



УДК 616.894.02:615.711.1

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ НОРАДРЕНАЛИНА МЕТОДОМ ПЕРЕНОСА СРЕЗОВ КОРЫ МОЗГА КРЫС

БАЗЯН А. С., КРУГЛИКОВ Р. П.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Описана установка для исследования секреции медиаторов методом переноса срезов, которая позволяет провести многочасовое исследование этого процесса параллельно на 4—8 срезах мозга. Описаны результаты исследования секреции 3Н-норадреналина (НА) параллельно из 4 горизонтальных срезов коры мозга крыс. 5-кратное исследование секреции 3Н-НА с интервалом 30 мин у всех 4 срезов одновременно позволяет провести статистическую обработку полученных результатов индивидуально для каждого животного.

Показано, что деполяризация срезов 20 мМ КСl приводит к Ca^{2+} -зависимому усилению секреции 3Н-НА. При исследовании влияния различных концентраций экзогенного НА на секрецию 3Н-НА показано, что НА в низких концентрациях (10^{-11} — 10^{-9} М) усиливает, а при более высоких (10^{-8} — 10^{-7} М)—тормозит секрецию. Полученные результаты объясняются активацией пресинаптических β - и α -адренорецепторов соответственно.

Для изучения секреции медиаторов из срезов мозга и других тканей используется ставший уже классическим метод перфузии исследуемых образцов инкубационной средой. Однако, из-за трудности равномерной прокачки инкубационной среды через параллельно подключенные камеры перфузии к единой инкубационной среде и равномерной продувки карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2) инкубационных сред возможно исследование только одного образца ткани в одной установке. Для устранения этого недостатка и была разработана установка для исследования секреции медиаторов методом переноса ткани.

Материалы и методы

Установка для исследования секреции медиаторов (рис. 1) состоит из термостатов (1), держателей образцов инкубируемой ткани (2), системы автоматической подачи инкубационных сред (7, а, б), делителя карбогена (4) и источника карбогена (5).

Держатели образцов—полые стеклянные трубки диаметром 10 мм, длиной 70 мм (рис. 2)—предназначены для быстрого переноса исследуемой ткани из одной инкубационной среды в другую. Алмазной пилкой в нижней части трубки под струей воды выпиливаются два окошка шириной 4—5 мм, длиной 6—7 мм (1). На 3—4 мм выше них выпиливаются 4 отверстия диаметром 1—2 мм (2). К нижней части трубки при помощи силиконового кольца (5) прикрепляется нейлоновая сетка (4); на

которую и помещают образец ткани. Силиконовые трубки (6) от делителя карбогена фиксируются в держателе резиновой пробкой (7). При переносе держателей в инкубационную среду (9 и 10) трубки, подающие карбоген (6), не погружаются в нее. Поскольку среда предварительно насыщена карбогеном, то газ, поступающий в держатель через 4 отверстия в корпусе, полностью вытеснит воздух с поверхности среды, тем самым препятствуя обмену карбогена, растворенного в среде с воздухом. Данный способ поддержания насыщенности среды позволяет использовать одновременно несколько держателей.

