

УДК 576.535:577.175.4

*В. Н. НИКАНДРОВ, Д. К. МАРДАС, Е. Ф. ПОЛУКОШКО***ВЛИЯНИЕ АТРОПИНА И ПИЛОКАРПИНА НА АКТИВНОСТЬ
КОМПОНЕНТОВ ПРОТЕОЛИЗА В ОРГАНОТИПИЧЕСКИХ
КУЛЬТУРАХ ВЕГЕТАТИВНЫХ ГАНГЛИЕВ***Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Изучено влияние добавления М-холинолитика атропина и М-холиномиметика пилокарпина к органотипическим культурам краниального шейного и узлового блуждающего нерва ганглиев крысы на их морфологию, а также на активность трипсиноподобных протеиназ, белков-ингибиторов (по гидролизу бензоил-аргинил-р-нитроанилида) в культуральной жидкости, расщепление ею казеина в тонком слое агарового геля и ее действие на казеинолитическую активность трипсина. Показано, что эффект данных соединений существенно различается, причем таковой пилокарпина ведет к достаточно быстрой деструкции ткани ганглиев. Полученные результаты не позволяют усмотреть прямую связь последней с активацией изученных звеньев протеолиза. В целом, не складывается впечатление, что наблюдаемые в культуральной жидкости ганглиев изменения активности компонентов протеолиза обусловлены именно воздействием на М-холинореактивные структуры. Скорее всего, выявленные эффекты – следствие общего воздействия соединений на клетки, характер которого определяется структурой и физико-химическими свойствами атропина и пилокарпина.

Ключевые слова: атропин, пилокарпин, органотипические культуры, вегетативные ганглии, морфология, компоненты протеолиза.

В предыдущих работах нами было показано, что при перегревании или переохлаждении в крови крыс изменялся баланс «активность трипсиноподобных протеиназ-активность ингибиторов этих протеиназ» [6]. Оказалось также, что характер выявленных сдвигов существенно менялся при введении М-холинэргических препаратов – атропина и пилокарпина [2], что позволяет усматривать участие М-холинорецепторов в эффекте температуры на организм.

Вместе с тем, действие М-холинолитиков на состояние протеиназо-ингибиторного баланса структур нервной системы остается малоизученным.

Цель настоящей работы – выявить особенности воздействия М-холиномиметика пилокарпина и М-холинолитика атропина на уровень активности протеиназ и ингибиторов протеиназ культуральной жидкости органотипических культур вегетативных ганглиев: краниального шейного (симпатического) и узлового блуждающего нерва (смешанного типа).

Материалы и методы. Органотипические культуры краниального шейного и узлового блуждающего нерва ганглиев новорожденных крысят получали по стандартной методике [5]. Выращенные на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки крови, 6–8-суточные культуры указанных ганглиев переводили на питательную среду, содержащую 0,5% сыворотки крови. Через 24 ч в культуральную жидкость добавляли пилокарпин или атропин в концентрации 0,05 и 0,1 г/л соответственно. Затем через 3 и 20 ч отбирали аликвоты культуральной жидкости для определения активности компонентов протеолиза, морфологическое состояние культур оценивали методом прижизненной микроскопии на микроскопе “Leica DM II”.

Активность трипсиноподобных протеиназ и белков-ингибиторов по гидролизу бензоил-аргинил-р-нитроанилида определяли согласно [1].

Кроме того, протеолитическую активность определяли методом расщепления казеина в тонком слое агарового геля как описано в наших предыдущих статьях [4]. Концентрация казеина соответствовала 20 г/л, агара – 10 г/л, в качестве растворителя использовали 0,06 М фосфатный

буфер pH 7,4. На казеин-агаровые пластины наносили 20 мкл исследуемого образца. Площадь зон расщепления белка измеряли через 20 ч инкубации при 37 °С после обработки пластин 2 н раствором трихлоруксусной кислоты. При исследовании этим методом протеолиз-ингибиторной активности использовали раствор трипсина в концентрации 40 мг/л.

В работе использовали среду DMEM, бензоил-аргинил-р-нитроанилид (Sigma, США), трипсин (Fluka, Швейцария). Остальные реагенты были производства отечественного или стран СНГ.

