жидкости увеличивали до 60 мМ и эквимолярно уменьшали концентрацию NaCl. Непосредственно перед перфузией перфузионную жидкость насыщали карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>), доводя ее pH до 7,3. Скорость тока перфузионной жидкости составляла 35 мкл/мин, общее время перфузии—около 3,5 ч.

Через 1 ч 50 мин после начала перфузии производили сбор 4 последовательных 25-минутных фракций перфузата, которые подвергали хроматографическому анализу. Перфузат, собранный в течение 1 ч 50 мин от начала перфузии, не анализировали, так как в начальном периоде перфузии  $^3\text{H}$ -дофамин в перфузате содержится в относительно высоких

концентрациях, что обусловлено его вымыванием преимущественно из внеклеточной среды.

После получения фракций их доводили до рН 6,8 и наносили по 0,5 мл перфузата на колонки (0,8×12 см), содержавшие ионообменные смолы Dowex (50w×4, 100—200 меш и 50w×10, 20—50 меш). Собирали две последовательные фракции, получаемые в результате промывания колонок с нанесенными перфузатами 10 мл деионизированной водой и следующей за этим элюции 10 мл HCl. Первая фракция содержала метаболиты  $^3\text{H}$ -дофамина, к числу которых относят  $^3\text{H}$ -3,4-диоксибензилуксусную кислоту,  $^3\text{H}$ -гомованилиновую кислоту и  $^3\text{H}$ -3-метокси-тирамин [14], а вторая— $^3\text{H}$ -дофамин. Элюаты собирали в счетные флаконы и высушивали. После добавления 1 мл абсолютного этанола и 10 мл сцинтилляционной жидкости определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике «Intertechnique, SL-30» (Франция). Уровень высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина и его метаболитов в первой 25-минутной фракции принимали за 100% и относительно этого уровня оценивали радиоактивность следующих за ней фракций перфузата.

Для выявления влияния глюкокортикоидов на фоновое и вызванное деполяризацией (60 мМ  $\text{K}^+$ ) высвобождение дофамина в перфузируемую жидкость добавляли Д в концентрациях  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$  М («Galenika», Югославия).

Достоверность различий, выявляемых при сравнении результатов исследования различных групп животных и анализе изменений радиоактивности во фракциях перфузата, определяли по критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Данные о влиянии Д на фоновое высвобождение  $^3\text{H}$ -дофамина и количество его метаболитов представлены на рис. 1. При добавлении в перфузируемую жидкость Д в концентрации  $10^{-5}$  во 2-м периоде перфузии наблюдали статистически достоверное повышение высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина. В 3-м периоде (рис. 1, а, 3) во время отмывки в течение 25 мин было выявлено еще более выраженное возрастание высвобождения метки. В 4-м периоде добавление Д в более высокой концентрации ( $10^{-4}$  М) не вело к дальнейшему возрастанию высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина, хотя уровень его высвобождения значительно превышал фоновый. Подобным же образом изменялась и динамика выхода метаболитов  $^3\text{H}$ -дофамина (рис. 1, б).

Стимулирующий эффект применения Д в более высокой концентрации ( $10^{-4}$  М) во 2-м периоде перфузии оказался значительно менее выраженным (рис. 1, в, 2).

$\text{K}^+$ -деполяризация во 2-м периоде перфузии вызвала возрастание высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина на ~140%, в то время как количество его метаболитов не отличалось от величины, выявленной в 1-м периоде перфузии (рис. 2, а, б, светлые столбики). Повторная  $\text{K}^+$ -деполяризация в 4-м периоде сопровождалась незначительным увеличением вы-

свобождения медиатора. На выход метаболитов  $^3\text{H}$ -дофамина  $\text{K}^+$ -деполяризация почти не влияла. Если на фоне  $\text{K}^+$ -деполяризации во 2-м периоде вводили Д ( $10^{-5}$  М), то наблюдали угнетение вызванного кальцием высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина (рис. 2, а, 2). Следовательно, эффект Д зависел от величины мембранного потенциала дофаминергических нервных окончаний.

