

УДК 577.153.4:612.815.8

СВЯЗЫВАНИЕ [³H] ДОФАМИНА ДА₂-РЕЦЕПТОРАМИ
СИННАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН РАЗЛИЧНЫХ
ЗОН МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ОБУЧЕНИЯ
УСЛОВНОЙ РЕАКЦИИ ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ

ПОДГОРНАЯ Е. К., ГАЛКИНА О. В., ИЛЮЧЕНОК Р. Ю.

Институт физиологии СО АМН СССР, Новосибирск*

Установлено, что у животных, обученных условной реакции пассивного избегания (тестирование через 24 ч), наблюдается значительное увеличение рецепторной плотности дофаминовых рецепторов в четырех областях мозга (фронтальной коре, миндалии, гипоталамусе, стриатуме) в сравнении с интактными. Этот феномен сопровождался появлением в мозговой ткани значительных количеств *n*-тирамина (*n*-ТА).

Содержание дофамина (ДА) при этом заметно снижалось в стриатуме и увеличивалось в коре, миндалии и гипоталамусе. Полученные результаты позволяют предположить непосредственное участие постсинаптических ДА₂-рецепторов в механизмах обучения.

Известно, что наибольшим средством к природному медиатору— ДА обладают ДА₂-рецепторы с $K_d \sim 1$ нМ. Точная классификация этого типа рецепторов долгое время оставалась затруднительной. Одни авторы относили его к пресинаптическим высокоаффинным ДА-рецепторам на том основании, что они не связаны с ферментом аденилатциклазой и обладают наномолярным средством к ДА [1]. Другие полагали, что ДА₂-рецепторы являются подтипом ДА₁-рецепторов, поскольку они связываются бромкриптином [2]. В настоящее время экспериментально доказано, что этот тип рецепторов локализован на постсинаптической мембране, обладает наномолярным средством к ДА и микромолярным—к нейролентикам [3, 4] и связывает [³H] ДА в присутствии аскорбиновой кислоты и паргиллина [5, 6]. Его классифицируют или как постсинаптические ДА₂-рецепторы [3], или выделяют в отдельный ДА₃-рецепторный тип [4].

Биологическая роль как ДА₂-, так и ДА₃-рецепторов до конца не выяснена, хотя показано участие дофаминовых рецепторов в процессах памяти [7—9]. Так, введение крысам галоперидола—специфического блокатора ДА₂-рецепторов нарушает воспроизведение условной

* Данная статья подверглась серьезному разбору компетентными рецензентами. Поскольку некоторые из положений статьи так и не нашли удовлетворительного объяснения со стороны авторов, статья печатается в дискуссионном порядке.

реакции пассивного избегания (УРПИ), несмотря на компенсаторное ускорение синтеза и кругооборота ДА [9—11].

Что касается тирамина, то он является минорным симпатомиметическим амином, который может функционировать как альтернативный трансмиттер, либо как котрансмиттер [12—13]. По современным данным, эндогенный тирамин содержится в ингностриатных дофаминергических нервных терминалях, уровень этого амина контролируется тирозингидроксилазой, ферментом-маркером для катехолинергических нейронов [12]. Известно, что хотя основное количество ДА в мозгу синтезируется из ДОФА, небольшое его количество может образовываться из *n*-ТА при реализации побочного пути образования норадреналина и адреналина через тирамин и октопамин. До сих пор в литературе не рассматривался вопрос взаимосвязи содержания тирамина с функционированием дофаминовых рецепторов. Не известны также работы по исследованию изменений параметров [³H] дофаминового связывания в процессах обучения [14].

В настоящей статье предпринята попытка оценить вклад постсинаптических ДА₂-рецепторов в нейрохимические механизмы обучения.

Материалы и методы

Исследования проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 160—180 г, интактных и после физиологического воздействия. Животных обучали УРПИ при однократном электрокожном раздражении в течение 6 с и силой тока $I=1$ мА [15]. Тестирование проводили через 24 ч; обученными считались крысы, показавшие латентный период «перехода» из светлой камеры в темную, равный 180 с. Сразу после тестирования животных декапитировали.