Исследования проведены не менее, чем четырехкратно. Результаты обработаны общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. На органотипические культуры обоих ганглиев добавление М-холинолитика атропина, судя по результатам прижизненной микроскопии, через 3 ч существенного влияния не оказало (рис.1). Лишь после 72 ч в культурах обоих вегетативных ганглиев начинались деструктивные изменения, в конечном счете, приводящие к их гибели.

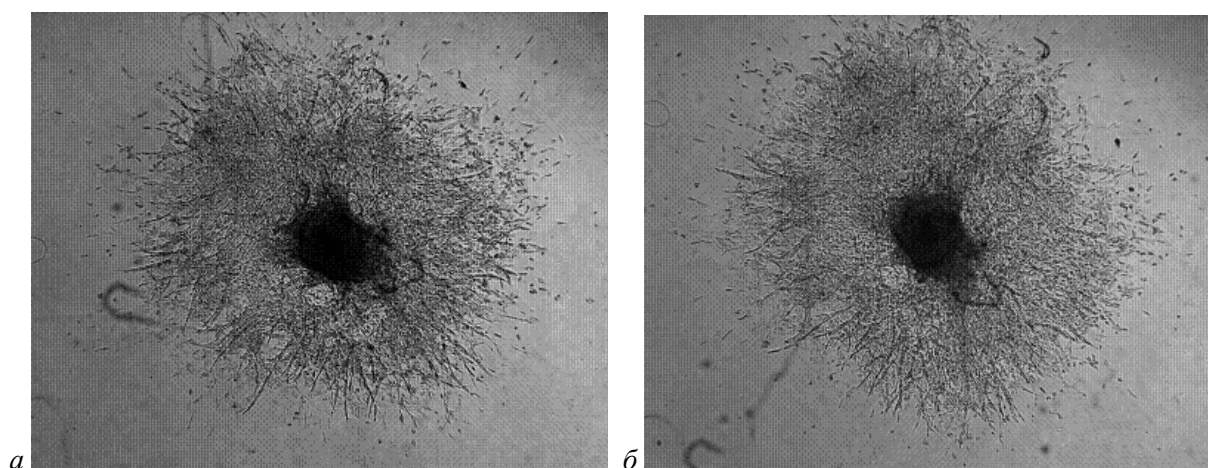


Рис. 1. Действие атропина (0,05 г/л) на семисуточную культуру краниального шейного ганглия новорожденной крысы:

а – до добавления эффектора,

б – через 3 ч после его добавления. Прижизненное наблюдение, проходящий свет, $\times 7,5$.

В отличие от действия атропина, эффект М-холиномиметика пилокарпина проявлялся достаточно быстро и носил в случае культур обоих ганглиев четкий деструктивный характер (рис.2). Практически в течение 48 ч все культуры погибали.

Добавление в питательную среду обоих М-холинергических препаратов существенно не отразилось на трипсиноподобной протеолитической активности и активности ингибиторов протеиназ α_1 -антитрипсина культуральной жидкости и краниального шейного и узлового ганглиев (табл. 1). В культуральной жидкости узлового ганглия отсутствовали изменения активности α_2 -макроглобулина. В культуральной же жидкости культур симпатического ганглия после добавления атропина или пилокарпина отмечено незначительное снижение активности α_2 -макроглобулина – на 7 и 16%, соответственно. Складывается впечатление, что α_2 -макроглобулиновая активность культуральной жидкости обусловлена присутствием сывороточных белков, в т.ч. этого глобулина.

Исследования казеинолитической активности показали, что стерильная питательная среда, содержащая 0,5% сыворотки крови, обладала небольшой казеинолитической активностью (табл. 2). Судя по всему, эта активность обусловлена присутствием в добавленной сыворотке крови активной протеиназы. Известно, что основной протеиназой сыворотки является плазмин. В этой связи отсутствие протеолитической активности, определяемой по расщеплению низкомолекулярного субстрата, объясняется, скорее всего, очень низкой активностью протеиназы и кратковременным воздействием на субстрат, тогда как в тесте лизиса казеин-агаровых пластин время инкубации составляет 24 ч, что и способствовало выявлению этой следовой активности.

