



УДК 612.822.1:615.832.9

**РЕЦЕПТОР-ЛИГАНДНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СТРУКТУРАХ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ****ЧИЖЕВСКАЯ И. В., ШИФМАН М. И., БАБИЧУК Г. А.***Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков*

В статье рассматривается влияние умеренного охлаждения на нейрорегуляторные процессы коры и гипоталамуса головного мозга крыс. Показано, что умеренная кранио-церебральная гипотермия ($30-32^{\circ}$) оказывает заметное влияние на пре- и постсинаптические процессы адренергической передачи в ЦНС. Существенную роль в механизмах терморегуляции в условиях гипотермии играет не только динамика высвобождения и обратного захвата норадреналина и серотонина, но и кинетика рецепторного опосредования действия терморегуляторных нейротрансмиттеров. На фоне наркоза умеренная кранио-церебральная гипотермия повышает афферентность связывания лигандов адренорецепторами.

Известно, что гипотермия приводит к активации центральных адренергических структур, высвобождению нейромедиаторов и возбуждению гипоталамических центров, контролирующих кортикотропную функцию гипофиза [1, 2]. В настоящее время значительный интерес представляет изучение взаимоотношения нейромедиаторов, типа рецепторов, через который опосредуют свое действие терморегуляторные нейротрансмиттеры в ЦНС, а также кинетических характеристик рецепторных взаимодействий при кранио-церебральной гипотермии (КЦГ).

Адренергические рецепторы в ЦНС влияют на выделение гормонов гипофиза и являются одним из звеньев регуляции гомеостаза, например, температуры, кровяного давления. Постсинаптические α_1 -адренорецепторы (АР) в целом медируют реакции возбуждения (например, сужение сосудов), а пресинаптические α_2 -АР—тормозящее воздействие (уменьшение высвобождения норадреналина (НА) во время раздражения нерва) [9]. На фоне наркоза умеренные уровни охлаждения (температура тела $30-32^{\circ}$) способны обеспечить блокаду ЦНС.

Целью наших исследований было изучение влияния умеренного охлаждения на нейрорегуляторные процессы, а именно: на высвобождение [3 H]НА и обратный захват [3 H]серотонина (5-ОТ), кинетику радиолигандного связывания адренергических (α_1 , α_2 и β), а также имидазольных рецепторов. Изучение сопряженных с адезилатциклазой β -АР дает

возможность проследить не только изменение кинетики рецепторного связывания, но также динамику изменения физиологического ответа—по включению системы «вторичных мессенджеров» как следующего звена в цепи опосредования нейротрансмиттерной информации. Изучение этих процессов, по-видимому, способно дать представление об изменении процессов нейротрансмиттерной передачи в структурах головного мозга при КЦГ.

Материалы и методы

КЦГ наркотизированным крысам проводили на установке для программного охлаждения, созданной в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Ректальная температура ($T_{\text{г}}$) 34° соответствовала поверхностной гипотермии, $T_{\text{р}}$ $30\text{--}32^{\circ}$ —умеренному охлаждению. Используемый в эксперименте наркоз—20% γ -оксимасляная кислота (0,5 мл/100 г массы) + 5% тиопентал натрия (0,1 мл/100 г массы)—внутрибрюшинно.

Исследования проводили на 4-х экспериментальных группах: I—интактные животные; II—наркотизированные животные без охлаждения; III—животные с поверхностной гипотермией ($T_{\text{р}}$ 34°); IV—животные с умеренной гипотермией ($T_{\text{р}}$ $30\text{--}32^{\circ}$).

Из коры и гипоталамуса головного мозга крыс получали препарат синапсом по методу Hajos [3]. Препарат синаптических мембран из тех же структур получали ранее описанным способом [4]. Кинетические характеристики (K_d и количество мест связывания— B_{max}) адренорецепторов получали методом равновесного связывания меченых соединений с препаратом мембран синапсом. Реакционная смесь содержала 400 мкл суспензии мембран ($\approx 500\mu$) в 50 мМ трис-HCl буфере (pH 7,4), 50 мкл меченого лиганда и 50 мкл немеченого (или трис-HCl буферного раствора) на каждую пробирку. Связывание α_1 и α_2 адренорецепторов проводили [^3H] WB 4101 и [^3H]нохимбином соответственно, связывание β -АР [^3H]дигидроальprenололом происходило в присутствии 10 мМ MgCl_2 , имипраминовых рецепторов—[^3H]имипрамином в присутствии 120 мМ NaCl + 5 мМ KCl. Разделение связанного и свободного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования через стекловолокнистые фильтры GF/C («Whatman», Англия) при температуре $0\text{--}4^{\circ}$. Величину специфического связывания определяли по разнице между уровнем связывания в отсутствие и в присутствии немеченого лиганда. Анализ кривых связывания в координатах Скэтчарда [5, 6] проводили с учетом модели комплексообразования лигандов с несколькими типами центров связывания.

