



УДК 616.894.02:615.711.1

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АУТОАДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ
ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ СЕКРЕЦИИ НОРАДРЕНАЛИНА

БАЗЯН А. С., КРУГЛИКОВ Р. И.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Исследовали зависимость показателя зоны стабильной секреции, заключенной между α - и β -пресинаптическими аутоадренорецепторами, от интенсивности секреции [^3H] норадреналина (НА) в тангенциальных срезах темной коры мозга крыс. Срезы деполяризовали повышением концентрации KCl с 4,8 до 20, 30, 60 мМ в присутствии 1,3 и 2,6 мМ CaCl_2 в инкубационной среде. У 7–8-месячных животных увеличение концентрации KCl с 20 до 60 мМ при 1,3 мМ CaCl_2 усиливает интенсивность секреции [^3H] НА в 2,87 раза. При этом активность аутоадренорецепторов меняется так, что концентрация НА, соответствующая зоне стабильной секреции, увеличивается в 1000 раз. У 3–4-месячных животных деполяризацию проводили 20 мМ KCl + 1,3 мМ CaCl_2 , 20 мМ KCl + 2,6 мМ CaCl_2 и 30 мМ KCl + 2,6 мМ CaCl_2 . Интенсивность секреции [^3H] НА усиливалась в 1,44, 2,21 и 3,18 раза, а концентрация НА, соответствующая зоне стабильной секреции, увеличивалась соответственно в 10, 25 и 250 раз. Таким образом, обнаружена пропорциональная зависимость между интенсивностью секреции и зоной стабильной секреции. Обсуждаются возможные механизмы данной зависимости.

В предыдущих работах [1–5] было показано, что α - и β -аутоадренорецепторы, активируемые НА, изменяют количество секретируемого медиатора на последующую деполяризацию. Величина и направленность изменений зависит от концентраций НА, активирующих эти рецепторы. Низкие концентрации НА усиливают секрецию, активируя β -аутоадренорецептор. Причем эффект усиления дозозависимо возрастает до определенного предела при увеличении концентрации НА. Дальнейшее увеличение концентрации НА приводит к тому, что усиливающий секрецию медиатора эффект β -аутоадренорецептора, постепенно уменьшаясь, полностью исчезает. При еще большем увеличении концентрации НА наблюдается дозозависимое торможение секреции медиатора вследствие активации α -ауторецепторов. Та концентрация НА, при которой полностью исчезает эффект β -ауторецепторов и еще не проявляется эффект α -ауторецепторов, названа нами зоной стабильной секреции. Зона стабильной секреции—это тот уровень концентрации НА, при котором стабилизируется концентрация секретируемого на каждый импульс ме-

диатора, стабилизируя амплитуду ВПСР после синаптической депрессии или синаптического облегчения в серии пресинаптической импульсации заданной частоты [1, 2].

Теоретический модельный анализ [3] показал, что в адренергических терминалях усиление секреции медиатора при увеличении частоты импульсации связано с изменением активности α - и β -ауторецепторов и сдвигом зоны стабильной секреции в сторону высоких концентраций НА. Таким образом, модельный анализ предсказывает наличие взаимосвязи между интенсивностью секреции медиатора и концентрации НА, при которой образуется зона стабильной секреции. Чем выше зона стабильной секреции, тем выше интенсивность секреции и наоборот.

Целью данной работы является проверка предсказания модельного анализа путем исследования взаимосвязи между интенсивностью секреции НА, вызванной разной степенью деполяризации и зоны стабильной секреции.

Материалы и методы

Опыты проводили на 7—8-месячных самцах белых беспородных крыс, массой 300—350 г и 3—4-месячных, массой 180—230 г.

