

ВПЛИВ АГОНІСТА β_2 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРІВ НА РЕАКЦІЇ ПІРАМІДНИХ НЕЙРОНІВ ЗОНИ *CA1* ГІПОКАМПА ЩУРІВ, МОДУЛЬОВАНІ В РЕЗУЛЬТАТІ БЛОКУВАННЯ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРІВ

Надійшла 10.10.12.

На переживаючих зрізах мозку щурів за допомогою позаклітинного відведення потенціалів досліджували впливи агоніста β_2 -адренорецепторів метапротеренолу (МПТ) та блокатора ГАМК_A-рецепторів бікукуліну на реакції пірамідних нейронів зони *CA1* гіпокампа щурів, викликані електричною стимуляцією колатералей Шафера. Ізольована аплікація МПТ зумовлювала певну тенденцію до зростання інтенсивності ортодромних популяційних розрядів (ОПР) пірамідних нейронів. Аплікація бікукуліну призводила до появи додаткових піків (до трьох) у складі таких викликаних ОПР. При одночасній аплікації МПТ і бікукуліну ефект останнього зберігався, а в деяких випадках навіть помітно зростав. Отже, агоніст β_2 -адренорецепторів МПТ не протидіє механізмам, які запускаються в умовах блокування ГАМК_A-рецепторів, а, можливо, навіть сприяє відповідним ефектам.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гіпокамп, зона *CA1*, β_2 -адренорецептори, метапротеренол, ГАМК_A-рецептори, бікукулін.

ВСТУП

Широко визнано, що ефекти такого ендогенного нейротрансмітера, як норадреналін, опосередковуються α - і β -адренорецепторами. Норадреналін може по-різному впливати на нейронну активність, в одних випадках гальмуючи, а в інших посилюючи фонову імпульсацію поодиноких нейронів та їх викликані відповіді [1, 2]. Під дією норадреналіну відповіді на аплікацію збуджувальних та гальмівних нейротрансмітерів та їх агоністів у різних ділянках мозку здебільшого потенціюються [3]. Однією з таких ділянок є гіпокамп [4, 5], до якого надходять норадренергічні проекції від *locus coeruleus* (амінергічних нейронів групи A8) [6, 7]. Терміналі таких норадренергічних проекцій локалізовані як на пірамідних клітинах, так і на інтернейронах гіпокампа [8, 9]. До числа останніх відносяться і ГАМК-ергічні нейрони цієї структури [10, 11]. Наявність різних адренорецепторів (α , β) на мембранах клітин двох “принципових” типів –

вихідних пірамідних нейронів і гальмівних ГАМК-ергічних інтернейронів – зумовлює можливість різноманітних змін балансу між процесами збудження та гальмування в гіпокампі під впливом норадреналіну, що вивільнюється в різних поведінкових ситуаціях [12, 13].

У наших попередніх дослідженнях впливу агоніста β_2 -адренорецепторів метапротеренолу (МПТ) на ГАМК-ергічну передачу в зоні *CA1* гіпокампа було виявлено, що ГАМК-індуковане пригнічення нейронних відповідей, викликаних у цій зоні в умовах одночасної аплікації ГАМК та зазначеного агоніста, зазвичай істотно зменшується. Проте могли спостерігатись і інші ситуації, коли гальмування викликаної активності в умовах паралельної аплікації ГАМК і МПТ не змінювалося [14]. Одночасна аплікація МПТ і блокатора ГАМК_B-рецепторів баклофену в усіх випадках помітно прешкоджала проявам впливу ГАМК на викликані відповіді пірамідних нейронів зони *CA1* [15].

В описаних нижче експериментах на переживаючих зрізах гіпокампа щурів ми продовжили вивчення впливу агоніста β_2 -адренорецепторів МПТ на реакції пірамідних клітин зони *CA1* гіпокампа, що виникали в цій зоні в умовах блокування ГАМК_A-рецепторів.

¹ Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ (Україна).

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: nata_nr@biph.kiev.ua (Н. М. Розумна).

