

## ◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© А. А. МОКРУШИН, В. Г. ШАЛЯПИНА, 2003

УДК 612.825.266.06:612.018:577.175.325].08

А. А. Мокрушин, В. Г. Шаляпина

### НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОРТИКОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ФАКТОРА В ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗАХ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЗОНЫ КОРЫ МОЗГА КРЫС

Институт физиологии им. И. П. Павлова (дир. — проф. Д. П. Дворецкий) РАН, Санкт-Петербург

Апликация кортикотропин-релизинг-фактора (КРФ) в концентрациях  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  М на переживающие срезы мозга вызывала активацию пре- и постсинаптических возбуждающих компонентов фокальных потенциалов, регистрируемых в срезах. Амплитуда и длительность АМПА- и НМДА-компонентов ВПСР при действии КРФ возрастали, тогда как амплитуда ГАМК<sub>B</sub>-опосредуемого ТПСР<sub>и</sub> уменьшалась. При большей концентрации КРФ ( $10^{-8}$  М) в клетках срезов регистрировались эпилептоподобные разряды. Эффекты КРФ были обратимы и при его отмывании устранялись. Длительное действие КРФ (90 мин) индуцировало в клетках срезов явления, аналогичные долговременной посттетанической потенциации. Полученные данные свидетельствуют о том, что КРФ обладает выраженными активирующими свойствами и оказывает влияние на глутамат- и ГАМКергические системы.

Application of corticotrophin-releasing factor (CRF) in concentrations of  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  M on the rat olfactory cortex slices induced activation of the pre- and postsynaptic excitatory components of the focal potentials recorded in the slices. The amplitude and duration of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic and N-methyl-D-aspartate components of postsynaptic evoking potentials increased upon exposure to CRF, while the amplitude of GABA<sub>B</sub>-mediated inhibitory postsynaptic potentials was suppressed. At higher concentrations of CRF ( $10^{-8}$  M) epileptiform charges were recorded in the cells. CRF effects were reversible and eliminated after washing. A long (90 min) exposure induced the phenomena similar to long-term posttetanic potentiation. The findings suggest that CRF has pronounced activating properties and affects the glutamatergic and GABAergic systems.

Кортикотропин-релизинг-фактор (КРФ) и КРФ-подобные эндогенные гипоталамические нейропептиды играют ключевую роль в реакции организма на разнообразные стрессы [8, 13]. В организацию стрессовых реакций активно вовлекается экстрагипоталамическая КРФ-система [12]. Она образована популяциями нейронов различных структур мозга, продуцирующих КРФ [17], а также специфическими рецепторами. К настоящему времени выделено 2 типа рецепторов: КРФ-1 и КРФ-2 [7, 15], причем КРФ-1-рецепторы, через которые опосредует свои эффекты КРФ, локализованы в коре, амигдале, обонятельной луковице и других структурах мозга [5, 16].

Экзогенное введение КРФ в мозговые структуры индуцирует разнообразный спектр поведенческих реакций, проявление которых зависит от исходного функционального состояния животных и дозы гормона. В таких исследованиях можно выявить закономерность, согласно которой КРФ дозозависимо усиливает поведенческие реакции [2, 8, 13]. Этот активирующий вектор действия КРФ на поведение означает наличие у него отчетливых нейротропных свойств. Внутрижелудочковое введение или микроапликация КРФ в отдельные области мозга, действительно, индуцирует в них возбуждающие эффекты, что проявляется в увеличении частоты спонтанных разрядов нейронов [3, 6, 9, 10, 18, 19]. Электрофизиологический механизм активирующего действия КРФ на экстрагипоталамические нейроны заключается, по-видимому, в деполаризации их цитоплазматической мембраны [3].

Несмотря на достигнутый прогресс в исследовании нейротропных эффектов КРФ, остаются неизвестными молекулярно-клеточные механизмы его взаимодействия с глутаматергической системой, широко представленной в мозге и являющейся одной из ключевых в развитии как нормальных, так и патологических процессов.

