



УДК 616.894.02:615.711.1

АУТОАДРЕНОРЕЦЕПТОРЫ И СТАБИЛЬНОСТЬ
АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

БАЗЯН А. С., КРУГЛИКОВ Р. И.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Исследования проводили на 7—8- и 3—4-месячных крысах в зимний и весенний периоды. Используя многократную, с интервалом 30 мин, последовательную калиевую деполяризацию срезов коры мозга, определяли интенсивность секреции [^3H]норадреналина (НА). Для определения стабильности секреции вычисляли коэффициенты вариации величины интенсивности первой секреции S_1 , коэффициенты вариации средних величины интенсивности секреции $S_{\text{ср}}$ и коэффициенты вариации величины соотношений последующих секреций к первой. Полученные результаты показали, что в весенний период интенсивность секреции [^3H]НА достоверно увеличивается, повышаются также коэффициенты вариаций, что определяется как дестабилизация секреции. У крыс, исследованных в весенний период, активность аутоадренорецепторов приводит к отсутствию зоны стабильной секреции. Отмечена корреляция между активностью аутоадренорецепторов и изменением интенсивности секреции [^3H]НА при многократной калиевой деполяризации срезов коры мозга крыс с интервалом 30 мин. В зимний период, когда аутоадренорецепторы образуют зону стабильной секреции, наблюдали усиление и стабилизацию секреции [^3H]НА. В весенний же период, когда зона стабильной секреции не образуется, и в аутоадренорецепторах превалирует тормозной α -рецепторный эффект, имело место непрерывное уменьшение секреции [^3H]НА без последующей стабилизации. Сделан вывод, что аутоадренорецепторы активируются секретируемым из терминалей НА и регулируют секрецию медиатора при последующей деполяризации, подавляемой через 30 мин.

Ранее теоретически было обосновано [1, 2] и экспериментально показано [3—5], что при исследовании зависимости активности аутоадренорецепторов от концентрации НА выявляется концентрация, на которую уже не реагирует β -аутоадренорецептор и которая еще не активирует α -аутоадренорецептор. Эта концентрация названа нами зоной стабильной секреции. В адренергических синапсах она обеспечивает реализацию таких нейрофизиологических процессов, как синаптическая депрессия и синаптическое облегчение, при последовательной серии пресинаптической импульсации. Но главная функция зоны стабильной секреции сводится к стабилизации количества секретируемого медиатора на каждый импульс, которое уже не меняется в следующих импульсах данной серии.

Целью данной работы служит исследование взаимосвязи между наличием зоны стабильной секреции в аутоадренорецепторах и стабильностью секреции $[^3\text{H}]\text{HA}$.

Методы исследования

Опыты проводили на самцах белых беспородных крыс в возрасте 7—8 месяцев, массой 300—350 г и в возрасте 3—4 месяцев, массой 180—230 г в зимний и весенний периоды. Для исследования основных параметров секреции HA был использован метод переноса срезов, описанный ранее [3].

Четыре (от одного животного) или восемь (от двух животных) тангенциальных срезов теменной коры толщиной 0,3 мм инкубировали в общем объеме (4 или 8 мл) двухбуферной (1 мМ Na -фосфатный и 15 мМ бикарбонатный) среды Кребса-Рингера, pH 7,25 в течение 15 мин, при 37°. Затем в ту же инкубационную среду добавляли 10 или 20 мкКи $\text{DL-}[^3\text{H}]\text{HA}$ («Amersham», Англия, У. А. 10 или 20 Ки/ммоль), с конечной концентрацией $2,5 \cdot 10^{-10}$ М HA и инкубировали 10 мин. Срезы промывали чистой средой Кребса-Рингера в течение 30 мин и многократно, через каждые 30 мин, исследовали спонтанное и вызванное калиевой деполяризацией накопление радиоактивности в 1 мл среды при 2-минутной инкубации в них срезов. Деполяризацию срезов 7—8-месячных животных вызывали 20 мМ KCl при содержании 1,3 мМ CaCl_2 в среде Кребса-Рингера. У 3—4-месячных животных деполяризацию вызывали средой, содержащей 20 или 30 мМ KCl и 2,6 мМ CaCl_2 . Интенсивность секреции S определяли соотношением величины радиоактивности накопленной при K^+ -деполяризации к величине спонтанно накопленной радиоактивности. Для активации аутоадренорецепторов использовали экзогенный $\alpha\text{-HA}$ («Serva», ФРГ) в концентрации 10^{-11} — 10^{-7} М и определяли коэффициент регуляции секреции S . Зону стабильной секреции определяли графически (подробнее см. [3—5]).