МЕТОДИКА

Експерименти проводилися на переживаючих зрізах гіпокампа щурів віком один-півтора місяця. Ортодромні популяційні розряди (ОПР), викликані електричною стимуляцією колатералей Шафера в зоні *stratum radiatum*, відводили позаклітинно від ділянки розташування тіл пірамідних нейронів (*stratum pyramidale*) зони *CA1*. Детально методика була описана в нашому попередньому повідомленні [14].

МПТ (150 мкМ; „Sigma”, США) і бікукулін (10 мкМ; „Sigma”, США) аплікували, додаючи агенти до розчину, що омивав зрізи.

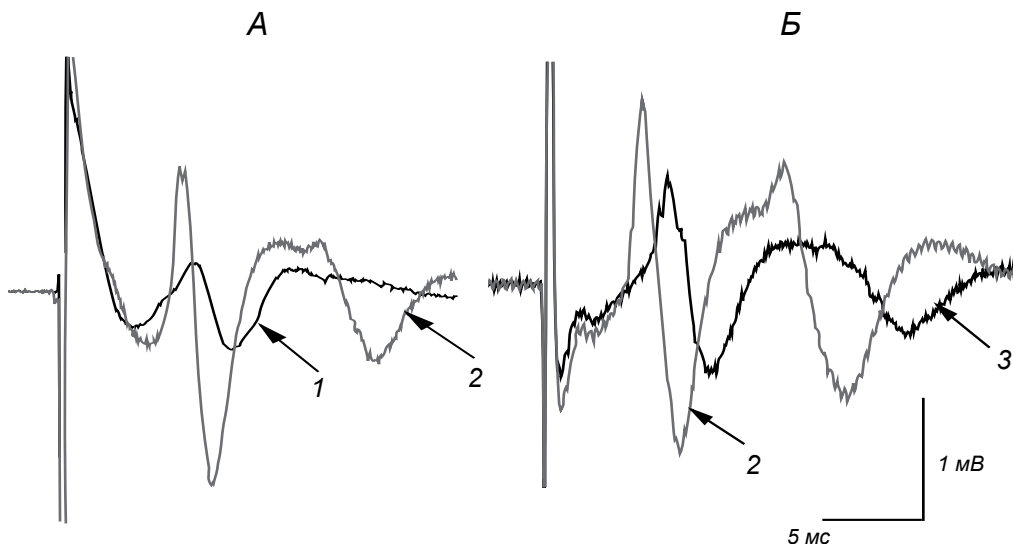
Статистична обробка отриманих даних проводилася за допомогою програми „Origin”. Вірогідність відмінностей результатів вимірювань, зроблених до і після аплікації тестованих речовин, оцінювали із застосуванням дисперсійного аналізу повторних вимірювань (ANOVA repeated measures) і критерію Ньюмена–Кейлса для множинних порівнянь.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У наших попередніх експериментах ми виявили, що ізольоване застосування агоніста β_2 -адренорецепторів МПТ не викликало істотних змін амплітуди ОПР, викликаних у пірамідному шарі зони *CA1* гіпокампа щурів стимуляцією *str. radiatum*. Спостерігалася деяка тенденція до збільшення амплітуди таких відповідей, але вплив МПТ не досягав рівня статистичної значущості. Після

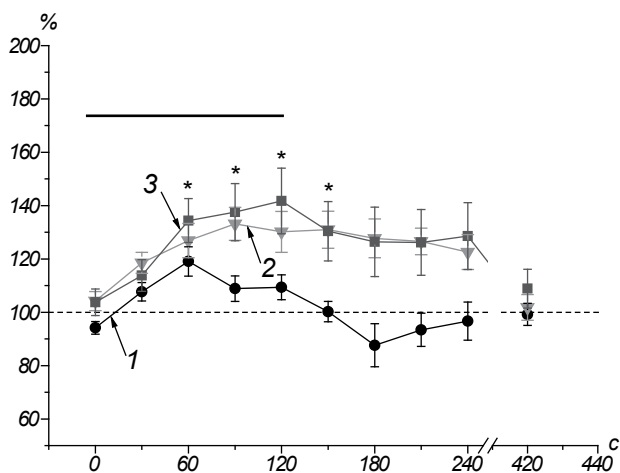
відмивання зрізів від даного агоніста параметри викликаних відповідей в усіх випадках практично поверталися до початкового рівня (рис. 1, Б) [14, 15].

