Биомедицинская химия, 2007, том 53, вып. 3, с. 290-296.

УДК 612.89.03

ВЛИЯНИЕ Н-ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ БЛОКАДЫ НА СОДЕРЖАНИЕ АДЕНИЛАТНЫХ МАКРОЭРГОВ И НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ СИСТЕМУ ЛДГ В СИМПАТИЧЕСКОМ ГАНГЛИИ

П.Л. Гореликов*, С.В. Савельев

НИИ морфологии человека РАМН, 117418, Москва, ул. Цюрупы, 3;
тел.: 120-00-50; эл. почта: petr_gorelikov@mail.ru.

Определяли активность изоферментов ЛДГ и содержание ATP, ADP, AMP в краниальном шейном симпатическом ганглии (КШСГ) кроликов в условиях экспериментально вызванной частичной и полной блокады ганглинарных Н-холинергических (Н-ХЕ) синапсов. Установлено, что при блокаде меняется изоферментный спектр ЛДГ: при частичной блокаде из спектра исчезают катодные фракции (ЛДГ-4 и ЛДГ-5), при полной блокаде исчезает также и ЛДГ-3. Активность остающихся в спектре анодных фракций (ЛДГ-1 и ЛДГ-2) и общей ЛДГ значительно снижается. Изменения последовательно нарастают вместе с усилением блокады. В условиях полной блокады общая активность ЛДГ составляет всего 9% от уровня ее активности в контроле, а активность ЛДГ-1, также как и активность ЛДГ-2, составляет 16% от активности этих изоферментов в контроле. Содержание макроэргов при блокаде также существенно уменьшается. Содержание ATP при частичной блокаде падает на 53%, при полной - на 93%, содержание ADP уменьшается соответственно на 33% и 65%, AMP – на 80% и 56%. Динамика изменений ЛДГ и макроэргов указывает на то, что блокада Н-ХЕ синапсов вызывает в симпатическом ганглии нарушение энергетического гомеостаза и энергетический дефицит. Это позволяют рассматривать активность Н-ХЕ синапсов в качестве необходимого фактора, обеспечивающего энергетический гомеостаз симпатического ганглия. Предполагается, что основным механизмом контроля энергетического гомеостаза в симпатическом ганглии со стороны Н-ХЕ синапсов является обеспечение ими ионного баланса, нарушение которого при синаптической блокаде и является вероятной причиной изменений ферментативной системы ЛДГ и макроэргов.

Ключевые слова: ЛДГ, макроэрги, симпатический ганглий, Н-холинергические синапсы, энергетический обмен.

ВВЕДЕНИЕ. Н-холинергические (Н-ХЕ) синапсы выполняют в организме самый широкий спектр функций - от регуляции гемодинамики до участия в когнитивной деятельности мозга [1-3]. Нарушение нормальной функции упомянутых синапсов - причина различных патологических состояний [2, 4]. В связи с этим в клинической практике широко применяются и продолжают интенсивно апробироваться в качестве агонистов или антагонистов Н-холинорецепторов различные фармакологические средства [3, 5, 6]. Однако, если клинико-физиологическим аспектам фармакологической модуляции Н-ХЕ синаптической передачи посвящено достаточно много исследований, то о метаболических сдвигах после воздействия на Н-ХЕ синапсы в соответствующих отделах нервной системы известно сравнительно немного [7-9]. Вместе с тем, такие исследования представляют вполне понятный интерес в свете получения детальных представлений о молекулярных механизмах, лежащих в основе

* - адресат для переписки

фармакологической модуляции Н-ХЕ синаптической передачи и перспектив направленного влияния на различные отделы нервной системы.

В связи с этим важным представляется исследование метаболических изменений в симпатических ганглиях после применения фармакологической блокады Н-ХЕ синаптической передачи с преганглионарных на постганглионарные волокна, которая является одним из эффективных средств для создания гипотензивного эффекта в клинической практике [3, 10].

Цель настоящей работы - в условиях экспериментально вызванной как частичной, так и максимальной фармакологической блокады ганглионарной Н-ХЕ синаптической передачи изучить в краниальном шейном симпатическом ганглии (КШСГ) аденилатный пул макроэргов и ферментативную систему ЛДГ, которые, как известно [11-13], являются важнейшими факторами регулирующими как энергетический обмен, так и клеточный метаболизм в целом. Вместе с этим важно рассмотреть вопрос и о возможных молекулярных механизмах эффекта блокады Н-ХЕ синаптической передачи на параметры энергетического обмена – ЛДГ и аденилатный пул макроэргов.