4 или 8 тангенциальных срезов теменной коры толщиной 0,3 мм инкубировали в 4 или 8 мл двухбуферной (1 мМ Na^+ -фосфатной и 15 мМ бикарбонатной, рН 7,25 при насыщении карбогеном) среды Кребса-Рингера в течение 15 мин, 37°. Затем в данные объемы инкубационной среды добавляли 10 или 20 мкКи соответственно DL-[^3H] НА («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 10 или 20 Ки/ммоль (конечная концентрация $2,5 \cdot 10^{-11}$ моль/мл НА) и инкубировали еще 10 мин. Срезы в отдельности, но одновременно промывали в течение 30 мин посредством параллельного переноса через каждые 2 мин в чистые инкубационные среды. После промывки определяли спонтанную и вызванную секрецию [^3H] НА из каждого среза. Спонтанную секрецию определяли измерением радиоактивности, накопленной в 1 мл нормальной среды Кребса-Рингера, после 2-минутной инкубации в ней среза. Вызванную секрецию определяли после 2-минутной инкубации среза в 1 мл среды, содержащей 20, 60 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl_2 (7—8-месячные животные), или 20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl_2 , 20, 30 мМ KCl, 2,6 мМ CaCl_2 (3—4-месячные животные). Интенсивность секреции S_1 определяли соотношением вызванной секреции к спонтанной. После деполяризации срезы промывали нормальной средой Кребса-Рингера 30 мин и повторно определяли интенсивность секреции S_2 . У каждого среза интенсивность секреции определяли 3 или 5 раз (S_1 — S_3 или S_1 — S_5). У части срезов за 15 мин до повторных исследований интенсивности секреции (S_2 — S_5) в инкубационную среду добавляли 10^{-11} — 10^{-7} М L-НА («Serva», ФРГ). Спонтанную и вызванную секреции в этих срезах определяли в присутствии данной концентрации экзогенного НА. Из отношения интенсивности секреции в присутствии экзогенного НА к интенсивности секре-

ции в его отсутствие определяли влияние данной концентрации НА на интенсивность секреции $[^3\text{H}]$ НА—коэффициент регуляции секреции S [4]. На основании полученных величин S строили дозозависимую кривую активности аутоадренорецепторов. Точку пересечения этой кривой с осью абсцисс определяли как зону стабильной секреции [5]. Для статистической обработки полученных результатов использовали критерии Стьюдента— P_1 , Вилкоксона, для сопряженных пар— P_2 и Вилкоксона-Мана-Уитни— P_{11} .

Результаты исследований

Результаты исследований изменения интенсивности секреции при разной степени деполяризации при двух концентрациях Ca^{2+} представлены в таблице. Увеличение концентрации KCl с 20 до 60 мМ усиливает интенсивность секреции $[^3\text{H}]$ НА у 7—8-месячных животных в 2,87 раза. Увеличение концентрации CaCl_2 с 1,3 до 2,6 мМ при концентрации KCl 20 мМ повышает интенсивность секреции у 3—4-месячных животных в 1,44 раза. Увеличение концентрации KCl до 30 мМ, при CaCl_2 2, 6 мМ усиливает интенсивность секреции в этой группе животных в 3,18 раза по отношению к 20 мМ KCl , 1,3 мМ CaCl_2 и в 2,21 раза по отношению к 20 мМ KCl , 2,6 мМ CaCl_2 .

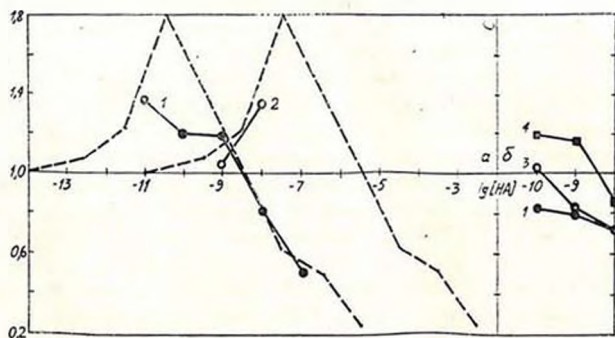


Рис. Зависимость активности аутоадренорецепторов у 7—8-месячных (а) и 3—4-месячных (б) животных от концентрации экзогенного норадреналина при деполяризации срезов коры мозга крыс 20 мМ KCl , 1,3 мМ CaCl_2 (1); 60 мМ KCl , 1,3 мМ CaCl_2 (2); 20 мМ KCl , 2,6 мМ CaCl_2 (3); 30 мМ KCl , 2,6 мМ CaCl_2 (4). Пунктирная линия—теоретическая кривая зависимости активности аутоадренорецепторов от концентрации норадреналина [1—3]. По оси абсцисс—логарифм концентрации норадреналина, по оси ординат—коэффициент регуляции секреции S

