

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.815:577.175.823

РЕГИОНАРНЫЕ И СЕЗОННЫЕ РАЗЛИЧИЯ В
СВЯЗЫВАНИИ [^3H]СЕРОТОНИНА В МОЗГУ КРЫС

Молодцова Г.Ф.

Институт физиологии СО АМН СССР, Новосибирск

Серотонин играет важную роль в регуляции многих физиологических функций. Однако несмотря на то, что большинство аспектов функционирования серотонинергической системы хорошо изучено, роль рецепторных структур, через которые осуществляется действие медиатора на постсинаптическую мембрану, в регуляции физиологических функций остается практически не исследованной.

В настоящее время на основании результатов радиолигандных исследований выделяют два основных типа центральных серотониновых рецепторов: С1 рецепторы, обладающие высоким сродством к [^3H]серотонину и низким к его антагонистам, и С2 рецепторы, имеющие высокое сродство к [^3H]спиперону или [^3H]кетансерину и низкое (микромолярное) сродство к самому серотонину [1 — 4]. Функциональная роль С2 рецепторов изучена несколько лучше, так как большинство известных серотонинергических антагонистов связывается именно с этим типом рецепторов и только небольшое число соединений взаимодействует с С1 рецепторами, причем многие из них являются индольными производными с агонистическими свойствами [5 — 7]. В последние годы появились также данные о вовлечении С1 рецепторов в некоторые функции организма: в регуляцию цикла сон—бодрствование и циркадных ритмов [8], в сексуальное поведение у крыс [9], в наступление зимней спячки у сусликов [10]. Однако такие работы немногочисленны и требуются дальнейшие исследования для выяснения роли С1 рецепторов в различных функциональных состояниях.

В данной работе исследовали функциональную активность С1 рецепторов в серотонинергических структурах мозга крыс и особенности их функционирования в разные сезоны года—зима—лето.

В опытах использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 200 — 230 г. Одну группу животных декапитировали летом (июнь — июль), другую — зимой (январь — февраль). На холоде выделяли следующие структуры

мозга: фронтальную кору, гиппокамп, миндалину, центральное серое вещество среднего мозга. Специфическое связывание серотониновых рецепторов первого типа определяли радиолигандным методом [11] по связыванию [^3H]серотонина в мембранной фракции соответствующих структур мозга. Ткань гомогенизировали в 50 объемах 50 мМ трис- HCl буфера, pH 7,4 и центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в том же буфере и инкубировали 10 мин при 37° для удаления эндогенного серотонина, затем вновь центрифугировали при тех же условиях. Конечный осадок ресуспендировали в 50 мМ трис- HCl буфере, pH 7,4, содержащем 4 мМ CaCl_2 , 5,7 мМ аскорбиновую кислоту и 10 мкМ паргиллин («Sigma», США; 1 мл суспензии содержал 30 мг сырого веса ткани). В качестве радиолиганда использовали [^3H]серотонин (21,8 Ки/ммоль, «Amersham», Англия). Пробы в объеме 2,1 мл, содержащие 0,5 мл тканевой суспензии, [^3H]серотонин и немеченый серотонин (1 мкМ, «Reanal», Венгрия), инкубировали в течение 10 мин при 37°. Инкубацию останавливали быстрым охлаждением в ледяной воде с последующим центрифугированием. Высушенные осадки заливали сцинтилляционной жидкостью. Связанную радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Delta - 300» с 55%-ной эффективностью. Специфическое связывание меченого лиганда с рецепторами определяли по разнице между общим и неспецифическим связыванием (в присутствии немеченого серотонина) и выражали в фмоль на 1 мг белка. Неспецифическое связывание составляло 40% от общего. Белок в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [12].

Обработку экспериментальных данных для количества связывающих участков проводили по одно- и двухцентральной моделям связывания [13]. Критерием выбора между одно- и двухцентральной моделями связывания служила величина суммы квадратов отклонений для этих моделей (F-критерий). Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Данные, полученные при определении связывания [^3H]серотонина с мембранами различных серотонинергических структур мозга крыс представлены в таблице. Обнаружены регионарные различия в распределении связывающих [^3H]серотонин участков в исследованных областях мозга. Наиболее высокое специфическое связывание серотонина наблюдалось в гиппокампе, а наиболее низкое — во фронтальной коре, что соответствует литературным данным [6]. В центральном сером веществе связывание [^3H]серотонина было на таком же высоком уровне, как и в гиппокампе. В миндалине специфическое связывание серотонина было в 1,4 раза ниже, чем в гиппокампе и практически не отличалось от его связывания во фронтальной коре.