Вплив бікукуліну на викликану активність у зоні CA1 гіпокампа щурів. У контролі електрична стимуляція призводила до виникнення ОПР, у складі котрих був наявним поодинокий пік (рис. 1, А). При аплікації антагоніста ГАМК_A-рецепторів бікукуліну в більшості досліджених клітин така ж сама стимуляція призводила до генерації більших відповідей. Амплітуда і тривалість таких реакцій поступово збільшувалися, і в цих викликаних відповідях з'являлися один–три додаткові синхронні піки, певною мірою подібні до епілептиформних розрядів (А). Амплітуда перших піків у складі викликаної відповіді збільшувалася вірогідно на 2-й хв аплікації бікукуліну (в середньому на $26 \pm 5.3\%$), і такий полегшувальний ефект зберігався декілька хвилин під час відмивання (рис. 2). Відновлення вихідних характеристик відповіді могло наставати з 30-ї хв і пізніше. Додаткові синхронні піки інколи зберігалися протягом усього періоду реєстрації. Таким чином, результати наших експериментів показали, що вплив бікукуліну зумовлює посилення збудження вихідних нейронів гіпокампа – включення більшої кількості нейронних одиниць у викликану відповідь, про що свідчить поява множинних ОПР. Подібні впливи бікукуліну спостерігали й інші автори в умовах експериментів *in vivo*, реєструючи спонтанні та викликані епілептиформні розряди [16], судомну та епілептиформну активність у гіпокампі [17]. Певною мірою аналогічні феномени були також відмічені в умовах *in vitro*, коли було



Р и с. 1. Впливи бікукуліну та метапротеренолу (МПТ) на реакції пірамідних нейронів зони *CA1* гіпокампа щурів.

А – приклад оригінальних записів ортодромних популяційних розрядів (ОПР) у контролі (1) та при ізольованій аплікації антагоніста ГАМК_A-рецепторів бікукуліну (2). Б – порівняння впливу ізольованих аплікацій бікукуліну (2) та МПТ (3) на ОПР, викликані електричною стимуляцією.



Р и с. 2. Динаміка амплітуди ортодромних популяційних піків у зоні CA1 гіпокампа щурів *in vitro* при ізольованих аплікаціях агоніста β_2 -адренорецепторів метапротеренолу – МПТ (1; $n = 20$) і антагоніста ГАМК_A-рецепторів бікукуліну (2; $n = 25$), а також при комбінованій аплікації МПТ і бікукуліну (3; $n = 23$). По осі абсцис – час, с; по осі ординат – середні нормовані значення амплітуди ОПР, % (за 100 % прийняті значення показників до початку аплікації МПТ). Горизонтальною лінією над графіками показана тривалість аплікації речовин. * $P < 0.05$ щодо контролю.

зареєстровано епілептиформні розряди в переживаючих і культивованих зрізах гіпокампа [18, 19]. Таку полегшувальну дію бікукуліну на нейронну активність у церебральних структурах пояснюють його здатністю блокувати ГАМК_A-рецептори і, таким чином, припиняти гальмівну ГАМК_A-передачу від гальмівних інтернейронів, наявних у таких структурах.

