



УДК 616.894.02:615.711.1

РЕГУЛЯЦИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ^3H -НОРАДРЕНАЛИНА ПРЕСИНАПТИЧЕСКИМИ α - И β -АДРЕНОРЕЦЕПТОРАМИ В СРЕЗАХ КОРЫ МОЗГА КРЫС

БАЗЯН А. С., КРУГЛИКОВ Р. И.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Исследовали вызванное (20 мМ КСl) и спонтанное высвобождение ^3H -норадреналина (НА) из срезов коры мозга крыс. Экзогенный НА в низких концентрациях (10^{-11} — 10^{-9} М) на фоне 20 мМ КСl вызывает β -ауторецепторную реакцию—усиление высвобождения, а при более высоких (10^{-8} — 10^{-7} М)— α -ауторецепторную реакцию—уменьшение высвобождения ^3H -НА у 7—8-месячных животных. При изменении концентрации НА в соответствующих диапазонах окорость β -реакции убывает, а α -реакции нарастает. Такая зависимость аутоадренорецепторов от концентрации медиатора образует зону стабильного высвобождения ($5,5 \cdot 10^{-9}$ М). У 3—4-месячных животных низкие концентрации НА (10^{-10} — 10^{-9} М) вызывают α -ауторецепторную реакцию, при этом стабильное высвобождение наблюдается при концентрации НА ниже 10^{-10} М. Увеличение концентрации Ca^{2+} от 1,3 до 2,6 мМ усиливает высвобождение в 1,44 раза, и сдвигает зону стабильного высвобождения до $2,4 \cdot 10^{-10}$ М НА.

Экзогенный НА в концентрациях 10^{-8} — 10^{-7} М в отсутствие КСl вызывает усиление накопления меченого медиатора в инкубационной среде. Анализ зависимости этого накопления от концентрации экзогенного НА указывает на процесс высокоаффинного захвата НА срезами коры с величиной $K_m 1,5 \cdot 10^{-7}$ М, автономно протекающий в срезах наряду с ауторецепторными процессами.

В течение последнего десятилетия были открыты и интенсивно исследованы центральные и периферические пресинаптические аутоадренорецепторы, которые локализованы на адренергических терминалях и регулируют высвобождение НА. Пресинаптический β -адренорецептор активируется меньшими концентрациями адреноагонистов и приводит к усилению высвобождения НА. Пресинаптический α -адренорецептор активируется высокими концентрациями адреноагонистов, при этом уменьшается высвобождение НА. Эти свойства пресинаптических адренорецепторов были учтены при разработке гипотезы, объясняющей некоторые механизмы синаптической пластичности при адренергической передаче [1].

Согласно этой гипотезе, активация пресинаптических адренорецепторов обеспечивает синаптическую депрессию или облегчение, в

основе которых лежат процессы постепенного уменьшения или увеличения количества высвобождаемого медиатора—от импульса к импульсу в серии пресинаптической импульсации и дальнейшая стабилизация секреции на определенном уровне. Модельный математический анализ гипотезы [2, 3] показал, что вышеуказанные процессы возможны, когда функционирование пресинаптических β - и α -адренорецепторов образует зону стабильного высвобождения. Эта зона соответствует той концентрации НА, при которой пресинаптический β -рецептор уже не активируется, усиливая высвобождение при концентрациях НА ниже концентрации зоны стабильного высвобождения, а пресинаптический α -рецептор еще не активируется, но начиная с концентрации, соответствующей зоне стабильного высвобождения, увеличивается тормозное действие α -рецептора при увеличении концентрации НА.

Целью настоящей работы было выяснение зависимости высвобождения ^3H -НА от концентраций экзогенного помеченного НА, активирующих пресинаптические адренорецепторы.