В данной работе представлены результаты исследований влияния экзогенного КРФ на электрофизиологические характеристики переживающих срезов обонятельной коры мозга крыс. Отметим, что в нижнем этаже этой сенсорной системы — обонятельной луковице — выявлены нейроны, продуцирующие КРФ, а также рецепторы типа КРФ-1 [5, 16, 17]. В обонятельной коре также обнаружено 2 подтипа глутаматных ионотропных рецепторов:  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-изоксазол-4-пропионовые (АМПА) и N-метил-D-аспарататные (НМДА) [1]. Изучить влияние КРФ на эти рецепторные системы, учитывая, что глутамат является основным возбуждающим медиатором в мозге,

на ГАМК-тормозные системы, а также на длительную посттетаническую потенциацию, рассматриваемую как модель обучения и формирования энграммы памяти, было целью наших исследований.

#### Материалы и методы

Работа проведена на тангенциальных переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс толщиной 400–500 мкм (рис. 1, а). Состав инкубационной среды (в мМ): NaCl — 124; KCl — 5; CaCl<sub>2</sub> — 2,6; KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> — 1,24; MgSO<sub>4</sub> — 1,2; NaHCO<sub>3</sub> — 3; глюкоза — 10; трис-НСl — 23. Раствор тщательно насыщали кислородом, температуру поддерживали на уровне 37°C. рН 7,2–7,3. Срез перфузировали со скоростью 2 мл/мин. Эффекты КРФ ("Sigma") исследовали в концентрации  $5 \cdot 10^{-8}$  и  $5 \cdot 10^{-9}$  М.

До начала тестирования в срезах регистрировали контрольные фокальные потенциалы (ФП) на одиночные ортодромные

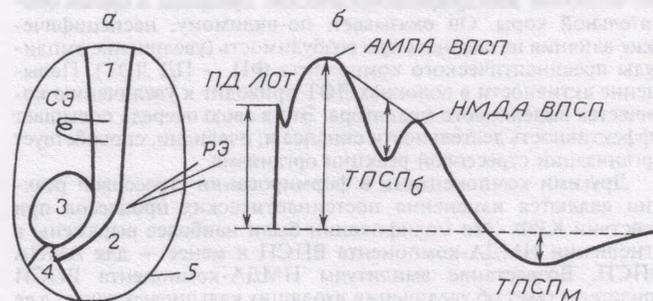


Рис. 1. Схема среза обонятельной коры мозга крыс (а) и схема ФП, регистрируемого в нем (б).

а — структуры мозга, входящие в срез, вид с пильной поверхности: 1 — латеральный обонятельный тракт; 2 — периформальная кора; 3 — обонятельный бугорок; 4 — часть кортикального амигдаларного ядра; 5 — граница среза; локализации стимулирующего (СЭ) и регистрирующего (РЭ) электродов; б — схема ФП с указанием соответствующих компонентов. Пунктир — изолиния. Стрелки — измерения амплитуд компонентов ФП. Полярность колебаний: негативность — вверх, позитивность — вниз от изолинии.

раздражения латерального обонятельного тракта (ЛОТ) с интервалом 5 мин. Затем перфузия переключалась на среду с КРФ в одной из концентраций. Длительность тестирования составляла 20 мин. В течение этого времени с интервалом 5 мин регистрировались ФП в ответ на одиночные раздражения ЛОТ. Вслед за этим в течение 15 мин проводили отмывание срезов контрольной средой.

