



УДК 577.175.3

МОДЕЛЬНАЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА: ПРОШЛЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ В БУДУЩЕМ

*УИТТАКЕР В. П.

Отдел нейрохимии, Институт биофизической химии им. Макса Планка, Геттинген, ФРГ

Модельные системы в биологии. Возможно, что первое высказывание о полезности использования модельных систем в биологии было сделано Thomas Henry Huxley в предисловии к его книге по зоологии рака, опубликованной в 1880 г. [1]. Он заявил:

«Когда я писал книгу о раке, моим намерением не было представить зоологическую монографию об этой группе животных, и я не ставил перед собой цель написать трактат о нашем английском раке... то, что я имел в виду, гораздо скромнее, хотя при современном состоянии науки не менее полезно. В самом деле, я хотел показать, как тщательное изучение одного из обычных и весьма незначительных животных ведет шаг за шагом от ограниченного познания к широким обобщениям и к наиболее трудным проблемам зоологии, даже биологической науки вообще».

Со времен Huxley нейробиологи широко использовали модельные системы (табл. 1): гигантский аксон кальмара, который оказался идеальной модельной системой для изучения распространения потенциала дей-

Таблица 1

Модельные системы в нейробиологии

Вид животного	Структура	Исследованные функции	Авторы
Моллюск морской амен	Нейронная сеть	Простые системы обучения	Kandel, Strumwasser
Кальмар	Гигантский аксон	Потенциал действия	Young, Hodgkin, Huxley
Рак	Рецептор расщепления	Торможение	Adamkiewicz, Elliott
Электрический скат	Электромоторная система	Накопление и выход нейромедиатора	Whittaker
Пиявка	Брюшная цепочка	Рецептор АХ	Karlin, Raftery, Changeux, Numa, Nicholls
Омар	Брюшная цепочка	Плавающий рефлекс	Nicholls
		Специфические клеточные антигены	
		Нейромедиаторы, опосредование	Kravitz

* Статья оформлена по материалам доклада, представленного на конференцию «Функциональная нейрохимия белков, пептидов, трансмисмиттеров», Ереван, 1986 г. (печатается с сокращениями).

ствия: морской моллюск *Aplysia* (морской заяц), так много используемый в качестве простой модели обучения и поведения: приведший к идентифицированию ГАМК как тормозного синаптического нейромедиатора рецептор растяжения рака, которого изучал Huxley. Это только три модельные системы из многих, которые можно было бы упомянуть.

Эта статья посвящена модельной системе, которую мы и другие исследователи широко и интенсивно использовали в прошедшие 10—15 лет — электромоторной системе электрического ската (*Torpedo*). Я надеюсь показать, что способности этой системы далеко не исчерпаны, и она предоставляет благоприятные возможности для исследований в 90-х годах.

На рис. 1, а и в представлена электромоторная система электрического ската (*Torpedo*) с телами клеток в электрических долях, миелинизированными аксонами, образующими 4 больших нервных ствола, которые между жабрами проникают в электрический орган.

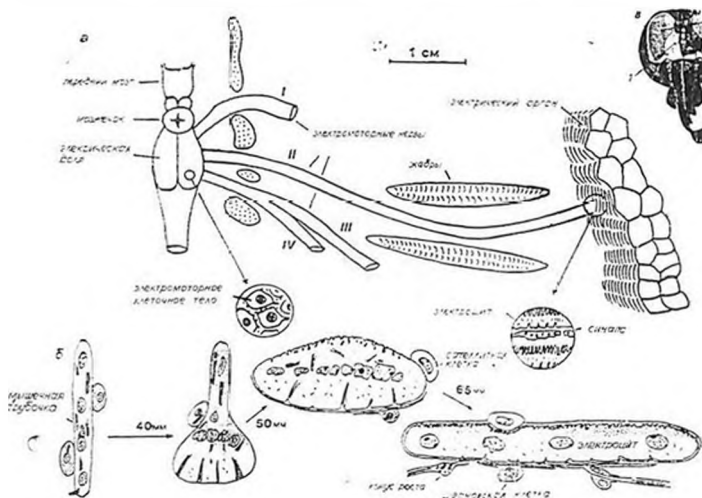


Рис. 1. а — электромоторная система электрического ската (*Torpedo*); б — развитие электроцитов мышечных трубочек; в — частично вскрытая рыба: электрическая доля (1), нервы (2), электрический орган (3)