МЕТОДИКА. В эксперименте использовано 23 половозрелых кролика породы шиншилла. Н-ХЕ синапсы блокировали ганглиоблокатором димеколином, избирательно прерывающим Н-холинергическую передачу с преганглионарных на постганглионарные волокна симпатических ганглиев [3]. Эксперимент планировали в соответствии с установленной для кроликов фармакодинамикой димеколина [14]. Для создания частичной и полной блокады препарат вводили подкожно в дозах 10 и 50 мг/кг соответственно. После введения указанных доз препарата материал брали через 1 час, когда проявление блокирующего действия максимально. Животных выводили из эксперимента в соответствии с нормами и правилами, изложенными в приказе МЗ РФ №267 от 19. 06. 2003 “Об утверждении правил лабораторной практики”.

Определение аденилатных макроэргов проводили методом, сочетающим концентрирование адениловых нуклеотидов уксуснокислой ртутью с последующим разделением компонентов аденилатного пула с помощью распределительной тонкослойной хроматографии на силуфоловых пластинках, который позволяет с достаточной степенью воспроизводимости результатов и точности анализа изучать динамику количественных изменений компонентов аденилатного пула [15]. После препарирования и замораживания в жидком азоте, ганглии (правый и левый) взвешивали в замороженном состоянии на аналитических весах (5-7 мг) и гомогенизировали 2 ганглия в 3 мл 5% охлаждённого раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Полученный от обоих ганглиев гомогенат центрифугировали на высокоскоростной центрифуге (Poland, type-216) при 2 тыс. об/мин в течение 10 мин. Осадок с белковой фракцией удаляли, а в надосадочную жидкость добавляли для осаждения нуклеотидов 20% раствор уксуснокислой ртути в 2% растворе уксусной кислоты из расчета 1 мл на 2 мл надосадка. Раствор перемешивали и выдерживали 15 мин во льду и повторно центрифугировали при тех же условиях. После чего надосадочную жидкость тщательно отделяли от образующегося ртутного осадка нуклеотидов, в который после этого добавляли 3 мл 2% раствор уксусной кислоты и снова центрифугировали для отмывания избытка уксуснокислой ртути при соблюдении тех же условий. После удаления надосадочной жидкости доводили объем ртутного осадка аденилатов дистиллированной водой до 0,4 мл и затем разлагали сероводородом на холоду в течение 5 мин. Затем суспензию аэрировали (2 мин) с последующим отделением образовавшейся взвеси сернистой ртути с помощью центрифугирования, при выше указанных параметрах. Надосадочную жидкость со свободными нуклеотидами в объёме 0,02 мл наносили на силуфоловую пластинку UV-254 с линией старта 2 см от нижнего края. При этом рядом с каждой пробой каждый раз наносили стандартные растворы свидетелей (ATP, ADP и AMP в концентрации 0,25 мМ в объёме 0,02 мл). Силуфоловые пластинки с нанесенными пробами высушивали струей холодного воздуха и помещали в герметичную хроматографическую камеру, в которую предварительно наливали слоем в 1 см (достаточным для насыщения объема камеры парами растворителя) растворитель по Хейнсу-Ишервуду следующего состава: *n*-пропиловый спирт, 25% водный раствор аммиака, дистиллированная вода в соотношении 60:30:10. При использовании данного растворителя наибольшая скорость движения была у AMP, затем ADP и ATP. Когда фронт растворителя поднимался на высоту 10–15 см, пластинки вынимали, высушивали на воздухе. Местоположение нуклеотидов идентифицировали в УФ с помощью хроматоскопа Брумберга. Соответствующие участки с нуклеотидами и контрольный такой же площади, без нуклеотидов обводили простым карандашом, вырезали и обрабатывали 3 мл 0,1 М раствором соляной кислоты (2 час, 37°С) и затем центрифугировали. Полученные таким образом элюаты, содержащие компоненты адениловой системы, спектрофотометрировали на приборе СФ-16 с контролем в максимуме (260 нм) и минимуме (290 нм) поглощения аденина. Из первой величины вычитали вторую (специфическое поглощение, обусловленное аденином). Молярную концентрацию аденина рассчитывали, принимая во внимание, что растворы аденина (1 моль/л) характеризуются экстинкцией $14{,}2\times10^3$ $М^{-1}\bullet см^{-1}$. Количество нуклеотидов выражали в мг%, учитывая объем нанесенного на хроматограмму центрифугата и все разведения в процессе работы. В контроле и в каждой из серий опыта использовано по 3 животных. Анализировали по 4 пробы от каждого животного.

