

УДК 615.214.22:612.822.5.599.323.4:577.175.8

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ «МИКРОТРУБОЧКОВОЙ КАТАСТРОФЫ», ВЫЗВАННОЙ НЕЙРОЛЕПТИКАМИ

БАРДАХЧЬЯН Э. А., МАКЛЯКОВ Ю. С., ХАРЛАНОВА Н. Г., КУЛИКОВА О. Н.

Научно-исследовательский противочумный институт
Государственный медицинский институт, Ростов-на-Дону

Исследовали изменения концентрации нейроспецифического белка S-100 и ультраструктуры в различных отделах ЦНС при введении нейролептиков—аминазина и галоперидола. На высоте действия препаратов показано увеличение в мозгу содержания белка S-100 и одновременное практически полное исчезновение микротрубочек в дендритах. В течение суток ультраструктура их восстанавливается, уровень белка S-100 практически не отличается от исходных значений. Обсуждаются возможные причины дезагрегации и агрегации микротрубочек.

Впервые микротрубочки были обнаружены более четверти века тому назад и почти тогда же им была отведена роль опорного элемента цитоскелета. Однако в настоящее время с введением современного метода компьютерного усиления изображения, получаемого в световом микроскопе, представилась возможность доказать участие их в перемещении пузырьков и органелл в цитоплазме и отростках нервных клеток [1]. Помимо внутриклеточного и аксонального транспорта, микротрубочкам в НС приписывают участие в синаптической передаче, кеплинге рецепторов, росте клеток и т. д. [2, 3].

Установлено обратимое связывание аминазина с тубулином и его ингибирующее действие на полимеризацию последнего в микротрубочки [4, 5]. Образующиеся при этом амальные структуры в виде агрегатов кроме тубулина содержат также повышенное количество микротубулонассоциированных белков [6], среди которых особое место занимает нейроспецифический белок S-100 [7, 8].

В связи с этим представлялось интересным проведение специального комплексного изучения биохимических и ультраструктурных изменений в различных отделах ЦНС при действии нейролептиков аминазина и галоперидола.

Материалы и методы

Исследование количественных изменений белка S-100 выполнено на 30 беспородных белых крысах-самцах массой 180—200 г (по 10 животных в каждой серии). Содержание белка S-100 в нео-

кортексе, гиппокампе, промежуточном мозгу и его стволовой части определяли при однократном внутривенном введении 5 мг/кг аминазина (производное фенотиазинового ряда) или галоперидола (производное бутирофенонов). Контрольным животным вводили адекватные объемы стерильного физиологического раствора. Через 3 ч после инъекции каждого из нейролептиков, то есть на пике фармакологического действия препаратов, а также спустя сутки водорастворимую фракцию белка S-100 исследовали с помощью диск-электрофореза в 20%-ном ПААГ в первой щелочной системе по Мауреру с рН-разделением 9,5 [9]. Полученные результаты статистически обработаны.

Для электронно-микроскопического исследования (27 крыс) сенсомоторной коры, таламуса, гиппокампа, хвостатого ядра и центрального серого вещества использована глицероформальная фиксация. Экспериментальный материал от 18 животных изолировали через 30 мин, 3 и 24 ч (по 3 животных на каждый срок и на каждый нейролептик) после введения препаратов. В качестве контроля использовали 9 животных. После общепринятой обработки кусочки тканей заключали в эпоксидный смол и для идентификации соответствующих структур с каждого блока делали срезы толщиной 1—2 мкм, окрашивали их метиленовым или толундиновым синим и просматривали в световом микроскопе. В передней теменной области выделяли зону (область РА, поле РА⁵), определяемую обзорным просмотром предварительно ориентированных для заточки блоков. Кусочки из V—VI слоев, в последующем изученные в электронном микроскопе, по морфологическим признакам характеризовались наличием крупных нейронов, функционально эквивалентных сенсомоторной области [10]. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме LKB 8800, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-100 S.