моторные нейроны электрических долей представляют собой холиннергические клетки, их тела расположены в парных ядрах, выступающих на стволе головного мозга рыбы, а пресинаптические окончания их аксонов находятся в электрическом органе. Последний состоит из размещенных в сотовидном порядке пакетов уплощенных электроцитов, вентральную поверхность которых и покрывают пресинаптические нервные окончания. Холинореактивные постсинаптические клетки электрического органа (электроциты) развиваются (рис. 1, б) из вертикально ориенти-

рованных мышечных трубочек в процессе роста эмбрионов (в длину) от 40 до 65 мм. Хотя клетки электрического органа мышечные по происхождению, он во много раз богаче иннервирован, чем мышцы, и содержит синаптического материала приблизительно в 1000 раз больше, чем эквивалентная по массе мышечная ткань. По мере роста ската эмбриональные электроциты увеличиваются и за счет сливающихся с ними расположенных на них сателлитных клеток (рис. 1, б), а шванновские клетки постепенно покрывают нервные окончания, представленные на том же рисунке врастающими конусами роста.

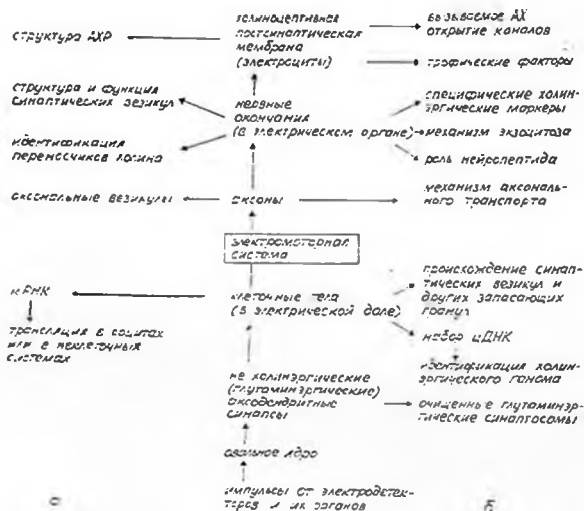


Рис. 2. Разработка проблем электромоторной системы: а—изучение далеко продвинуто, б—только начато

В общем, эта система является идеальной для изучения биохимии холинергической передачи. Однако возможность ее использования в нейробиологии гораздо шире. Так, при ее помощи можно было изучать такие проблемы, как контроль над развитием трофических факторов, явление запрограммированной клеточной смерти и наличие в той или другой условно-нейромедиаторной системе физиологически активных нейропептидов.

На рис. 2 представлены некоторые проблемы изучения электромоторной системы: те, разрешение которых далеко продвинуто (а), и те, разработка которых в настоящее время еще только начата (б), и их разрешение потребует усилий и в 90-х годах. Все это не умозрительная программа, а практические проекты. В докладе будут лишь кратко про-

ня чеш и съсредоточено внимание **НАШИЯ** **СЪОБЩАТЕЛИ**

Трофические факторы. При работе с совместными культурами тканей эмбрионального электрического органа и электрической доли мозга мои сотрудники Richardson, Rimschen и Fox [4] обнаружили два трофических фактора, образуемых электрическим органом: 1) термостабильный диализуемый нейротрофический фактор, необходимый для жизнеспособности тел электромоторных клеток в электрической доле мозга, и 2) термолабильный недиализуемый холинотрофический фактор, вызывающий экспрессию холинергических свойств у клеток электрической доли. Идентифицирование этих факторов является интересной задачей для будущих исследований.

