



УДК 612.84+547.466.64

ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА, БЕНЗОДИАЗЕПИНА И ГАМК В ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ КРЫСЫ (СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

ШАИБС Р., РОТЕ Т.

Институт исследований мозга им. Пауля Флексига
Университета им. Карла Маркса, Лейпциг, ГДР

С использованием метода связывания лигандов было исследовано постнатальное развитие глутаматных, бензодиазепиновых и ГАМК-рецепторов в сетчатке, ядре наружного коленчатого тела (ЯНКТ), верхнем холмике четверохолмия (ВХЧ) и зрительной коре головного мозга крыс. Установлено, что в центральных зрительных областях онтогенез мест связывания глутамата опережает развитие рецепторов ГАМК и бензодиазепина. Максимальное связывание глутамата было выявлено уже на 14-м дне постнатального развития. Временная картина развития бензодиазепиновых рецепторов в зрительной коре и сетчатке в этих областях отставала от развития рецепторов ГАМК, тогда как связывание бензодиазепина в ЯНКТ и в ВХЧ опережало связывание ГАМК. Различия по времени отчетливого проявления глутаматных, бензодиазепиновых и ГАМК-рецепторов в зрительных областях указывает, что глутамат- и ГАМК-ергические проводящие пути неодинаково включаются в функциональное созревание зрительной системы крыс. Развитие глутаматных рецепторов в центральных зрительных областях, видимо, тесно связано с механизмами избирательной стабилизации синаптических контактов, тогда как онтогенез рецепторов ГАМК и бензодиазепина контролируется более сложным образом.

В зрительной системе крыс происходят постнатальные функциональные и структурные изменения. Можно полагать, что они увязаны с развитием функциональных свойств системы опознавания. Адекватный зрительный поток, видимо, взаимодействует с этим развитием и влияет на конечную настройку функциональных и/или структурных нейронных связей в зрительном пути [1].

Наши сведения о созревании зрительной системы были получены по большей части на основе результатов электрофизиологических и морфологических исследований [2]; меньше данных имеется о развитии нейрохимических параметров зрительной системы крыс. Так как главные нейромедиаторы, участвующие в первичной передаче зрительной информации, все еще неизвестны, мы сосредоточили внимание на постнатальном онтогенезе глутамат- и ГАМК-ергической передач, которые в головном мозгу рассматривают соответственно как основные возбуж-

дающие и тормозящие системы [3—5]. Нейромедиаторные рецепторы являются одними из решающих звеньев в цепи синаптической обработки информации. Благодаря их способности к адаптации в ответ на изменяющиеся количества нейромедиаторов в зависимости от сдвигов активности нейронов [6], они особенно важны для функционально-адаптивных процессов, которые протекают во время созревания зрительной системы. Поэтому мы изучали развитие глутаматных, бензодиазепиновых и ГАМК-рецепторов в зрительных отделах (зрительной области коры больших полушарий, ЯНКТ, ВХЧ и сетчатке) крысы для того, чтобы выяснить, существует ли корреляция между онтогенезом этих рецепторов и созреванием процессов обработки информации в этой хорошо изученной сенсорной системе. Кроме того, мы были заинтересованы в определении величин временных различий в созревании основных возбуждающей и ГАМК-ергической передач, выявляемых при онтогенезе рецепторов в зрительной системе крыс.