Активность аденилатциклазной системы (АЦ-системы) определяли по скорости накопления cAMP в препарате синаптических мембран [7]. Конечную концентрацию cAMP определяли, используя стандартный набор реактивов «Cyclic AMP-assay Kit» («Amersham», Англия).

Изучение транспорта нейромедиаторов проводили путем инкубации

синапсом (3,5 мин при 37°) в солевом буфере Кребса-Рингера с $[^3\text{H}]$ нейромедиаторами (конечные концентрации—0,1—1,0 мкМ). Процесс аккумуляции нейромедиаторов останавливали добавлением 5 мл буфера и последующей быстрой фильтрацией через мембранные фильтры «Супрог-5» (диаметр пор—0,45 мкм), которые дважды промывали 0,15 М NaCl. Концентрацию меченого медиатора определяли измерением радиоактивности. Кинетические параметры захвата— K_m и максимальную скорость захвата (V_{max})—вычисляли по методу наименьших квадратов [8].

Для изучения K^+ -индуцированного высвобождения $[^3\text{H}]$ нейромедиаторов синапсосомы, «нагруженные» мечеными медиаторами, из инкубационной среды переносили аликвотами по 0,5 мл на стеклофильтры «Whatman GF/C» и промывали деполяризующим раствором Кребса-Рингера с концентрацией ионов калия 60 мМ. Высвобождение $[^3\text{H}]$ нейромедиаторов определяли как разность значений радиоактивности фильтров контроля, то есть промытых обычным раствором Кребса-Рингера, и фильтров, промытых деполяризующим раствором.

Результаты и обсуждение

Динамика изменений кинетических параметров α -рецепторов по диаграмме (рис. 1) указывает на то, что в условиях наркоза понижается сродство лигандов к рецепторам (особенно резко это выражено в случае α_1 -АР). K_d возрастает примерно в 3 раза. При анализе кривых связывания в координатах Скэтчарда при температуре 32° график для α_1 -АР имеет нелинейный характер (рис. 2), что говорит о наличии двух популяций данного типа рецепторов с различными K_d (рис. 1). Если общую

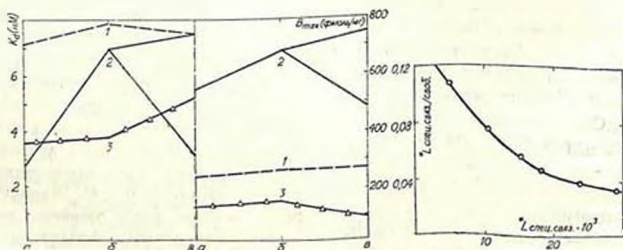


Рис. 1. Влияние краниоцеребральной гипотермии (КУГ 32°) на параметры связывания $[^3\text{H}]$ нохимбина (α_2 -АР, 1), $[^3\text{H}]$ WB 4101 (α_1 -АР, 2) $[^3\text{H}]$ имипрамина (имипраминаовс Р, 3) препаратом мембран синапсом коры и гипоталамуса головного мозга крыс: а—норма, б—контроль наркоза, в—КУГ—32°

Рис. 2. Анализ кривых связывания $[^3\text{H}]$ WB 4101 препаратом мембран синапсом коры и гипоталамуса головного мозга крыс в координатах Скэтчарда (серия КУГ—32°)

популяцию рецепторов принять за 100%, то количество рецепторов с высокой степенью сродства составит примерно 40%. Для α_2 -АР, осуществляющих пресинаптическую регуляцию секреции НА, такой динамики не наблюдается. Это коррелирует с тем, что и суммарный уровень секреции НА в том же режиме гипотермии практически возвращается к исходным цифрам (рис. 3).

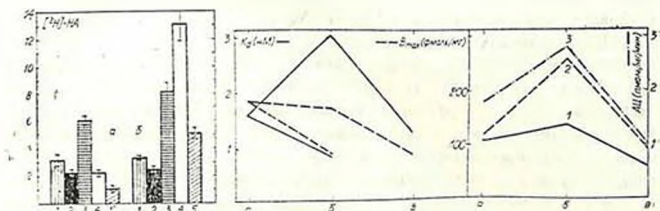


Рис. 3. Высвобождение $[^3H]$ норадренилина ($\times 10^4$ имп/мин/мг белка) синяпсомами коры (а) и гипоталамуса (б) головного мозга крыс в динамике КЦГ: 1—норма, 2—контроль наркоза, 3—начало охлаждения (15 мин), 4—КЦГ— 34° , 5—КЦГ— 30°