Материалы и методы

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. 4 или 8 тангенциальных срезов теменной коры толщиной 0,3 мм инкубировали одновременно в буферной (1 мМ Na + -фосфата и 15 мМ бикарбоната) среде Кребса-Рингера (рН 7,25) при насыщении карбогеном (95% O_2 +5% CO_2) в течение 15 мин при 37°. Затем в инкубационную среду добавляли 10 или 20 мкКи DL- ^3H -НА («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 10 или 20 Ки/ммоль и концентрацией $2,5 \cdot 10^{-10}$ М НА/мл и инкубировали 10 мин. Срезы одновременно промывали в течение 30 мин их параллельным переносом в чистые инкубационные среды. Спонтанное высвобождение определяли измерением радиоактивности, накопленной в течение 2-минутной инкубации в 1 мл среды Кребса-Рингера. Вызванное высвобождение определяли измерением радиоактивности, накопленной в течение 2-минутной инкубации срезов в 1 мл среды Кребса-Рингера, содержащей 20 мМ KCl. Интенсивность секреции S определяли соотношением вызванного и спонтанного высвобождения, интенсивность которого исследовали до 5 раз (S_1 — S_5) параллельно у каждого среза с интервалом промывки между секретами 30 мин. У половины срезов за 15 мин до исследования S_2 — S_5 промывку проводили при наличии в инкубационной среде 10^{-11} — 10^{-7} М L-НА («Serva», ФРГ). Спонтанное и вызванное высвобождение из этих срезов определяли при тех же условиях. На основании 5-кратного исследования S вычисляли соотношение S_n/S_1 , где n—порядковый номер деполяризации, равный 2, 3, 4 и 5. Коэффициент регуляции высвобождения НА (C)—отношение S_n/S_1 в присутствии экзогенного НА к S_n/S_1 в отсутствие НА—определял степень влияния различных концентраций НА на секрецию ^3H -НА [4].

Результаты исследования

Результаты, полученные при исследовании влияния экзогенного НА разной концентрации на высвобождение ^3H -НА у 7—8-месячных животных, представлены на рис. 1. Обнаружено, что НА в низких концентрациях (10^{-11} — 10^{-9} М) усиливает высвобождение ^3H -НА, при этом эффект уменьшается с увеличением концентрации НА. Более высокие концентрации (10^{-8} — 10^{-7} М) уменьшают высвобождение

^3H -НА. Данный эффект усиливается при увеличении концентрации НА. На рис. 1 представлена гипотетическая кривая зависимости коэффициента регуляции высвобождения НА (С) пресинаптическими аутоадренорецепторами от концентрации НА [2, 3, 5]. Видно достаточное соответствие между гипотетической и экспериментальной кривыми. Зона стабильного высвобождения (точка пересечения кривой с осью абсцисс) у 7—8-месячных животных равна $5,5 \cdot 10^{-9}$ М НА.

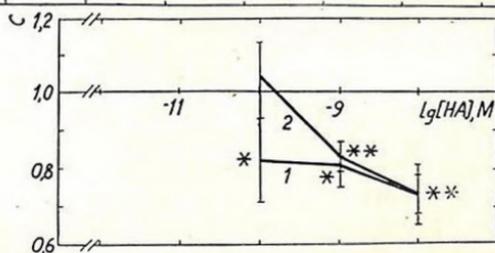
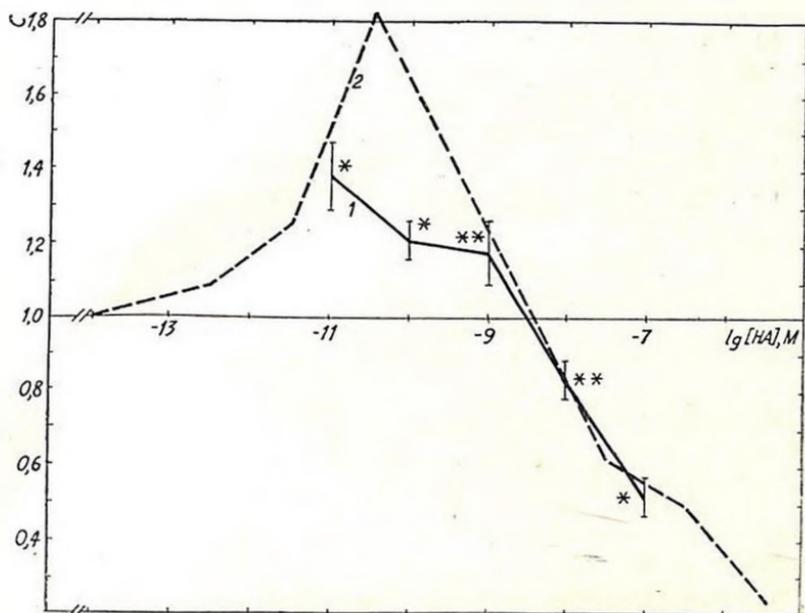


Рис. 1. График зависимости коэффициента регуляции высвобождения С от концентрации экзогенного НА у 7—8-месячных животных. 1—экспериментальная кривая; 2—гипотетическая кривая; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с $C=1$