Материалы и методы

Крысы линии BD III любого пола находились в условиях 12-часового затемнения в сутки и обычного виварного содержания. Их декапитировали в различном (10—90-дневном) возрасте и под стереомикроскопом, как было описано ранее [7], выделяли зрительную область коры, ЯНКТ, ВХЧ и сетчатку. Пробы ткани гомогенизировали в инкубационном буфере и сохраняли при -20° . Для количественного определения рецепторов исследуемых агентов использовали метод радиолигандного связывания. После инкубации радиолиганда с мембранной фракцией, полученной из ткани соответствующей области, образованный лиганд-рецепторный комплекс отделяли либо фильтрованием (при определении бензодиазепиновых рецепторов), либо центрифугированием (в случае рецепторов глутамата и ГАМК). Радиоактивность материала, задержанного на фильтрах или перешедшего в осадок при центрифугировании, измеряли при помощи счета в жидком сцинтилляторе. Для определения различных видов рецепторов применяли следующие радиолиганды: $[^3\text{H}]$ глутамат—для глутаматных рецепторов [8], $[^3\text{H}]$ флуни-тразепам—для бензодиазепиновых [9] и $[^3\text{H}]$ мусцимол—для рецепторов ГАМК [10]. Величину специфического связывания вычисляли как разницу между общим связыванием и связыванием, определяемым в присутствии немеченого рецепторного ингибитора (неспецифическое связывание). В этих опытах использовали радиолиганды и ингибиторы в следующих концентрациях: 3 нМ $[^3\text{H}]$ глутамата и 1 нМ немеченого L-глутамата; 1,5 нМ $[^3\text{H}]$ флуни-тразапама и 10 мкМ хлордиазепоксида; 2 нМ $[^3\text{H}]$ мусцимола и 1 нМ ГАМК. Полученные величины специфического связывания выражали как отношение связанного радиолиганда к содержанию белка в пробе, которое определяли по методу Lowry и соавт. [11].

Результаты и обсуждение

Для сравнения изменявшихся во времени состояний онтогенеза рецепторов глутамата, бензодиазепина и ГАМК в изучаемых зрительных областях временные сдвиги в специфическом связывании выражали в процентах от величины максимального связывания, достигавшейся в течение исследуемого периода развития.

В зрительной коре (рисунк, а) связывание глутамата с 10-го по 14-й день постнатального развития поднималось $\approx$ на 31% и достигало максимального уровня, установленного при онтогенезе. К 25-му дню связывание глутамата падало ($\approx$ в 10 раз) и уже в этом возрасте

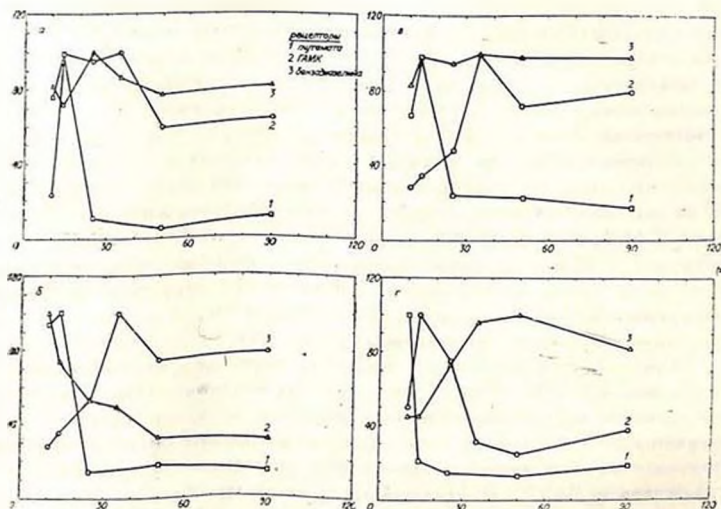


Рис. Постнатальное развитие рецепторов глутамата, ГАМК и бензодиазепина в зрительной области коры больших полушарий (а), ядре наружного колленчатого тела (б), верхнем холмике четверохолмия (в) и сетчатке глаза (г). Величины связывания выражены в % от максимального, принятого за 100%, достигнутого при исследуемом периоде онтогенеза соответствующим видом рецепторов. Абсолютные величины составляли при этом (нмоль/г белка):

- а) 5020 ± 194 (1), 163 ± 26 (2) и 356 ± 22 (3);
- б) 14891 ± 1964 (1), 142 ± 17 (2) и 277 ± 12 (3);
- в) 5234 ± 344 (1), 155 ± 10 (2) и 399 ± 28 (3);
- г) 4064 ± 131 (1), 81 ± 5 (2) и 141 ± 3 (3).

По оси абсцисс — возраст в днях, по оси ординат — связывание.