Рис. 4. Корреляция между характеристиками связывания $[^3H]$ дигидроаллопрекосола препаратом мембран синапсом коры и гипоталамуса головного мозга крыс (слева) и активностью аденилатциклазной системы (справа) и том же препарате без эффекторов (1), в присутствии 10^{-5} М изопро-теринола (2) и 10^{-4} М NaF (3): а—норма, б—контроль наркоза, в—КЦГ— 32°

Появление двух популяций α_1 -рецепторов при гипотермии (или при наркозе без охлаждения, как будет показано ниже для β -АР) может объясняться модификацией липидного окружения рецепторов таким образом, что насыщенность связывания неспецифическими компонентами будет находиться в пределах концентраций K_d и, следовательно, вытесняться 100-кратными концентрациями немеченого лиганда. График Скэтчарда при этом будет также нелинейен. Возможно, это отражает также разнонаправленный характер изменений кинетики радиолигандного связывания в коре и гипоталамусе, так как в данном эксперименте мы объединяли мембраны этих структур. Кроме того, появление популяции рецепторов с высоким и низким сродством может быть проявлением функциональной неоднородности рецепторов одного и того же фармакологического типа, что хорошо объясняется с позиций теории «кластеризации» [10].

Для β -АР нелинейный график Скэтчарда появляется во II экспериментальной группе. Доля рецепторов с высокой степенью сродства составляет 35%. При гипотермии популяция рецепторов с низким сродством исчезает, а значение K_d понижается до более низкого уровня, чем у интактных животных, однако и количество мест связывания уменьшается вдвое по сравнению с нормой (рис. 4).

Сопоставляя полученные данные с динамикой высвобождения $[^3H]$ НА структурами коры и гипоталамуса (рис. 3), мы видим, что на начальных этапах охлаждения (в коре и гипоталамусе) и на уровне $T_p - 34^\circ$ (в гипоталамусе) происходит массивный выброс НА. Полученные результаты можно интерпретировать как явление десенситилизации рецепторов в результате довольно длительного контакта с высокими концентрациями агониста. Для подтверждения этого вывода была исследована каталитическая активность АЦ-системы, сопряженной с β -АР.

Представленная диаграмма (рис. 4) демонстрирует показатели активности аденилатциклазы, выраженные в пмоль сАМР/мг белка/мин в присутствии изопротеринаола (10^{-5} М), NaF (10 мМ) и без применения афферторов. Наркоз усиливает степень активации АЦ-системы агонистом β -АР—изопротеринаолом, что коррелирует с появлением в этой серии эксперимента популяции рецепторов с высокой степенью сродства. Это снимает предположение о псевдоспецифике второй популяции мест связывания и говорит лишь о функциональной неоднородности β -АР. Отсутствие стимуляции АЦ-системы после применения КЦГ подтверждает вывод о десенситилизации β -АР, сопряженных с аденилатциклазой, в той же экспериментальной серии.

Таблица

Кинетические параметры захвата $[^3H]$ серотонина синаптическими коры и гипоталамуса головного мозга крыс

Серии эксперимента	К о р а		Гипоталамус	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Интактные животные	$0,26 \pm 0,05$	$15,61 \pm 1,62$	$0,69 \pm 0,02$	$16,94 \pm 1,20$
Наркотизированные животные без охлаждения	$0,58 \pm 0,15$	$21,36 \pm 5,19$	$1,72 \pm 0,47^*$	$21,01 \pm 4,93$
Животные с поверхностной гипотермией ($T_p - 34^\circ$)	$0,56 \pm 0,36$	$16,84 \pm 6,23$	$0,34 \pm 0,03^{**}$	$23,44 \pm 3,14$
Животные с умеренной гипотермией ($T_p - 32^\circ$)	$2,58 \pm 0,44^{**}$	$113,64 \pm 18,13^{**}$	$0,52 \pm 0,06^{**}$	$26,18 \pm 4,3$

Примечание. K_m —в мМ, V_{max} —в пмоль/мг белка·мин; различия по сравнению с контролем достоверны, $^*p < 0,05$; различия по сравнению с контролем наркоза достоверны, $^{**}p < 0,05$

Феномен десенситилизации является доказательством конформационных переходов в рецепторных белках [11]. Активация АЦ-системы NaF осуществляется посредством образования каталитически активного комплекса: N-белок-каталитическая субъединица аденилатциклазы (С) [12]. Согласно моделям Cassel, Selinger [12, 13], активация аденилатциклазы под влиянием медиаторов осуществляется через образование двойных белковых комплексов: рецептор—N-белок, затем—N-белок-С. При гипотермии на уровне $T_p - 32^\circ$ стимуляция АЦ-системы NaF отсутствует. Следовательно, можно полагать, что КЦГ является фактором, модулиру-

ющим не только изменения в рецепторных белках, но и угнетающим функциональную активность GTP-связывающего белка (N-белка) в звене N-белок-С.