Рис. 2. График зависимости коэффициента регуляции высвобождения С от концентрации экзогенного НА у 3—4-месячных крыс. 1— $1,3 \text{ мМ Ca}^{2+}$, 2— $2,6 \text{ мМ Ca}^{2+}$. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Результаты, полученные при исследовании 3—4-месячных животных при двух концентрациях Ca^{2+} в инкубационной среде, $1,3 \text{ мМ}$ (кривая 1) и $2,6 \text{ мМ}$ (кривая 2)—представлены на рис. 2. Все иссле-

дованные концентрации экзогенного немеченого НА (10^{-10} — 10^{-9} М) вызывают уменьшение высвобождения ^3H -НА при концентрации Ca^{2+} 1,3 мМ (кривая 1). Увеличение вдвое концентрации Ca^{2+} не приводит к достоверным изменениям величины С в каждой точке, но повышает зону стабильного высвобождения. При сравнении рис. 1 и 2 видно, что кривая активности пресинаптической регуляции высвобождения НА у более молодых животных сдвинута в сторону низких концентраций НА, при этом зона стабильного высвобождения $\leq 2,4 \cdot 10^{-10}$ М НА.

Средние величины интенсивности высвобождения ^3H -НА у различных групп животных представлены в табл. 1. Интенсивность высвобождения у 3—4- и 7—8-месячных животных при 1,3 мМ Ca^{2+} практически одинакова, увеличение концентрации Ca^{2+} до 2,6 мМ усиливает её в 1,44 раза.

Таблица 1
Интенсивность высвобождения ^3H -НА из срезов коры мозга крыс

Группа животных	S
3—4-месячные животные, 2,6 мМ Ca^{2+}	$3,14 \pm 0,26$ (8)
3—4-месячные животные, 1,3 мМ Ca^{2+}	$2,18 \pm 0,11$ (8) $p_1 < 0,01$
7—8-месячные животные, 1,3 мМ Ca^{2+}	$2,19 \pm 0,09$ (3) $p_1 < 0,001$

Примечание. p_1 —критерий Стьюдента по сравнению с группой 1. В скобках указано количество животных.

Для определения влияния экзогенного НА отдельно на спонтанное и вызванное высвобождение ^3H -НА из срезов вычисляли процентное отношение последующего спонтанного высвобождения (CB_n , где $n=2\dots 5$) к CB_1 и последующего вызванного высвобождения (ВВ_n , где $n=2\dots 5$) к ВВ_1 . Те же отношения вычисляли в присутствии экзогенного НА. Как видно из табл. 2, экзогенный немеченый НА в концентрациях 10^{-11} — 10^{-9} М не приводит к достоверным изменениям спонтанного высвобождения ^3H -НА, в то время как концентрации 10^{-8} — 10^{-7} М значительно усиливают этот процесс. Условия проводимых экспериментов таковы, что спонтанно выделившийся ^3H -НА может вновь активно захватываться терминалями и глialными клетками срезов коры. Немеченый НА, добавляемый в среду инкубации, конкурирует со спонтанно выделившимся ^3H -НА, уменьшая долю его захвата. Для построения зависимости накопления ^3H -НА в инкубационной среде от концентрации НА использовали только достоверные результаты из табл. 2 и рассчитывали эффект воздействия экзогенного НА, приравнивая начало координат отсчета к нулю. Первым способом пересчитывали величину отношения Π/I . Эффект соответствующей концентрации НА составлял $[(\Pi/I) - 1] : 10^{-8}$ М НА = $1,20 -$

Таблица 2

Влияние экзогенного НА на спонтанное и вызванное высвобождения ЗН-НА из срезов коры мозга крыс в инкубационную среду