Анализировали амплитуды возбуждающих и тормозных потенциалов, имеющих различную рецепторную организацию и ионные механизмы генеза (рис. 1, б). Возбуждающие потенциалы — пресинаптический компонент (ПД ЛОТ) — свидетельствуют о прохождении возбуждения по волокнам ЛОТ. Постсинаптические возбуждающие потенциалы (ВПСП) опосредованы неN-метил-D-аспаратом (неНМДА) и НМДА-компонентами ВПСП. Первый из них связан с активацией АМПА-рецепторов, второй — с НМДА-рецепторами. Среди тормозных постсинаптических потенциалов (ТПСП) регистрировали и анализировали медленный ТПСП (ТПСП<sub>м</sub>) (см. рис. 1, б). Генерация этого потенциала связана с активацией ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов и сопряженных с ними хлорных токов. Быстрый ТПСП (ТПСП<sub>б</sub>) в данной работе не анализировали, поскольку его возникновение было нестабильным. Способы измерения амплитуд соответствующих компонентов ФП указаны стрелками на рис. 1, б.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением методов непараметрической статистики, а также с использованием *t*-критерия.

### Результаты и их обсуждение

Как показали проведенные исследования, КРФ в концентрации  $10^{-8}$  М вызывал активацию пре- и постсинаптических возбуждающих компонентов ФП. Эффекты возникали быстро и были отчетливо выражены через 1—1,5 мин. Увеличивались амплитуды пресинаптического компонента ФП — ПД ЛОТ, но особенно постсинаптических — АМПА и НМДА ВПСП. При этом длительность НМДА-компонента ВПСП существенно возрастала. Тормозной компонент — ТПСП<sub>м</sub> — прогрессивно угнетался и, начиная с 5-й минуты, был полностью блокирован (рис. 2, а, б). Наблюдаемые явления, индуцируемые КРФ, были устойчивы и сохранялись в течение 20 мин (время наблюдения) (см. рис. 2, а, б).

Эффекты КРФ были обратимыми, поскольку при отмывании срезов они почти полностью устранялись (см. рис. 2, а, б).

Применение меньшей концентрации КРФ ( $10^{-9}$  М) давало аналогичные эффекты, но менее выраженные. Это свидетельствует о дозозависимом характере действия КРФ на электрогенез отдельных компонентов ФП в переживающих срезах обонятельной коры мыши.

Следует отметить, что перфузия срезов с КРФ в концентрации  $5 \cdot 10^{-8}$  М приводила в некоторых срезах ( $n = 3$ ) к повышению спонтанной электрической активности и появлению аperiodических спонтанно возникающих эпилептогенных разрядов. Последние часто усиливались при электрической низкой частотной (1/с) стимуляции срезов и выражались в значительном возрастании амплитуды суммарного ВПСП и появлении на нем быстрых высокоамплитудных волн.

Эти данные свидетельствуют о том, что КРФ обладает нейротропным свойством и способен длительно модифицировать все базисные электрофизиологические процессы в срезах обонятельной коры. Он оказывает, по-видимому, неспецифические влияния на аксональную возбудимость (увеличение амплитуды пресинаптического компонента ФП — ПД ЛОТ). Повышение активности в волокнах ЛОТ приводит к увеличению количества выделяемого медиатора. Это в свою очередь повышает эффективность деятельности синапса и, очевидно, способствует организации стрессовой реакции организма.

Другими компонентами в формировании стрессовой реакции являются изменения постсинаптических процессов при действии КРФ. Эти модификации были наиболее выражены в отношении НМДА-компонента ВПСП и менее — для АМПА ВПСП. Возрастание амплитуды НМДА-компонента ВПСП свидетельствует об увеличении входящих кальциевых токов, а ее удлинение указывает на увеличение времени открытого состояния этих каналов. Это приводит к повышению возбудимости нервных клеток и способствует формированию стрессовой реакции. Такой вывод подтверждается экспериментальными данными об увеличении внутриклеточной концентрации кальция при появлении нейrogормона в экстраклеточной среде [4].