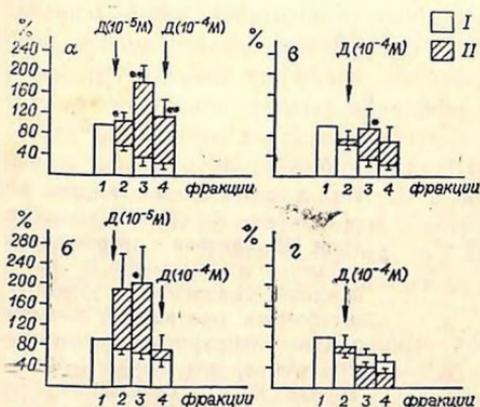


Рис. 1. Влияние дексаметазона (Д) на фоновое высвобождение  $^3\text{H}$ -дофамина и уровни его метаболитов. I, 2, 3 и 4 — последовательные 25-минутные фракции; а, б—динамика высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина; в, г— динамика уровней метаболитов  $^3\text{H}$ -дофамина; I — фоновое высвобождение  $^3\text{H}$ -дофамина и уровни его метаболитов у контрольной группы животных (контроль-1); II—измененное высвобождение  $^3\text{H}$ -дофамина и уровней его метаболитов при действии Д  
\*  $0.01 \leq p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ .

Если  $\text{K}^+$ -деполяризацию в 4-м периоде проводили после воздействия Д во 2-м, то наблюдали значительное возрастание высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина (на  $\sim 150\%$ ). Выход метаболитов  $^3\text{H}$ -дофамина во время и после воздействия Д ( $10^{-5}$  М) во 2-м периоде перфузии на фоне  $\text{K}^+$ -деполяризации практически не изменялся (рис. 2, б).

Возрастание концентрации глюкокортикоидов в крови и их проникновение в головной мозг сопровождают любую стрессовую реакцию. Прогрессирующее развитие стрессовой реакции и появление сопутствующих ей вредных последствий в большей мере зависят, по-видимому, от срабатывания механизмов обратной связи, среди которых важную роль может играть взаимодействие глюкокортикоидов с их рецепторами в ЦНС.

Моделируя локально условия стресса путем подведения глюкокортикоидов, важным моментом было обеспечение их постоянной и воспроизводимой концентрации в перфузируемой области ЦНС. Поскольку кортизол и кортикостерон взаимодействуют как с цитоплазматическими рецепторными белками, так и с кортикоидсвязывающими глобулинами, которые выходят из крови в область перфузии, то нами и был избран синтетический глюкокортикоид Д, связывающийся исключительно с рецепторами в цитоплазме [15]. О правомерности использования Д для имитирования механизма обратной связи при стрессе свидетельствует тот факт, что предварительное его системное введение блокирует механизмы активации гипоталамо-гипофизарной системы и

полностью предотвращает повышение концентрации АКТГ [16], а также пролактина [17] в крови. Использование же «пуш-пул»-канюли с последующим определением содержания катехоламинов и их метаболитов во фракциях перфузата является, таким образом, перспективным для раскрытия местных механизмов взаимодействия адаптивных гормонов с медиаторными системами.

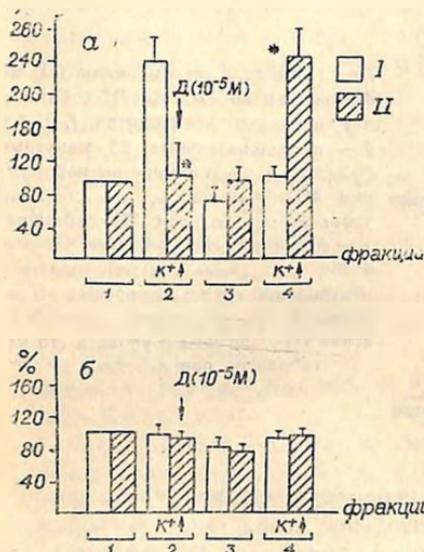


Рис. 2. Влияние дексаметазона (Д) на вызванное К<sup>+</sup> (60 мМ) высвобождение <sup>3</sup>H-дофамина и уровни его метаболитов: а — вызванное К<sup>+</sup> высвобождение <sup>3</sup>H-дофамина и уровни его метаболитов (контроль-2); б — высвобождение <sup>3</sup>H-дофамина и уровни его метаболитов при комбинированном действии К<sup>+</sup> и Д. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Об участии катехоламинергических образований в механизмах обратной связи при стрессе свидетельствует тот факт, что как АКТГ, так и кортикостеронды обладают способностью активировать тирозингидроксилазу в стриатуме и других подкорковых структурах [18]. Эксперименты с применением К<sup>+</sup> или вератридина в высоких концентрациях [19] свидетельствуют о том, что в основе повышения высвобождения дофамина лежит эффект деполяризации. Такой же вывод можно сделать и из данных, полученных при воздействии гидрокортизона и Д на электрическую активность нейронов срезов гиппокампа: через 2,5 с после начала воздействия гормонов возросла частота спайковой активности на фоне отчетливой деполяризации [10]. При повышенной концентрации гормонов развивался деполяризационный блок, длившийся от 15 с до нескольких минут.