Группа животных	Концентрация НА, М	$\frac{СВ_n}{СВ_1}$ %	$\frac{СВ_n(НА)}{СВ_1}$ %	р	II/I	$\frac{ВВ_n}{ВВ_1}$ %	$\frac{ВВ_n(НА)}{ВВ_1}$ %	р	IV/III	Количество животных		
		I	II			III	IV					
7-8-месячные животные, 1,3 мМ СаСl ₂	10 ⁻¹¹	58,7±5,1	55,2±4,9	p _z < 0,01 p _t < 0,001		0,89±0,08	53,1±4,7	p _z < 0,0 1	1,14±0,11	5		
	10 ⁻¹⁰	37,9±3,9	37,9±4,2			1,00±0,1	42,8±4,1		50,0±5,1		1,19±0,09	6
	10 ⁻⁹	36,2±2,8	37,3±2,5			1,06±0,04	47,2±7,1		47,3±7,5		1,08±0,11	11
	10 ⁻⁸	28,8±4,4	34,6±6,2			1,20±0,05	54,9±7,3		51,0±6,2		0,97±0,1	11
	10 ⁻⁷	48,4±6,9	104,8±19,9			2,24±0,13	39,9±7,3		48,3±5,4		1,29±0,1	10
3-4-месячные животные, 1,3 мМ СаСl ₂	10 ⁻¹⁰	51,0±5,5	52,0±5,7	p _t < 0,05		1,03±0,02	52,5±2,7		0,94±0,08	6		
	10 ⁻⁹	32,6±3,5	30,9±4,9			1,05±0,1	35,3±4,0		33,6±5,2		0,94±0,06	6
	10 ⁻⁸	22,5±1,6	29,1±1,2			1,27±0,08	24,2±2,8		24,7±3,8		1,01±0,08	6
3-4-месячные животные, 2,6 мМ СаСl ₂	10 ⁻¹⁰	44,4±1,2	43,3±2,0	p _t < 0,01		0,98±0,05	54,3±5,2	p _z < 0,05	0,92±0,09	8		
	10 ⁻⁹	29,0±1,3	31,2±1,4			1,08±0,04	31,1±3,5		26,1±3,0		0,85±0,05	8
	10 ⁻⁸	21,9±0,9	27,6±1,4			1,29±0,09	21,8±2,8		19,6±2,8		0,91±0,06	8

Примечание: p_z—критерий Вилкоксона для сопряженных пар, p_t—критерий Стьюдента.

$I = 0,20$; 10^{-7} М НА = 2,24 — 1 = 1,24. Вторым способом приравнивали отношение I к 50% и пересчитывали эффект соответствующей концентрации НА для отношения $I: 10^{-8}$ М НА = $(50/28,2) \cdot 34,6 - 50 = 10,1$; 10^{-7} М НА = $(50/48,8) \cdot 104,8 - 50 = 58,3$. Используя систему двойных обратных координат, получили линейный график высокоаффинного захвата НА срезами коры мозга крыс с $K_m = 1,5 \cdot 10^{-7}$ М НА (рис. 3). По литературным данным, K_m высокоаффинного захвата НА срезами или синапсомы мозга животных составляет $2-4 \cdot 10^{-7}$ М НА [6].

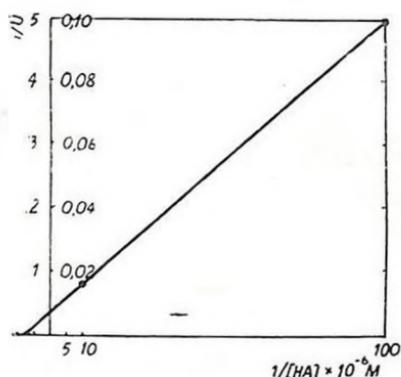


Рис. 3. График анализа зависимости накопления ^3H -НА в инкубационной среде U от концентраций экзогенного НА. $U = [(I/I) - 1]$ при масштабе делений 1...5, $U = [50 / (CB_n / CB_1) \cdot (CB_n \text{ (НА)} / CB_1)] - 50$ при масштабе делений 0,02 ... 0,1. Данные рассчитаны из достоверных значений табл. 2.

Анализ результатов по влиянию экзогенного немеченого НА на вызванное высвобождение ^3H -НА (табл. 2) показывает, что изменения, в основном, недостоверны, но они сохраняют ту же тенденцию (за исключением НА в концентрациях 10^{-7} и 10^{-8} М), которая наблюдается при исследовании влияния экзогенного НА на интенсивность высвобождения ^3H -НА (рис. 1 и 2).