Анализ изоферментного состава ЛДГ осуществляли разделяя их с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ) по методике, специально разработанной для этого фермента [16], в микромодификации [17], позволяющей провести более четкое разделение отдельных фракций. Ганглий после извлечения гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера в 1,2 мл трис-глициновом электрофоретическом буфере с рН 8,65. Гомогенат центрифугировали на вышеуказанной центрифуге при 2 тыс. об/мин в течение 15 мин, затем осторожно отбирали надосадочную жидкость для последующих операций. Электрофорез проводили на приборе фирмы “Reanal” (Венгрия) с 12 трубками размера 70×6,3 мм. Использовали 5,5% ПАГ с рН 8,9, который готовили по рецепту фирмы. Трубки заполняли свежеприготовленным ПАГ высотой 4,5 см и после окончания полимеризации (20-30мин) на ПАГ колонку наносили предварительно разведенный 40% раствором сахарозы (1:1) исследуемый экстракт в объеме 0,06 мл, который обеспечивал четкое разделение изоферментов. Для предотвращения смешивания с электрофоретическим буфером на экстракт наслаивали 0,08 мл 40% раствора сахарозы. Электрофорез проводили при напряжении 300 В и силе тока 2,5 мА на трубку при 4°С в течении 30 мин. Окрашивание электрофореграмм изоферментов ЛДГ в ПАГе проводили с помощью специфической реакции с нитро-синим тетразолием (нитро-СТ) [16, 17]. Активность изоферментов ЛДГ определяли в относительных единицах методом количественной фотографической фотометрии [18]. Для этого окрашенные электрофореграммы фотографировали в максимуме поглощения формазана (λ=569 нм) на специально подобранную аэрофотопленку, позволявшую подобрать такие экспозиции при которых соблюдалась необходимая пропорциональность между величиной интегральной оптической плотности каждой полосы изофермента на электрофореграмме и величиной оптической плотности ее почернения на негативном изображении фотопленки. Полученные таким образом изображения изоферментных полос денситометрировали на микрофотометре ИФО-451. Вклад каждого изофермента в общую активность ЛДГ рассчитывали в % по формуле: $B_i = 100\%\ A_i/\Sigma A_j$, где i, j = 1, 2, 3, 4, 5 – номера изоферментов, согласно принятой номенклатуре ЛДГ [11], B_i – вклад отдельного изофермента в общую активность ЛДГ, A_i – активность изофермента в отн.ед. В контроле и при полной блокаде было использовано по 5 животных, при частичной блокаде – 4 животных. Достоверность статистических различий оценивали по непараметрическому критерию U Вилкоксона – Манна – Уитни с $p<0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Н-ХЕ синаптическая блокада вызывает последовательное сокращение числа изоферментов ЛДГ (табл. 1). Так, если в норме в состав ЛДГ симпатического ганглия входят все 5 основных изоформ: ЛДГ-1,-2,-3,-4,-5, то при частичной блокаде в спектре ЛДГ остаются 3 изофермента - анодные фракции ЛДГ-1, ЛДГ–2 и гибридная изоформа ЛДГ–3. При этом активность всех трех изоформ весьма существенно, более чем в 2 раза, снижается (табл. 2). При полной блокаде в изоферментном спектре ЛДГ остаются только 2 изоформы: ЛДГ-1 и ЛДГ–2 (табл. 1), активность которых еще более снижается ($p<0,05$) и составляет всего 16% их активности в контроле (табл. 2). Следствием описанных выше изменений является и значительное снижение общей активности ЛДГ: при частичной блокаде ее активность составляет 19% ($p<0,05$), а при полной - лишь 9% ($p<0,05$) от активности в контроле (табл. 2).

Таблица 1. Динамика изменений изоферментного спектра ЛДГ при частичной и полной синаптической блокаде.