Таким образом, можно предположить, что в основе повышения высвобождения <sup>3</sup>H-дофамина из нервных терминалей неостриатума под влиянием локально вводимого Д также лежит эффект деполяризации.

Однако данные, полученные в настоящей работе, не полностью согласуются с этими представлениями. Если при действии К<sup>+</sup> или вератридина эффект наступал немедленно и возрастание высвобождения дофамина было отмечено лишь на протяжении действия деполяри-

зующего агента, то при действии Д эффект был отставленным и продолжительным: максимальная стимуляция высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина была зарегистрирована на протяжении 5—25 мин после прекращения действия Д, следовательно, для его проявления необходимо некоторое время.

Механизм действия глюкокортикоидов, по-видимому, сходен с действием других стероидных гормонов [8, 9], о чем свидетельствует тот факт, что эффект Д зависел от дозы: при возрастании концентрации Д с  $10^{-5}$  до  $10^{-4}$  М эффект значительно ослаблялся. Это можно объяснить либо значительным уменьшением числа рецепторов вследствие интернализации гормон-рецепторных комплексов [20], либо развитием при избытке стероидов субчувствительности рецепторов, как это имеет место при избытке норадреналина при стрессе [21].

Эти результаты свидетельствуют о том, что Д оказывает дозозависимое действие на высвобождение  $^3\text{H}$ -дофамина из хвостатого ядра головного мозга крыс. Д в концентрации  $10^{-5}$  М повышает фоновое и угнетает вызванное  $\text{K}^+$  возрастание высвобождения  $^3\text{H}$ -дофамина. Эффект Д отставленный и длительный, с максимальным проявлением через 5—25 мин после прекращения доступа Д в неостриатум.

При анализе полученных данных необходимо иметь в виду, что хвостатое ядро отличается сложностью взаимоотношений между дофамин-, ацетилхолин-, серотонин- и ГАМКергическими нейронами [22, 23]. В частности, в регуляции высвобождения и обновления дофамина в дофаминергических терминалях стриатума могут принимать участие пресинаптические рецепторы мускаринового типа, которые располагаются в этих терминалях [24]. Об участии холинергической системы в регуляции метаболизма и медиаторной функции при стрессе может свидетельствовать изменение активности ацетилхолинэстеразы и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы головного мозга при введении глюкокортикоидов [12].

Снижение тонуса дофаминергических структур в хвостатом ядре может лежать в основе возникновения ряда патологических явлений. Ингибиторные дофаминергические структуры в хвостатом ядре противодействуют возбуждению холинергических структур, ответственных за стимуляцию скелетных мышц [25, 26]. Хвостатое ядро и связанные с ним базальные ядра головного мозга могут влиять на тремор и ригидность скелетных мышц путем регулирования функционального баланса между стриатными дофамин- и холинергическими структурами [27]. Эффективность тонуса тормозящих влияний дофаминергических нейронов в неостриатуме может также возрастать за счет наличия синаптических окончаний, не имеющих прямых синаптических контактов с другими структурами и способных модулировать активность нескольких нейронов одновременно [28]. В условиях экспериментального паркинсонического синдрома холинергические нейроны хвостатого ядра могут выступать в роли генератора патологически усиленного возбуждения [29].

Таким образом, при локальном введении в головной мозг глюкокортикоиды могут оказывать длительное, причем отставленное, влияние на высвобождение дофамина и процессы его деградации. Этот эффект является результатом взаимодействия глюкокортикоидов с пресинаптическими рецепторами и, по-видимому, не обусловлен непосредственно деполаризацией синаптических мембран. Повышение концентрации внеклеточного  $K^+$  оказывает тормозящее влияние на способность D повышать высвобождение дофамина из дофаминергических терминалей. Повышение количества глюкокортикоидов в организме при стрессовых реакциях может играть существенную роль в регуляции нейротрансдачи и уровня функциональной активности неспецифических механизмов адаптации.

## EFFECTS OF DEXAMETHASONE ON $^3H$ -DOPAMINE RELEASE AND CATABOLISM IN RAT N. CAUDATUS

Haidarliu S. H., Godukhin O. V., Budantsev A. Ju.