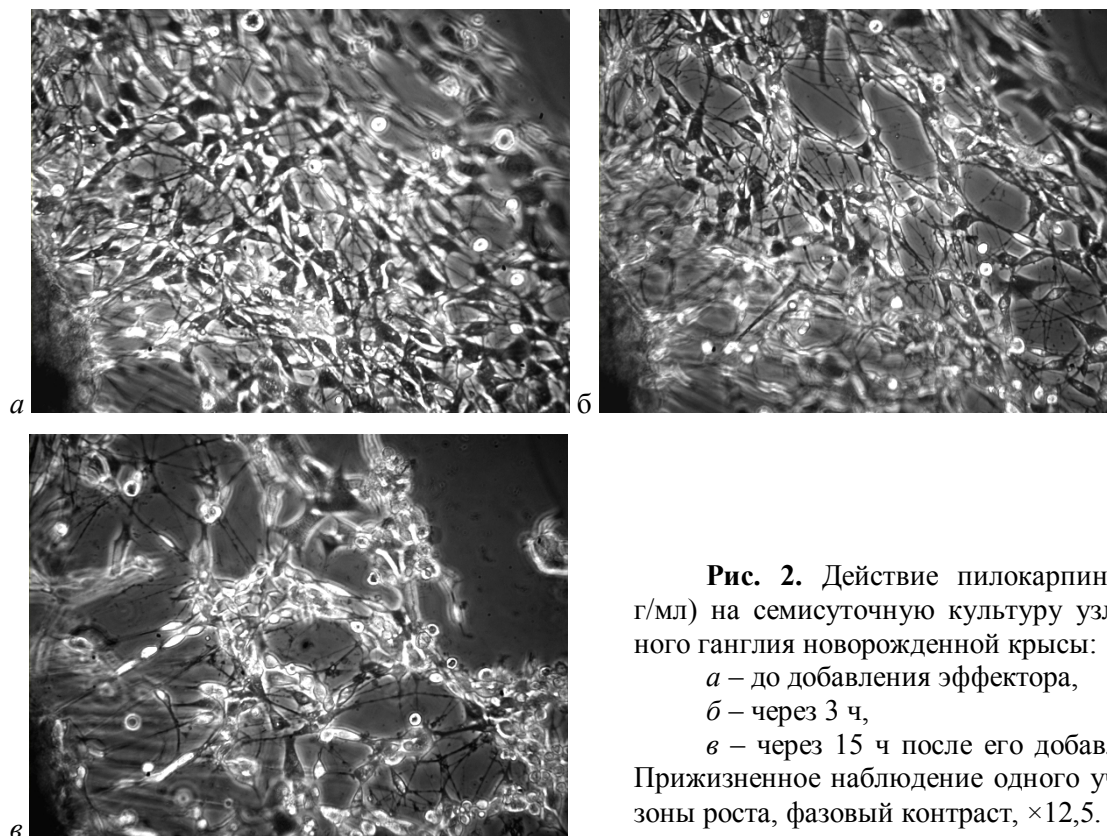


Рис. 2. Действие пилокарпина (0,1 г/мл) на семисуточную культуру узловидного ганглия новорожденной крысы:
а – до добавления эфффектора,
б – через 3 ч,
в – через 15 ч после его добавления.
 Прижизненное наблюдение одного участка зоны роста, фазовый контраст, $\times 12,5$.

Табл. 1. Изменения трипсиноподобной и протеиназоингибиторной активности (мкМ/с·л) в культуральной жидкости органотипически культур вегетативных ганглиев после добавления в питательную среду атропина или пилокарпина

Варианты эксперимента		Трипсино-подобная активность	Активность α_1 -анти-трипсина	Активность α_2 -макроглобулина
Краниальный шейный ганглий,	3 ч	0	0	$0,22 \pm 0,01$
Узловидный ганглий,	3 ч	0	0	$0,24 \pm 0,01$
Краниальный шейный ганглий + атропин,	3 ч	0	0	$0,22 \pm 0,01$
Краниальный шейный ганглий + пилокарпин,	3 ч	0	0	$0,22 \pm 0,01$
Узловидный ганглий + атропин,	3 ч	0	0	$0,20 \pm 0,01$
Узловидный ганглий+ пилокарпин,	3 ч	0	0	$0,22 \pm 0,01$

Как видно из материалов данной таблицы, добавление атропина не повлияло на уровень базовой протеолитической активности. В то же время пилокарпин вызвал ее увеличение на 56%, $P < 0,05$. Это достаточно неожиданный факт. Из литературы неизвестно о влиянии этого М-холиномиметика на активность протеиназ сыворотки. Причины такого эффекта требуют проведения отдельных исследований, выходящих за рамки настоящей статьи. Можно предположить, что пилокарпин вызвал активацию части присутствующего в сыворотке крови зимогена – плазминогена, уровень которого в сыворотке также невелик.