Фронтальную кору, гипоталамус, миндалину и стрiatum от 3—5 контрольных и обученных крыс выделяли, гомогенизировали на льду в 9 объемах 0,32 М сахарозы в 10 мМ трис-НСl, 2 мМ ЭДТА, рН 7,4. [³H] ДА-связывание проводили по методу Moggi, Hsu [6] с некоторыми модификациями. Гомогенат отмывали от эндогенного ДА центрифугированием при 4° 50 000 г в течение 20 мин. В полученном таким образом супернатанте определяли содержание катехолов методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Осадок ресуспендировали в 0,2 М К²-фосфатном буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, 1 мМ диэтилотриэтиламина, 0,2% аскорбиновой кислоты и 1 мкМ паргиллина, рН 7,4. Аликвоты гомогената, содержащие 0,5 мг белка инкубировали с различными концентрациями [³H] ДА при 3° в течение 17 ч [3]. Конечный объем пробы при этом составлял 0,5 мл. Радиоактивность измеряли на жидкостном β-сцинтилляционном счетчике «Delta-30». Эффективность счета составляла 55%. Специфическое связывание определяли как разницу между радиоактивностью при наличии и отсутствии 1 мМ не радиоактивного ДА. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоурин. Кд и В_{max} определяли по методу Скэтчарда [16]. Кривую насыщения строили по связыванию [³H] ДА в

области концентраций от 0,2 до 2,4 нМ (не менее 10 точек; рис. 1). Связывание проводили в триплетах. Обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента.

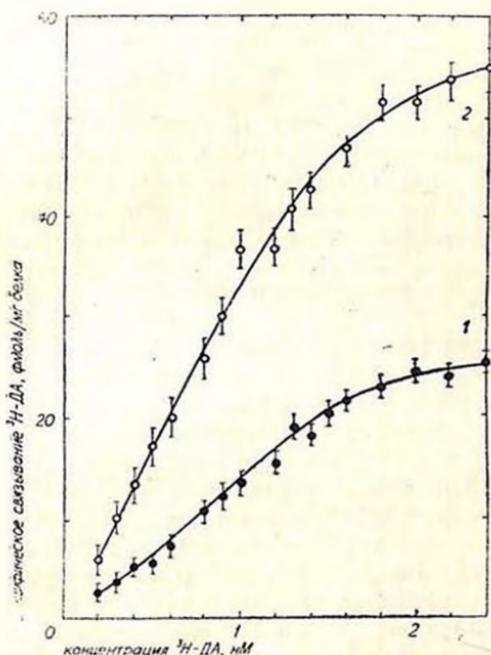


Рис. 1. Специфическое связывание $[^3H]$ дофамина синаптическими мембранами гомогената фронтальной коры мозга: 1—интактные крысы, 2—после обучения условной реакции пассивного избегания. Специфическое связывание определяли как разницу между радиоактивностью в присутствии и в отсутствие 1 мМ нерадиоактивного дофамина. По оси абсцисс—концентрация $[^3H]$ дофамина, нМ, по оси ординат—величина специфического связывания $[^3H]$ дофамина, фмоль/мг белка.

Катехолы (ДА, *n*-ТА, ДОФУК—3,4-диоксифенилуксусная кислота, ДОФА—3,4-диоксифенилаланин, НА—норадреналин) определяли в супернатанте методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией на приборе фирмы «ЛКВ» (Швеция). Условия хроматографии были следующие: колонка из нержавеющей стали размером 250×4 мм, упакованная сорбентом для обращенно-фазовой хроматографии «Lichrosorb RP-18» с размером частиц 5 мкм («ЛКВ», Швеция); подвижная фаза, приготовленная на бидистиллированной воде, содержащая 0,1 М NaH_2PO_4 , 1 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, 5 мг/л октилсульфоната натрия и 10% (по объему) метилового спирта, pH 4,0. Скорость элюции составляла 1 мл/мин. Потенциал стеклоуглеродного электрода устанавливали равным $\pm 0,65$ в. Катехолы адсорбировали на микроколонке с Al_2O_3 (27–30 мг), промывали микроколонку водой и элюировали кате-

зола 100—500 мкл 0,1 н. HCl [17]. Элюат (50—200 мкл) вводили микрошприцем («Rheodyne» Inc., США) в колонку для ВЭЖХ. Для расчета содержания ДА и *n*-ТА в тканях мозга в пробы сувернатанта добавляли 50—70 нг стандарта ДОБА (3,4-диоксбензиламин) и Ин (Изопротеренол) [17, 18]. Статистическую обработку полученных данных проводили по *t*-критерию Стьюдента.