достигало величины, свойственной взрослым крысам. Связывание ГАМК с 10-го по 14-й день значительно увеличивалось (приблизительно в 4 раза), поддерживалось на высоком уровне до 35-го дня и уменьшалось на 43% к 50-му дню, достигая величины, наблюдаемой у взрослых

животных. Бензодиазепиновое связывание медленно повышалось с 10-го по 25-й день на 22%, достигая максимальной величины, затем оно постепенно снижалось до 50-го дня, когда становилось характерным для взрослых крыс.

В подкорковых областях ЯНКТ и ВХЧ (рисунок, б, в) онтогенетический профиль глутаматных рецепторов был близким к описанному в случае зрительной коры. После подъема связывания глутамата с 10-го по 14-й день, когда достигалось максимальное связывание, оно стремительно падало, достигая к 25-му дню уровня у взрослых животных. Связывание ГАМК в ЯНКТ и ВХЧ постепенно увеличивалось от 10-го до 35-го дня, достигая максимальной величины с последующим существенным снижением до 50-го дня, когда были отмечены величины, характерные для взрослых крыс. Бензодиазепиновое связывание в ВХЧ медленно нарастало с 10-го по 14-й день (на 16%) и оставалось на этом уровне до взрослого состояния (рисунок, в), тогда как в ЯНКТ связывание бензодиаземина с 10-го дня постоянно снижалось до величины, свойственной взрослым крысам (рисунок, б).

В сетчатке (рисунок, г) максимальное связывание глутамата было обнаружено уже у 10-дневных крыс, а затем оно резко снижалось до 25-го дня, достигая к этому сроку уровня у взрослых животных. Связывание ГАМК с 10-го по 14-й день повышалось на 50%, затем снижалось до 35-го дня, достигая наблюдаемого в случае взрослых крыс. Бензодиазепиновое же связывание с 10-го по 37-й день существенно повышалось, находилось на достигнутом уровне до 50-го дня, а потом понемногу опускалось до величины у взрослых.

Сравнение постнатального онтогенеза рецепторов глутамата, бензодиаземина и ГАМК в зрительных областях головного мозга крыс выявило, таким образом, значительные различия в картине развития этих рецепторов. В каждой из исследованных зрительных областей развитие глутаматных рецепторов предшествовало созреванию рецепторов бензодиаземина и ГАМК. В центральных зрительных областях самое высокое связывание глутамата было установлено на 14-е сутки постнатального развития. В сетчатке максимальная величина связывания оказалась в самый первый срок исследования—10-й день.

Глутамат может служить кортикальным нейромедиатором, как на это указывает его Ca^{2+} -зависимый выход из эндогенных запасов и специфическое поглощение пирамидными клетками слоя VI зрительной коры [12, 13]. В настоящее время имеются веские доказательства, что нервные волокна, идущие из зрительной коры в ЯНКТ и ВХЧ, используют в качестве нейромедиатора глутамат [14].

Развитие высокоаффинного связывания глутамата, которое можно рассматривать как маркер глутаматергических нервных окончаний, видимо, протекает параллельно с морфологическим созреванием зрительных кортикофугальных и кортико-кортикальных проекций [15]. Период максимального связывания глутамата тесно совпадает с тем, когда созревание глутаматергических нервных окончаний достигает взрослого

состояния. Резкое постнатальное падение глутаматного связывания в центральных зрительных областях с 14-го по 25-й день, таким образом, можно рассматривать как деградацию тех мест связывания глутамата, которые оказались неэффективно вовлеченными в протекающее образование глутаматергических синаптических контактов. Интересно, что у крыс возраст, при котором достигается самое высокое в течение всего постнатального развития связывание глутамата, совпадает с временем прозревания. Следовательно, «включение» зрения, видимо, побуждает окончательное морфофункциональное созревание глутаматергической передачи в центральных зрительных областях. Подобное же резкое снижение числа мест связывания глутамата в сетчатке, возможно, зависит от тех же механизмов.