КРФ оказывал также значительное потенцирующее влияние на АМПА-генерируемые процессы. Как известно, их активация сопряжена с усилением входящих натриевых токов, КРФ бла-

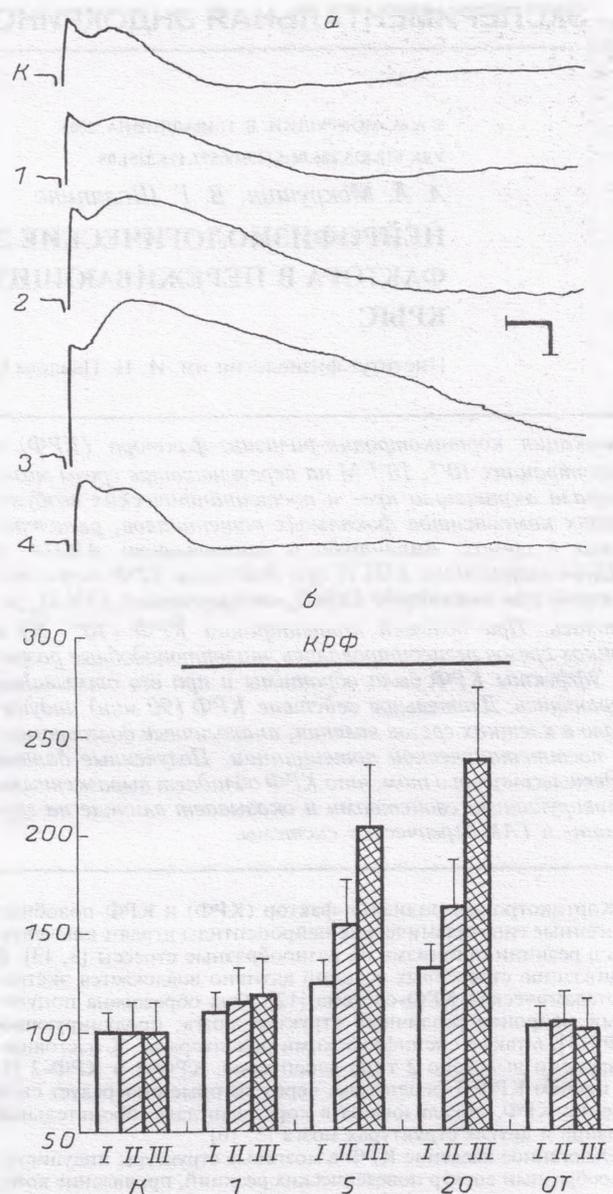


Рис. 2. Изменения профилей ФП в срезах обонятельной коры мозга крыс при перфузии средой с КРФ в концентрации  $10^{-8}$  М.

а: К — контроль; 1, 2, 3 — ФП через 1, 5, 20 мин от начала перфузии с КРФ; 4 — отмывание среза через 15 мин. Калибровка: 0,1 мВ; 10 мс; б: суммарные данные изменений амплитуд отдельных компонентов ФП при действии КРФ в концентрации  $10^{-8}$  М. Здесь и на рис. 3: по оси ординат — амплитуда (в % к контролю); по оси абсцисс — время (в мин). К — контроль; 0Т — отмывание через 15 мин ( $n = 7$ ). I — ПД ЛОТ; II — АМПА; III — НМДА.

гоприятствовал этим процессам и также способствовал общему повышению возбудимости нервных клеток.

Что касается тормозных процессов, то они под действием КРФ прогрессивно угнетались и блокировались. Это выразилось в уменьшении амплитуды ТПСП<sub>м</sub> и, следовательно, КРФ действовал на ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы угнетающим образом и также способствовал повышению возбудимости нервных клеток. Снижение тормозящего и увеличение возбуждающего компонента в балансе процессов возбуждения и торможения в нервной системе под действием КРФ сопровождалось в наших экспериментах возникновением эпилептогенных разрядов. Подобные явления также обнаружены *in vivo* [10, 14] и *in vitro* на срезах гиппокампа [3]. Полагают, что возникновение судорожных разрядов опосредуется действием КРФ на КРФ-1-рецепторы.