Стабильность секреции количественно определяли вычислением коэффициентов вариации интенсивности секреции $[^3\text{H}]\text{HA}$. CV_{S_1} — коэффициент вариации интенсивности секреции при первой деполяризации S_1 каждого из 4 параллельных срезов, $\text{CV}_{S_{cp}}$ — коэффициент вариации средней величины интенсивности секреции, S_{cp} — средняя арифметическая из 10 или 12 величин S от всех 4 параллельных срезов одного животного [3]. На одном срезе интенсивность секреции последовательно определяли 4 или 5 раз, с интервалом 30 мин, и вычисляли соотношение величины интенсивности секреции при последующей деполяризации к первой S_n/S_1 , где $n=2, 3, 4$ и 5 [3]. $\text{CV}_{S_n S_1}$ — коэффициент вариации данного соотношения.

Для статистической обработки полученных результатов использовали критерий Стьюдента — t и Вилкоксона, для сопряженных пар — Pz

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований представлены в таблице, где средняя величина интенсивности секреции $[^3\text{H}]\text{НА}$ из срезов коры мозга крыс в весенний период значительно выше, чем в зимний. Одновременно увеличивается и коэффициент вариации интенсивности секреции. Причем CV_S , в весенний период выше, чем в зимний, но изменения незначительные. А $CV_{S_{cp}}$ уже повышается достоверно как по отношению к $CV_{S_{cp}}$ зимнего периода, так к CV_S , весеннего периода. Из таблицы видно, что средняя ошибка CV_S больше, чем средняя ошибка $CV_{S_{cp}}$. Это происходит вследствие того, что при вычислении CV_{S_1} используется 4 значения S_1 , а при вычислении $CV_{S_{cp}}$ —10—12 значений S от одного животного (см. „Методы исследования“).

На рис. 1 представлены величины соотношения S_n/S_1 при $n=2, 3, 4$ и 5 у обеих групп животных. Как видно из рисунка, при по-

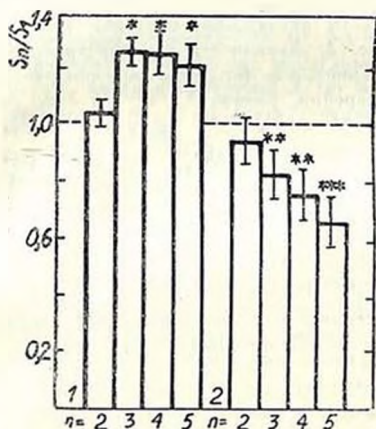


Рис. 1. Интенсивность секреции $[^3\text{H}]\text{норадреналина}$ из срезов коры мозга 7—8-месячных животных в зимний (1) и весенний (2) период при многократной, с интервалом в 30 мин, последовательной деполяризации 20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl_2 . По оси ординат отложены отношения интенсивности секреции $[^3\text{H}]\text{норадреналина}$ при последующих деполяризациях к первой, принятой за 1 (пунктирная линия); * $p_1 < 0.001$, 0,01 и 0,05 для $n=3, 4$ и 5 соответственно; ** $p_2 < 0.05$; *** $p_2 < 0.01$

