

© Гореликов П.Л., 2015

УДК: 591.481.13:591.41:591.112.4

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕПРИВАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НИКОТИНЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСОВ

П.Л. Гореликов

ФГБНУ НИИ морфологии человека, г. Москва

Исследовали содержание АТФ, АДФ, АМФ и активность изоферментной системы ЛДГ в краниальном шейном симпатическом ганглии (КШСГ) кроликов при частичной и полной депривации Н-холинергических (Н-ХЕ) синапсов. Динамика активности ЛДГ и содержания макроэргов при депривации Н-ХЕ синапсов указывает на то, что блокада Н-ХЕ синапсов приводит в симпатическом ганглии к значительному энергетическому дефициту и нарушению энергетического гомеостаза. Предполагается, что изменения в энергетическом обмене являются основной причиной гипофункции КШСГ наблюдаемой при фармакологической блокаде антагонистами Н-ХЕ синапсов.

Ключевые слова: симпатический ганглий, депривация холинергических синапсов, изоферменты ЛДГ, макроэрги.

Никотинчувствительные холинергические (Н-ХЕ) синапсы играют заметную роль в регуляции висцеральных функций и когнитивной деятельности мозга [7, 9, 19]. Нарушение нормальной функции Н-ХЕ синапсов является причиной многих патологических состояний [16, 17]. В клинической практике для коррекции функций Н-ХЕ синапсов расположенных в разных отделах нервной системы широко применяются и продолжают интенсивно апробироваться в качестве агонистов и антагонистов Н-холинорецепторов различные фармакологические средства [7, 12, 13].

В связи с научно-практической значимостью проблемы клинко-физиологические вопросы фармакологической модуляции Н-ХЕ синаптической передачи вызывающей определенный терапевтический эффект при блокировании периферических синапсов в симпатических ганглиях находятся в сфере внимания исследователей и интенсивно изучаются [7, 16, 10, 20].

Напротив, другой аспект проблемы – изучение метаболических сдвигов в

симпатических ганглиях сопровождающих депривацию холинергических синапсов остается не разработанной проблемой. Вместе с тем исследования в этом направлении представляют вполне понятное значение в свете получения детальных представлений о молекулярных механизмах лежащих в основе фармакологической модуляции Н-ХЕ синаптической передачи и перспектив направленного влияния антагонистов на Н-ХЕ синапсы, находящиеся в ганглиях периферической нервной системы.

Цель настоящей работы – в условиях частичной и полной фармакологической депривации Н-ХЕ синаптической передачи в краниальном шейном симпатическом ганглии (КШСГ) изучить энергетический обмен в КШСГ.

Материалы и методы

Определяли в КШСГ половозрелых самцов кроликов породы шиншилла возраста 8 месяцев содержание АТФ, АДФ, АМФ и активность изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которые являются адекватными показателями биоэнергети-

ческих процессов [8, 15, 14]. В качестве антагониста Н-ХЕ синапсов использовали ганглиоблокатор димеколин, избирательно прерывающий никотинчувствительную холинергическую передачу в симпатических ганглиях [6, 7]. Энергетические изменения в ганглии изучали как при частичной, так и при полной депривации синапсов путем подкожного введения препарата в дозах – соответственно 10 и 50 мг/кг, руководствуясь установленной для кроликов фармакодинамикой препарата [6]. После введения указанных доз препарата материал брали через 1 час, когда проявление блокирующего действия выражено максимально [6]. При работе с экспериментальными животными и при выведении животных из эксперимента руководствовались приказами Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977 г. и Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н. «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Разделение изоферментов ЛДГ в гомогенатах КШСГ осуществляли с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле [5]. В гомогенатах КШСГ определяли активность изоферментов ЛДГ в относительных единицах методом фотографической фотометрии [1]. Электрофореграммы в максимуме поглощения формазана ($\lambda=569$ нм) фотографировали на аэрофотопленку в условиях, при которых соблюдалась пропорциональность между интегральной оптической плотностью каждой полосы изофермента на электрофореграмме и ее плотностью по-

чернения на негативном изображении фотопленки. Полученные таким образом изображения изоферментных полос денситометрировали на микрофотометре ИФО-451. В контроле использовано 5 животных. Число экспериментальных групп животных составляло – при частичной депривации синапсов 4 животных, при полной – 5 особей. Анализировали по 4 пробы от каждого животного.

