



УДК 577.352+3.612.821.

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ [^3H] ДИАЗЕПАМА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС ПРИ ОБУЧЕНИИ

КОРОТКОВ К. О., АКСЕНТЬЕВА М. С., ЖУЛИН В. В.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

В экспериментах *in vitro* с помощью анализа по Скотчарду изучали влияние обучения на параметры связывания [^3H] диазепама к синаптическим мембранам неопортекса крыс. Графики Скотчарда для крыс, обученных условному рефлексу двухстороннего избегания, крыс, стрессированных несочетанными электрическими раздражителями, и интактных животных имели нелинейный характер. Мы предлагаем возможные объяснения этого факта. Используя модель двух независимых участков связывания, определяли K_d и V_{max} (максимальное число участков связывания) для мембран обученных и стрессированных крыс. Плотность рецепторов стрессированных крыс была намного выше, чем у обученных, в основном, за счет увеличения низкоаффинной популяции, при этом аффинности обеих популяций были практически одинаковы. Различия между кривыми в графиках Скотчарда, соответствующими обученным и интактным животным, были незначительны. Исходя из этого, мы предполагаем, что изменения на уровне бензодиазепиновых рецепторов соответствуют уровню эмоционального возбуждения во время обучения.

Принято считать, что фармакологические эффекты бензодиазепинов опосредуются через высокоаффинные участки связывания в мозгу—бензодиазепиновые рецепторы [1, 2]. Большое количество косвенных данных, свидетельствующих об их гетерогенности, частично объясняет чрезвычайно широкий спектр физиологической активности бензодиазепинов [3, 4]. Один из важнейших эффектов этой группы лекарств—анксиолитический—тесно связан с процессами высшей нервной деятельности. Распределение бензодиазепиновых рецепторов в мозгу [5, 6] подтверждает предположение, что они определенным образом включены в высшие интегративные процессы. Так, показано, что бензодиазепины могут влиять на способность к обучению у человека [7—9]. Известно также, что некоторые формы экспериментального стресса изменяют параметры высокоаффинного связывания бензодиазепинов у крыс [10].

Ранее было установлено, что синаптические мембраны коры больших полушарий мозга крыс, подвергшихся воздействию несочетанных раздражителей—света и электрокожных раздражений (ЭКР)—связы-

вают больше диазепам, чем синаптические мембраны крыс, обученных избеганию. В свою очередь, последние обладали статистически достоверно большим уровнем связывания, чем мембраны интактных животных [11].

В настоящей работе представлены данные, показывающие, что значительное увеличение связывания [^3H] диазепам при указанных воздействиях обусловлено возрастанием плотности рецепторов синаптических мембран без изменения их аффинности.

Материалы и методы

Условный рефлекс двустороннего избегания (УРДИ) вырабатывался у самцов белых крыс по общепринятой методике. Обучение продолжали до достижения критерия 5 избеганий подряд. Животных, получавших несочетанные раздражители, соответствующие по количеству раздражителям, примененным для выработки условного рефлекса, использовали как активный контроль (АК), а животных, не подвергавшихся каким-либо воздействиям—как пассивный контроль (ПК). В каждой группе было по 8 крыс.

Через несколько мин после обучения животных декапитировали, отделяли серое вещество больших полушарий, выделенный материал помещали в жидкий азот. После оттаивания материал тщательно гомогенизировали в стеклянном сосуде Поттера в 25 объемах среды выделения (0,32 М сахароза, «Sigma», США; 1 мМ ЭДТА и 50 мМ трис- HCl , «Serva», ФРГ, pH 7.4) при температуре 4° , которую поддерживали на всех стадиях выделения. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1500g. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали 20 мин при 20000g. Осадок (фракция P_2) суспендировали в 25 объемах по отношению к исходной ткани 50 мМ трис- HCl , pH 7.4 в стеклянном гомогенизаторе и хранили несколько дней при температуре -20° .

Связывание проводили при температуре $0.5-1^\circ$. К 0.4 мл оттаявших и повторно гомогенизированных мембран добавляли 50 мкл [^3H] диазепам (87 Ки/ммоль, «Amersham», Англия). Конечные концентрации [^3H] диазепам варьировали от 0.3 до 30 нМ. Реакцию останавливали через 60 мин фильтрованием образцов через фильтры GF/B под вакуумом. Фильтры дважды промывали 5 мл ледяного буфера (общее время фильтрования составляло 10—15 с). Радиоактивность фильтров определяли в сцинтилляторе Брея с использованием счетчика «Beckman LS-9000», США. Для определения неспецифического связывания использовали немеченый диазепам в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М [12]. Белок определяли по Lowry и соавт. [13]. Концентрация белка в опыте составляла 0,2—0,4 мг.

