



УДК 612.821

ВЛИЯНИЕ ДИБУТИРИЛ cAMP И ФОРСКОЛИНА НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ^3H -ГЛУТАМАТА И ^3H -ДОФАМИНА ИЗ НЕОСТРИАТУМА МОЗГА КРЫСЫ

ГОДУХИН О. В.

Институт биологической физики АН СССР, г. Пушкино

При изучении молекулярных механизмов пресинаптической регуляции высвобождения нейротрансмиттеров важное значение имеет выяснение роли циклических нуклеотидов, в частности cAMP, в этих механизмах. Хотя по гистологическим данным аденилатциклаза и cAMP локализованы в основном в телах интернейронов неостриатума [1], небольшой уровень аденилатциклазной активности обнаруживается и в пресинаптических окончаниях нейронов этой структуры мозга [2].

Известно, что унилатеральная электрическая стимуляция глутаматергических кортикостриатных и дофаминергических нигростриатных нейронов вызывает значительное повышение уровня cAMP в неостриатуме [3]. Однако связано ли это с высвобождением глутамата и дофамина из соответствующих окончаний—остается неясным.

Целью настоящей работы было изучение влияния липофильного аналога cAMP—дибутирил-cAMP и прямого активатора аденилатциклазы форсколина на спонтанное и вызванное K^+ -деполяризацией высвобождение ^3H -глутамата и ^3H -дофамина из неостриатума мозга крыс.

В опытах была использована методика локальной суперфузии мозга крыс (линии Wistar, масса 250—300 г). На шестой день после предварительной операции, в ходе которой животным в неостриатум вживляли направляющую трубку, через неё микрошприцем вводили 3 мкл ^3H -глутамата (У. А. 29 Ки/ммоль, «Amersham», Англия), либо 3 мкл ^3H -дофамина (У. А. 35 Ки/ммоль, «Amersham», Англия). Во время эксперимента животные находились под нембуталовым наркозом (35 мг/кг, внутривенно). Через 20 мин после введения препаратов (время, необходимое для захвата ^3H -глутамата и ^3H -дофамина клеточными элементами) осуществляли посредством пуш-пул канюли суперфузию неостриатума раствором Кребса-Рингера следующего состава (мм): NaCl—126,5; KCl—2,4; CaCl_2 —1,1; KH_2PO_4 —0,5; NaHCO_3 —27,5; MgSO_4 —1,1; глюкоза—5,9. В опытах с ^3H -дофамином в суперфузат добавляли также ингибитор МАО ниналамид (10^{-6} М). Раствор Кребса-Рингера насыщали газовой смесью O_2/CO_2 (95%/5%) до pH 7,4. Скорость суперфузии

равнялась 50 мкл/мин. Через 60 мин (в опытах с ^3H -глутаматом) и 1 ч 50 мин (в опытах с ^3H -дофамином) после начала суперфузии собирали 3 последовательные 20-минутные фракции суперфузата в пробирки с охлажденным (40°) раствором Кребс-Рингера (200 мкл). Радиоактивность ^3H -глутамата и ^3H -дофамина в первой собранной фракции принимали за 100% и относительно неё оценивали уровни радиоактивных нейротрансмиттеров в последующих двух фракциях (2 и 3). Изменение ионного состава среды (K^+ -деполяризация) и добавление в среду форсколина и дибутирил сАМР производили во время прохождения 2-ой фракции через мозг. Во время прохождения 3-й фракции («отмывка») состав суперфузионной среды возвращался к норме. В опытах с ^3H -глутаматом в пробирки добавляли нерадиоактивный глутамат (конечная концентрация 10–5 М), а в опытах с ^3H -дофамином—смесь, состоящую из нерадиоактивного дофамина (0,005%), аскорбиновой кислоты (6%) и ЭДТА (0,2%). Для очистки ^3H -глутамата и ^3H -дофамина от радиоактивных метаболитов использовали ионообменную хроматографию.

Подробнее методика эксперимента и процедура очистки описана нами ранее [4, 5].

Полученные результаты приведены в таблице. Дибутирил сАМР и форсколин практически не влияли на спонтанное, но ингибировали вызванное высокой концентрацией K^+ в среде высвобождение ^3H -глутамата и ^3H -дофамина. Таким образом, как прямое увеличение уровня сАМР, так и увеличение уровня эндогенного сАМР, вызванное активацией аденилатциклазы, в нейронах суперфузируемой области неостриатума приводило к ингибированию вызванного высвобождения исследованных нейротрансмиттеров. По всей вероятности, это высвобождение происходит из пресинаптических окончаний, так как в суперфузируемой области мозга локализованы только окончания, но не тела глутамат- и дофаминергических нейронов.

Считается, что влияние сАМР на высвобождение нейротрансмиттеров опосредуется сАМР-зависимым фосфорилированием синаптических белков [6], которое, по-видимому, не принимает прямого участия в процессе высвобождения. По данным Llinas и соавт., время от момента вызванного потенциалом действия входа Ca^{2+} в пресинаптическое окончание до выброса квантов нейротрансмиттера не превышает 200 мкс [7], что значительно меньше времени, требуемого для каскада ферментных реакций, приводящих к увеличению уровня сАМР и последующему фосфорилированию синаптических белков. Тем не менее, более длительные процессы пресинаптической модуляции высвобождения нейротрансмиттеров, осуществляемые другими нейротрансмиттерными веществами и гормонами, могут быть опосредованы увеличением уровня сАМР в пресинаптическом окончании.