Представленные данные о действии КРФ как ключевого гормона стресса на электрогенез в переживающих срезах мозга обонятельной коры мозга крыс следует, на наш взгляд, рассмат-

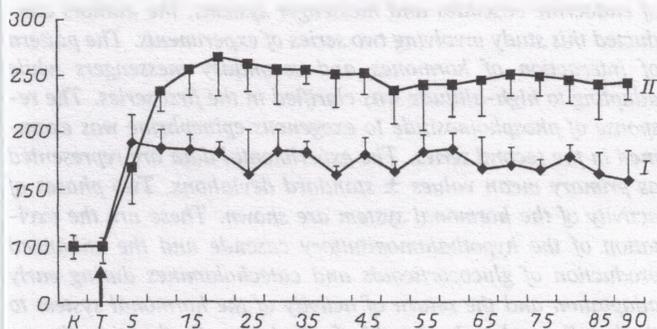


рис. 3. ДПП, индуцируемая электрической тетанизацией латерального обонятельного тракта и аппликацией КРФ ( $10^{-8}$  М) в течение 90 мин.

По оси абсцисс: К — контроль, Т и стрелка — тетанизация латерального обонятельного тракта и введение КРФ соответственно. I — тетанизация ( $n = 19$ ); II — КРФ ( $n = 7$ ).

ривать как электрофизиологическую основу тех процессов, которые разворачиваются в мозге при стрессовых ситуациях. Можно полагать, что КРФ, способствуя формированию стрессовой реакции организма, может стимулировать развитие некоторых пластических изменений в ЦНС, тем более что известно модулирующее влияние КРФ на некоторые процессы поведенческого обучения и памяти [11]. Кроме того, КРФ активировал АМПА- и НМДА-компоненты ВПСП в наших опытах и вызывал повышение уровня внутриклеточного кальция [4].

Для того, чтобы проверить это предположение, срезы мозга перфузировали с КРФ в течение 90 мин. Возбуждающий эффект КРФ проявлялся через 1—1,5 мин, достигал своего максимума через 15—20 мин и сохранялся в течение 90 мин (время наблюдения), причем величина декремента амплитуды НМДА ВПСП составляла к концу наблюдения примерно 20% (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что КРФ самостоятельно индуцировал в клетках срезов мозга явление, аналогичное долговременной посттетанической потенциации (ДПП). Ход ее развития несколько отличался от электрически-вызванной ДПП (см. рис. 3). Эти отличия проявлялись в фазе индукции тем, что КРФ-вызванная ДПП развивалась более медленно, но в фазу сохранения была более устойчивой. Это еще раз доказывает, что эндогенные пептиды принимают активное участие в развитии пластических процессов в мозге, способствуя трансформации кратковременных базисных процессов возбудимости в длительно сохраняющиеся [1].

Полученные данные раскрывают основные нейрофизиологические механизмы вовлечения возбуждающей (глутаматергической) и тормозной (ГАМКергической) систем мозга в ответ на действие КРФ, секреция которого при стрессе быстро возрастает не только в гипоталамусе, но и во многих структурах мозга. Длительная активация возбуждающих процессов при синхронном подавлении тормозных в нервных клетках, возникновение в них явления устойчивого возбуждения, аналогичного ДПП, индукция спорадических эпилептогенных разрядов — вот те

электрофизиологические механизмы, которые, по всей вероятности, лежат в основе реакций мозга на разнообразные стрессы.

## Выводы

1. Перфузия переживающих срезов обонятельной коры мозга крыс срезой с КРФ ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  М) вызывала увеличение амплитуды и длительности АМПА- и НМДА-компонентов ВПСП. Напротив, амплитуда ТПСР<sub>д</sub> угнеталась.

2. При действии КРФ в большей концентрации ( $10^{-8}$  М) в срезах возникали эпилептоподобные разряды.