следовательной деполяризации срезов с интервалом в 30 мин в зимний период наблюдается усиление интенсивности секреции и ее стабилизация при $n=3, 4$ и 5. Разница между соотношениями S_1/S_1 к S_2/S_1 и S_2/S_1 к S_1/S_1 составляет 1 и 3% соответственно. Коэффициенты вариации для каждого соотношения S_n/S_1 равны 17,1, 15,7, 19,6 и 15,9% соответственно. Эти величины значительно не отличаются друг от друга и соответствуют величинам CV для этой группы животных, приведенным в табл. Изменения соотношений S_n/S_1 в весенний период имеют прямо противоположную направленность, выраженную в значительном уменьшении интенсивности секреции при последовательной деполяризации срезов с интервалом 30 мин. В этом случае коэффициент вариации для каждого соотношения S_n/S_1 составляет 21,6, 22,3, 34,2 и 34,0% соответственно. Таким образом, многократная деполяризация срезов коры мозга крыс в весенний период приводит к повы-

шению коэффициента вариации S_n/S_1 при увеличении n почти на 50%. Значительное возрастание коэффициента вариации указывает на дестабилизацию секреции $[^3\text{H}]$ НА из срезов коры мозга крыс в весенний период.

Таблица

Соотношение величин интенсивности секреции $[^3\text{H}]$ норадреналина из срезов коры мозга 7—8-месячных животных ($n=13$) в зимний и весенний периоды

	Зимний период	Весенний период	P_t
S_{cp}	$2,19 \pm 0,09$	$4,06 \pm 0,39$	$<0,001$
$CV_{S_1} \%$	$14,8 \pm 2,6$	$19,3 \pm 3,1$	$<0,001$
$CV_{S_{cp}} \%$	$17,6 \pm 1,5$	$26,3 \pm 1,4$	
P_t		$<0,05$	

Результаты исследований активности аутоадренорецепторов у этих групп животных представлены на рис. 2. Активность аутоадренорецепторов коры мозга крыс в зимний период, что подробно описано ранее [3—5], образует зону стабильной секреции, равной $5,5 \cdot 10^{-9}$ М НА. А в весенний период ауторецепторы коры мозга крыс зону стабильной секреции не образуют. На достаточно большом диапазоне концентраций секреции не образуют. На достаточно большом диапазоне концентраций наблюдается только эффект уменьшения секреции $[^3\text{H}]$ НА при активации аутоадренорецепторов экзогенным НА. Причем отсутствует характерная для зимнего периода дозозависимая реакция. При концентрации экзогенного НА 10^{-11} М $C=0,76$, $p_t < 0,001$; 10^{-10} М $C=0,79$, $p_t < 0,001$; 10^{-9} М $C=0,91$ и 10^{-8} М $C=0,76$, $p_t < 0,05$. Величины C при концентрациях экзогенного НА 10^{-11} — 10^{-9} М у весенних и зимних животных достоверно отличаются $p_t < 0,001$ (10^{-11} и 10^{-10}) и $< 0,05$ (10^{-9}).

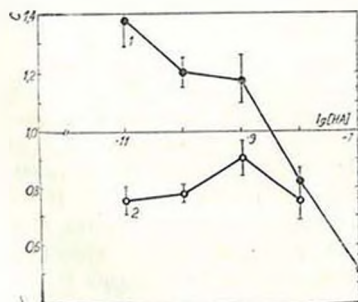


Рис. 2. Зависимость активности аутоадренорецепторов у 7—8-месячных животных от концентрации экзогенного норадреналина при деполяризации срезов коры мозга крыс 20 мМ КСl, 1,3 мМ СаСl₂ в зимний (1) и весенний (2) периоды. По оси абсцисс — логарифм концентрации норадреналина; по оси ординат — коэффициент регуляции секреции $[^3\text{H}]$ норадреналина аутоадренорецепторами

Сопоставление результатов, представленных на рис. 1 и 2, указывает на то, что при наличии в аутоадренорецепторах зоны стабильной секреции наблюдается стабилизация секреции $[^3\text{H}]$ НА при многократных последовательных деполяризациях срезов коры мозга крыс, а отсутствие зоны стабильной секреции приводит к дестабилиза-