Результаты и обсуждение

Спустя 3 ч после внутривенного введения галоперидола в неокортексе обнаруживалось значительное (на 93,8%) повышение по сравнению с контролем содержания белка S-100. Как видно из рис. 1, в остальных отделах мозга увеличение концентрации белка носило менее выраженный характер—58—65% ($p < 0,05$). С другой стороны, аминазин за тот же промежуток времени приводил к падению уровня нейроспецифического белка S-100 в гиппокампе и неокортексе примерно на 62,5 и 39,5% ($p < 0,05$) соответственно. Спустя сутки отмечалось инволюционное изменение психолептического эффекта изученных нейролептиков, а количество белка S-100 снижалось до исходного уровня.

Таким образом, оба препарата на высоте фармакологического действия приблизительно в одинаковой степени способствовали по-

вышенно содержания белка S-100 в гиппокампе, а в неокортексе этот сдвиг был наиболее выраженным под действием галоперидола.

В контрольных экспериментах во все сроки наблюдения после внутрибрюшинного введения физиологического раствора электронно-

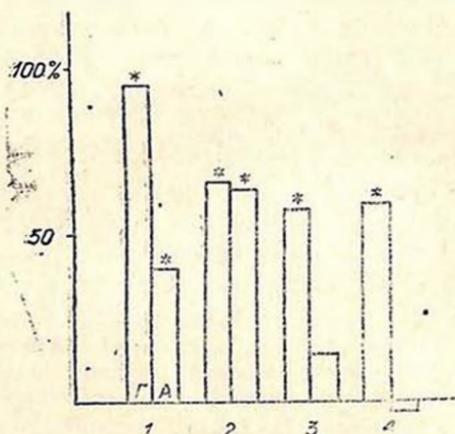


Рис. 1. Изменение содержания нейроспецифического белка S-100 в различных отделах головного мозга крысы при действии галоперидола (Г) и амиапаина (А) (в % к контролю): 1—неокортекс, 2—гиппокамп, 3—промежуточный мозг, 4—ствол мозга; * $p < 0,0$.

микроскопический анализ не позволил обнаружить сколько-нибудь заметных изменений в исследованных нервных структурах.

На фоне введения нейролептиков в течение первых трех часов в цитоплазме нейронов всех изученных отделов мозга наблюдалось наличие большого количества окаймленных везикул. Отмеченная ультраструктурная перестройка, являющаяся достаточно универсальной, по-видимому, обусловлена спецификой взаимодействия рецепторов с соответствующими лигандами за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза [11—15]. Кроме того, оба изученных препарата вызывали ряд реактивных и деструктивных изменений, интерпретация которых станет предметом специального обсуждения в дальнейшем. В настоящем же сообщении мы остановимся лишь на вопросах, касающихся морфофункциональных изменений дендритного аппарата.

Согласно проведенным наблюдениям, у контрольных животных дендриты характеризуются наличием в них многочисленных микротрубочек и других цитоплазматических органелл, выявляющихся на продольных срезах в виде параллельно вытянутых парных мембран, между которыми могут находиться тончайшие микрофиламенты; на поперечных срезах также прослеживается строгая упорядоченность окружных профилей диаметром в пределах 25 нм по наружному контуру (рис. 2, а). Результаты наших исследований согласуются с данными литературы [2, 16, 17].

Через 30 мин после введения амиапаина и галоперидола в дендритах нейронов изученных отделов ЦНС наиболее ранней реакцией является тотальное исчезновение микротрубочек (рис. 2, б, в), ис-

зависящая ни от участка дендрита, ни от его диаметра. Спустя 3 ч после инъекции в отдельных клеточных отростках прослеживается появление микротрубочек, а к началу первых суток и полное восстановление их структуры, приобретающей иногда резко выраженный извитой характер.