В работе использовали реактивы ДА, ДОФУК, НА, ДОБА, ЭДТА, SOS (октилсульфат натрия), ДТТ («Sigma», США), *n*-ТА, 3-МТ (3-метокс-4-оксифенилэтиламин), ГВК (4-окс-3-метоксфенилуксусная кислота; «Merck», ФРГ), ДОФА («Reanal» ВНР), 7,8 [³H] ДА (51 Ки/ммоль), «Amersham» (Англия). Все остальные реактивы отечественного производства марки ос.ч или перекристаллизованные.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены параметры связывания [³H] ДА постсинаптическими ДА₂-рецепторами из четырех областей мозга интактных крыс и после обучения УРПИ. Во всех указанных областях мозга обучившихся крыс зафиксировано значительное увеличение рецепторной плотности этого типа рецепторов в сравнении с интактными. Этот феномен для дофаминовых рецепторов обнаружен впервые, и сам подход рассмотрения роли ДА₂-рецепторов в нейрохимических механизмах обучения в литературе не обсуждался. Описано только участие дофаминовых рецепторов в регуляции психической деятельности человека в норме и патологии [5, 20], а феномен изменения рецепторной плотности ДА₂-рецепторов отдельные авторы связывают исключительно с патогенезом психических и неврологических заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и инзофрения.

Зарегистрированное нами изменение рецепторной плотности ДА₂-рецепторов в указанных областях мозга обученных крыс сопровождалось изменением содержания катехолов, измеренных одновременно с параметрами связывания [³H] ДА. Так, во фронтальной коре, миндалине и гипоталамусе зарегистрировано появление больших количеств *n*-ТА (рис. 2, табл. 2), а в стриатуме—значительное увеличение его в сравнении с интактными животными (табл. 2). Вопрос взаимосвязи содержания *n*-ТА с функционированием ДА-рецепторов в литературе до сих пор не обсуждался. Обычно *n*-ТА относят к минорным симпатсиметическим биогенным аминам; его максимальное количество в тканях мозга крыс составляет не более 50 нг/г ткани [12]. Приведенные нами значения концентрации *n*-ТА в коре, миндалине, гипоталамусе и стриатуме сравнимы с содержанием ДА—основного биогенного амина. Это позволило нам предположить, что значительные количества *n*-ТА, появляющиеся в мозгу обученных крыс, могут быть связаны с функционированием дофаминовых рецепторов.

Принципиальная возможность нетрадиционного пути превращения ДА в *n*-ТА была показана нами в экспериментальной системе, где эндогенный ДА, преддублированный с мембранной фракцией ткани

Таблица 1

Параметры связывания [^3H] дофамина постсинаптическими DA_2 -рецепторами
синаптических мембран различных зон мозга крыс интактных и после
обучения условной реакции пассивного избегания ($\text{M} \pm \text{m}$,
тестирование через 24 ч)

Область параметры связывания	Кора n=30		Миндалина n=35		Гипоталамус n=30		Стриатум n=25	
	интактные	обучив- шиеся	интактные	обучив- шиеся	интактные	обучив- шиеся	интактные	обучив- шиеся
V_{max} фмоль/мг белка	25 ± 1	$56 \pm 2^*$	27 ± 1	$43 \pm 1,2^*$	$21 \pm 0,8$	$40 \pm 1^*$	30 ± 1	$52 \pm 1,3^*$
K_d пМ	$1,0 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,08$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,08$	$0,8 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,09$	$0,8 \pm 0,07$

Примечание. * $p < 0,01$ в сравнении с интактными животными, n—число животных.

Таблица 2

Содержание катехолов во фронтальной коре, миндалине, гипоталамусе, стриатуме
мозга интактных крыс и при обучении условной реакции пассивного
избегания (нг/г ткани, $\text{M} \pm \text{m}$)

Область катехолов нг/г	Фронтальная кора		Миндалина		Гипоталамус		Стриатум	
	интактные n=12	обученные n=12	интактные n=1	обученные n=12	интактные n=12	обученные n=15	интактные n=2	обученные n=15
ДОФА	1939 ± 600	$405 \pm 162^*$	—	—	3359 ± 212	$511 \pm 150^*$	4998 ± 1000	$836 \pm 205^*$
ДА	274 ± 72	$824 \pm 250^*$	244 ± 0	725 ± 93	364 ± 4	$624 \pm 87^*$	8000 ± 930	$1419 \pm 339^*$
n-ТА	н. д.	$738 \pm 3,1$	н. д.	565 ± 158	н. д.	260 ± 81	1024 ± 300	$4827 \pm 1239^*$
ДОФУК	72 ± 50	65 ± 33	167 ± 96	$1,6 \pm 74$	143 ± 35	142 ± 35	840 ± 150	$70 \pm 7^*$
НА	1512 ± 140	$169 \pm 36,9$	1134 ± 330	966 ± 288	2596 ± 637	2083 ± 512	503 ± 140	523 ± 156

Примечание. н. д.—нет детекции; — не определяли; * $p < 0,05$ по сравнению с ин-
тактными, n—число животных.