Вплив комбінованої аплікації бікукуліну і МПТ на викликану активність у зоні CA1 гіпокампа щурів. У всіх експериментах цієї серії аплікація МПТ не протидіяла полегшувальному ефекту бікукуліну протягом усього двохвилинного періоду дії цього блокатора ГАМК_A-рецепторів; аналогічна ситуація спостерігалася навіть у період відмивання, коли ефект бікукуліну не зменшувався, а в деяких випадках навіть зростав. Амплітуда перших ОПР у таких умовах вірогідно збільшувалась (у середньому на 30 ± 10 %). Додаткові піки в складі ОПР, що реєструвалися в зоні CA1 при паралельній аплікації бікукуліну і МПТ, завжди зберігалися досить тривалий час у перебігу відмивання. Відновлення характеристик перших ОПР викликаній відповіді під час відмивання відбувалося швидше порівняно з таким у разі ізольованої дії бікукуліну, приблизно з 15-ї хв відмивання. Таким чином, під час

одночасної аплікації МПТ та бікукуліну агоніст β_2 -адренорецепторів не усував розгальмовуючого ефекту останнього, а навіть іноді в деякій мірі потенціював його. Отже, як слід вважати, МПТ не протидіяв механізмам, які запустилися при блокуванні ГАМК_A-рецепторів, а впливав до певної міри синергічно цим процесам.

Показано, що норадреналін, впливаючи на β -адренорецептори, збільшує збудливість пірамідних клітин, причому такий ефект забезпечується цАМФ-залежним механізмом [2, 20]. Вже згадувалося, що при ізольованій аплікації МПТ у наших дослідах у частині випадків спостерігалася тенденція до полегшення викликаних відповідей пірамідних нейронів гіпокампа. Таким чином, ефекти паралельної аплікації агоніста β_2 -адренорецепторів і бікукуліну можуть бути сумою ефектів двох даних агентів. З урахуванням подібних міркувань слід припустити, що норадренергічна церебральна система в разі її інтенсивної активації (наприклад, пов'язаної зі стресом) може бути певною мірою задіяна в розвиток станів, оснований на патологічних патернах активності кортикальних та гіпокампальних нейронних мереж. Як виявилось в описаних вище експериментах, агоніст β_2 -адренорецепторів не скасовує дії основної інгібуючої системи мозку – ГАМК-ергічної – під впливом бікукуліну або навіть потенціює ефекти останнього. Роль ендogenous норадреналіну в генезі та попередженні судомної активності експериментального походження обговорювалася Віншенкером та співавт. [21]. Адренергічні впливи на судомні феномени, очевидно, є досить складними, і їх характер залежить від типів залучених адренорецепторів. Показано, що комбінована активація α_2 - та β_2 -адренорецепторів призводить до інгібування лімбічної судомної активності в гіпокампі, тоді як при одночасній активації α_{1A} - та α_{1D} -адренорецепторів вплив на судому є протилежним [22]. Отже, дані, отримані в цитованих роботах, як і результати наших експериментів, вказують на те, що залученість норадренергічної церебральної системи в генез епілептиформної активності може бути значно більшою, ніж це традиційно вважається. Таким чином, в інноваційних розробках препаратів для лікування епілепсії норадренергічна система мозку може в певних аспектах розглядатись як перспективна мішень.

Дослідження виконувалися згідно з положеннями Міжнародної конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях

(Страсбург, 1985), а також згідно з положеннями Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори даної статті – А. В. Романько та Н. М. Розумна – підтверджують, що у них немає конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. D. J. Woodward, H. C. Moises, B. D. Waterhouse, et al., "Modulatory actions of norepinephrine in the central nervous system," *Fed. Proc.*, **38**, No. 7, 2109-2116 (1979).
2. A. L. Mueller, B. J. Hoffer, and T. V. Dunwiddie, "Noradrenergic responses in rat hippocampus: evidence for medication by alpha and beta receptors in the *in vitro* slice," *Brain Res.*, **214**, No. 1, 113-126 (1981).
3. B. D. Waterhouse, F. M. Sessler, J. T. Cheng, et al., "New evidence for a gating action of norepinephrine in central neuronal circuits of mammalian brain," *Brain Res. Bull.*, **21**, No. 3, 425-432 (1988).
4. H. Katsuki, Y. Izumi, and C. F. Zorumski, "Noradrenergic regulation of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region," *J. Neurophysiol.*, **77**, No. 6, 3013-3020 (1997).
5. C. W. Jurgens, K. E. Rau, C. A. Knudson, et al., "Beta1 adrenergic receptor-mediated enhancement of hippocampal CA3 network activity," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, No. 2, 552-560 (2005).
6. R. Loy, D. A. Koziell, J. D. Lindsey, and R. Y. Moore, "Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation," *J. Comp. Neurol.*, **189**, No. 4, 699-710 (1980).
7. S. Oleskevich, L. Descarries, and J. C. Lacaille, "Quantified distribution of the noradrenaline innervation in the hippocampus of adult rat," *J. Neurosci.*, **9**, No. 11, 3803-3815 (1989).
8. M. Frotscher and C. Leranth, "Catecholaminergic innervation of pyramidal and GABAergic nonpyramidal neurons in the rat hippocampus. Double label immunostaining with antibodies against tyrosine hydroxylase and glutamate decarboxylase," *Histochemistry*, **88**, Nos. 3/6, 313-319 (1988).
9. A. P. Nicholas, T. Hokfelt, and V. A. Pieribone, "The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with *in situ* hybridization," *Trends Pharmacol. Sci.*, **17**, No. 7, 245-255 (1996).
10. T. A. Milner and C. E. Bacon, "GABAergic neurons in the rat hippocampal formation: ultrastructure and synaptic relationships with catecholaminergic terminals," *J. Neurosci.*, **9**, No. 10, 3410-3427 (1989).
11. P. Parra, A. I. Gulyas, and R. Miles, "How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus?" *Neuron*, **20**, No. 5, 983-993 (1998).
12. K. Tully and V. Y. Bolshakov, "Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity," *Mol. Brain*, **3**, 15 (2010).
13. H. Salgado, F. Garcia-Oscos, L. Martinolich, et al., "Pre- and postsynaptic effects of norepinephrine on γ -aminobutyric acid-mediated synaptic transmission in layer 2/3 of the rat auditory cortex," *Synapse*, **66**, No. 1, 20-28 (2012).
14. Н. Н. Разумная, "Опосредованные β_2 -адренорецепторами норадренергические влияния на ГАМК-эргическую передачу в зоне CA1 гиппокампа крыс *in vitro*", *Нейрофизиология/ Neurophysiology*, **42**, № 3, 199-205 (2010).
15. Н. Н. Разумная, "Влияние норадренергической системы на торможение, вызываемое активацией ГАМК_B-рецепторов, в зоне CA1 гиппокампа крыс *in vitro*", *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **43**, № 3, 265-269 (2011).
16. A. M. Campbell and O. Holmes, "Bicuculline epileptogenesis in the rat," *Brain Res.*, **323**, No. 2, 239-246 (1984).
17. M. V. Butuzova and V. F. Kitchigina, "Repeated blockade of GABA_A receptors in the medial septal region induces epileptiform activity in the hippocampus," *Neurosci. Lett.*, **434**, 133-138 (2008).
18. A. Amer, "Effects of the alkaloids 6-benzoylheteratisine and heteratisine on neuronal activity in rat hippocampal slices," *Neuropharmacology*, **36**, No. 8, 1039-1046 (1997).
19. M. Samoilova, J. Li, M. R. Pelletier, et al., "Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: increased gap junctional function and expression," *J. Neurochem.*, **86**, No. 3, 687-699 (2003).
20. D. V. Madison and R. A. Nicoll, "Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate mediates beta-receptor actions of noradrenaline in rat hippocampal pyramidal cells," *J. Physiol.*, **372**, 245-259 (1986).
21. D. Weinshenker, P. Szot, N. S. Miller, and R. D. Palmiter, "Alpha(1) and beta(2) adrenoceptor agonists inhibit pentylentetrazole-induced seizures in mice lacking norepinephrine," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 1042-1048 (2001).
22. R. Clinckers, T. Zgavc, K. Vermoesen, et al., "Pharmacological and neurochemical characterization of the involvement of hippocampal adrenoceptor subtypes in the modulation of acute limbic seizures," *J. Neurochem.*, **115**, 1595-1607 (2010).