Таким образом, в сумме исследованы 24 препарата синаптических мембран, выделенных от 24 животных. Данные по связыванию представлены в виде графиков Скэтчарда. Каждая точка на графике соответствует среднему арифметическому всех опытов. При этом по формуле

$\sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}}$ вычисляли и откладывали на графике стандарт-

ное отклонение σ_{n-1} . Уровень приближения к линейной регрессии оценивали по критерию f^2 . Разложение экспериментальных точек в соответствии с моделью двух независимых участков связывания (для групп обучения и АК) проводили по Feldman [14] с использованием метода наименьших квадратов. В рамках этого метода определены отклонения для величин K_d и B_{max} . Интерполяционная кривая для группы ПК аппроксимирована моделью, предполагающей комбинацию двух популяций рецепторов, одна из которых связывается с лигандом по мономолекулярному механизму, а другая может равно отвечать как варианту положительной кооперативности, так и варианту самоконвертирующихся конформационных форм рецептора.

Обсуждение результатов

Результаты связывания $[^3H]$ диазепама синаптическими мембранами представлены на рис. 1 и 2. В противоположность широко распространенным данным, график Скэтчарда для мембран крыс ПК не является прямой линией, он лучше описывается кривой, имеющей максимум и точку перегиба. Если же провести прямую методом линейной

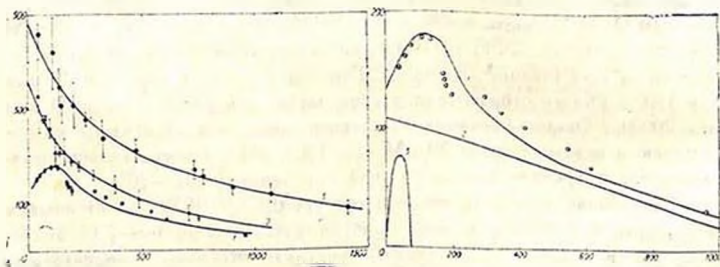


Рис. 1. Графики Скэтчарда для связывания $[^3H]$ диазепама с синаптическими мембранами коры больших полушарий мозга крыс. По оси абсцисс—специфическое связывание (фмоль/мг белка), по оси ординат—отношение специфического связывания к концентрации несвязавшейся метки (фмоль/фмоль · мг белка · 10^{-3}). 1—группа интактных крыс, 2—обучение УРДИ, 3—активный контроль. Для каждой точки взято среднее значение из 8 опытов

Рис. 2. Разложение экспериментальной кривой Скэтчарда для связывания $[^3H]$ диазепама с синаптическими мембранами коры больших полушарий мозга интактных крыс. 1—экспериментальная кривая, 2—прямая, соответствующая простой бимолекулярной реакции лиганд-рецепторного взаимодействия, 3—парабола, соответствующая модели положительной кооперативности или конформационных переходов рецепторов. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

регрессии через точки с $R \geq 300$ фмоль/мг белка, то полученные K_d и B_{max} (соответственно 3.74 нМ и 1.2 пмоль/мг белка) близки к данным, известным из литературы [15, 16]: R —количество специфически связанного рецептора. Проверка такого приближения по методу i^2 (включая точки с $R < 300$ фмоль/мг белка) дает $i^2 = 210$ ($n=2$), при этом достоверная вероятность приближения для всех экспериментальных точек оказалась меньше 0,01. Тем не менее, нелинейный характер графика, соответствующего группе ПК, и достоверное наличие максимума в области малых концентраций (0,1—1,0 нМ) [3H] диазепам потребовали дополнительной экспериментальной проверки. Было показано, что изменение условий первого центрифугирования при выделении синаптических мембран, скорости фильтрации и некоторых других экспериментальных процедур влияет на параметры связывания [3H] диазепам, но не является критическим для выявления максимума на графике Скэтчарда. Кроме того, для идентификации модели была проведена вспомогательная серия опытов по связыванию, где начальная концентрация белка R_0 варьировала от 0,2 до 2,0 мг/мл. Оказалось, что форма максимума не зависит от величины R_0 . На основании результатов этого эксперимента отдали предпочтение модели, которая предполагает наличие двух популяций рецепторных молекул, одна из которых (R_1) описывается прямой линией на графике Скэтчарда ($K_{d1} = 24,4$ нМ и $B_{max1} = 2,44$ пмоль/мг белка), а вторая (R_2) имеет плотность $B_{max2} = 0,1$ пмоль/мг белка и соответствующий ей график может быть описан моделью предельной положительной кооперативности с двумя местами связывания ($n=2$) или моделью конформационного перехода между двумя формами рецептора. Полученное значение B_{max2} для кривой ПК хорошо согласуется с величинами плотности рецепторов со сверхвысоким сродством, выявленным Ehlert и соавт. [17], в эксперименте по связыванию бензодиазепиновых рецепторов с этиловым эфиром β -карболин-3-карбоновой кислоты.