3. Длительная (90 мин) перфузия срезов раствором с КРФ индуцировала в них процессы, аналогичные электрически-вызванной долговременной посттетанической потенциации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мокрушин А. А. Пептид-зависимые механизмы нейрональной пластичности в обонятельной коре: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — СПб., 1997. — С. 3—42.
2. Шалыпина В. Г., Рыбникова Е. А., Ракицкая В. В. // Рос. физиол. журн. — 1998. — Т. 84, № 10. — С. 1146—1151.
3. Aldenhoff J. B., Gruol D. L., Rivier J. et al. // Science. — 1983. — Vol. 221, N 4613. — P. 875—877.
4. Aldenhoff J. B. // Psychoendocrinology. — 1986. — Vol. 11, N 2. — P. 231—236.
5. Chaimers D. T., Lovenberg T. W., De Souza E. B. // J. Neurosci. — 1995. — Vol. 15. — P. 6340—6350.
6. Curtis A. L., Lechner S. M., Pavcovich L. A. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1997. — Vol. 281. — P. 163—172.
7. De Souza E. B. // J. Neurosci. — 1987. — Vol. 7. — P. 88—100.
8. Dunn A. J., Berridge C. W. // Brain Res. Rev. — 1990. — Vol. 15, N 2. — P. 71—100.
9. Eberly L. B., Dudley C. A., Moss R. L. // Peptides. — 1983. — Vol. 4. — P. 837—841.
10. Ehlers C. L., Henriksen S. J., Wang M. et al. // Brain Res. — 1983. — Vol. 278. — P. 332—336.
11. Koob G. F., Bloom F. E. // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44. — P. 259—263.
12. Koob G. F., Markou A., Weiss F. // Semin. Neurosci. — 1993. — Vol. 5. — P. 351—358.
13. Koob G. F., Heinrichs S. C. // Brain Res. — 1999. — Vol. 848, N 1—2. — P. 141—152.
14. Marrosu F., Mereu G., Fratta W. // Ibid. — 1987. — Vol. 408. — P. 394—398.
15. Perrin M., Donaldson C., Chen R. et al. // Endocrinology. — 1993. — Vol. 133. — P. 3058—3061.
16. Perrin M., Donaldson C., Chen R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — Vol. 92. — P. 2969—2973.
17. Swanson L. W., Sawchenko P. E., Rivier J. et al. // Neuroendocrinology. — 1983. — Vol. 36. — P. 165—186.
18. Valentino R. J., Foote S. L., Aston-Lones G. // Brain Res. — 1983. — Vol. 270, N 2. — P. 363—367.
19. Valentino R. J., Foote S. L. // Neuroendocrinology. — 1987. — Vol. 45. — P. 28—36.

Поступила 16.01.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 612.275.1.014.49.018.084

А. А. Вишневский, Д. З. Закиров, В. М. Яковлев, Л. Ы. Жолдубаева, Г. А. Захаров

## ЭНДОКРИННЫЕ И МЕССЕНДЖЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ПРИ АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ ВЫСОКОГОРЬЯ

Лаборатория молекулярных механизмов адаптации и лаборатория нейроэндокринных механизмов адаптации Института физиологии и экспериментальной патологии высокогорья НАН Кыргызской Республики, Бишкек

Снижение активности гормональной системы во второй фазе адаптации к условиям высокогорья (3200 м) является переходом на новую ступень регуляции, обусловленную изменением чувствительности клеток-мишеней. Эта чувствительность определяется динамическим балансом активности двух основных систем вторичных мессенджеров —

Decreased hormonal activities in the second phase of adaptation to high-altitude (3200 m) is show transition to a new regulation stage caused by a change in the sensitivity of target cells. This sensitivity is determined by the dynamic balance of the activities of two major systems of secondary messengers — phosphoinositide and adenylate cyclase ones. To elucidate the pattern of interaction