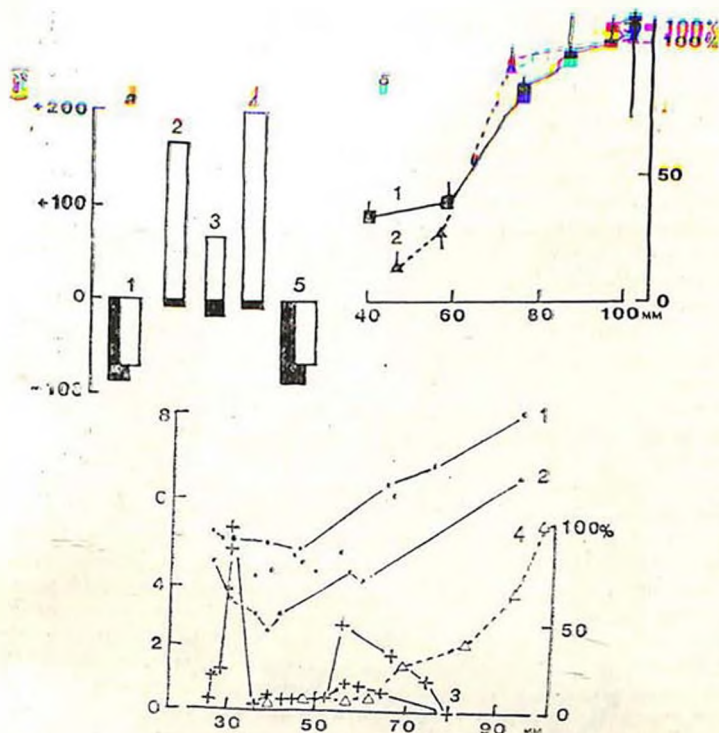


Рис. 3. а—повышение (+) или снижение (—) числа жизнеспособных эмбриональных электромоторных нейронов (черные столбики, в %) и холинэстеразной активности (белые столбики, в %) в эксплантах ткани электрической доли 50—60-миллиметровых эмбрионов электрического ската, находившихся в культуральной среде без добавления (1) или с добавлением экстракта электрического органа 105-миллиметрового эмбриона, нативного (2) или подвергнутого нагреванию (3), охлаждению (4), диализу (5); по оси ординат—изменения, в %; б—ответ эксплантата ткани электрической доли 50—60-миллиметрового эмбриона на экстракт электрического органа 40—110-миллиметровых эмбрионов.

по оси ординат (слева)—число клеток, $\times 10^{-4}$, по оси ординат (справа)—ферментативная активность по сравнению с неинкубированными, в %. Данные а и б относятся к 1-недельному периоду

недифференцируемый холинотрофический фактор не способен оказывать эффект в отсутствие нейротрофического (ср. рис. 3, а. белые столбики 2 и 5). Так, данные, представленные на рис. 3, в, показывают, что продукция нейротрофического фактора эмбриональным электрическим органом начинается лишь у 80-миллиметровых эмбрионов как раз в тот период, когда волна гибели клеток в электрической доле спадает и число жизнеспособных клеток повышается вместе с увеличением и ХАТ-активности. Это свидетельствует о том, что препрограммированный синтез трофических факторов в развивающемся электрическом органе стабилизирует размер пула электромоторных нейронов и вызывает в них синтез ХАТ именно перед началом функционального синаптогенеза, имеющего место, когда эмбрионы достигают величины 90-100 мм.

Антисыворотки, связанные с нейромедиаторами, как специфические холинэргические маркеры. Мы много занимались также идентифицированием специфических холинэргических маркеров, используя антитела, выработанные на очень чистые препараты электромоторных синаптических пузырьков и пресинаптических плазматических мембран, которые были выделены методами субцеллюлярного фракционирования. Первым из таких маркеров явился специфический протеогликан пузырьков (СПГП). Он позволил нам следить гистохимически за образованием пузырьков в теле клетки, их передвижением по аксону и накоплением в нервных окончаниях [5, 6]. На рис. 4, а можно рассмотреть сделавшиеся видимыми под влиянием анти-СПГП-антисыворотки и меченого флуоресцентом второго антитела пузырьки, готовые к переходу по аксону из тела электромоторного нейрона. На рис. 4, б виден СПГП, скопившийся в аксоне проксимально от лигатуры, а на рис. 4, г заметно уменьшение содержания СПГП в пресинаптическом окончании, вызванное перевязкой аксона (ср. рис. 4, г с картиной в интактном органе на рис. 4, а).

В других работах [7—9] мы идентифицировали специфический холинэргический маркер (СХМ-1)—трисналоганглиозид необычной конфигурации. На основе недавней работы Tettamanti и его сотрудников, выполненной вместе с нами, в этом веществе один остаток снаховой кислоты присоединен к ацетилглюкозаминовому остатку. Антисыворотка к этому ганглиозиду специфически вызывает избирательный лизис комплемента холинэргической субпопуляции синапсом головного мозга [8].