ции секреции [^3H]НА. Кроме того, наблюдается соответствие между преобладающим тормозным эффектом аутоадренорецепторов и постепенным уменьшением секреции [^3H]НА при последующих деполяризациях срезов коры мозга крыс в весенний период. Из всего сказанного можно сделать вывод, что даже в наших условиях эксперимента секретируемый из терминалей вследствие деполяризации НА активирует аутоадренорецепторы и регулирует секрецию медиатора при последующей деполяризации, несмотря на то, что интервал между деполяризациями составляет 30 мин. Для подтверждения приведенного вывода на рис. 3 представлены соотношения S_2/S_1 у других групп животных, исследованных в зимний период, аутоадренорецепторы которых образуют зону стабильной секреции. Последовательная деполяризация срезов коры мозга 3—4-месячных крыс при добавлении 20 и 30 мМ KCl (8 и 11 животных соответственно) также приводит к усилению и дальнейшей стабилизации секреции [^3H]НА. Разница между соотношениями S_3/S_1 и S_4/S_1 при 20 мМ KCl составляет 1%, а при 30 мМ KCl—4%, $CV_{сер} = 18,7$ и 18,8%, а зона стабильной секреции— $2,4 \cdot 10^{-10}$ и $6 \cdot 10^{-9}$ М НА соответственно [5]. Обнаруженные изменения исследованных показателей в весенний период воспроизводили в течение 3 лет в обеих возрастных группах животных при разных условиях деполяризации.

Таким образом, полученные результаты экспериментально подтверждают выдвинутую [6] и математически обоснованную [1, 2, 7] гипотезу о функциональной роли α - и β -аутоадренорецепторов, заключающейся в стабилизации секреции медиатора в серии пресинаптической импульсации и дестабилизации секреции при нарушении нормального функционирования аутоадренорецепторов.

Общезвестно, что у животных в весенний период многие процессы отклоняются от нормы. Такие отклонения выявлены и в наших исследованиях—повышение интенсивности секреции [^3H]НА при равной концентрации деполяризующего агента. Повышение интенсивности секреции при прочих равных условиях связано, по-видимому, с возбудимостью нервных клеток. Вероятно, в весенний период порог возбудимости нервных клеток снижен, поэтому одинаковые по силе деполяризующие агенты вызывают более интенсивную секрецию медиатора из срезов коры мозга по сравнению с зимним периодом. Изменение порога возбудимости нервных клеток связано с изменением внеклеточной концентрации Ca^{2+} , уменьшение которой понижает порог возбудимости клеток [8]. Но известно также, что внеклеточная концентрация поливалентных катионов, в том числе и Ca^{2+} , определяет поверхностный заряд возбудимых мембран и оказывает прямое стабилизирующее действие на структуру мембраны [8]. Поскольку аутоадренорецепторы являются структурными белками возбудимых мембран, появляется возможность соединить в единую цепь последовательных событий уменьшение внеклеточной концентрации Ca^{2+} , уменьшение порога возбудимости клеток, дестабилизацию структуры пресинаптических мембран и отсутствие зоны стабильной секреции в аутоадренорецепторах, наблюдаемые у животных

в весенний период. Анализ кривых активности аутоадренорецепторов индивидуально для каждого животного позволяет сделать вывод о том, что в весенний период происходит, по-видимому, «бесконтрольный» сдвиг активности аутоадренорецепторов по шкале концентраций НА. График активности рецепторов в весенний период, представленный на рис. 2, можно получить из теоретических кривых активности аутоадренорецепторов [1, 2, 7] наложением кривой β -рецептора на кривую α -рецептора при условии, что активность α -рецептора больше активности β -рецептора.