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	–	–	–

Таблица 2. Динамика снижения активности ЛДГ и ее изоферментов при частичной и полной синаптической блокаде (в % к контролю).

Блокада	ЛДГ общая	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3
Частичная	81	71	70	87
Полная	91	84	84	–

Примечание: здесь и в таблице 3 все изменения относительно контроля статистически значимы (непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни U, $p<0,05$).

Аналогичные изменения наблюдаются и при исследовании макроэргов. При блокаде Н-ХЕ синапсов содержание АТР, ADP и AMP в ганглии существенно снижается (табл. 3). При частичной блокаде содержание АТР уменьшается на 53%, а при полной - на 93%, для ADP уровень снижения содержания составил соответственно 33% и 65% ($p<0,05$). Что касается AMP то, уменьшение количества этого макроэрга в большей мере отмечается при частичной блокаде - на 80%, при полной блокаде содержание AMP уменьшается на 56% ($p<0,05$). В целом, суммарное содержание макроэргов при частичной блокаде уменьшается в ганглии почти в 2, а при полной - в 4,5 раза относительно контрольных показателей.

Таблица 3. Динамика снижения содержания макроэргов при частичной и полной синаптической блокаде (в % к контролю)

Блокада	Σ_A	ATP	ADP	AMP
Частичная	49	53	33	80
Полная	78,5	93	65	57

Таким образом, Н-ХЕ синаптическая блокада в равной мере, как частичная, так и полная, вызывает в симпатическом ганглии однотипные изменения изучаемых показателей - редукцию ферментативной системы ЛДГ (сокращение числа изоформ, уменьшение активности ЛДГ и уменьшение активности остающихся в ее составе изоферментов) и дефицит аденилатных макроэргов. При этом, по мере усиления блокирующего воздействия, изменения последовательно нарастают, и при полной блокаде наблюдаемые сдвиги настолько велики, что в этих условиях блокады 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 и аденилатным макроэргам и то, что уровни активности ЛДГ и содержания аденилатных макроэргов отражают интенсивность энергопродуцирующих процессов [11-13], можно заключить, что синаптическая блокада вызывает нарушение энергетического гомеостаза и приводит к существенному энергетическому дефициту. Вероятно, возникающим энергетическим дефицитом и можно объяснить эффект синаптической блокады приводящий, как известно [3, 7], к гипофункции ганглиев.