мозга обучившихся крыс, подвергался воздействию активных частиц (валентно-несвязанных электронов и радикалов ОН), генерируемых при микроразрядном электрорадиолизе раствора электролита. В продуктах воздействия детектировался *n*-ТА в значительном соотношении к введенному в систему 1 мМ ДА. В контрольных растворах ДА и ДА, преникубированного с мембранами мозга интактных и необучавшихся крыс, в этих же условиях воздействия *n*-ТА не образовывался [22].

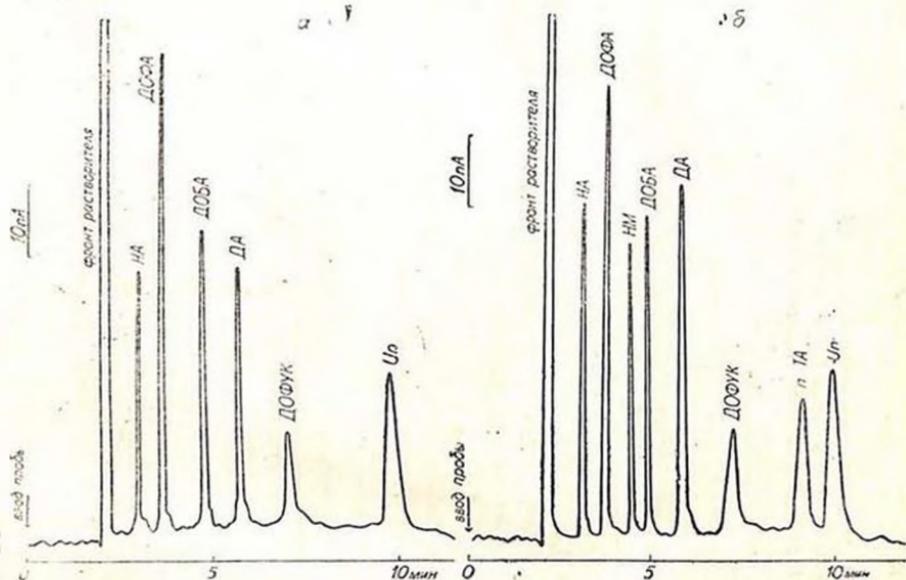


Рис. 2. Хроматограммы катехолов супернатантов гомогенатов фронтальной коры мозга: а—интактной крысы, б—после обучения условной реакции пассивного избегания.

Одновременно с появлением *n*-ТА в мозгу обученных животных были обнаружены изменения уровня ДА: достоверное увеличение его количества во фронтальной коре, миндалине и гипоталамусе и значительное снижение в стриатуме (табл. 2). Характер полученных изменений содержания ДА согласуется с литературными данными. Так, Gold и Welch обнаружили снижение уровня ДА в неостриатуме и повышение его в неокортексе при изучении регионарного содержания катехоламинов в мозгу крыс через 10 мин после выработки УРПИ [23]. Nergam и соавт. показали возрастание уровня ДА в миндалевидном комплексе после обучения крыс УРПИ [24].

Следует добавить, что отсутствие тестирования через 24 ч после выработки УРПИ в наших экспериментах не изменяло содержания катехолов и параметров специфического связывания [³H] ДА ДА₂-рецепторами во фронтальной коре, миндалине, гипоталамусе, стриатуме мозга крыс по сравнению с данными, полученными при тестировании.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что увеличение рецепторной плотности постсинаптических DA_2 -рецепторов, феномен появления *p*-ТА, изменение содержания ДА и достоверное снижение уровня ДОФА у обученных животных, связаны между собой и обуславливают процесс формирования следа памяти. Следовательно, участие постсинаптических DA_2 -рецепторов в нейрохимических механизмах обучения может приводить к изменению пути обычного метаболизма.

PARAMETERS OF $[^3H]$ DOPAMINE BINDING BY DA_2 -RECEPTORS OF SYNAPTIC MEMBRANES OF VARIOUS REGIONS OF THE RAT BRAIN AFTER CRPA LEARNING

PODGORNAYA E. K., GALKINA O. V., ILYUCHENOK R. Yu.