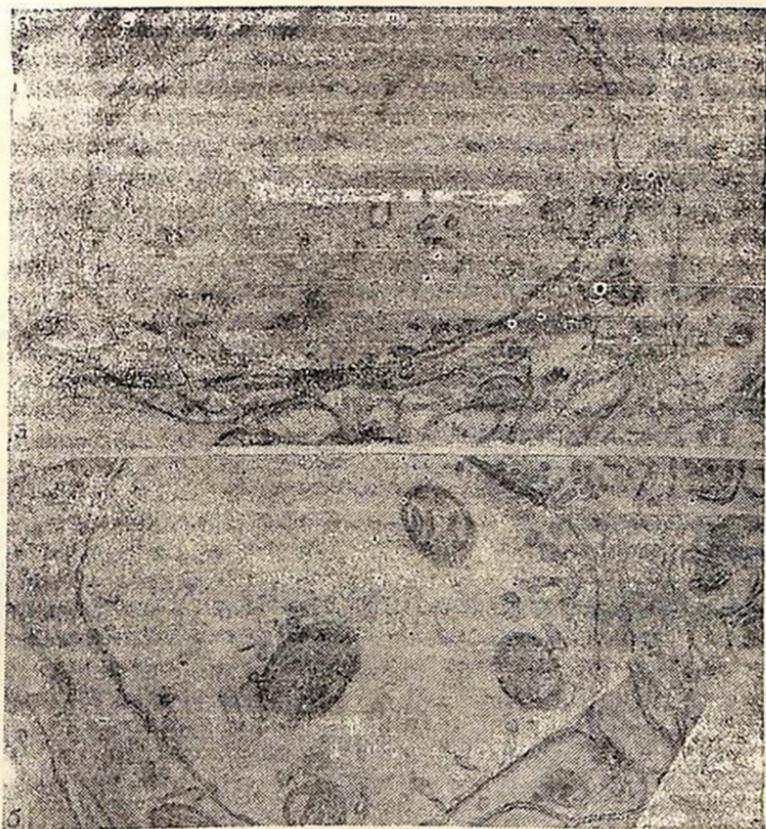


Рис. 2. Резкое уменьшение количества микротрубочек в дендритах при введении нейролептиков: а—введение галоперидола (сенсомоторная кора); увел. 28000; б—введение амназина (сенсомоторная кора), увел. 20000.

Как известно, фибриллярные элементы цитоплазмы (микротрубочки, микрофиламенты) различных клеток могут быть связаны с рецепторами клеточной поверхности и рассматриваться как рецепторно-скелетный комплекс [18, 19]. Полагают, что микротрубочки функционально и морфологически объединяют отдельные участки цитомембраны: они построены из кислого белка тубулина и обладают свойством быстро распадаться и восстанавливаться. Температурная зависимость этого процесса очевидна: низкая температура способст-

ствует деполимеризации микротрубочек. Высокие концентрации Ca^{2+} , циклических нуклеотидов, в частности cGMP, способствующего реассоциации микротрубочек, величины pH и давления также выступают в качестве регуляторов указанного процесса. —

По-видимому, имеется связь между нейрональными рецепторами и микротрубочками, а контакты между молекулами галоперидола и аминазина с рецепторами оказываются небезразличными для фибриллярных элементов дендроплазмы. Реальность такого предположения очевидна, поскольку известно о существовании специфических ядов (колхицин, вибластин и т. д.), оказывающих разрушающее действие на микротрубочки и микрофиламенты (цитохалазины). Примечательно аналогичное действие некоторых местных анестетиков (дibuкаин, прокаин, тетракаин) [20].

Хотя выдвигаемая нами гипотеза слишком зигурна и аргументируется принципами проведения аналогии, тем не менее она может способствовать привлечению внимания специалистов различного профиля для разрешения затронутой проблемы. С другой стороны, она привлекательна и с точки зрения нового понимания механизмов «микротрубочковой катастрофы» [21], в частности в оценке вклада нарушений синаптической трансмиссии, изменяющейся при действии нейролептиков. В настоящее время считается установленным, что угнетающее действие последних на характер поведенческих реакций животных обусловлено неактивным состоянием синаптического аппарата, в частности синаптических пузырьков, концентрирующихся в центре аксоплазмы [22]. Согласно данным других источников [23], изученные препараты благодаря разрушающему и растворяющему действию на синаптические везикулы вызывают нарушение процессов медиации.