Что касается молекулярных механизмов, лежащих в основе эффекта блокады на ЛДГ и аденилатные макроэрги в симпатическом ганглии, то они, по всей вероятности, обусловлены особенностями морфофункциональной организации Н-ХЕ синапсов и механизмом действия самого ганглиоблокатора. Если принять во внимание, что указанные синапсы, с одной стороны, являются ионотропными и выполняют важную роль в поддержании в нервной ткани гомеостаза катионных ионов, в первую очередь Ca^{2+} [2, 19], а с другой то, что механизм действия ганглиоблокатора прежде всего заключается в блокировании ионного канала Н-холинорецептора [3], можно с большой долей вероятности предполагать, что нарушение гомеостаза катионных ионов, Ca^{2+}, возможно, и других катионов, в результате синаптической блокады Н-холинорецепторов, является одной из причин редукции ферментативной системы ЛДГ и дефицита аденилатных макроэргов. Такое предположение соответствует современным данным о регуляторном влиянии Ca^{2+} на энергетический обмен в нервной ткани [20] и о высокой чувствительности аденилатов [21, 22] и изоферментов ЛДГ [19, 23] к ионному составу окружающей среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Фармакологическая блокада Н-холинорецепторов с преганглионарных на постганглионарные волокна, как частичная, так и полная, вызывает редукцию ферментативной системы ЛДГ и приводит к значительному дефициту аденилатных макроэргов в краниальном шейном симпатическом ганглии. Это позволяет предположить, что гипофункция ганглия, вызываемая синаптической блокадой, связана с нарушением энергетического гомеостаза и энергетическим дефицитом. По-видимому, для поддержания энергетического гомеостаза в симпатическом ганглии существенную роль играет активность Н-ХЕ синапсов, обеспечивающая необходимый ионный баланс, нарушение которого при блокаде и является вероятной причиной изменений ферментативной системы ЛДГ и макроэргов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mansvelder H., Aerde K., Couey J., Brussard A.* (2006) Psychopharmacology, **184,** 292-305.
2. *Gotti C., Clementi F.* (2004) Progr. Neurobiol., **74**, 363–396.
3. *Скок В.И., Селянко А.А., ДеркачВ.А.* (1987) Нейрональные холинорецепторы, Наука, М.
4. *Lindsrom J.* (1997) Mol. Neurobiol., **15**, 193-222.
5. *Lloyd K., Williams M.* (2000) J. Pharmacol. Exp. Ther., **292,** 461-467.
6. *Dwoskin L., Crooks P.* (2001) Pharmacol., **298**, 395-402.
7. *Булыгин И.А.* (1979) Новые принципы структурно-функциональной организации симпатических ганглиев, Наука и техника, Минск.
8. *Голиков С.Н., Долго-Сабуров В.Б., Елаев Н.Р., Кулешов В.И.* (1985) Холинергическая регуляция биохимических систем клетки, Медицина, М.
9. *Жуков В.П.* (1983) Сравнительный анализ метаболических последствий возбуждения центральных и периферических входов в симпатический ганглий в условиях изменений реактивности его холинергических и адренергических систем. Автореф. дисс.канд.наук, НИИ физиологии АН БССР, Минск.
10. *Ситникова И.И.* (1992) Клинические аспекты лечения больных гипертонической болезнью с учетом взаимодействия М- и Н-холинергических механизмов. Автореф. дисс. канд.наук, СпБ.
11. *Зимин Ю.В., Сяткин С.П., Березов Т.Т.* (2001) Вопр. мед. химии, **47**, 279-287.
12. *Popanda O., Fox G., Thielmann H.* (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1397,** 102-117.
13. *Dzeja P., Terzic A.* (2003) J. Exp. Biol., **206**, 2039–2047.
14. *Першин Б.Н.* (1966) Новые лекарственные средства. Вып. 10, М., 72.
15. *Самохин В.Т., Обрывкова Е.И., Бащев А.Д.* (1981) Ветеринария, №7, 65–66.
16. *Dietz A., Lubrano T., Rubinstein H.,* (1970) Clin. Chim. Acta, **27**, 225–232.
17. *Панавене* Д.П. (1974) Лаб. дело, №9, 542-544.
18. *Агроскин Л.С., Папаян Г.В.* (1977) Цитофотометрия, Наука, Л.
19. *Rathouz M., Vijayaraghavan S., Berg D.* (1996) Mol. Neurobiol., **12**, 117-131.
20. *Кудряшова И.В.* (2003) Нейрохимия, **20**(1), 5–11.
21. *Masino S., Christopher D.* (2005) Neurological Res., **27,** 149–152.
22. *Madshus I.* (1988) Biochem. J., **250**, 1-8.
23. *Read J., Winter V., Eszes C., Sessions R., Brady R.* (2001) Proteins: Structure, Function and Genetics, **43,** 175–185.

Поступила: 30. 10. 2006.

ADENYLATE LEVEL AND LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) IN THE SYMPATHETIC GANGLION: THE EFFECT OF N-CHOLINERGIC BLOCKADE

P.L. Gorelikov, S.V. Saveliev

Institute of Human Morphology, Russian Academy of Medical Sciences, Tsuryupy ul., 3, Moscow, 117418 Russia; tel.: 120-80-65; e-mail: petr_gorelikov@mail.ru

Activity of LDH isoenzymes and the level of ATP, ADP, and AMP were determined in the rabbit superior cervical sympathetic ganglion under conditions of experimentally induced partial or total blockade of N-cholinergic (N-CE) synapses. This blockade changed the spectrum of LDH isoenzymes: partial blockade was accompanied by disappearance of LDH-4 and LDH-5; total blockade also caused disappearance of LDH-3. LDH-1 and LDH-2 that remained in the isoenzyme spectrum as well as total LDH activity decreased significantly. Under conditions of total N-CE blockade total activity of LDH represented 9% of control, whereas activity of LDH-1 and LDH-2 represented 16% of control.

ATP content decreased by 53 and 93% under conditions of partial and total N-CE blockade, respectively. The levels of ADP and AMP decreased by 33 and 65 and 80 and 56%, respectively. Results of the present study suggest that activity of N-CE synapses is a crucial factor involved into the energy homeostasis of the sympathetic ganglion.

Key words: LDH, adenylates, sympathetic ganglion, N-cholinergic synapses, energy metabolism.