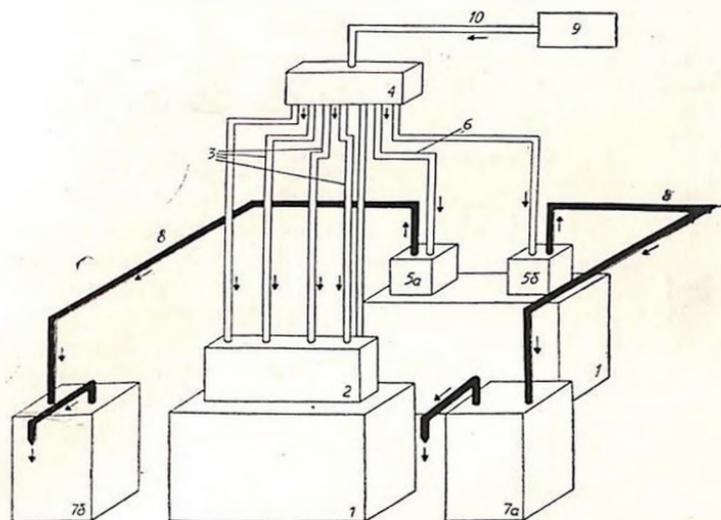


Рис. 1. Схема установки для исследования способом переноса секрета медиаторов из срезов мозга и других тканей. 1—термостаты; 2—термостатируемый блок держателей образцов (подробнее на рис. 2); 3, 6, 10—трубки, подающие карбоген; 4—делитель карбогена; 5—термостатируемые сосуды инкубационной среды (а) и среды деполаризации (б); 7—автоматические дозаторы, подающие среду инкубации (а) и среду деполаризации (б); 8—трубки, подающие среды деполаризации и инкубации; 9—источник карбогена

Для термостатирования исследуемых образцов ткани и основных инкубационных сред использовали два отечественных серийных термостата для гемокоагуляции. В середине ванны первого термостата прикреплен подвешенный, свободно качающийся штатив (рис. 2, 8), справа на корпусе термостата прикреплен мотор для встряхивания штатива. В ванну второго термостата поместили герметически закрытые объемы основных инкубационных сред (рис. 1, 5, а, б), соединенные силиконовыми трубками (рис. 1, 6) с делителем карбогена и с системой автоматической подачи инкубационных сред. Такая система соединения обеспечивает замену использованной инкубационной среды на карбоген. Автоматическая подача инкубационных сред осуществлялась при помощи двух отечественных автоматических дозаторов А2.

Делитель карбогена состоит из сосуда, наполненного водой и соединенного с тройником. Через сосуд пропускается карбоген. Первый выход тройника связан с основным объемом инкубационной среды, второй—с основным объемом среды деполаризации, через третий выход карбоген подается на 4 параллельных держателя срезов (рис. 2, 10).

Методика исследования секреции. Для инкубации срезов использовали среду 1, содержащую (в мМ): NaCl—118, KCl—4,8, CaCl₂—1,3, MgSO₄—1,2, глюкоза—11,1, ЭДТА—0,004, аскорбиновая кислота—0,11, Na-фосфатный буфер (рН 7,3)—1, NaHCO₃—15 (при насыщении карбогеном рН 7,25—7,3). Для деполяризации срезов использовали среду 2, отличающуюся от среды 1 только тем, что концентрация в ней NaCl и KCl составляла соответственно 109,8 и 20 мМ.