Таблица

Специфическое связывание [^3H] серотонина (2,5 нМ) в различных структурах мозга крыс в зависимости от сезона зима-лето (в фмоль/мг белка)

Группа животных	Гиппокамп	Центральное серое вещество	Миндалина	Фронтальная кора
Лето	$89,7 \pm 6,6$ (5)	$90,5 \pm 6,8$ (5)	$65,8 \pm 4,0$ (9)	$56,3 \pm 3,8$ (9)
Зима	$52,7 \pm 4,3^*$ (9)	$49,7 \pm 2,9^*$ (7)	$66,5 \pm 2,6$ (6)	$58,5 \pm 3,6$ (9)

Примечание. * $p < 0,001$, в скобках — количество определений.

Чтобы выяснить, чем обусловлены различия в функциональной активности С1 рецепторов в исследуемых областях мозга, были проведены эксперименты по определению основных параметров, характеризующих связывание с рецепторами, — K_d и максимального количества связывающих участков ($B_{\max}$). Во фронтальной коре и гиппокампе связывание [^3H] серотонина в координатах Скотчарда было линейным (рис., а), что указывает на один тип участков связывания серотонина. Для фронтальной коры были получены $K_d = 3,8 \pm 0,4$ нМ и $B_{\max} = 145 \pm 15$ фмоль/мг белка и для гиппокампа (в летний сезон) соответственно $K_d = 2,7 \pm 0,3$ нМ и $B_{\max} = 200 \pm 24$ фмоль/мг белка. Из-за отсутствия статистически значимых различий между K_d и $B_{\max}$ для фронтальной коры и соответствующими параметрами для гиппокампа трудно определить, каким именно кинетическим параметром обусловлены различия в функциональной активности С1 рецепторов в этих структурах, так как возможно, что более высокая функциональная активность С1 рецепторов в гиппокампе связана с изменением обоих параметров как большим количеством рецепторов, так и более высоким их сродством к серотонину. По данным Schnellman и соавт. [14], более высокое специфическое связывание серотонина в гиппокампе обусловлено большим количеством связывающих участков.

В отличие от фронтальной коры и гиппокампа в миндалине связывание [^3H] серотонина в координатах Скотчарда отклонялось от линейной зависимости (рис., б). Полученные экспериментальные данные лучше описывались двухцентровой моделью связывания, что указывает на наличие двух участков связывания с $K_{d1} = 0,7 \pm 0,1$ нМ и $B_{\max 1} = 38 \pm 1,1$ фмоль/мг белка для высокоаффинного связывания и $K_{d2} = 17, \pm 1,0$ нМ и $B_{\max 2} = 259 \pm 17$ фмоль/мг белка для низкоаффинного связывания.

Известно, что серотонинергическая система мозга вовлекается в регуляцию различных функций организма: сексуального поведения, терморегуляцию, регуляцию сна и других, на которые оказывает влияние сезонный фактор. Обнаружено, что специфическое связывание серотонина

изменяется в зависимости от сезона года—зима-лето (таблица), причем наблюдаются регионарные различия в сезонных изменениях. В гиппокампе и центральном сером веществе связывание серотонина зимой понижалось