Для более полной характеристики пресинаптических механизмов процесса нейротрансмиссии были исследованы кинетические параметры связывания имидазопиридиновых рецепторов, соответствующих местам обратного захвата 5-ОТ и кинетика обратного захвата [^3H]5-ОТ синаптическими коры и гипоталамуса (рис. 1, таблица).

КЦГ (34°) приводит к уменьшению K_m захвата [^3H]5-ОТ синаптическими, выделенными из гипоталамуса, по сравнению с контролем наркоза на 81%, то есть к возрастанию специфичности переносчика. Таким образом, гипотермия как бы нивелирует действие наркоза на процессы захвата. С понижением температуры тела специфичность переносчика падает примерно в 1,5 раза, а $V_{\max}$ имеет тенденцию к повышению, то есть эти процессы компенсируются, и захват остается практически на прежнем уровне.

Привлекает особое внимание динамика изменения процессов захвата [^3H]5-ОТ в коре. Кинетические параметры обратного захвата [^3H]5-ОТ синаптическими коры под действием наркоза и начального этапа охлаждения меняются незначительно. Умеренная гипотермия приводит к резкому увеличению K_m и $V_{\max}$ [^3H]5-ОТ. При тех же экспериментальных условиях в аналогичном препарате синаптических мембран происходит некоторое уменьшение сродства и мест связывания имидазопиридиновых рецепторов (рис. 1). Полученные результаты могут являться следствием уменьшения числа высокоаффинных переносчиков 5-ОТ и появления новой популяции переносчиков с низким сродством к субстрату как проявление компенсаторного механизма для сохранения системы захвата 5-ОТ. Столь резкие различия кинетических параметров обратного захвата [^3H]5-ОТ в структурах коры и гипоталамуса связаны, по-видимому, с тем, что при температуре тела 30° перепад температур между корой и гипоталамусом составлял 4° , то есть кора подвергается более интенсивному холодовому воздействию.

Таким образом, при КЦГ происходят взаимообусловленные изменения синаптических процессов, находящиеся в зависимости от температуры охлаждения. Наркоз и гипотермия вносят существенные изменения в кинетику пре- и постсинаптических процессов адренергической передачи в ЦНС. В рецепторном звене динамика этих изменений различна для каждого типа рецепторов. Общей закономерностью является в той или иной степени выраженное повышение специфичности рецепторов к лигандам (по сравнению с группой контроля наркоза) после применения гипотермии. Кроме того, КЦГ способна модулировать конформационные перестройки в рецепторных белках.

RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS IN RAT BRAIN STRUCTURES DURING HYPOTHERMIA

CHIZHEVSKAJA I. V., SHIFMAN M. I., BABIYCHUK G. A.

Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems, Ukr. SSR Acad. Sci., Kharkov

The effect of moderate cooling on the neuroregulatory processes in rat brain cortex and hypothalamus has been considered. Craniocerebral hypothermia (30–32°) exerted marked influence on pre- and post-synaptic processes of adrenergic transmission in CNS. The role of dynamics of noradrenaline and serotonin secretion, reuptake and kinetics of receptor binding in termoregulation mechanisms appeared to be significant. Against a background of anesthesia the moderate craniocerebral hypothermia increased the effectiveness of ligand binding.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сааков Б. А., Еремина С. А., Межера Э. П.—В сб.: Теоретические проблемы действия низких температур на организм, с. 154–162, Владимир, 1972.
2. Шифман М. И., Марченко В. С. Криобиология, № 4, с. 47–48, 1986.
3. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 483–489, 1975.
4. Зайцев С. В., Курочкин Н. Н., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. Биохимия, т. 49, № 7, с. 1127–1133, 1984.
5. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях, М., изд-во МГУ, 1982.
6. Klotz Irving M. Science, v. 217, p. 1247–1249, 1982.
7. Ткачук В. А., Балденков Г. Н. Биохимия, т. 43, с. 1097–1110, 1978.
8. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
9. Ланге С. Э.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов, с. 59–82, М., Медицина, 1982.
10. Васильков В. А. Итоги науки и техники, № 2, с. 141–190, 1984.
11. Глзбов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
12. Ткачук В. А. Укр. биохим. журн., т. 53, № 2, с. 5–27, 1981.
13. Cassel D., Sellinger Z. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., v. 75, № 9, p. 4155–4159, 1978.

Поступила 6. V 1988.