Содержание в ганглии АТФ, АДФ, АМФ определяли с помощью метода тонкослойной хроматографии на силиколовых пластинках, с последующим количественным спектрофотометрическим определением каждого из аденилатных макроэргов в УФ диапазоне (260 нм) [3]. В контроле и в каждой из экспериментальных групп использовано по 3 животных. Анализировали по 4 пробы от каждого животного.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ “STATISTICA 6.1”. Достоверность статистических различий оценивали по непараметрическому критерию U Вилкоксона – Манна – Уитни. Статистические различия показателей оценивали при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В изучаемом ганглии синаптическая блокада никотиновых холинергических синапсов полностью изменяет изоферментный профиль ЛДГ вызывая последовательное, по мере усиления блокирующего воздействия, уменьшение числа изоферментов ЛДГ (табл. 1).

Таблица 1

Изменения изоферментного спектра ЛДГ при частичной и полной депривации синапсов

Серии опыта	Относительная активность каждого изофермента в % к суммарной активности всех изоформ				
	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5
Контрольная	30	25	21	13	10
Блокада частичная	46	40	14	-	-
Блокада полная	55	45	-	-	-

Так если в норме в состав ЛДГ симпатического ганглия входят все 5 изоформ: ЛДГ-1, ЛДГ-2, ЛДГ-3, ЛДГ-4, и

ЛДГ-5, то при частичной депривации синапсов в спектре ЛДГ остаются только анодные фракции – ЛДГ-1, ЛДГ-2 и

гибридная изоформа – ЛДГ-3. При этом активность всех этих трех изоформ весьма существенно, более чем в 2 раза, снижается (табл. 2).

Таблица 2

Динамика снижения относительно контроля (в %) активности ЛДГ и каждого из изоферментов, остающихся в спектре после при частичной и полной депривации синапсов

Серии опыта	ЛДГ общая	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3
Частичная блокада	81	71	70	87
Полная блокада	91	84	84	-

Примечание: здесь и в табл. 3 все изменения относительно контроля статистически значимы (U критерий, $p < 0,05$)

При полной депривации синапсов эти изменения еще более существенны и в изоферментном спектре ЛДГ остаются только катодные фракции – ЛДГ-1 и ЛДГ-2 (табл.1), активность которых при этом еще более снижается ($p < 0,05$) и составляет всего 16% от их активности в контроле (табл.2). Следствием описанных выше изменений является и значительное снижение общей активности ЛДГ – при частичной депривации синапсов активность общей ЛДГ составляет всего 19% ($p < 0,05$), а при полной – лишь 9% ($p < 0,05$) от активности этого фермента в контроле (табл. 2).

Результаты определения содержания макроэргов при депривации выявляют аналогичные тенденции, что и при измерении активности ЛДГ – существенное снижение

содержания всех аденилатных макроэргов (табл. 3). При частичной депривации синапсов содержание АТФ уменьшается на 53%, при полной – на 93%, для АДФ уровень снижения содержания составил соответственно 33% и 65% ($p < 0,05$). Уменьшение содержания АМФ в большей мере отмечается при частичной депривации – на 80%, при полной депривации содержание АМФ уменьшается на 56% ($p < 0,05$). В целом суммарное содержание макроэргов при частичной депривации синапсов уменьшается в ганглии почти в 2, а при полной – в 4,5 раза относительно контрольных показателей (табл. 3).