Временная динамика развития бензодиазепиновых рецепторов в зрительной коре и сетчатке отстает от развития рецепторов ГАМК в этих областях, тогда как в ЯНКТ и ВХЧ связывание бензодиазепаина опережает связывание ГАМК. В некоторых частях головного мозга бензодиазепиновые рецепторы, возможно, ассоциированы с рецепторами ГАМК и белками хлорных каналов, образуя некий супрамолекулярный комплекс [16]. Различный ход онтогенеза мест связывания бензодиазепаина и ГАМК в изученных нами зрительных областях может указывать на неодинаковое развитие в них обоих рецепторов или на зависящие от возраста изменения в функциональных свойствах ГАМК—бензодиазепиновый рецептор—хлоридонофорного комплекса.

В зрительной системе крыс наблюдали также региональные отличия в типах развития высокоаффинного связывания ГАМК и глутаматдекарбоксилазной активности, которые считаются маркерами ГАМК-ергических пресинаптических нервных окончаний. В ЯНКТ активность глутаматдекарбоксилазы достигает уровня, характерного для взрослых животных, на 15-й день постнатального развития, тогда как в зрительной коре и в ВХЧ и после 30-го дня эта ферментативная активность оказывается еще не полностью выраженной [15]. Высокоаффинное связывание ГАМК во всех трех изучаемых областях проявляло выраженный пик на 15-й день онтогенеза, несовпадавший с развитием глутаматдекарбоксилазной активности [15]. Таким образом, различные компоненты ГАМК-ергической передачи развиваются по разной схеме.

В ВХЧ и зрительной коре развитие рецепторов ГАМК, видимо, опережает становление активности глутаматдекарбоксилазы. Наоборот, онтогенез мест связывания ГАМК в ЯНКТ отстает от развития этой ферментативной активности в данной области. Сравнение таких фактов указывает, что образование рецепторов ГАМК не требует индукции со стороны образования функциональных синапсов, что похоже на результаты онтогенетических исследований и других нейромедиаторных систем [17, 18].

Различное по времени появление рецепторов глутамата, бензодиазепаина и ГАМК в зрительных областях позволяет допустить, что глутамат- и ГАМК-ергические передачи по-разному вовлекаются в функцио-

нальное созревание зрительной системы крыс. Характер развития глутаматных рецепторов в зрительной системе указывает на избирательную стабилизацию синаптических контактов путем устранения избытка рецепторных мест связывания, как это предполагали Changeux и Danchin [19]. Совпадение сокращения связывания глутамата с моментом прозревания подчеркивает важность характера опознавания для установления функционально работоспособной нейронной сети.

На основе данных о типах развития рецепторов ГАМК и бензодиазефина нельзя прийти к подобного рода заключениям. Более того, ГАМК-ергическая передача не ограничена лишь одним видом нейронов. Поэтому наблюдаемая картина онтогенеза отражает усредненное влияние различных механизмов развития и может быть к тому же перекрыта эффектами, возникающими под влиянием среды.

Такой же вывод можно сделать и по поводу неодинаковой картины развития рецепторов ГАМК и бензодиазефина. Поэтому явные различия в случае этих двух видов рецепторов в сетчатке и в ЯНКТ на основе современных сведений трудно объяснить.

DEVELOPMENT OF GLUTAMATE, BENZODIAZEPINE, AND GABA BINDING SITES IN RAT VISUAL SYSTEM. A COMPARATIVE STUDY

SCHLIEBS R., ROTHE T.

Paul Flechsig Institute for Brain Research, Department of Neurochemistry,
Karl Marx University, Leipzig, G. D. R.

The postnatal development of glutamate, benzodiazepine and GABA receptors has been studied in the retina, lateral geniculate nucleus, superior colliculus and visual cortex of the rat using radioligand binding techniques.

In the central visual regions the ontogeny of glutamate binding sites precedes that of GABA and benzodiazepine receptors. Highest glutamate binding was already detectable on postnatal day 14. The temporal pattern of the development of benzodiazepine receptors in the visual cortex and in the retina lags behind that of GABA receptors in these regions, whereas in the lateral geniculate nucleus and the superior colliculus benzodiazepine binding precedes that of GABA binding.