Обсуждение результатов

Таким образом, проведенные исследования показали, что у 7—8-месячных животных НА в низких концентрациях вызывает усиление высвобождения, а при более высоких концентрациях — уменьшение высвобождения ^3H -НА. Применение тангенциальных срезов коры мозга и исходной концентрации ^3H -НА $2 \cdot 10^{-10}$ М дает основание предполагать, что наблюдаемые эффекты обусловлены активацией пресинаптических адренорецепторов, локализованных на адренергических терминалях [4]. При помощи фармакологического анализа было показано, что усиление секреции НА связано с активацией пресинаптического β -аутоадренорецептора, а уменьшение — с активацией α -аутоадренорецептора [1, 7, 8]. Эти реакции наблюдаются и в периферической [1], и в центральной [7, 8] НС. На основании сходства полученных нами результатов и указанных выше литературных данных можно сделать вывод, что наблюдаемое усиление высвобождения ^3H -НА, вызываемое низкими концентрациями экзогенного НА, обус-

ловлено активацией центральных β -ауторецепторов, а уменьшение высвобождения, индуцируемое более высокими концентрациями НА,— центральных α -ауторецепторов.

В данной работе показано (рис. 1), что между концентрациями, активирующими β - и α -ауторецепторы, находится концентрация НА, на которую уже не реагирует β -рецептор и еще не реагирует α -рецептор. Анализ математических моделей показал [2, 3], что это та концентрация НА, при которой наблюдается высвобождение постоянного количества медиатора на каждый импульс в серии, что стабилизирует амплитуду постсинаптического потенциала вследствие синаптической депрессии или облегчения в течение пресинаптической импульсации. Мы назвали эту концентрацию зоной стабильного высвобождения. В наших экспериментальных исследованиях калевая деполяризация (20 мМ КСl) выступает как одиночный тестирующий стимул большой длительности. У 7—8-месячных животных в данном случае зона стабильного высвобождения находится в районе $5,5 \cdot 10^{-9}$ М НА.

Ранее были сделаны безуспешные попытки обнаружить β -аутоадренорецепторную реакцию в адренергических терминалях коры мозга крыс [7]. В более поздних исследованиях было показано [8], что β -адреноагонисты усиливают, а антагонисты уменьшают высвобождение ^3H -НА из чувствительных к резерпину участков коры мозга крыс. Такое противоречие литературных данных обусловлено, по-видимому, концентрациями лиганда, его родством к β -адренорецептору, степенью деполяризации, а также возрастом и состоянием животных. Действительно, в наших исследованиях концентрации НА 10^{-10} — 10^{-9} М вызывают β -ауторепторную реакцию в срезах 7—8-месячных животных, а именно усиление высвобождения, а у 3—4-месячных животных НА в этих же концентрациях вызывает α -рецепторную реакцию, то есть уменьшение высвобождения. У более молодых животных β -аутоадренорецепторы, вероятно, активируются более низкими концентрациями НА, при этом зона стабильного высвобождения $\leq 2,4 \cdot 10^{-10}$ М НА.

Было показано, что пресинаптические ауторецепторы модулируют только лишь вызванное высвобождение ^3H -НА. Этот факт имеет принципиальное значение, поскольку считается, что истинно спонтанное и вызванное высвобождения медиаторов имеют единый квантовый механизм. Если истинно спонтанное и вызванное высвобождения отличаются только по количественным показателям, то и результаты воздействия на эти процессы должны отличаться только количественно. Наши исследования еще раз подтвердили известный факт, что НА поглощается срезами коры мозга при помощи механизма высокоаффинного захвата, интенсивность которого зависит от концентрации НА. Если и есть какое-то влияние активации аутоадренорецепторов на истинно спонтанное высвобождение, то оно может перекрываться процессом высокоаффинного захвата. Деполяризация, количественно усиливающая влияние ауторепторов на процесс секреции, может привести к тому, что в этом

случае уже эффективность регуляции высвобождения перекрывает эффективность высокоаффинного захвата. Следовательно, результаты, представленные в табл. 2, в конечном счете определяются двумя автономными механизмами: захватом и высвобождением медиатора.

Исследование интенсивности высвобождения S исключает влияние высокоаффинного захвата, приравненного к единице, на величину коэффициента регуляции высвобождения (C) в том случае, если скорость и степень захвата в покое и возбуждении равны. Сравнение величины S и $ВВ$, приведенных на рис. 1, 2 и в табл. 2, дает основание полагать, что при деполяризации процесс регуляции высвобождения аутоадренорецепторами количественно перекрывает процесс высокоаффинного захвата. Известно, что при деполяризации эффективность высокоаффинного захвата уменьшается [6], но эти эксперименты не исключают участия вызванного высвобождения меченого НА, что может быть причиной меньшего накопления метки в срезах или синантосомах. Если деполяризация действительно независимо от высвобождения уменьшает высокоаффинный захват 3H -НА, то при измерениях величины S окажутся несколько заниженными, особенно при концентрации 10^{-7} М НА. Однако пока нет возможности точно оценить вклад обоих механизмов в экспериментальных условиях.