Между тем результаты наших исследований во все сроки наблюдения (30 мин, 3 и 24 ч) позволили выявить наличие многочисленных синаптических пузырьков, располагающихся по всей терминали аксона и в области активных зон. Отсутствие каких-либо заметных повреждений в пресинаптических окончаниях дает основание полагать, что межнейрональные коммуникации при введении нейролептиков нарушались преимущественно за счет деструктивных изменений в дендритах. По-видимому, активное поглощение препарата нейронами за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза и последующая деградация его лизосомальным аппаратом нейронов спустя сутки способствует сборке микротрубочек из димеров тубулина.

Что касается микротрубочек нейронов центрального серого вещества, то в первые 30 мин после введения нейролептиков они подвергаются альтерациям лишь в части дендритов. Спустя 3 ч не отмечалось изменений в общей картине, которая в течение суток после действия препарата характеризовалась появлением незначительного количества микротрубочек.

Обсуждая роль различных факторов в сборке-разборке микротрубочек, мы обращали внимание на необходимость соблюдения ряда

условий, пренятствующих или способствующих этому процессу. В частности, имеются указания о том, что увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме нейронов предотвращает процесс сборки и, возможно, приводит к дезагрегации микротрубочек [24]. Кроме того, они в качестве вторичного мессенджера необходимы для внутри- и



Рис. 3. Ультраструктурные изменения синапсов при введении аминазина: *а*—деструкция аксо-дендритического синапса по темному типу (гиппокам), увел. 25000; *б*—образование многочисленных аксо-дендритических синапсов (гиппокам), увел. 20000.

межклеточной передачи возбуждения [25]. Поэтому логично допустить, что любые отклонения в содержании этих ионов, основным источником которых является внутриклеточная жидкость, могут

влиять как на структуру микротрубочек, так и на генерацию потенциалов. Принимая во внимание тот факт, что синаптический аппарат в ответ на действие аминазина и галоперидола повсеместно сохраняет интактность (за исключением гиппокампа), мы допускаем возможность развития нейролептического эффекта не за счет повреждения ультраструктуры синапсов, а в результате нарушений во вторичной мессенджерной системе.

Таким образом, помимо специфического влияния на нейроны, галоперидол и аминазин оказывают дестабилизирующее действие на микротрубочковый аппарат дендритов. В свою очередь, кальциевый эффект, индуцированный нейролептиками, отражается на механизмах синаптической передачи и обуславливает нейролептическое действие препарата.

Отличительной стороной действия аминазина является его разрушающее действие в гиппокампе, приводящее в отдельных случаях к деструкции синапсов по темному типу (рис. 3, а), то есть к необратимым повреждениям, завершающимся полным распадом синапса и фагоцитозом его астроцитами [26]. По-видимому, в ответ на подобные альтернативные изменения синапто-архитектоники в порядке компенсаторной реакции происходит установление новых нейрональных взаимоотношений. Они характеризуются тем, что в дендрите, лишенном микротрубочек, удается идентифицировать до 4—5 и более аксо-дендритических контактов (рис. 3, б), что повышает информативность межнейронных связей [26].

На основании полученных результатов можно заключить, что независимо от исследованного отдела мозга во всех случаях регистрируются максимально приближенные изменения. Инъекция нейролептиков сопровождается высвобождением белков, ассоциированных с микротрубочками, среди которых важное место занимает нейроспецифический белок S-100. Поскольку белки группы S-100 подвергаются Ca^{2+} -зависимому взаимодействию с достаточно широким кругом белков нервной ткани, в том числе и с тубулином [7], то становятся понятны эффекты аминазина и галоперидола, характеризующиеся дестабилизирующим действием в отношении микротрубочек.

ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL BASIS OF "MICROTUBULE CATASTROPHE" INDUCED BY NEUROLEPTICS

BARDAKHCHIAN E. A., MAKLIAROV Yu. S., KHARLANOVA N. G.,
KULIKOVA O. N.

Scientific Research Antiplague Institute, Medical Institute, Rostov on Don

Disturbances in neurospecific protein S-100 concentration and ultrastructural alterations in different parts of central nervous system after neuroleptics (aminazine and haloperidol) injection were investigated. At a peak of preparates action the protein S-100 content in brain was shown

to be raised. At the same time the microtubules practically completely disappears in dendrites. Twenty-four hours later the fine structure of microtubules was restored. Possible reasons of microtubules disaggregation and aggregation are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allen R. D. Ann. Rev. Biophysics and Biophys. Chem., v. 11, p. 265—290, 1985.
2. Воробьев В. С. — В кн.: Ультраструктура нейрона (Итоги науки и техники ВНИИТИ. Сер. Морфология человека и животных). М., т. 10, с. 6—26, 1983.
3. Lew's S. A., Isanoz I. E., Lee G.—H., Cowan N. J. Nature, v. 342, № 6249, p. 498—505, 1989.
4. Appri R. A. G., Sain J. R. Mol. Pharmacol., v. 19, p. 295—301, 1981.
5. Ekström P., Kanje M., Edström A. Acta Physiol. Scand., v. 116, p. 121—125, 1982.
6. Андросова Л. В., Бурбаева Г. Ш. Биохимия, т. 52, № 7, с. 1162—1168, 1987.
7. Полетаев А. Б., Мещерякова О. Д. Биохимия, т. 47, № 11, с. 1835—1838, 1982.
8. Полетаев А. Б., Шерстнев В. В. Успехи соврем. биол., т. 103, № 1, с. 124—132, 1987.
9. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., Мир, 247 с., 1971.
10. Светухина В. М. Архив анат., т. 42, № 2, с. 31—45, 1962.
11. Повилайтите П. Е., Бардахчян Э. А., Вилков Г. А. Цитология и гуснетика, т. 20, № 5, с. 323—326, 1986.
12. Каркищенко Н. Н., Солодилов В. В., Бардахчян Э. А. Изв. Сев.—Кавк. науч. центра высш. шк., № 2, с. 122—127, 1987.
13. Бардахчян Э. А., Повилайтите П. Е., Поляк А. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 106, № 6, с. 730—733, 1988.
14. Макляков Ю. С., Страдомский Б. В., Бардахчян Э. А. Нейрохимия, т. 9, № 1, с. 91—95, 1990.
15. Dautry-Varsa A., Lodish H. F. Sci. Amer., v. 250, № 1, p. 48—54, 1984.
16. Питерс А., Палей С., Узбергер Г. Ультраструктура нервной системы. М., Мир, 1972.
17. Косицын Н. С. Микроструктура дендритов и аксодендритических связей в центральной нервной системе. М., Наука, 1976.
18. Yahara I., Edelman G. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 72, p. 1579—1583, 1975.
19. Edelman G. M. Science, v. 192, p. 218—226, 1976.
20. Roth J. E. p. Pathol. (Iena), Suppl. 3, p. 186—186, 1978.
21. McIntosh J. R. Nature, v. 312, № 5931, p. 196—197, 1984.
22. Втюриц Б. В., Туманов В. П. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 72, № 10, с. 108—110, 1971.
23. Матвеев В. Ф. Морфологические изменения в головном мозге при экспериментальной дизергической нитоксикации. М., Медицина 1976.
24. Капуччинелли П. Подвижность живых клеток, М., Мир, 1982.
25. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. т. 1. Нервная система. М., Мир, 1985.
26. Боголенов Н. Н. Ультраструктура синапсов в норме и патологии. М., Медицина, 1975.

Поступила 23. IV. 1991