НЕЙРОХИМИЯ
т. 11, № 1, 1992

УДК 612.822.1

НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА И СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В ХОЛИНЕРГЧИЕСКИХ ТЕРМИНАЛЯХ МОЗГА

ДОЛГО-САБУРОВ В. Б., ПОДОСИНОВИКОВА Н. Н., САНКОВСКИЙ А. А.

Институт токсикологии, Ленинград

Изучено влияние холиноэлакторов, холиномиметиков и бисчетвертичного пиридиниевого оксима ТМБ-4 на Ca^{2+}-зависимый K^+-стимулируемый выброс АХ из пресинаптических нервных окончаний нережизающих срезов коры головного мозга крыс. Показано, что все холиноэлакторы стимулируют выброс АХ с значениями EC_{50}, близкими к константам сродства к пресинаптическим M_2-холинорецепторам. Полный агонист мускариновых холинорецепторов (М—ХР) карбамилхолин (КХ) и оксим ТМБ—4 тормозят выброс медиатора. Частичный агонист пилокарпин, подобно антагонистам, стимулирует выброс АХ. Предполагается два пути торможения выброса медиатора: транерецепторный, опосредуемый фосфоинозитидной системой и независимый от аденилатциклазной системы вторичных мессенджеров, и внерецепторный, не связанный с активацией гидролиза фосфоинозитидов, характерный для бисчетвертичных пиридиниевых оксимов. Не обнаружено влияния КХ и ТМБ—4 на синтез АХ в центральных холинергических терминалях.

Проблема регуляции синаптической передачи на протяжении многих десятилетий привлекает к себе пристальное внимание. При этом наибольший интерес вызывают механизмы регуляции функционального состояния нервной терминали, призванные оптимизировать освобождение в синаптическую щель нейромедиаторов и позволяющие таким образом работать синапсу в эффективном и экономичном режиме.

В настоящее время считается установленным факт саморегуляции выброса АХ пресинаптическими аутохолинорецепторами по принципу отрицательной обратной связи. Доказательством транерецепторного пути ингибирования выброса АХ служат эксперименты с использованием М-холинолитиков. Холинергические антагонисты, блокируя пресинаптические М-холинорецепторы, предотвращают активацию их АХ и нарушают механизмы ауторегуляции его секреции, что приводит к увеличению количества медиатора в синаптической щели. Остаются невыясненными биохимические механизмы ингибирования АХ собственного выброса. Как известно, возбуждение М-ХР сопряжено с изменением функционального состояния вполне определенных систем вторичных мессенджеров: стимуляцией фосфоинозитидного и ингибированием аденилатциклазного ответов. Логично предположить

возможность участия этих систем в качестве биохимических посредников трансрецепторной регуляции выброса АХ. Некоторые экспериментальные подходы к решению этого вопроса и составили содержание настоящего сообщения.

Материалы и методы

Работа выполнена на белых крысах-самках линии *Wistar* массой 180—200 г. Исследование высвобождения АХ проводили на пережи-вающем срезе мозга. Крыс декапитировали, мозг извлекали и делали срез толщиной 350±50 мкм с теменной области правого полушария. На 2-й мин после декапитации срез помещали в колбу, содержащую 2 мл предварительно барбатированного карбогеном при 37° бикарбонатного буфера, pH 7,4. Буферная смесь имела следующий состав: (ммоль/л): NaCl—125; KCl—5,0; $CaCl_2$—2,7; KH_2PO_4—1,25; $MgSO_4$—1,25; $NaHCO_3$—15,0; Na_2HPO_4—14; глюкоза—10. Колба со срезом барбатировалась повторно, герметично закрывалась и помещалась в водяную баню с непрерывным встряхиванием (120 качаний в мин) при 37°. Стадия преинкубации продолжалась до 30-й мин, предшествовала любым манипуляциям со срезом и была необходима для восстановления активности ткани после препаративной травмы. После преинкубации срез помещали в среду того же состава, но содержащую 0,1 мкмоль [^{3}H]холина («Amersham», Англия, 70 Ки/ммоль). Оценка кинетических параметров насыщения среза меченым холином показала, что в первые 30 мин инкубации включение метки на единицу массы среза идет линейно с достаточно высокой скоростью. В дальнейшем для всех опытов была выбрана экспозиция срезов с [^{3}H] холином продолжительностью 15 мин. Параметры отмывки исследовали в опытах с непрерывным последовательным переносом среза каждые 2 мин в колбу со свежим буфером. Практически полная отмывка от невключившейся метки происходила к 16—20 мин. В дальнейших экспериментах после насыщения холином срез отмывали в «чистом» буфере дважды по 10 мин.