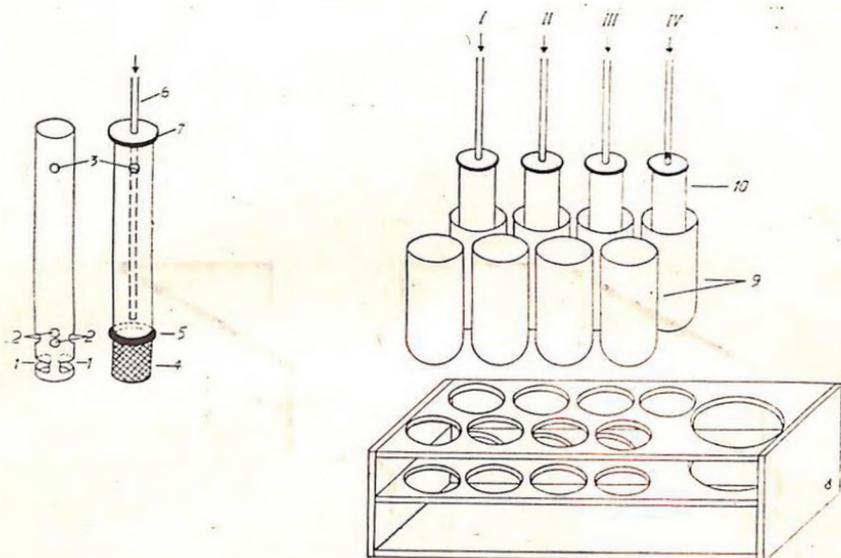


Рис. 2. Блок держателей образцов. 1—окошки для обмена инкубационных сред; 2—отверстия для обмена карбогена; 3—отверстие для выхода излишка карбогена; 4—нейлоновая сетка; 5—силиконовое кольцо; 6—трубка подачи карбогена; 7—пробка фиксации трубки в держателе; 8—штатив-встряхиватель; 9—пробирки для инкубации; 10—держатели образцов

Четыре горизонтальных среза коры мозга крысы размером 10×5 мм, толщиной 0,3 мм помещали в 4 держателя и инкубировали 15 мин в 4 мл среды 1 при 37°. Все дальнейшие процедуры проводили при данной температуре. Далее в общий объем добавляли 10 или 20 мкКи D-L-3H-НА («Amersham», Англия, удельная радиоактивность—10 или 20 Ки/ммоль) с конечной концентрацией 2,5·10⁻¹⁰М НА на 1 мл и инкубировали 10 мин.

Первый цикл. После инкубации каждый держатель со срезом промывали отдельно 30 мин. Промывка представляет собой параллельный перенос всех держателей со срезами в пробирки, содержащие 2 мл среды 1 (рис. 2, 9, 10), и инкубацию в течение 2 мин. Эту процедуру повторяли 10 раз. В процедурах с 11-ой по 16-ую инкубацию срезов проводили в 1 мл среды 1 в течение 2 мин. После 16-ой процедуры инкубационные среды от всех 4 срезов сохраняли для последующего исследования радиоактивности в них, определяя таким путем степень отмывки и уровень спонтанной секреции. Во время 17-ой процедуры инкубационные пробирки наполняли 1 мл среды 2 и срезы инкубировали 2 мин. Эти среды также сохраняли для последующего исследования радиоактивности, определяя таким путем вызванную секрецию.

Второй цикл. Срезы промывали 8 раз 2 мл среды 1 по 2 мин и 7 раз 1 мл среды 1 по 2 мин, с дальнейшим исследованием при 16- и 17-ой процедурах спонтан-

гой и вызванной секреции (I и III срезы). Для II и IV срезов после 8-ой процедуры параллельной промывки в инкубационные среды добавляли по 10^{-11} М немеченого НА (9—15-ая процедуры, за 14 мин до спонтанной секреции). Спонтанную и вызванную секрецию проводили тоже при данной концентрации НА.

Третий, четвертый и пятый циклы полностью повторяли второй с той лишь разницей, что в этих циклах применяли 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} или 10^{-7} М немеченого НА соответственно.

Для исследования радиоактивности из проб отбирали по 0,2 мл среды и добавляли к 10 мл сцинтиллятора (РРО—4 г, РОРОР—0,2 г, нафталин—60 г, метанол—100 мл, диоксан—до 1 л), радиоактивность измеряли на счетчике «RakBeta», LKB (Швеция). Результаты обрабатывали статистически: r_1 — критерий Стьюдента, r_2 — критерий Вилкоксона для сопряженных пар.

Результаты исследований

Показателем насыщенности инкубационной среды карбогеном является рН среды, равный 7,25—7,3 после насыщения и 7,4—7,5 до насыщения. Держатели срезов помещали в 4 мл насыщенной среды I и инкубировали 25 мин (время преникубации и инкубации с меткой), после чего измеряли рН среды. В ряде случаев измеряли также рН среды после 2-минутных промывок. Все измерения показали, что величина рН оставалась без изменения. Это указывает на сохранение насыщенности среды карбогеном при использовании данного способа продувки.

Опыты проводили на 7—8-месячных самцах беспородных белых крыс массой 300—350 г.