У всех пяти групп животных была исследована активность аутоадренорецепторов. Результаты исследований, проведенных на 7—8-месячных животных, представлены на рис., а. График зависимости активности аутоадренорецепторов от концентрации экзогенного НА у этих жи-

вотных при 20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl₂ подробно описан в предыдущих работах [4, 5]. При данных условиях эксперимента зона стабильной секреции равна $5,5 \cdot 10^{-9}$ М НА. При увеличении концентрации KCl до 60 мМ, усиливающей интенсивность секреции [³H] НА в 2,87 раза, характер зависимости активности ауторецепторов от концентрации экзогенного НА резко меняется. При концентрации 10^{-9} М НА наблюдается незначительное повышение интенсивности секреции [³H] НА ($C = 1,05 \pm 0,13$) вместо выраженного усиления секреции при 20 мМ KCl. Концентрация экзогенного НА (10^{-8} М) при 60 мМ KCl достоверно усиливает интенсивность секреции ($C = 1,37 \pm 0,11$; $P_n < 0,05$) вместо достоверного уменьшения интенсивности секреции при 20 мМ KCl. Разница между величинами C в данной точке при 20 и 60 мМ KCl также достоверна ($P_n < 0,01$).

Как видно из рис., а, при 20 мМ KCl зона стабильной секреции образуется на основании обратной зависимости величины C от концентраций экзогенного НА 10^{-9} , 10^{-8} М. При 60 мМ KCl эти концентрации НА приводят к дозозависимому возрастанию величины C, которое свойственно β-аутоадренорецептору. Таким образом, зависимость активности аутоадренорецепторов от концентрации НА сдвигается настолько, что концентрации 10^{-9} , 10^{-8} М НА активируют уже β-аутоадренорецептор. Для наглядности на рис., а пунктирными линиями представили теоретически полученный график [2, 3] так, чтобы он практически совпадал с экспериментальными кривыми (в одном случае — с кривой 1, а в другом — с кривой 2). Из рис., а видно, что при увеличении концентрации KCl с 20 до 60 мМ, усиливающей интенсивность секреции [³H] НА в 2,87 раза, кривые активности аутоадренорецепторов сдвигаются в сторону высоких концентраций НА, а зона стабильной секреции увеличивается в 1000 раз.

Результаты исследований, проведенных на 3—4-месячных животных, представлены на рис., б. График зависимости активности аутоадренорецепторов от концентрации экзогенного НА у этих групп животных при 20 мМ KCl, 1,3 и 2,6 мМ CaCl₂ подробно описаны в предыдущей работе [5]. В присутствии 1,3 мМ CaCl₂ зона стабильной секреции с использованием теоретического графика приравнивается к $2,4 \cdot 10^{-11}$ М НА, а в присутствии 2,6 мМ CaCl₂ — $2,4 \cdot 10^{-10}$ М НА. При деполяризации срезов 30 мМ KCl, 2,6 мМ CaCl₂ концентрация экзогенного НА 10^{-10} М усиливает интенсивность секреции [³H] НА ($C = 1,18 \pm 0,06$; $P_z = 0,01$), достоверно отличаясь от того же показателя при 20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl₂ ($P_t < 0,05$). Концентрация НА 10^{-9} М также усиливает интенсивность секреции ($C = 1,16 \pm 0,06$; $P_z < 0,05$), достоверно отличаясь от того же показателя при 20 мМ KCl, 1,3 и 2,6 мМ CaCl₂ ($P_t < 0,01$). При 10^{-8} М НА интенсивность секреции уменьшается ($C = 0,86 \pm 0,04$; $P_z < 0,01$), но незначительно отличается от данного показателя при 20 мМ KCl. Как видно из рис., б, зона стабильной секреции при 30 мМ KCl и 2,6 мМ CaCl₂ соответствует $6 \cdot 10^{-9}$ М НА. Таким образом, проведенные исследования показали пропорциональную зависимость между изменениями интенсивности секреции НА и зоной

стабильной секреции. Чем больше интенсивность секреции, тем выше зона стабильной секреции.