Индуцированное высвобождение АХ исследовали в условиях деполяризации среза избытком K^+ (25 мМ KCl). Результаты оценивали интегральным показателем накопления метки за 15 мин деполяризации и выражали величиной «доли выброса» не менее чем в шести независимых опытах—Д (%).

$$Д(\%) = \frac{\text{радиоактивность выброса (распады/мин)}}{\text{радиоактивность выброса (распады/мин)} + \text{радиоактивность гомогената (распады/мин)}} \times 100$$

Идентификацию [^{3}H]АХ и [^{3}H]холина проводили в суперфузате и гомогенате срезов мозга в отсутствие или в присутствии 10^{-4} М эзерина. Разделение холина и АХ проводили методом ВЭЖХ на хроматографе «Altex» (США) с идентификацией пиков спектрофотометрическим методом.

Определение сродства холинотропных лигандов к M_1-ХР больших полушарий мозга и M_2-ХР миокарда крыс проводили методом радиолигандного анализа. В качестве меченого лиганда использовали [^{3}H] хинуклидинилбензилат («Amersham», Англия) с величиной У.А. 30,0—37,0 Ки/ммоль. Детали постановки экспериментов описаны ранее [1]. О сродстве немеченых соединений к рецепторам судили по величине константы конкурентного ингибирования (Ki) связывания меченого лиганда. Для селективных холинолитиков и холинергических агонистов методом нелинейного регрессионного анализа на персональном компьютере IBM PC AT по специально разработанной программе рассчитывали константы высокого (K high) и низкого (K low) сродства к рецепторам и процентное содержание участков соответствующего сродства в общей популяции ХР.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что целью настоящего исследования явилось изучение механизмов трансрецепторного регулирования выброса АХ, были оценены параметры взаимодействия интересующих нас холинотропных соединений с ХР больших полушарий мозга, до 80% которых представлены М-подтипом и с ХР миокарда, до 90% популяции которых составляют M_2-ХР. Полученные данные представлены в табл. 1.

Следующим этапом работы явилось изучение влияния холинергических лигандов на стимулированный калиевой деполяризацией выброс АХ из пресинаптических нервных окончаний переживающих срезов коры мозга крыс.

Все исследованные холинолитики стимулируют индуцированный K^+ выброс АХ (рис. 1, табл. 2). При сопоставлении влияния на выброс (величина EC_{50} по активации выброса, табл. 2) со сродством антагонистов к М-ХР (величина K_i; табл. 1) привлекает внимание хорошее совпадение параметров связывания селективных холинолитиков пирензепина и имперналина с M_3-подтипом ХР с их значениями EC_{50} по влиянию на выброс АХ. Эти результаты совпадают с литературными данными о принадлежности пресинаптических аутохолинорецепторов коры больших полушарий к M_2-подтипу [2, 3] и подтверждают представления о том, что холиноблокаторы стимулируют пресинаптический выброс АХ именно за счет блокады ХР. Очевидно, используемая модель адекватна поставленной задаче и позволяет сопоставлять связывание лигандов с рецепторами с их влиянием на пресинаптический выброс АХ.

M_2-селективный холиноблокатор имперналин, в малых концентрациях стимулировавший выброс медиатора, в концентрации более 10^{-6} М начинает ингибировать его. Мы не располагаем экспериментальным материалом для объяснения этого эффекта, можно лишь предполагать, что в спектре действия препарата могут присутствовать [H] холиноблокирующие свойства, которые и вызывают эф-

фекты, противоположные влиянию М-холиноблокаторов. Подобного рода противоположно направленное действие на выброс АХ М- и Н-составляющих таких агонистов, как АХ и метахолин, показано, в частности, на препарате синаптосом коры мозга крыс [4].

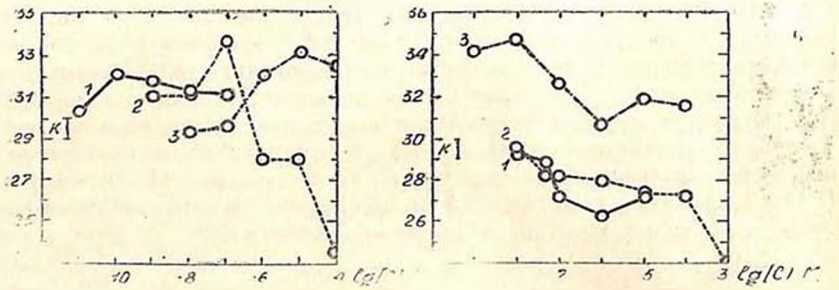

Рис. 1. Влияние холинолитиков на стимулированный калиевой деполяризацией выброс АХ. *1*-глицин, *2*-империалин, *3*-пирензепин, К—доля выброса в контроле. По оси ординат—доля выброса, в %.