The temporal distinct appearance of glutamate, benzodiazepine and GABA receptors in the visual regions suggests that the glutamatergic and GABAergic transmission systems are differently involved in the functional maturation of rat visual system. The development of the glutamate receptors in the central visual regions seems to follow closely the mechanisms of selective stabilization of synaptic contacts, whereas the ontogeny of GABA and benzodiazepine receptors is controlled in a more complex fashion.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Singer W.*—In: *Synergetics of the Brain* (eds. E. Basar, H. Flohr, H. Haken, A. J. Mandell), p. 89—101, Springer, Berlin—West, 1983.
2. *Schiller P. H.* *Vision Res.*, v. 26, p. 1351—1386, 1986.
3. *Fonnum F. J.* *Neurochem.*, v. 42, p. 1—11, 1984.
4. *Roberts P. J., Storm-Mathisen J., Johnston G. A. R.* *Glutamate transmitter in the central nervous system*, John Wiley & Sons, Chichester, 1981.
5. *Parnavelas J. G., McDonald J. K.*—In: *Chemical neuroanatomy* (ed. P. C. Emson), p. 505—549, Raven Press, New York, 1983.
6. *Schwartz J. C., Cortes C. L., Rose C., Quach T. T., Pollard H.* *Progr. Brain Res.*, v. 48, p. 117—129, 1983.
7. *Bigl V., Biesold D., Wetsz K. J.* *Neurochem.*, v. 22, p. 505—509, 1974.
8. *Schliebs R., Kunert E., Bigl V. J.* *Neurochem.*, v. 43, p. 1490—1493, 1984.
9. *Schliebs R., Rothe T., Bigl V.* *Dev. Brain Res.*, v. 24, p. 179—185, 1986.
10. *Schliebs R., Rothe T.* *Gen. Physiol. Biophys.* (submitted), 1987.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
12. *Baugham R. W., Gilbert C. D.* *Nature*, v. 287, p. 848—850, 1980.
13. *Baugham R. W., Gilbert C. D.* *J. Neurosci.*, v. 1, p. 427—439, 1981.
14. *Kvale I., Fonnum F.* *Dev. Brain Res.*, v. 11, p. 261—266, 1983.
15. *Kvale I., Fosse V. M., Fonnum F.* *Dev. Brain Res.*, v. 7, p. 137—145, 1983.
16. *Tallman J. F., Gallager D. W.* *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 8, p. 21—44, 1985.
17. *Bylund D. B.* *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 16, p. 133—162, 1979.
18. *Coyte J. T., Yamamura H. I.* *Brain Res.*, v. 118, p. 429—440, 1976.
19. *Changeux J. P., Danchin A.* *Nature*, v. 264, p. 705—712, 1976.

Поступила 14. V 1987

Нейропептиды и поведение. т. I. Действие АКТГ, МСГ и опионидных пептидов на ЦНС. Pergamon Press, 480 с., 1985.

Neuropeptides and Behaviour—v. I. CNS effects of ACTG, MSH and opioid peptides (ed. by D. De Wied, W. H. Gispen and T. J. B. Van Vimersma Greidanus). Pergamon Press, Oxford, England, 480 p., 1985.

Этой книгой открывается серия изданий, посвященных нейропептидам и поведению. В настоящем томе описаны нейропептиды, связанные с АКТГ, МСГ, эндорфинами и энкефалинами, а также локализация, распространение и процессинг проопиомеланокортина в мозгу и вилочковой железе. Следующие главы рассматривают их функции в качестве нейротрансмиттеров, нейромодуляторов и нейрогормонов, которые выявлены с помощью электрофизиологических, нейрохимических и нейробиологических исследований. Предметом рассмотрения являются также поведенческие эффекты этих соединений. Книга предназначена для фармакологов, нейрохимиков, нейробиологов и электрофизиологов.