На рис. 5, а показан избирательный выход ХАТ из препаратов синапсом коры больших полушарий мозга морской свинки, подвергнутых лизису комплемента в присутствии антисыворотки к анти-СХМ-1. При этом маркер адренэргических синапсом (тирозингидроксилаза) не выходил: выходило около 10% цитоплазматического маркера — лактатдегидрогеназы. Это соответствует той доле синапсомной цитоплазмы, которая отвечает за холинэргическую субпопуляцию пузырьков. На рис. 5, б представлены подобные результаты, полученные в случае препаратов синапсом, нагруженных перед лизисом радиоактивной деоксиглюкозой (в качестве цитоплазматического маркера) и мечеными же нейромедиаторами — глутаматом, ГАМК, дофамином, норадреналином

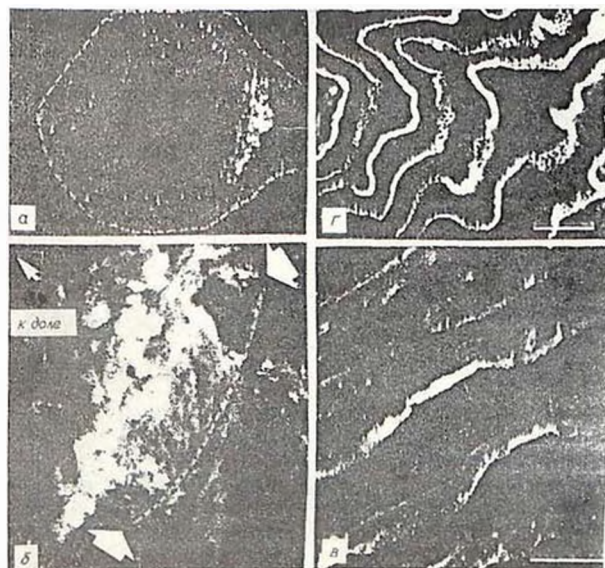


Рис. 4. а—СПП-положительные органеллы (синаптические пузырьки), готовые к выходу из перикариона (очерчено) электромоторного нейрона; б—СПП-иммунореактивность, накопившаяся над перемычкой (между стрелками); в и г—СПП-иммунореактивность в окончаниях электромоторного нерва к центральной поверхности электроцита, когда аксон переязан (в) и интактен (г)

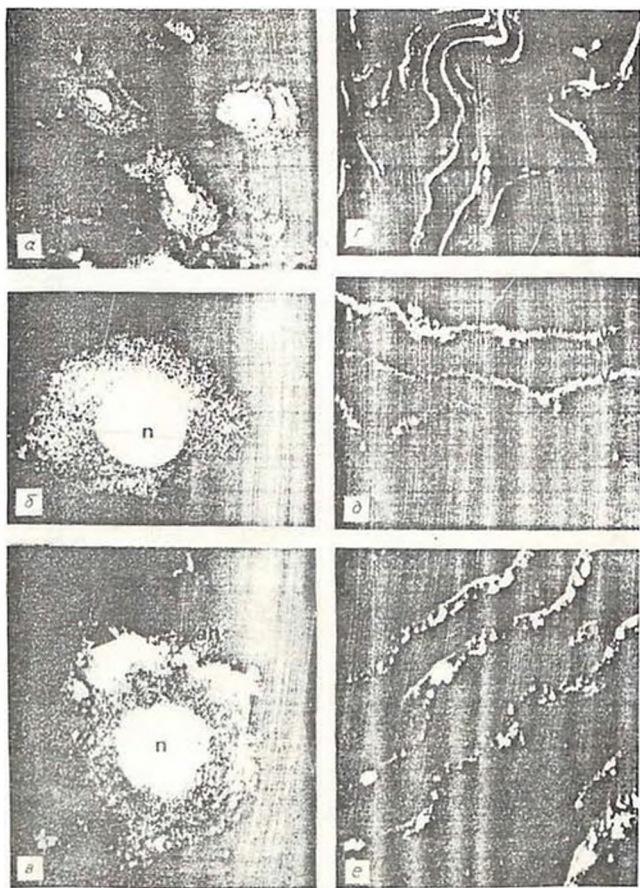


Рис. 6. ВКП-подобная иммунореактивность в криостатных срезах электрической доли (а, б, н) и электрического органа (i, л, с) после перенязки электромоторных аксонов (а, б, i, л) и в нерве (а, е); б и л—увеличение структур в полях, соответствующих а и i. Аккумуляция западающих гранул наблюдается в аксонном бугорке. Клеточное ядро (n) также окрашивается