INVOLVEMENT OF PRESYNAPTIC β - AND α -ADRENORECEPTORS IN THE RELEASE OF 3H -NORADRENALINE IN RAT BRAIN CORTEX SLICES

BAZYAN A. S., KRUGLIKOV R. I.

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

Spontaneous and 20 mM KCl-induced release of 3H -noradrenaline (3H -NA) has been investigated in rat brain cortex slices. Application of NA (10^{-11} — 10^{-9} M) in the presence of 20 mM KCl induces increase in release of 3H -NA (β -autoreceptor reaction), while 10^{-8} — 10^{-7} M NA—decrease in 3H -NA release (α -autoreceptor reaction) in 7—8-months-old animals. This dose-response data create a zone of stable release of NA at $5,5 \cdot 10^{-9}$ M, in 3—4-months-old animals this zone is less than 10^{-10} M. Increase in Ca^{2+} (from 1,3 mM to 2,6 mM) enhances NA release 1,4-fold and shifts the zone of stable release to $2,4 \cdot 10^{-10}$ M.

In the absence of KCl, application of NA (10^{-8} — 10^{-7} M) leads to accumulation of 3H -NA in the incubation medium. Analysis of dose-response data point to a high-affinity uptake of NA by rat brain ($K_m = 1,5 \cdot 10^{-7}$ M) that exists independently from autoreceptor processes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Базян А. С. Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—125, 1981.
2. Базян А. С., Бродский Б. Л. Биофизика, т. 28, № 5, с. 858—862, 1983.
3. Базян А. С. Биофизика, т. 29, № 3, с. 470—472, 1984.
4. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 172—179, 1986.
5. Базян А. С., Беркинблит М. Б., Бродский Б. Л. Биофизика, т. 29, № 5, с. 895—898, 1984.
6. Базян А. С., Майсов Н. И. Успехи соврем. биол., т. 96, № 6, с. 435—450, 1983.
7. Старк К.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 135—176, М., Медицина, 1982.
8. Shenoy A. K., Ziance R. J. Life Sci., v. 24, № 3, p. 255—264, 1979.

Поступила 12. II 1986

УДК 577.352.5:612.822

ДЕЙСТВИЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК НА МЕМБРАННЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕЙСМЕКЕРНОГО НЕЙРОНА

ЗАХАРЯН Р. А., РЫЧКОВ Г. Е., ДАДАЛЯН С. С., БАКУНЦ И. С.,
АГАБАЛЯН А. С., РУХКЯН Л. А., АПРАПЕТЯН С. Н.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Изучено действие двухцепочечной РНК (дцРНК) на пейсмерную активность нейрона РРА1 ЦНС виноградной улитки. Исследована зависимость действия дцРНК на активность идентифицированных нейронов от содержания Ca^{2+} , K^{+} и Cl^{-} в перфузирующем растворе. Показано, что дцРНК существенно увеличивает амплитуду колебаний мембранного потенциала, что сопровождается значительным увеличением амплитуды фазы межпачковой гиперполяризации. Действие дцРНК может быть опосредовано активацией Na^{+} -насоса и увеличением входа Ca^{2+} внутрь клетки.

В настоящее время дцРНК рассматривается не только как индуктор интерферонов, но и как модулятор различных биохимических реакций, протекающих в клетке и зависящих, по крайней мере, от двух процессов, индуцируемых дцРНК в клетке: 1) активация синтеза (2'—5')-олигоаденилата, в свою очередь активирующего латентную РНКазу-Н [1]; 2) индукция дцРНК-зависимой протеникиназы, фосфорилирующей фактор инициации eI_1-2 [2]. Установлена тесная функциональная связь между регуляторными системами клетки, зависящими от 3', 5'-сАМР (сАМР) и (2'—5')-олигоаденилата [3].

Показано, что дцРНК является стимулятором первичного и вторично-гуморального ответов [4, 5]. Хотя препараты РНК используются при лечении разных заболеваний—тапето-ретиальной дистрофии, язвы желудка, бронхиальной астмы, пневмонии, трофических язв [6, 7], мембранный механизм действия остается практически не изученным.