И для стрессированных (АК), и для обученных крыс форма кривой Скэтчарда соответствует механизму связывания для двух или более независимых подтипов рецептора (максимум на кривой отсутствует). Ранее похожие формы графиков Скэтчарда были продемонстрированы для взаимодействия [3H] диазепам с бензодиазепиновыми рецепторами неокортекса необученных кроликов [18], а также для связывания [3H] флуниотразепам с синаптическими мембранами, выделенными из различных отделов мозга крыс, в присутствии этилового эфира β -карболин-3-карбоновой кислоты [19]. При расчете термодинамических параметров связывания [3H] флуниотразепам и [3H] клоназепам показано, что изменение аффинности связывания по мере изменения температуры не совпадает с термодинамической константой равновесия, характерной для бимолекулярной реакции, поэтому возможность существования двух независимых подтипов бензодиазепинового рецептора разрешает это противоречие [20].

Пока невозможно точно оценить какому типу бензодиазепиновых рецепторов отвечает появление перегиба на графике Скэтчарда. Обнаруженные с помощью $[^3\text{H}]$ 4'-хлордiazепама (R. 05—4864) так называемые рецепторы «периферического» типа локализованы не только в «периферических» органах, но и в ткани мозга [21]. Однако плотность таких рецепторов в неокортексе крыс существенно ниже, чем рецепторов «центрального» типа [22]. «Периферические» рецепторы не связаны с ГАМК-регулируемыми ионными каналами, опосредующими эффект анксиолитиков и антиконвульсантов бензодиазепиновой природы, которые взаимодействуют с рецепторами «центрального» типа [23]. Согласно последним исследованиям, по субклеточному фракционированию гомогенатов мозга крыс рецепторы «периферического» типа преимущественно локализованы на внешней мембране митохондрий, а их функции, по-видимому, тесно связаны с процессами окислительного фосфорилирования [23, 24]. Разумеется, в нашем эксперименте $[^3\text{H}]$ diaзепам связывался с рецепторами обоих типов, присутствующих во фракции P_2 . Тем не менее, принимая во внимание вышесказанное, участие рецепторов «периферического» типа в процессах высшей нервной деятельности представляется маловероятным. Скорее перегиб на графике Скэтчарда отвечает двум неоднородным популяциям рецепторов «центрального» типа.

Таблица

Разложение экспериментальных кривых связывания $[^3\text{H}]$ diaзепам с синаптическими мембранами коры мозга крыс в соответствии с моделью двух неоднородных участков связывания

Условия опытов	Высокоаффинные участки		Низкоаффинные участки	
	K_d , нМ	B_{max} , фмоль/мг белка	K_d , нМ	B_{max} , фмоль/мг белка
1. Обучение	$1 \pm 0,5$	150 ± 50	10 ± 2	800 ± 100
2. Активный контроль	$0,85 \pm 0,4$	200 ± 50	10 ± 2	$1500 \pm 200^*$

Примечание. $^*p_{2-1} < 0,05$.

Приняв модель двух независимых участков связывания, мы можем разложить экспериментальные кривые на два линейных компонента и определить для них величины K_d и B_{max} (таблица). Альтернативная интерпретация этих кривых заключается в том, что использованные воздействия не изменяют механизм связывания, но сдвигают параболический конформационный компонент ближе к нулю на оси абсцисс в графике Скэтчарда, вследствие чего график переходит в форму, более соответствующую модели с двумя участками.

Однако независимо от интерпретации кривых, рецепторы обученных и стрессированных крыс проявляют качественно близкий способ связывания. График Скэтчарда у стрессированных животных проходит гораздо выше, чем у обученных, что может быть объяснено увеличением, в основном, за счет низкоаффинной популяции доступных рецеп-

торов, тогда как аффинность обеих популяций остается практически на одном и том же уровне. В то же время плотности участков связывания и аффинности мембран мозга обученных и необученных животных достаточно близки.