Рис. 2. Влияние холиномиметиков и ТМБ—4 на стимулированный калиевой деполяризацией выброс АХ. *1*—ТМБ—4, *2*—карбамилхолин, *3*—пилокарпин, К—доля выброса в контроле. По оси ординат—доля выброса, в %.

Таблица 1

Параметры связывания холинергических лигандов с М-холинорецепторами

Холинергический лиганд	M_1-ХР мозга			M_2 ХР миокарда			M_2/M_1
	Ki [M]			Ki [M]			
Глицин	$6{,}6\cdot10^{-10}$			$6{,}2\cdot10^{-10}$			1
Пирензепин	$3{,}0\cdot10^{-8}$ 78%	$1{,}0\cdot10^{-6}$ 19%		$1{,}2\cdot10^{-6}$			40
Империалин	$2{,}7\cdot10^{-7}$			$4{,}9\cdot10^{-8}$			0,2
	Khigh	Klow	L/H	Khigh	Klow		L/H
Карбамилхолин	$1{,}5\cdot10^{-6}$ 41%	$6{,}8\cdot10^{-5}$ 59%	45	$5{,}0\cdot10^{-7}$ 61%	$6{,}3\cdot10^{-6}$ 39%		13
Пилокарпин	$9{,}5\cdot10^{-6}$ 100%		1	$9{,}8\cdot10^{-6}$ 100%			1
ТМБ—4	$3{,}7\cdot10^{-6}$ 100%		1	$3{,}4\cdot10^{-6}$ 75%	$1{,}1\cdot10^{-5}$ 25%		3

Примечание. M_2/M_1—отношение констант сродства холинолитика к соответствующим подтипам М—ХР. L/H—отношение констант низкого и высокого сродства лигандов в пределах данного подтипа рецепторов

Для изучения механизмов торможения выброса АХ были выбраны два прямых холиномиметика—карбамилхолин (КХ) и пилокарпин, первый из которых является полным холинергическим агонистом и способен, подобно АХ, вызывать достаточно выраженный аденилатциклазный и фосфоинозитидный ответы. Пилокарпин представляет собой частичный агонист с сильно редуцированной или полностью отсутствующей (по различным литературным источникам) способностью индуцировать образование вторичных мессенджеров в фосфоинозитидной сигнальной системе [5, 6]. При сравнении действия КХ и пилокарпина на индуцированный K^+-деполяризацией выброс АХ предполагалось оценить участие фосфоинозитидной системы вторичных мессенджеров в процессе ингибирования освобождения медиатора. Полученные результаты представлены на рис. 2 и в табл. 2. КХ ингибирует пресинаптический выброс АХ с значением EC_{50} =

Таблица 2

Влияние холинергических соединений на индуцированное калиевой деполяризацией высвобождение ацетилхолина из срезов коры мозга крыс

Холинергический лиганд	EC_{50} (М) по активации выброса АХ	EC_{50} (М) по ингибированию выброса АХ
Глицин	$6.0 \cdot 10^{-11}$	—
Пирензепин	$1.0 \cdot 10^{-6}$	—
Империалин	$2.0 \cdot 10^{-8}$	—
Карбамилхолин	—	$8.5 \cdot 10^{-5}$
Пилокарпин	$1.0 \cdot 10^{-5}$	—
ТМБ-4	—	$7.5 \cdot 10^{-8}$

$8{,}5 — 10^{-5}$ М. Пилокарпин не проявляет ингибирующего действия; он, подобно холинолитикам, стимулирует пресинаптический выброс АХ. Представленные данные свидетельствуют о том, что опосредуемое М-ХР торможение K^+-стимулированного пресинаптического выброса АХ осуществляется лишь теми холиномиметиками, которые способны активировать фосфоинозитидную систему вторичных мессенджеров. Очевидно, биохимические пути трансрецепторного ингибирования выброса АХ по известному механизму отрицательной обратной связи включают активацию этой системы. В то же время, полученные результаты не дают оснований для предположения об участии в торможении выброса медиатора аденилатциклазы. Принципиальным отличием пилокарпина, как частичного агониста, от антагонистов является его способность ингибировать аденилатциклазу. По литературным данным, значение EC_{50} пилокарпина в тесте ингибирования аденилатциклазного ответа составляет порядка $3 \cdot 10^{-6}$ М [7]. Мы исследовали действие пилокарпина на выброс АХ в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-4} М. Очевидно, в этих условиях пилокарпин был способен изменять циклазную активность, однако он не оказывал на выброс медиатора действия, отличного от холиноблокато-

ров, не влияющих на активность этого фермента. Полученные данные позволяют предположить, что аденилатциклазная система вторичных мессенджеров не участвует в передаче сигнала от пресинаптического М-ХР к биохимическим системам нервной терминали, регулирующим выброс АХ.