и серотонином (в качестве маркеров соответствующих синаптических субпопуляций) [10]. При этом также подвергалась лизису лишь холинергическая субпопуляция, а количество высвобождавшейся деоксиглюкозы соответствовало ее фракции, захваченной этой субпопуляцией. Наоборот, лизис комплемента неспецифических антикортикальных антител сопровождался выходом вместе с деоксиглюкозой и всех нейромедиаторов. Эти эксперименты также показали насколько специфичен захват различных нейромедиаторов разными субпопуляциями.

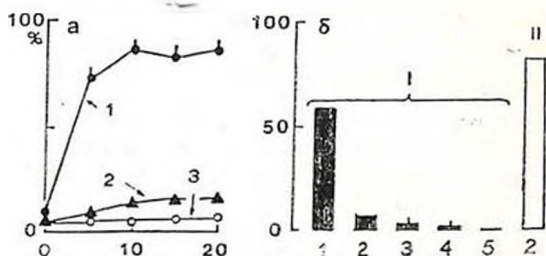


Рис. 5. Избирательный вызываемый комплементом лизис холинергических синапсов больших полушарий: головного мозга морской свинки после сенсibilизации анти-СХМ-1 антисывороткой: а—холинацетилтрансфераза (1), лактатдегидрогеназа (2), тирозингидроксилаза (3); по оси абсцисс— время (в мин), по оси ординат—выход, в %; б—результаты такого же опыта [10] с сенсibilизацией анти-СХМ-1 антисывороткой (1) с синапсами, нагруженными деоксиглюкозой (2), глутаматом (3), ГАМК (4), серотонином, норадреналином и дофамином (5); избирательный выход лишь холинацетилтрансферазы (1); выход всех компонентов при неспецифической сенсibilизации под влиянием антисыворотки против всего комплекса антигенов коры больших полушарий (II, белый столбик)

Функция СХМ-1 в настоящее время неизвестна, но одной из возможностей, которую мы рассматриваем, может быть то, что он присоединяется к комплементарной структуре холинорецептивной клетки-мышцы во время синаптогенеза. Результаты недавних эмбриологических исследований электрического скота поддерживают эту точку зрения. Изучение функции СХМ-1 и его возможной роли в аутоиммунных заболеваниях НС, сопровождающихся избирательной дегенерацией холинергических нейронов, будет целью исследований еще и в следующем 10-летии.

Кальций. Мало известно о механизме экзоцитоза. Наша группа (Valker, Sudhof и Fritsche) недавно обнаружила новый класс белков, которые прочно связываются с липопротеиновыми мембранами. Мы полагаем, что этот регулируемый Ca^{2+} процесс, возможно, участвует в экзоцитозе и слиянии пузырьков.

Если полученные при гомогенизации препараты мембран электрического органа хорошо промыты Ca^{2+} -содержащими соевыми растворами и затем элюированы той же средой, содержащей ЭГТА, то

такой экстракт содержит один главный белковый компонент с M_r 32 кД [11, 12]. Этот белок, получивший название калелектрина [12], связывается с мембранами в присутствии Ca^{2+} , а также усиливает вызываемую двухвалентными катионами коацервацию мембранных пузырьков, включая синаптические, со специфическим участием Ca^{2+} [13]. Антисыворотка к калелектрину вступает в перекрестные реакции с близкими белками во многих клетках и тканях млекопитающих, включая печень, мозговой слой надпочечников, головной мозг, лейкоциты и сперматозоиды. Одной из функций калелектрина может быть то, что он способствует прикреплению содержащих десмин цитоскелетных элементов к мембране при помощи фосфатидилсерина и других отрицательно заряженных липидов [14]. Было установлено, что антисыворотка против калелектрина электрического скота может опознавать целый класс находящихся во многих клетках новых белков, обладающих общими для них повторяющимися аминокислотными последовательностями и способностью к Ca^{2+} -зависимому связыванию с липидами [15].