Таблица 3

Динамика снижения относительно контроля (в %) содержания макроэргов при частичной и полной депривации синапсов

Серии опыта	Σ_A	АТФ	АДФ	АМФ
Частичная блокада	49	53	33	80
Полная блокада	78,5	93	65	57

Примечание: Σ_A – суммарное количество аденилатных макроэргов

Таким образом, Н-ХЕ синаптическая блокада, как частичная, так и полная, в равной мере вызывает в симпатическом ганглии существенные изменения показателей, которые отражают уровень биоэнергетического обмена [8, 15, 14]. Значительно падает, вместе с исчезновением целого ряда изоферментов активность ферментативной системы ЛДГ и весьма существенно уменьшается содержание

аденилатных макроэргов. Следует при этом подчеркнуть, что эти изменения прямо связаны со степенью депривации синапсов и при полной их депривации участие ЛДГ и аденилатных макроэргов в энергетических, равно как и в других метаболических процессах КШСГ если не полностью исключается, то становится, по крайней мере, минимальным. С учетом того, что ключевая роль в регуляции

клеточного энергетического обмена принадлежит ферментной системе ЛДГ, которая осуществляет регуляцию суб-стратного обеспечения энергетических процессов [2, 15], и аденилатным макроэргам, уровень содержания которых характеризует энергетический статус и общую интеграцию биохимических процессов [14], можно заключить, что синаптическая блокада никотиновых холинергических синапсов вызывает нарушение энергетического гомеостаза и приводит к существенному энергетическому дефициту. Именно энергетический дефицит прежде всего и объясняет основной эффект синаптической холинергической блокады приводящий, как известно [4, 7] к гипофункции ганглиев.

Действительно Н-ХЕ синапсы, ионотропные по своей природе, выполняют важную роль в поддержании в нервной ткани гомеостаза катионных ионов, в первую очередь Ca^{2+} [7, 16], в связи, с чем депривация вышеозначенных синапсов вызывает нарушение гомеостаза катионных ионов, Ca^{2+} , возможно и других катионов. Принимая во внимание современные данные о регуляторном влиянии Ca^{2+} на энергетический обмен в нервной ткани [11, 22] и о высокой чувствительности аденилатов [18] и изоферментов ЛДГ [21] к ионному составу окружающей среды, именно изменение ионотропного эффекта селективного потока катионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , при депривации является основной причиной редукции ферментативной системы ЛДГ и дефицита аденилатных макроэргов.

Заключение

Результаты настоящего исследования указывают на то, что фармакологическая депривация периферических никотинчувствительных холинергических синапсов приводит к существенному энергетическому дефициту в краниальном шейном симпатическом ганглии. С большей степенью вероятности можно утверждать, что нарушение энергетического гомеостаза является основной причиной гипофункции симпатических ганглиев при действии антагонистов на никотинчувствительные холинорецепторы.

Литература

1. Агроскин Л.С. Цитофотометрия / Л.С. Агроскин, Г.В. Папаян. – Л.: Наука, 1977. – 295 с.
2. Зимин Ю.В. Надмолекулярная регуляция активности некоторых оксидоредуктаз клетки в норме и патологии / Ю.В. Зимин, С.П. Сяткин, Т.Т. Березов // *Вопр. мед. химии.* – 2001. – Т. 47, № 3. – С. 279-287.
3. Определение адениловых нуклеотидов в цельной крови / В.Т. Самохин [и др.] // *Ветеринария.* – 1981. – № 7. – С. 65-66.
4. Особенности строения ионного канала нейронального никотинового холинорецептора, установленные на основании изучения связи структуры и активности в ряду ганглиоблокаторов / Н.Б. Бровцына [и др.] // *Биол. мембраны.* – 1996. – Т. 13, № 1. – С. 57-70.
5. Панавене Д.П. К методике разделения изоферментов лактатдегидрогеназы на полиакриламидном геле / Д.П. Панавене // *Лаб. дело.* – 1974. – № 9. – С. 542-544.
6. Першин Г.И. Димеколин / Г.И. Першин // *Новые лекарственные средства / под ред. Г.И. Першина.* – М.: Медицина, 1966. – Вып. 10. – С. 72-100.
7. Скок В.И. Нейрональные холинорецепторы / В.И. Скок, А.А. Селянко, В.А. Деркач. – М.: Наука, 1987. – 343 с.
8. Хватова Е.М. Нуклеотиды мозга / Е.М. Хватова, А.Н. Сидоркина, Г.В. Миронина. – М.: Наука, 1987. – 208 с.
9. Anglade P. Historical landmarks in the histochemistry of the cholinergic synapse: Perspectives for future researches / P. Anglade, Y. Larabi-Godinot // *Biomed Res.* – 2010. – Vol. 31, № 1. – P. 1-12.
10. Becker D.E. Basic and clinical pharmacology of autonomic drugs / D.E. Becker // *Anesth Prog.* – 2012. – Vol. 59, № 4. – P. 159-168.
11. Calcium signaling in physiology and pathophysiology / H. Cheng [et al.] // *Acta pharmacologica sinica.* – 2006. – Vol. 27, № 7. – P. 767-772.
12. Dani J.A. Nicotinic acetylcholine receptors as therapeutic targets: emerging frontiers in basic research and clinical