Анализ величин интенсивности секреции [^3H] НА показал, что зона стабильной секреции, в отличие от интенсивности секреции, является индивидуальным для каждого животного показателем, обладающим достаточно большой вариабельностью. Например, в группе 7—8-месячных животных при 20 мМ КСl и 1,3 мМ СаСl₂ коэффициент вариации S равен 14,2%, а коэффициент вариации зоны стабильной секреции равен 135,7%. Вследствии этого изменения зоны стабильной секреции могут выявляться при достаточном изменении степени деполяризации, или, что одно и то же, при достаточном изменении интенсивности секреции. Групповой характер зоны стабильной секреции проявляется в сравнении результатов, полученных при исследовании 7—8- и 3—4-месячных животных. Средние величины интенсивности секреции [^3H] НА в этих группах при 20 мМ КСl и 1,3 мМ СаСl₂ не отличаются (таблица), а величины S у 7—8-месячных животных достоверно выше, чем у 3—4-месячных при 10^{-10} и 10^{-9} М НА ($P < 0,01$, рис., а и б). Зона стабильной секреции у 7—8-месячных крыс в 230 раз выше, чем у 3—4-месячных при коэффициенте вариации зоны стабильной секреции у 3—4-месячных животных—106,4%. Такой сдвиг зоны стабильной секреции связан, по-видимому, с возрастными изменениями у животных. Так как зона стабильной секреции определяется как концентрация секретируемого НА, а интенсивность секреции, то есть количество секретируемого НА в этих группах не отличается, то причиной увеличения концентрации, которая создается секретируемым НА, может быть уменьшение свободного межклеточного пространства мозга, вызванное возрастными морфологическими изменениями, например, ростом и делением ганглийных клеток или другими морфологическими изменениями.

Обсуждение результатов

Таким образом, проведенные теоретические [3] и экспериментальные исследования показали прямую зависимость между интенсивностью секреции НА и уровнем зоны стабильной секреции: чем выше интенсивность секреции, тем выше уровень зоны стабильной секреции. Следовательно, увеличение степени деполяризации, повышение внеклеточной концентрации Са²⁺ и увеличение частоты стимуляции, усиливающие секрецию НА, повышают уровень зоны стабильной секреции, сдвигая чувствительность аутоадренорецепторов в сторону высоких концентраций НА. Было показано [6], что активность α -аутоадренорецептора уменьшается при увеличении частоты стимуляции или повышении концентрации Са²⁺. Исследования в основном проводили при одной концентрации лиганда. Полученные нами результаты показывают, что уменьшение активности α -аутоадренорецепторов, наблюдаемое в этих работах, в основном, связано со сдвигом всей кривой активности рецептора в сторону высоких концентраций НА (рис., б). В литературе имеется указание [7]

на то, что при увеличении интенсивности стимуляции активность β -ауто-рецептора уменьшается. Эти результаты также получены при одной концентрации агониста. Если бы при исследовании 7—8-месячных животных мы использовали бы только концентрацию 10^{-9} М НА, то на основании полученных результатов при данной концентрации сделали бы точно такой вывод, как и авторы цитируемой работы.

Таблица

Интенсивность секреции [3 H] норадреналина из срезов коры мозга крыс

Группы животных	Условия деполяризации	Сер	Количество животных	P _i
7—8-месячные животные	20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl ₂	2,15±0,09	13	<0,001
	60 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl ₂	6,28±0,37	5	
3—4-месячные животные	20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl ₂	2,18±0,11	8	<0,01
	20 мМ KCl, 2,6 мМ CaCl ₂	3,14±0,26	8	
	30 мМ KCl, 2,6 мМ CaCl ₂	6,93±0,48	11	

На основании полученных данных можно объяснить результаты работ, указывающих на отсутствие активности α -аутоадренорецепторов при чрезмерной интенсивности стимуляции [6] и ее появление при уменьшении концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде. Чрезмерная интенсивность стимуляции настолько сдвигает чувствительность аутоадренорецепторов, что исследуемые концентрации лигандов оказываются ниже чувствительности рецепторов. Уменьшение внеклеточной концентрации Ca^{2+} снижает уровень зоны стабильной секреции, то есть чувствительность ауторецепторов увеличивается, сдвигаясь вниз по концентрации НА, вследствие чего и исследуемая концентрация лиганда опять попадает в зону чувствительности ауторецептора.