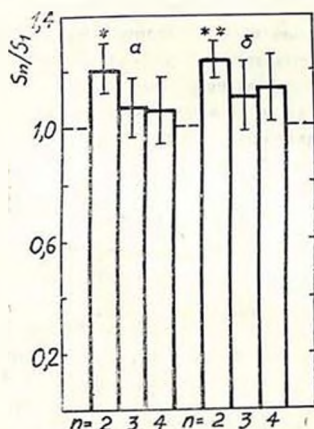


Рис. 3. Интенсивность секреции $[^3H]$ норэдренина из срезов коры мозга 3—4-месячных животных в зимний период при многократной, с интервалом 30 мин, последовательной деполяризации 20 (а) и 30 мМ KCl (б); 2,6 мМ $CaCl_2$. Обозначения по оси ординат те же, что и на рис. 1; * $p_z < 0.05$; ** $p_z < 0.01$

Величины CV_{S_1} и CV_{S_n/S_1} характеризуют диапазон случайных колебаний количества секретируемого медиатора в ответ на деполяризацию. Этот показатель имеет большое функциональное значение хотя бы потому, что его анализ позволил выдвинуть гипотезу о квантовом характере секреции АХ [9], свойственном также секреции НА [10]. Величина $CV_{S_{\text{ср}}}$ характеризует диапазон как случайных колебаний количества секретируемого медиатора в ответ на деполяризацию, так и закономерных изменений количества секретируемого медиатора, вызванных активацией аутоадренорецепторов. Проведенные исследования показали, что в зимний период величины CV_{S_1} и CV_{S_n/S_1} практически не отличаются, а сами S_n меняются, и их изменения обеспечиваются функционированием аутоадренорецепторов. На основании всего сказанного можно сделать вывод, что в условиях *in situ* при последовательной серии пресинаптических импульсов аутоадренорецепторы реализуют процессы синаптической депрессии или синаптического облегчения и стабилизации секреции НА, не изменяя диапазона случайных колебаний количества секретируемого медиатора на каждый импульс из серии. В весенний же период, когда аутоадренорецепторы не образуют зону стабильной секреции, наблюдается дестабилизация секреции $[^3H]$ НА. Практически любой исследователь поведения животных сталкивается с фактом затруднения выработки условного рефлекса в весенний период, что, по-

видимому, объясняется дестабилизацией секреции НА из адренергических терминалей коры мозга крыс, наблюдаемой в весенний период.

В проведенных исследованиях периодическая K^+ -деполяризация изменялась как тестирующая стимуляция, и, как нам казалось, 30-минутный интервал был достаточен для снятия эффекта предыдущей деполяризации на последующую. Но полученные результаты опровергли наше предположение. Изменения секреции при многократной последовательной K^+ -деполяризации с интервалом в 30 мин соответствуют активности аутоадренорецепторов (рис. 1, 2). В зимний период, когда аутоадренорецепторы образуют зону стабильной секреции, наблюдается очень сходный с синаптическим облегчением процесс (рис. 1, 3), описанный математической моделью [2]. Такое сохранение эффекта регуляции секреции во времени может иметь большое функциональное значение при процессах обучения и памяти.

AUTOADRENORECEPTORS AND STABILITY OF ADRENERGIC TRANSMISSION

BAZIAN A. S., KRUGLIKOV P. I.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR
Acad. Sci., Moscow

Experiments have been performed on 3—4- and 7—8-months-old rats in winter and spring. Intensity of 3H -NA secretion has been studied in brain cortex slices after K^+ -depolarization. To establish the stability of secretion the coefficient of variation of middle values of first secretion S_1 and secretion S_{middle} and that of the ratio of the subsequent secretions to the first one have been calculated. Data obtained indicate that in spring the intensity of 3H -NA secretion increases (the coefficients of secretion as well) that points to destabilization of secretion.

ЛИТЕРАТУРА

1. Базян А. С., Бродский Б. А. Биофизика, т. 28, № 5, с. 858—862, 1983.
2. Базян А. С. Биофизика, т. 29, № 3, с. 470—472, 1984.
3. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 172—179, 1986.
4. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 231—239, 1986.
5. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 488—494, 1987.
6. Базян А. С., Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—126, 1981.
7. Базян А. С., Беркинблит М. Б., Бродский Б. А. Биофизика, т. 29, № 5, с. 895—898, 1984.
8. Холоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран, серия «Руководство по физиологии», М., Наука, 1975.
9. Кэндел Э. Ключевые основы поведения, М., Мир, 1980.
10. Blakeley A. G. H., Cunnane T. C. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 2, № 69, p. 85—96, 1979.

Поступила 12. I 1987