- science-editorial comments / J.A. Dani, D. Donnelly-Roberts, D. Bertrand // *Biochem Pharmacol.* – 2013. – Vol. 86, № 8. – P. 1041.
13. D'hoedt D. Nicotinic acetylcholine receptors: an overview on drug discovery / D. D'hoedt, D. Bertrand // *Expert Opin Ther Targets.* – 2009. – Vol. 13, № 4. – P. 395-411.
14. Dzeja P. Phosphotransfer networks and cellular energetics / P. Dzeja, A. Terzic // *J. Exp. Biol.* – 2003. – Vol. 206. – P. 2039-2047.
15. Gladden L.B. A lactic perspective on metabolism / L.B. Gladden // *Med Sci Sports Exerc.* – 2008. – Vol. 40, № 3. – P. 477-485.
16. Gotti C. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology / C. Gotti, F. Clementi // *Prog. Neurobiol.* – 2004. – Vol. 74, № 6. – P. 363-396.
17. Lindstrom J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease / J. Lindstrom // *Mol Neurobiol.* – 1997. – Vol. 15, № 2. – P. 193-222.
18. Masino S. Adenosine, glutamate and pH: interactions and implications / S. Masino, C. Dulla // *Neurological Res.* – 2005. – Vol. 27, № 2. – P. 149-152.
19. Miwa J.M. Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses / J.M. Miwa, R. Freedman, H.A. Lester // *Neuron.* – 2011. – Vol. 70, №1. – P. 20-33.
20. Nizri E. The role of cholinergic balance perturbation in neurological diseases / E. Nizri, I. Wirguin, T. Brenner // *Drug News Perspect.* – 2007. – Vol. 20, № 7. – P. 421-429.
21. Rathouz M. Elevation of intracellular calcium levels in neurons by nicotinic acetylcholine receptors / M. Rathouz, S. Vijayaraghavan, D. Berg // *Mol. Neurobiol.* – 1996. – Vol. 12, № 2. – P. 117-131.
22. Verkhatsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons / A. Verkhatsky // *Physiol Rev.* – 2005. – Vol. 85, № 1. – P. 201-279.

METABOLIC ASPECTS OF PHARMACOLOGICAL DEPRIVATION PERIPHERAL NICOTINIC SENSITIVE CHOLINERGIC SYNAPSES

P.L. Gorelikov

Content of ATP, ADP, of AMP and activity of isozyme systems LDH in the cranial cervical sympathetic ganglia (CSSG) rabbits was investigated with partial and complete deprivation of N-cholinergic (N-HE) synapses. Dynamics of activity of LDH and content of macroergs in deprivation N-HE synapses indicates that blockade of N-HE synapses results in sympathetic ganglia to significant energy shortages and disruption of energy homeostasis. It is assumed that changes in energy metabolism are the main cause CSSG hypofunction observed during pharmacological blockade by antagonists N-HE synapses.

Keywords: *sympathetic ganglion, deprivation cholinergic synapses, isoforms of LDH, adenylate macroergs.*

Гореликов П.Л. – д.б.н., зав. лабораторией нейроморфологии НИИ морфологии человека РАМН.

E-mail: petr_gorelikov@mail.ru