Интересную группу модуляторов пресинаптического выброса АХ представляют собой бисчетвертичные пиридиниевые оксимы. Впервые способность соединений этого класса тормозить K^+-стимулированный выброс АХ из срезов продолговатого мозга крыс была показана J. Kloog и соавт. в 1986 г. [8]. Авторы представляют данные соединения в качестве селективных пресинаптических агонистов M_1-ХР продолговатого мозга, способных взаимодействовать с постсинаптическими рецепторами как холинергические антагонисты. В наших экспериментах на пресинаптических M_2-ХР срезах коры мозга крыс оксим ТМБ-4 также тормозил Ca^{2+}-зависимый K^+-стимулируемый выброс АХ (табл. 2, рис. 2). Радиолигандный анализ свидетельствует о том, что по характеру связывания ТМБ-4 аналогичен частичным холинергическим агонистам (типа пилокарпина) с очень незначительным различием констант высокого и низкого сродства к рецепторам (табл. 1). Согласно литературным данным, этот факт свидетельствует о крайне редуцированном фосфоинозитидном ответе холиномиметика [5, 6]. В то же время, ТМБ-4, в отличие от пилокарпина очень активно ингибирует выброс АХ.

В специально проведенной серии экспериментов было показано, что КХ и ТМБ-4 не оказывают влияния на синтез АХ в холинергических терминалях. В условиях блокады холинэстеразы эзерином исследовался синтез АХ из меченого [^{3}H] холина в переживающих срезах мозга. Методом ВЭЖХ было показано развивающееся во времени линейное накопление [^{3}H] АХ в срезах. КХ и ТМБ-4 не оказывали влияния на этот процесс.

Представленные факты позволяют сделать одно из предположений: либо пилокарпин является структурно обусловленным исключением в ряду частичных холинергических агонистов и его неспособность ингибировать выброс медиатора не связана с редукцией фосфоинозитидного ответа, либо бисчетвертичные пиридиниевые оксимы, в отличие от холиномиметиков, могут регулировать пресинаптический выброс АХ не транссинаптическим путем. Авторы настоящей работы склоняются в пользу второго предположения и считают, что изучение этого пути открывает принципиально новую возможность создания эффективных перецепторных модуляторов пресинаптического выброса АХ.

CERTAIN MECHANISMS OF THE REGULATION OF ACHETYLCHOLINE SYNTHESIS AND RELEASE IN BRAIN CHOLINERGIC TERMINALS

DOLGO-SABUROV V. B., PODOSINOVIKOVA N. P., SANKOVSKI A. A.

The Institute of Toxicology, Leningrad.

The influence of cholinolytics, cholinomimetics and bisquaternary pyridinium oxime TMB-4 on the Ca^{2+}-dependent K^+-stimulated release of acetylcholine from presynaptic terminals of superfused slices of rat brain cortex was studied. It was shown that all cholinomimetics stimulate the acetyl holine release with the EC_{50} values to their affinty constans to M_2-cholinoreceptors. The full agonist of muscarinic cholino-receptors, carbamoyl choline and oxime TMB—4 inhibit the release of the mediator. The partial agonist pilocarpine stimulates like antagonists the acetylcholine release. Two path ways of mediator release inhibition are supposed:

1) the transreceptor one mediated by phosphonositide system and therefore independent of adenylate cyclase system of second messengers.

2) nonreceptor way nonrelated with the activation of phosphoinositide system, typical for bisquaternary pyridinium oximes. No influence of carbamylcholine and TMB 4 on acetylcholine synthesis in the central cholinergic terminals was found.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Иванова Т. М., Подосиновикова Н. П., Долго-Сабуров В. Б., Предтеченский М. Б., Степанова Н. А.*, Фармакол. и токсикол., т. 53, № 2, с. 34—36, 1990.
2. *Raiteri M., Leardi R., Marchi M.* J. Pharmacol. Exper. Therapeutics,. v. 228 № 1. p. 209—214, 1983.
3. *Marchi M., Raiteri M.* Europ. J. Pharmacol., v. 107, p. 287—288, 1985.
4. *Meyer E. M., Olero D. H.* J. of Neurosci., v. 5, № 5, p. 1202—1207, 1985,
5. *Freedman S. B., Harley E. A., Iversen L. L.* Brit. J. Pharmacol., v. 93, p. 437—445, 1988.
6. *Evans T., Hepler J. R., Masters S. B., Brown J. H., Harden T. K.* Biochem. J., v. 232, p. 751—757, 1985.
7. *Kinney M. Mc., Stenstrom S., Richelson E.* Mol. Pharmacol., v. 27, p. 223—235, 1984.
8. *Kloog Y., Gatron R., Sokolovsky M.* J. Neurochem., v. 46, № 3, p. 767—772, 1986.

Поступила 7.I.1991