Institute of Physiology, Siberian Branch, USSR Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

We have established that in animals subjected to training for the conditioned reflex of passive avoidance, CRPA (testing after 24 h) there was a marked increase in the receptor density of dopamine receptors in several brain regions including frontal cortex, amygdala, hypothalamus and striatum, as compared with naive animals. This phenomenon was accompanied by the appearance in brain tissue of marked levels of *p*-tyramine (*p*-TA). The level of dopamine (DA) markedly diminished in striatum and increased in the cortex, amygdala and hypothalamus. These data lead to a hypothesis about the direct involvement of postsynaptic DA_2 -receptors in mechanisms of learning.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Kelly M. J. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., v. 250, p. 18—29, 1981.
2. Creese J.—In: Proc. Amer. Coll. Neuropsychopharmacol., San Diego, p. 34, 1981.
3. Niclancort K., Noshiro O., Sano K., Maeno H. J. Biol. Chem., v. 255, № 22, p. 10919—10915.
4. Leff S. E., Creese I. Nature, v. 306, № 5943, p. 586—589, 1983.
5. Seeman P., Titeler M., Tedesco J. et al. Adv. in Biochem. Psychopharmacol, v. 19 p. 167—176, 1978.
6. Morrot K., Hsu L. L. J. of Neurosci. Res., v. 12, № 3, p. 113—128, 1984.
7. Кругликов Р. И.—В кн.: Нейрохимические механизмы обучения и памяти, с. 210, М., Наука, 1981.
8. Ильюченко Р. Ю., Дубровина Н. И., Винницкий И. М. Ж.В.Н.Д., т. 37, № 6, с. 1148—1153, 1987.
9. Quartermain D.—In The physiological basis of memory, p. 337—43. Acad. Press., 1983.
10. Beatty W. W., Rush J. R. Pharmacol. Behav., v. 18, № 3, p. 7—12, 1983.
11. Antsman H., Zacharko R. M. Pharmacol. Biochem. and Behav., v. 17, № 2, p. 263—269, 1982.
12. Acer G. B., Dyck L. E.—In: Neuromethods N. Y. The Humana Press, v. 2, p. 477—478, 1985.

13. *Phillips S. R., Davis P. A., Durden D. A., Boulton A. A.* Can. J. Biochem., v. 53, p. 65—69, 1975.
14. *Seeman P.* Pharmacol. Rev., v. 32, p. 229—287, v. 5, 1975.
15. *Jarvic M. E., Kopp R.* Psychol. Rev., v. 21, p. 221—224, 1967.
16. *Scatchard G.* Ann. N. Y. Sci., v. 51, p. 660, 1949.
17. *Sundberg D. K., Bennet B. A., Morris M.* Physiol. Rev., v. 58, № 905, p. 493—511, 1978.
18. *Handfield H. G., Crane P.* et al. J. of Li. Chromatography, v. 8, p. 2689—2697, 1985.
19. *Sardar A., Juorio A. V., Boulton A. A.* Brain Res., v. 412, p. 370—374, 1987.
20. *Kaiser C., Jain T.* Medicinal Research Reviews, v. 5, p. 145—229, 1985.
21. *Ilyutchenok R. Yu., Dubrovina N. I., Podgornaja E. K., Galkina O. V.* The first Polish-Swedish symposium „Structure and Function in neuropharmacology“, p. 123, 1988.
22. *Подгорная Е. К., Галкина О. В., Поляков О. В.* Укр. биох. журн., т. 61, № 6, с. 27—31, 1989.
23. *Gold P. E., Welch K. A.* Behav. and Neural Biol., v. 47, № 2, p. 116—119, 1987.
24. *Herman J. P., Gullonneau D., Dantzer R. R.* et al. Life Sci., v. 30, p. 2207—2214, 1982.

Поступила 9. XI. 1989

C. U. M. SMITH. Elements of Molecular Neurobiology. J. Wiley and Sons, Battins Lane, Chichester, 538, 1989.

Элементы молекулярной нейробиологии

В восьмидесятые годы достигли очевидных успехов в понимании молекулярных основ нейробиологии. Молекулярный подход использован при изучении биологических мембран, белков, ионных каналов, элементов цитоскелета и нейроактивных пептидов. В настоящей книге сделана попытка свести воедино новые знания и показать, что молекулярный уровень исследований способствует выявлению процессов, происходящих в нервной системе в норме и патологии. Книга заинтересует специалистов, работающих в области фундаментальных и клинических нейронаук.