Идентифицирование участка генома, кодирующего холинергическую функцию. Столь большие тела электромоторных нейронов должны обладать объемом, по крайней мере в 30 раз превышающим размеры пресинаптических нервных окончаний. Это не удивительно, так как их перикарионы полны полисомами, а также грубым и гладким эндоплазматическим ретикулом. Из этих клеток была выделена мРНК [16], которая проявляла высокую активность в бесклеточной трансляционной системе: среди образующихся продуктов был обнаружен ряд цитоплазматических белков, свойственных пузырькам и нервным окончаниям. При посредстве этой мРНК была получена кДНК, которую успешно вводили в *E. coli* [17]. Был выполнен скрининг с меченой кДНК, выделенной из мышцы (как образец не нервной ткани) и из мозжечка (как образец структуры мозга с дефицитом холинергических нейронов). Приблизительно из 3500 клонов было изолировано 50, которые соответствовали специфично лишь кДНК электрической доли и, таким образом, несодержавшие последовательностей, кодирующих как белки, общие для всех нейронов, так и «хозяйственные» белки, свойственные вообще всем клеткам. Обнаружено, что лишь очень небольшое число клонов оказалось одинаково положительным в случае как электрической доли, так и мозжечка; еще меньше выявилось отвечающих и на пробу с мышечной тканью. Теперь предприняты попытки, используя вектор экспрессии, установить клоны, содержащие кДНК-последовательность, которая кодирует холинергические синаптические белки.

Вазоактивный кишечный пептид: холинергический ко-нейромедиатор? Этот последний раздел посвящен некоторым новым работам [18], показавшим, что в электромоторных нейронах имеется какой-то пептид с иммунореактивностью, близкой к проявляемой вазоактивным кишечным пептидом (ВКП); этот пептид из тел электромоторных нейронов транспортируется в нервные окончания.

На рис. 6 показано иммунохимическое выявление ВКП-подобной иммунореактивности в телах электромоторных клеток нормальной рыбы (рис. 6, а) и рыбы, у которой электромоторные нервы оставались перевязанными в течение 14 дней (рис. 6, а, б). Обратите внимание на усиление иммунореактивности в электрической доле после перевязки. Эти

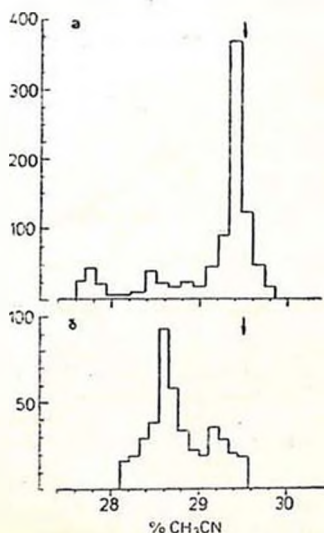


Рис. 7. Хроматография ВКП-подобной иммунореактивности электрической доли (а) и электрического органа (б). По оси ординат—концентрация ВКП, в мМ/л

результаты можно сравнить с подобными данными, полученными в случае СПГП и анти-СПГП-антисыворотки (рис. 4). Следует отметить также аккумуляцию накопительных гранул в аксонном бугорке (рис. 4). В соответствии с этим лигатура электрического органа (рис. 6, а, д) сопровождалась уменьшением ВКП-реакции из-за отключения содержащих ВКП гранул в результате перевязки аксона (рис. 6, а и е), так как локализация ВКП, подобно СПГП, ограничена нервными окончаниями, расположенными на вентральной поверхности электроцитов.

Количественные определения (табл. 2) подтвердили иммунохимические наблюдения: в результате перевязки электромоторных аксонов ВКП-иммунореактивность электрической доли повышалась, а в электрическом органе падала.

ВКП-подобный иммунореактивный материал электрической доли (а) и электрического органа (б) был подвергнут хроматографии (рис. 7). Можно видеть, что исследуемый препарат вел себя не совсем идентично свиному ВКП, объем пиков которого показан стрелками. Это было

подтверждено также и тем, что кривые вытеснения антисыворотки со свиного ВКП этим пептидом и ВКП электрического ската не совпадали (рис. 8). Далее было обнаружено, что иммунореактивные пептиды неодинаковы в двух разных участках электромоторных нейронов. Очист-