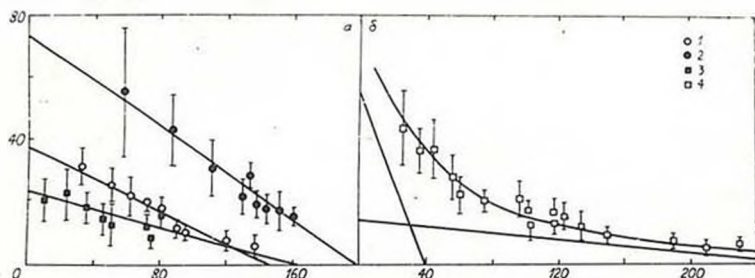


Рис. График Скетчарда связывания [^3H] серотонина с мембранной фракцией фронтальной коры и гиппокампа (а) и миндалины (б) мозга крыс. 1 - фронтальная кора, 2 - гиппокамп (лето), 3 - гиппокамп (зима), 4 - миндалина. По оси абсцисс—количество связанного лиганда (в фмоль/мг белка), по оси ординат—отношение связанного лиганда к свободному. Использовали следующие концентрации [^3H] серотонина: от 1,0 до 22 нМ для фронтальной коры, от 0,5 до 10 нМ для гиппокампа и от 0,6 до 43 нМ для миндалины

почти в два раза по сравнению с летом. В других структурах - миндалине и фронтальной коре зависимости связывания [^3H] серотонина от сезона не отмечалось, что указывает на важность C1 рецепторов гиппокампа и центрального серого вещества в сезонных изменениях физиологических функций. Следует отметить, что именно в этих структурах мозга наблюдается и наиболее высокая плотность C1 рецепторов.

Определение кинетических параметров связывания серотонина в гиппокампе крыс зимой показало $K_d = 6,9 \pm 1,3$ нМ и $V_{\text{max}} = 160 \pm 25$ фмоль /мг белка (рис.,а), то есть наиболее значительно изменялась (увеличение в 2,6 раза, $p < 0,02$) по сравнению с летом величина K_d . Таким образом, сезонные изменения специфического связывания серотонина обусловлены различиями в средстве рецепторов к серотонину.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в ответ на воздействие сезонного фактора среды вовлекаются регуляторные механизмы функциональной активности C1 рецепторов.

REGIONAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF 5-HT₁ RECEPTORS IN RAT BRAIN

Molodtsova G.F.

*Institute of Physiology, USSR Academy of
Medical Sciences, Siberian Division, Novosibirsk*

The functional role of 5-HT₁ receptors located in serotonergic structures of rat brain was studied in different seasons. The specific binding of serotonin was measured in the frontal cortex, hippocampus, amygdala and central grey matter in winter and summer. Regional and seasonal changes in the functional activity of 5-HT₁ receptors were found. The decrease of [³H]5-HT binding in hippocampus and central grey matter was observed in winter. K_d of serotonin binding in hippocampus increased 2.6 times. No seasonal changes were observed in amygdala and frontal cortex. Thus, mechanism controlling the functional activity of 5-HT₁ receptors are associated with seasonal changes of the physiological function of serotonergic structures.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peroutka S.J., Snyder S.H. *Mol. Pharmacol.*, v.16, p.687 - 699, 1979.
2. Nelson D.L. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.6, p.499 - 502, 1982.
3. Leysen J.E. *Neuropharmacol.*, v.23, p.247 - 254, 1984.
4. Bradleu P.B., Engel G., Feniuk W. et al. *Neuropharmacol.*, v.25, p.563 - 576, 1986.
5. Lucki I., Nobler M.S., Frazer A. *J. Pharm. Exp. Ther.*, v.228, p.133 - 139, 1984.
6. Leysen J.E. In: *Serotonin and the cardiovascular system* (ed. P.M. Vanhoutte), p.43 - 62, Raven Press, N.Y., 1985.
7. Peroutka S.J. *Neuropharmacol.*, v.23, p.1487 - 1492, 1984.
8. Wesemann W., Weiner N., Rotsch M., Schulz E. *J. Neural Transmission*, suppl.18, p.287 - 294, 1983.
9. Mendelson S.D., Gorzalka B.B. *Physiol. Behav.*, 37, p.345 - 351, 1986.
10. Пак Д.Ф., Куликов А.В., Попова Н.К. *Нейрохимия*, т.6, с.186 - 192, 1987.
11. Nelson D.L., Nerbet A., Bourgoin S. et al. *Mol. Pharmacol.*, v.14, p.983 - 995, 1978.
12. Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A., Randall R.J. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265 - 275, 1951.
13. Feldman H.A. *Anal. Biochem.*, v.48, p.317 - 338, 1972.
14. Schnellman R.G., Waters S.J., Nelson D.L. *J. Neurochem.*, v.42, p.65 - 70, 1984.

Поступила 12.12.1988