Однако необходимо отметить, что в литературе описаны и другие эффекты дибутирил сАМР на высвобождение ^3H -дофамина из стриатума. Westfall и соавт. обнаружили, что дибутирил сАМР в концентрации 100 мкМ потенцировал вызванное электрической стимуляцией с частотой импульсов 50 Гц высвобождение ^3H -дофамина из срезов стриатума крыс, предварительно проинкубированных в среде с экзогенным ^3H -дофамином [8]. По-видимому, причиной отличия этих данных от наших является нефизиологическая высокая частота электрической

Таблица

Влияние дибутирил сАМР и форсколина на высвобождение ^3H -глутамата и ^3H -дофамина из неостриатума крысы

Ф р а к ц и я	У с л о в и я о п ы т а							
	^3H -глутамат				^3H -дофамин			
	спонтанное высвобождение, %		K ⁺ -вызванное высвобождение, %		спонтанное высвобождение, %		K ⁺ -вызванное высвобождение, %	
	2	3 („отмывка“)	2	3 („отмывка“)	2	3 („отмывка“)	2	3 („отмывка“)
Контроль	74 $\pm$ 12	72 $\pm$ 15	153 $\pm$ 23	81 $\pm$ 17	66 $\pm$ 9	38 $\pm$ 3	256 $\pm$ 28	64 $\pm$ 9
Дибутирил сАМР ($2 \cdot 10^{-4}$ М)	82 $\pm$ 3	64 $\pm$ 10	79 $\pm$ 11*	44 $\pm$ 12	65 $\pm$ 16	44 $\pm$ 14	90 $\pm$ 16*	61 $\pm$ 5
Форсколин (10^{-4} М)	69 $\pm$ 2	45 $\pm$ 2	73 $\pm$ 6*	50 $\pm$ 4	87 $\pm$ 8	83 $\pm$ 14*	125 $\pm$ 15*	109 $\pm$ 1*

Примечание. При K⁺-деполяризации концентрацию K⁺ в среде увеличивали до 60 мМ и эквимолярно уменьшали концентрацию Na⁺ в среде для сохранения изотоничности. *—уровень соответствующих меченых нейротрансмиттеров во фракциях, достоверно ($p < 0,05$) отличающихся от таковых в контроле в тот же период суверфузии.

-стимуляции срезов стриатума в опытах Westfall и соавт., что может приводить к интенсивному притоку Na^+ в пресинаптическое окончание, благодаря которому усиливается отток Ca^{2+} из митохондрий в цитоплазму [9]. В отличие от локальной K^+ -деполяризации пресинаптических окончаний при таких условиях возможно независимое от внешней концентрации Ca^{2+} высвобождение нейротрансмиттеров [4], которое, по-видимому, потенцируется со стороны дибутирил cAMP.

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что пресинаптические модуляторы, ингибирующие Ca^{2+} -зависимое, вызванное деполяризующим стимулом, высвобождение глутамата и дофамина из окончаний соответствующих нейронов в неостриатуме, могут осуществлять свои эффекты через активацию пресинаптической аденилатциклазы и увеличение уровня cAMP.

EFFECT OF DIBUTIRYL-cAMP AND FORSCOLINE ON THE RELEASE OF ^3H -GLUTAMATE AND ^3H -DOPAMINE FROM RAT NEOSTRIATUM

GODUKHIN O. V.

Institute of Biological Physics, Poustchino

Dibutryl-cAMP—a lipophylic analogue of cAMP—and forskoline a direct activator of adenylate cyclase—don't affect spontaneous but inhibit K^+ -depolarization induced release of ^3H -glutamate and ^3H -dopamine from rat neostriatum. Data obtained indicate that presynaptic modulators inhibiting Ca^{2+} -dependent release of glutamate and dopamine from neurons may act through the activation of presynaptic adenylate cyclase increasing the level of cAMP.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ariano M. A., Butcher L. L., Appleman M. M. *Neuroscience*, v. 5, № 7, p. 1269—1276, 1980.
2. Глебов Р. Н. *Успехи соврем. биол.*, т. 91, вып. 3, с. 433—450, 1981.
3. Cherubini E., Bernardi G., Marclani M. G., Anchors I. M., Stanzione P. *Neurosci. Lett.*, v. 13, Suppl. № 3, p. 146, 1979.
4. Годухин О. В., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю. *Физиол. журн. СССР*, т. 68, № 6, с. 745—751, 1982.
5. Жарикова А. Д., Годухин О. В. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 11, с. 574—576, 1984.
6. Cooper I. R., Meyer E. M. *Neurochem. Inter.*, v. 6, № 4, p. 419—433, 1984.
7. Llinas R., Sugimori M., Simon S. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.* v. 79, p. 2415—2419, 1982.
8. Westfall T. C., Kitay D., Wahl G. J. *Pharmacol. and Exp. Therap.*, v. 199, № 1, p. 149—157, 1976.
9. Silbergeld E. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 77, p. 464—469, 1977.

Поступила 14. VIII 1985.