Параллельное исследование 4 срезов из мозга одного животного обеспечивает статистическую обработку результатов индивидуально у каждого животного. В табл. 1 приведены результаты, полученные при исследовании одного животного. Из таблицы видно, что калевая деполяризация (20 мМ KCl) приводит к усилению секреции. Усредненные величины спонтанной (среда I) и вызванной (среда 2) секреции составляют 279 ± 37 и 513 ± 69 распад/мин соответственно, $r_1 < 0,01$. Влияние экзогенного НА на секрецию ^3H -НА вычисляли следующим образом: интенсивность секреции получали делением уровня вызванной секреции к уровню спонтанной и обозначали через S_n ($n=1...5$) для всех 4 срезов. Затем вычисляли соотношение последующих секреций к первой $S'_n = S_n/S_1$, где $n=2...5$ также для 4-х срезов. Например, $S'_1 - \text{I срез} = 1,59/2,17 = 0,73$ (табл. 1). Влияние различных концентраций экзогенного НА на интенсивность секреции ^3H -НА вычисляли усреднением частных от деления величин S'_n II и IV срезов на величину S'_n I и III срезов. Например, с 10^{-8} М НА $= [(S'_2 - \text{II}/S'_2 - \text{I}) + (S'_2 - \text{IV}/S'_2 - \text{III})]/2 = [(1,37/0,86) + (1,02/1,13)]/2 = (1,59 + 0,90)/2 = 1,25$ (табл. 1). Средняя величина интенсивности секреции для данного животного составляет $1,84 \pm 0,07$. Коэффициент вариации интенсивности секреции $\text{CV} = 13,8\%$.

Исследования показали зависимость процесса вызванной секреции НА от Ca^{2+} . Увеличение концентрации Ca^{2+} в инкубационной

среле с 1,3 до 2.6 мМ увеличивает интенсивность секреции с 2.18 ± 0.11 (8 животных) до 3.14 ± 0.26 (8 животных), $p_1 < 0.01$.

Таблица 1

Одновременное исследование секреции ЭН-норадреналина (НА) из 4-х срезов коры мозга одной крысы

Сре- зы	Про- бл	Состав среды	ДМР распад мин	Среда 2 среда 1	$S_n S_1$	$C_{(НА)} = S'_{n(НА)} / S'_n$
I	1	1	411	$S_1 = 2,17$	$S'_1 = 0,73$	
	2	2	390			
	3	1	263	$S_2 = 1,59$	$S'_2 = 0,86$	
	4	2	426			
	5	1	186	$S_3 = 1,37$	$S'_3 = 0,67$	
	6	2	348			
	7	1	182	$S_4 = 1,45$	$S'_4 = 0,95$	
	8	2	264			
	9	1	132	$S_5 = 2,00$		
	10	2	272			
II	11	1	331	$S_1 = 1,85$	$S'_1 = 1,02$	
	12	2	613			
	13	1 (10^{-10} М НА)	256	$S_2 = 1,88$	$S'_2 = 1,37$	
	14	2 (10^{-10} М НА)	482			
	15	1 (10^{-9} М НА)	161	$S_3 = 2,53$	$S'_3 = 0,82$	
	16	2 (10^{-9} М НА)	408			
	17	1 (10^{-8} М НА)	165	$S_4 = 1,51$	$S'_4 = 0,65$	
	18	2 (10^{-8} М НА)	249			
	19	1 (10^{-7} М НА)	276	$S_5 = 1,21$		
	20	2 (10^{-7} М НА)	333			
III	21	1	575	$S_1 = 1,53$	$S'_1 = 1,12$	
	22	2	879			
	23	1	292	$S_2 = 2,18$	$S'_2 = 1,13$	
	24	2	637			
	25	1	223	$S_3 = 1,73$	$S'_3 = 1,30$	
	26	2	395			
	27	1	177	$S_4 = 1,99$	$S'_4 = 1,06$	
	28	2	352			
	29	1	173	$S_5 = 1,62$		
	30	2	231			
IV	31	1	392	$S_1 = 2,05$	$S'_1 = 0,97$	
	32	2	802			
	33	1 (10^{-10} М НА)	270	$S_2 = 1,99$	$S'_2 = 1,02$	
	34	2 (10^{-10} М НА)	537			
	35	1 (10^{-9} М НА)	188	$S_3 = 2,09$	$S'_3 = 0,87$	
	36	2 (10^{-9} М НА)	392			
	37	1 (10^{-8} М НА)	184	$S_4 = 1,79$	$S'_4 = 0,61$	
	38	2 (10^{-8} М НА)	330			
	39	1 (10^{-7} М НА)	274	$S_5 = 1,26$		
	40	2 (10^{-7} М НА)	316			