Institute of Zoology and Physiology, Moldavian Academy of Sciences, Kishinev, and Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Poustchino

Effects of dexamethasone (D) on  $^3H$ -dopamine release and its metabolites levels have been studied after local perfusion of neostriatum in vivo. 4  $\mu Ci$  of  $^3H$ -dopamine in 4  $\mu l$  of artificial CSF were stereotaxically injected in n. caudatus with subsequent perfusion using „push-pull“ cannula. D ( $10^{-1}$  and  $10^{-5}$  M) exhibited a dose-dependent effect on  $^3H$ -dopamine release from n. caudatus. D ( $10^{-5}$  M) enhanced basic and inhibited  $K^+$ -stimulated (60 mM)  $^3H$ -dopamine release. D effects were delayed and longlasting with maximal values during 5—25 min after administration. It is supposed that elevated glucocorticoid level during stress reaction may be essential in the regulation of neurotransmitter's metabolism and activity of nonspecific adaptation mechanisms.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хайдарлиу С. Х.—В кн.: Нервные и эндокринные механизмы стресса (под ред. акад. О. Г. Газенко и Ф. И. Фурдуй), Кишинев, Штиинца, с. 221—235, 1980.
2. Буданцев А. Ю. Моноаминергические системы мозга (под ред. Н. А. Смиттен и А. К. Черкашина), М., Наука, 1976.
3. Ehringer H., Hornykiewicz O. Klin. Wochensh., 33, 1236—1239, 1950.
4. Barbeau A., Sourkes T. L. Rev. canad. biol., 20, 197—203, 1961.
5. Schultz W., Ungerstedt U. Exp. Brain Res., 33, 159—171, 1978.
6. Ohye C., Bouchard R., Bouche R. J. Pharmacol. exp. Ther., 175, 700—703, 1970.
7. Altrogge D. M., Topel D. G., Cooper M. A. J. Animal Sci., 51, 1, 74—77, 1980.
8. Greenstein B. D. Tands In Neurosci., 1, 4—6, 1978.
9. Липман М.—В кн.: Взаимодействие гормонов с рецепторами (под ред. Дж. Леви), М., Мир, с. 213—234, 1979.
10. Воробьев В. С., Захаров Н. Д., Скребицкий В. Г., Осиповский С. А. Бюл. экспер. биол. и мед., 91, 132—133, 1981.

11. *Papir-Kritcheli D., Feldman S.* Exptl. Neurol., **73**, 801—811, 1981.
12. *Štastný F., Lodin Z., Panov A. M., Lisý V.*—In: Ontog. Brain, **3**, p. 167—174, Praha, 1980.
13. *Годухин О. В., Жарикова А. Д.* Физиол. ж. СССР, **65**, **10**, 141—143, 1979.
14. *McGeer P. L., Eccles J. C., McGeer E. G.* Molecular neurobiology of the mammalian brain. New York, London, Plenum Press, 1978.
15. *Lippman M. E., Wiggert B. O., Chader G. J., Thompson E. B.* J. Biol. Chem., **49**, 5916—5917, 1974.
16. *Berkenbosch F., Vermes I., Binnekade R., Tilders F. J. H.* Life Sci., **29**, 2249—2256, 1981.
17. *Rosster J., French E., Rivier C., Shibasaki J., Guillemin R., Bloom F. E.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 666—669, 1980.
18. *Nyakas C., Viltsek J., Endröczy E.*—In: Catecholamines and stress: recent advances, Developments in Neuroscience, **8**, p. 375—380, New York, Amsterdam, Oxford, 1980.
19. *Patrick R. L., Barchas J. D.* Fed Proc., **33**, 406, 1107A, 1976.
20. *Carpenter J.-L.*—In: Hormones and cell regulation (Elsevier/North Holland Biomedical Press), **5**, p. 97—105, 1981.
21. *Nomura S., Watanabe M., Ukei N., Nakozawa T.* Brain Res., **224**, 199—203, 1981.
22. *Отеллин В. А.* ДАН СССР, **205**, **1**, 254—256, 1972.
23. *Katya H., Kreutzberg G. W., Namba M.* Brain Res., **187**, 369—382, 1980.
24. *Kapoor V. J.* Physiol. (Gr. Brit.), **322**, **51**, 1982.
25. *Sethy V. H., Van Woert M. H.* Nature, **251**, 529—530, 1974.
26. *Siggins G. R., Hoffer B. J., Bloom F. E.*—In: The Basal Ganglia (ed. by M. D. Yahr), New York, p. 227—248, 1976.
27. *Agld Y., Guyenet P., Glowinski J., Beaujouan J. C., Javoy F.* Brain Res., **86**, 488—492, 1975.
28. *Groves P. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 6923—6929, 1980.
29. *Алиев М. Н., Игонькина С. Н., Крыжановский Г. Н.* Бюл. экпер. биол. и мед., **42**, 657—659, 1981.

Институт зоологии и физиологии  
 АН Молдавской ССР, Кишинев  
 Институт биологической физики  
 АН СССР, Пущино

Поступила 14. IX 1982