Теоретический анализ предсказал [3], что изменение частоты импульсации, в первую очередь, влияет на активность аутоадренорецепторов, следствием чего является изменение интенсивности секреции медиатора. Такая последовательность событий определяется как прямая реакция, так как основным способом перекодировки информации в мозгу является частота импульсной активности. Для экспериментального увеличения интенсивности секреции были использованы или высокие концентрации Ca^{2+} при одинаковой степени деполяризации, или более интенсивная деполяризация. Данный способ увеличения интенсивности секреции был применен для определения зависимости изменения активности аутоадренорецепторов от изменения интенсивности секреции (обратная связь).

Возможные механизмы сдвига кривых активности аутоадренорецепторов и уровня зоны стабильной секреции при изменении частоты импульсации подробно обсуждены ранее [3]. Пресинаптические адренорецепторы осуществляют регуляцию секреции НА через ряд ферментативных реакций: аутоадренорецептор—аденилатциклаза (АЦ)—сАМР— Ca^{2+} -канал [6].

Увеличение степени деполяризации или концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде приводит, в первую очередь, к повышению Ca^{2+} -тока внутрь терминалей, что влияет на регуляцию Ca^{2+} -зависимых процес-

сов (активности протеинкиназной и АЦ-реакции) [8]. Так как количество открываемых Ca^{2+} -каналов определяется содержанием сАМР, осуществляющей протеинкиназную реакцию в присутствии Ca^{2+} , то логично предположить, что количество открываемых Ca^{2+} -каналов и активность АЦ находятся в состоянии динамического равновесия. Следовательно, увеличение Ca^{2+} -тока влияет на активность АЦ. Последняя, в свою очередь, аллостерическим механизмом [8] изменяет активность аутоадренорецепторов, что в конечном счете приводит к сдвигу кривых активности аутоадренорецепторов так, как это проявляется в наших исследованиях. Возможно, что обратная реакция (повышение Ca^{2+} -тока, увеличение интенсивности секреции—повышение зоны стабильной секреции) осуществляется описанным выше способом.

DEPENDENCE OF AUTOADRENORECEPTORS ACTIVITY FROM THE INTENSIVITY OF NORADRENALINE SECRETION

BAZYAN A. S., KRYGLIKOV R. I.

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

Dependence of the index of the zone of stabile secretion (between α and β presynaptic adrenoreceptors) from the intensivity of ^3H -NA secretion in tangential slices of rat parietal lobe has been studied. The slices have been depolarized by increasing KCl concentration from 4,8 to 20, 30 and 60 mM in the presence of 1,3 and 2,6 mM CaCl_2 in the media. In 7—8 months old animals increase of KCl from 20 to 60 mM (CaCl_2 —1,3 mM) enhances ^3H -NA secretion 2,8-fold and leads to a 1000-fold increase in NA concentration in a stabile secretion zone. In 3—4 months-old animals depolarization was carried out with 20 mM KCl/1,3 mM CaCl_2 , 20 mM KCl/2,6 mM CaCl_2 , 30 mM KCl/2,6 mM CaCl_2 . Intensivity of ^3H -NA secretion enhanced 1,44, 2,21 and 3,18-fold, and NA concentration, corresponding to the zone of stabile secretion, increased 10, 25 and 250-fold, respectively. Thus, a correlation between the intensivity and the zone of secretion has been established. The possible mechanisms of this phenomenon are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Базян А. С., Бродский Б. А. Биофизика, т. 28, № 5, с. 858—862, 1983.
2. Базян А. С. Биофизика, т. 29, № 3, с. 470—472, 1984.
3. Базян А. С., Беркинблит М. Б., Бродский Б. А. Биофизика, т. 29, № 5, с. 895—898, 1984.
4. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 172—179, 1986.
5. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 231—240, 1986.
6. Базян А. С. Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—126, 1981.
7. Celuch S. M., Dubocovich M. L., Langer S. Z. Brit. J. Pharmacol., v. 63, № 1, p. 97—109, 1978.
8. Глзбов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1987.

Поступила 25. VI 1987