Примечание. С—коэффициент регуляции интенсивности секреции (S) различными концентрациями НА. Средняя величина интенсивности секреции—сумма $S_1 \cdot S_5$ I среза и III среза, $S_1 \cdot S_2$ среза и IV среза. n—номер цикла.

Анализ интенсивности секреции от S_1 — S_5 без воздействия экзогенного НА показал самоусиление секреции (табл. 2). Вследствие того, что наблюдается зависимое от времени самоусиление интенсивности секреции, исследование одних и тех же концентраций экзогенного НА в разных опытах проводили при различных значениях n, где (n=2...5).

Результаты по влиянию различных концентраций экзогенного НА

Соотношение интенсивности секреции ^3H -НА

Параметр	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
S_n	$1,93 \pm 0,1$	$2,07 \pm 0,12$	$2,43 \pm 0,16^*$	$2,36 \pm 0,15^*$	$2,19 \pm 0,11$
Количество животных	12	12	12	12	6
S_n/S_1		$1,03 \pm 0,04$	$1,26 \pm 0,05^{**}$	$1,25 \pm 0,03^{**}$	$1,21 \pm 0,03^{**}$
Количество животных		19	13	12	6

Примечание: n—номер цикла; * $p_1 < 0,05$ по сравнению с S_1 . ** $p_1 < 0,05$ по сравнению с параметром S_2/S_1 .

Таблица 3

Влияние различных концентраций экзогенного НА на интенсивность секреции ^3H -НА из срезов коры мозга крыс

Концентрация НА, М	S_n/S_1	$S_n(\text{НА})/S_1$	p	C(НА)	Количество животных
10^{-11}	$0,96 \pm 0,07$	$1,33 \pm 0,09$	$p_z = 0,05$	$1,38 \pm 0,09$	5
10^{-10}	$1,13 \pm 0,07$	$1,35 \pm 0,07$	$p_1 < 0,05$	$1,21 \pm 0,05$	6
10^{-9}	$1,12 \pm 0,07$	$1,27 \pm 0,07$	$p_z < 0,05$	$1,18 \pm 0,03$	11
10^{-8}	$1,16 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,06$	$p_1 < 0,001$	$0,83 \pm 0,05$	11
10^{-7}	$0,97 \pm 0,07$	$0,49 \pm 0,05$	$p_1 < 0,001$	$0,52 \pm 0,05$	8

на интенсивность секреции ^3H -НА суммированы в табл. 3. Как видно из таблицы, низкие концентрации экзогенного НА (10^{-11} — 10^{-9} М) усиливают, а более высокие (10^{-8} — 10^{-7} М)—тормозят секрецию ^3H -НА.

Обсуждение результатов

Таким образом, каллевая деполяризация приводит к значительному усилению выхода ^3H -НА из срезов мозга в омывающую инкубационную среду. Используемая нами исходная концентрация ^3H -НА при его насыщении срезами, равная $2,5 \cdot 10^{-10}$ М, а также зависимость выхода ^3H -НА от Ca^{2+} при деполяризации указывают на то, что мы наблюдаем секрецию НА из адренергических терминалей коры больших полушарий мозга крыс под влиянием деполяризации аналогично процессу, протекающему в условиях *in situ*.