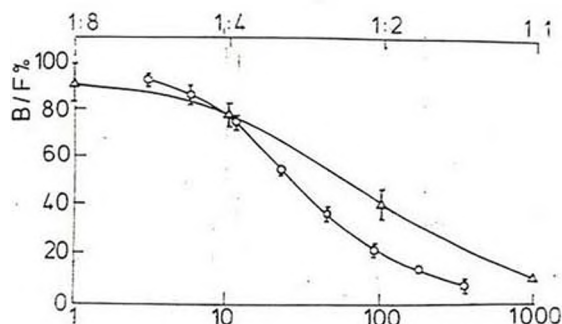


Рис. 8. Вытеснение антисыворотки со свиного ВКП холодным раствором свиного ВКП (○) и ВКП электрического ската (Δ). По верхней оси абсцисс—величина добавления экстракта; по нижней—концентрация пептида, в пМ/л; по оси ординат—отношение связанной антисыворотки к свободной, в %

Таблица 2

Эффект перевязки на величину ВКП-подобной иммунореактивности

Ткань	ВКП-подобная иммунореактивность в фмоля эквивалентах/г		изменения в %
	контроль	лигатура	
Электрическая доля	740±68	1371±226	+84±10
Нервы	183±32	244±38	+34±11
Электрический орган	130±16	60±11	-47±5

Примечание. Данные для индивидуальной рыбы являются средними из результатов 3 определений. Величины изменений представляют собой умноженные на 100 величины при перевязке с вычетом контрольных данных и деленные на эти контрольные величины. Отрицательные величины указывают на уменьшение, а положительные—на увеличение после перевязки. Результаты определений в первых относятся к их части, проксимальной к перевязке. Все данные статистически достоверны ($p < 0,01$).

но также, что при транспорте ВКП из тела клетки в нервное окончание происходит какой-то вид процессинга, который включает удаление гидрофобной последовательности в С-концевой части пептида.

Располагая такой хорошо охарактеризованной холинергической системой, мы теперь имеем модель для изучения запутанной и интригующей проблемы ко-нейромедиаторов. Сопровождается ли высвобождение АХ также и выходом ВКП? Какую роль играет ВКП в модуляции холинергической функции? Разработка данных и близких к ним вопросов с использованием этой и других модельных систем будет занимать нас и в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цит. по *Kandel E.* Cellular Basis of Behavior. Freeman, San Francisco, 1976.
2. *Heilbronn E.*—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), 2nd ed., v. 10, p. 241—284. New York, Plenum Press, 1985.
3. *Numa M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikuyotani S., Furutani Y., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S.* Nature, v. 302, p. 528—532, 1983.
4. *Richardson G. P., Rinschen B., Fox G. Q.* J. Comp. Neurol., v. 231, p. 339—352, 1985.
5. *Jones R. T., Walker J. H., Stadler H., Whittaker V. P.* Cell Tiss. Res., v. 223, p. 117—126, 1982.
6. *Walker J. H., Obrocki J., Zimmermann C. W.* J. Neurochem., v. 41, p. 209—216, 1983.
7. *Jones R. T., Walker J. H., Richardson P. J., Whittaker V. P.* Cell Tiss. Res., v. 218, p. 355—373, 1982.
8. *Richardson P. J., Walker J. H., Jones R. T., Whittaker V. P.* J. Neurochem., v. 38, p. 1605—1614, 1982.
9. *Ferretti P., Borroni E.* J. Neurochem., v. 42, p. 1085—1093, 1984.
10. *Richardson P. J.* J. Neurochem., v. 41, p. 640—648, 1983.
11. *Walker J. H.* J. Neurochem., v. 39, p. 815—823, 1982.
12. *Südhof T. C., Ebberke M., Walker J. H., Fritsche U., Boustead C.* Biochemistry, v. 23, p. 1103—1109, 1984.
13. *Südhof T. C., Walker J. H., Obrocki J.* EMBO J., v. 1, p. 1167—1170, 1982.
14. *Fiedler W., Walker J. H.* Eur. J. Cell. Biol., v. 33, p. 34—41, 1985.
15. *Geisow M. et al.* Nature, v. 320, p. 631—638, 1986.
16. *Schmid D. W., Stadler H., Whittaker V. P.* Eur. J. Biochem., v. 122, p. 633—639, 1982.
17. *Schmid D. W., Girou C.* J. Neurochem. (in press), 1986.
18. *Agoston D. V., Conlon J. M.* J. Neurochem., v. 47, p. 445—453, 1986.

Поступила 31. XI 1986