В процессе выработки УРДИ степень эмоционального возбуждения крыс постепенно снижается, в связи с чем, вероятно, наступает относительное понижение плотности участков связывания.

Изменения характеристик связывания с бензодиазепиновыми рецепторами, таким образом, в определенной мере соответствуют физиологическим закономерностям обучения. Сходство же в левой части графиков Скэтчарда для обучения и АК, в свою очередь, может быть вызвано менее выраженным проявлением эмоционального стресса у обученных крыс.

LEARNING ALTERS [^3H]-DIAZEPAM BINDING TO THE SYNAPTOSOMAL MEMBRANES OF RAT NEOCORTEX

KOROTKOV K. O., AKSENTIEVA M. S., ZHULIN V. V.

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

The effect of learning on the parameters of [^3H] diazepam binding to rat brain synaptosomal membranes has been studied in vitro experiments by Scatchard analysis. Scatchard plots for the rats which were trained to conditional reflex of double-sided avoidance, those stressed by unmatched irritations and intact rats did not represent a straight line. We propose a possible interpretation of this fact. Using the model of two independent binding sites, determination of dissociation constants (K_d) and maximum binding sites (B_{max}) for trained and stressed rats membranes has been made. The receptor density in stressed rats was much higher than in learned ones—mainly due to increase in low-affinity population while affinities were similar in both cases. Furthermore, the differences between the curves of trained and intact rats were not significant. On this ground we suggest that changes in the level of the benzodiazepine receptors are in accordance with the extent of emotional excitation during the training.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muller W. E. Pharmacology, v. 22, p. 153–161, 1981.
2. Mennini T., Garattini S. Life Sci., v. 31, p. 2025–2037, 1982.
3. Martin I. L., Chloé L. B., Doble A. Life Sci., v. 32, p. 1925–1935, 1983.
4. Montaldo S., Serra M., Concas A., Corda M. G., Meleand S., Biggio G. Neurosci. Lett., v. 52, p. 263–268, 1984.
5. Young W. S., Kuhar M. J. Nature, v. 280, p. 393–395, 1979.
6. Young W. S., Nichoff D. L., Kuhar M. J., Beer B., Lippa A. S. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 216, p. 425–430, 1981.

7. Liljequist R., Mattila M. J. Brit. J. Clin. Pharm., v. 8, suppl. 1, p. 55—56, 1979.
8. Lister R. G. Neurosci. Biobehav. Rev., v. 9, p. 87—95, 1985.
9. Petersen R. S., Ghonem M. M. Progress in Neuro-Pharmacol., v. 4, p. 81—90, 1980.
10. Lipka A. S., Klepner C. A., Yungler R. L., Sano M. S., Smith W. V., Beer B. Pharmacol. Biochem. Behav., v. 9, p. 853—856, 1978.
11. Коротков К. О., Жулин В. В., Круликов Р. И. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 12, с. 695—696, 1981.
12. Baghurst P. A., Nichol L. W. J. Theor. Biol., v. 74, p. 523—535, 1978.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
14. Feldman H. A. Anal. Biochem., v. 48, p. 317—338, 1972.
15. Braestrup C., Squires R. F. Nature, v. 266, p. 732—734, 1977.
16. Mohler H., Ocada T. Life Sci., v. 20, p. 210—222, 1977.
17. Ehlerl F. J., Roeske W. R., Yamamura H. I. Life Sci., v. 22, p. 235—248, 1981.
18. Yokoi I., Rose S. E., Yanagihara T. Life Sci., v. 28, p. 1591—1595, 1981.
19. Mielson M., Braestrup C. Nature, v. 286, p. 606—607, 1980.
20. Quast U., Muhlmann H., Vollmer K.-O. Mol. Pharmacol., v. 22, p. 20—25, 1982.
21. Shoemaker H., Bales R. J., Horst W. D., Yamamura H. I. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 225, p. 61—67, 1983.
22. Richards J. G., Mohler H. Neuropharmacology, v. 23, № 2B, p. 233—242, 1981.
23. Maranges P. J., Patel J., Boulenger J.-P., Clark-Rosenberg R. Mol. Pharmacol., v. 22, p. 26—32, 1982.
24. Basile A. S., Scolnick P. Neurochem., v. 46, p. 305—309, 1986.
25. Anholt R. R. H., Pedersen P. L., De Souza E. B., Snyder S. H. J. Biol. Chem., v. 261, p. 576—583, 1986.

Поступила 20. X 1986