Влияние экзогенного НА на вызванную деполяризацией секрецию ^3H -НА опосредовано, в основном, аутоадренорецепторами. Поскольку тела центральных адренергических нейронов локализованы главным образом в *locus coeruleus*, то использование горизонтальных срезов коры мозга исключает влияние соматодендритных адренорецепторов центральных адренергических нейронов. На отсутствие влияния «постсинаптических» адренорецепторов на секрецию ^3H -НА адренергическими варикозными расширениями было указано ранее [1, 2]. В условиях нашего эксперимента возможно влияние на изучаемый процесс

неадренергических нейронов коры мозга, обладающих тоματοдендритными адренорецепторами, медиаторы которых могут деполяризовать центральные адренергические варикозы наподобие предполагаемого действия Н-холинергических агонистов [3]. Но в этом случае на основании данных, представленных в табл. 3, экзогенный НА, деполяризующий эти терминали, должен был при меньших концентрациях вызывать дозозависимое усиление спонтанной секреции и, по крайней мере, не влиять на спонтанную секрецию при более высоких концентрациях. В литературе отсутствуют указания на подобного рода изменения спонтанной секреции под влиянием экзогенного НА, которое не проявляется также в наших исследованиях.

Остается рассмотреть возможное влияние неадренергических нейронов в период деполяризации. Медиаторы, секретируемые из терминалей этих нейронов в момент деполяризации, могут активировать соответствующие рецепторы на адренергических терминалях [3], модулируя секрецию НА. Это влияние минимально, так как имеет место и в контрольных срезах, не инкубирующихся с экзогенным НА. Далее экзогенный НА, активируя адренорецепторы на неадренергических нейронах, по-видимому, может влиять на степень вызванной деполяризации, модулируя секрецию других медиаторов. Степень связывания этих медиаторов с соответствующими рецепторами на адренергических терминалях— нарастающий во времени процесс, который запускается началом деполяризации и заканчивается его прекращением (2 мин в условиях наших опытов). Активация аутоадренорецепторов протекает в равновесных условиях (15 мин до деполяризации), что может перекрыть вклад в общий ответ первого процесса.

Тот факт, что НА в низких концентрациях (10^{-11} — 10^{-9} М) усиливает, а при более высоких (10^{-8} — 10^{-7} М)—тормозит секрецию ^3H -НА, указывает на наличие соответственно β - и α -пресинаптических адренорецепторов на адренергических терминалях срезов коры мозга крыс. Отсюда можно предположить, что НА в концентрации 10^{-11} — 10^{-9} М активирует пресинаптические β -адренорецепторы, а в концентрации 10^{-8} — 10^{-7} М—пресинаптические α -адренорецепторы.

SLICE TRANSFER METHOD TO STUDY NA SECRETION

BAZVAN A. S., KRUGLIKOV R. I.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR
Academy of Sciences, Moscow

A special device for a long-term study of transmitter secretion by the method of slice transfer is described. It makes possible to study this process on 4—8 brain slices simultaneously. ^3H -noradrenaline (NA) secretion has been studied on 4 slices from rat brain cortex at once, the aliquots from each slice have been taken with 30 min interval (5 times) that makes possible to use statistics for each animal. Depolarization of

slices by KCl (20 mM) leads to increase in Ca^{2+} -dependent secretion of ^3H -NA. Low concentrations of exogenous NA (10^{-11} — 10^{-9} M) stimulate secretion while high doses (10^{-8} — 10^{-7} M) inhibit it. Data obtained are due to activation of α - and β -presynaptic adrenoreceptors respectively.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бизли А. С. Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—123, 1981.
2. Ланге С. З.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 59—81. М., Медицина, 1982.
3. Старк К.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 135—176. М., Медицина, 1982.

Поступила 26. II 1986