Табл. 2. Влияние добавления атропина и пилокарпина в исходную питательную среду на ее протеолитическую активность (по лизису казеина в тонком слое агарового геля, мм²)

Исследуемый образец	Протеолитическая активность (мм ²)	
DMEM+ 0,5% сыворотки крови	81 ± 1	
	20 ч	81 ± 1
DMEM+ 0,5% сыворотки крови+ атропин,	81 ± 1	
	20 ч	81 ± 1
DMEM+ 0,5% сыворотки крови+ пилокарпин,	81 ± 1	
	20 ч	196 ± 4*

Ранее мы на очищенных образцах плазминогена человека показали возможность этой активации при обработке источниками активных форм кислорода, очищенным дифтерийным токсином или вирусом чумы птиц [3]. Во всех случаях эта активация была опосредована супероксидным радикалом. В настоящее время мы не располагаем данными литературы или собственными о возможности генерирования пилокарпином супероксидных радикалов. Однако, исходя из особенностей его структуры – два гетероциклических кольца, двойная связь у одного из атомов азота, а также свободная карбонильная группа (рис. 3), можно предположить наличие такой способности самой молекулы пилокарпина или его комплексов с металлами переменной валентности.

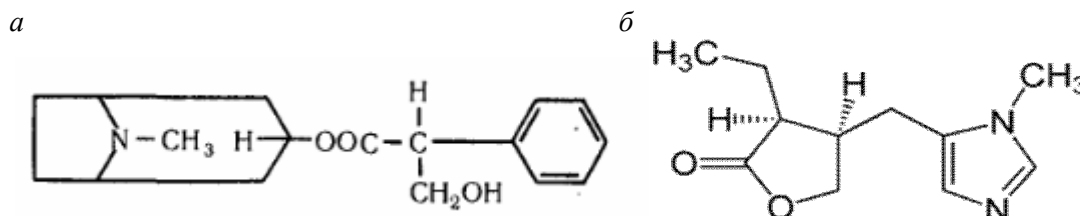


Рис. 3. Структурные формулы атропина – (8-метил-8-азабицикло[3.2.1]окт-3-ила) 3-гидрокси-2-фенилпропаноат (а) и пилокарпина – 38-цис)-3-этилдигидро-4-[(1-метил-1-Н-имидазол-5-ил-метил-2(3Н)-фуранон (б)

Культивирование на дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде вегетативных ганглиев сопровождалось, тем не менее, уже через 3 ч снижением казеинолитической активности культуральной жидкости на 30%, $P < 0,05$ (табл. 3). Этот эффект в случае краниального шейного ганглия снимался добавлением в питательную среду атропина. Следовательно, уже через 3 ч культивирования в культуральной жидкости вегетативных ганглиев, по-видимому, появляются ингибирующие активность казеинолитических протеиназ субстанции. Однако лишь для симпатического ганглия этот эффект нивелировался атропином. Поскольку он не усиливался пилокарпином, нет прямых оснований усматривать участие в проявлении ингибиторной активности М-холинорецепторов. Примечательно, что вызванные пилокарпином деструктивные изменения культур ганглиев по сути фактически не отразились на уровне казеинолитической активности культуральной жидкости.

Культуральная жидкость симпатического (но не узлоvidного) ганглия через 3 ч усиливала казеинолитическую активность трипсина на 44%, $P < 0,05$. Однако к 20 ч, судя по материалам табл. 3, происходил выброс ингибирующих протеолиз субстанций, что вело к подавлению активности трипсина на 27%, $P < 0,05$. Это не наблюдалось в случае ганглия смешанной природы – узлоvidного.

Добавление к культурам симпатического или узлоvidного ганглия атропина практически не влияло на интенсивность расщепления казеина культуральной жидкостью, тогда как воздействие пилокарпина сопровождалось нарастанием казеинолитической активности в сравнении с таковой трипсина и через 3 и через 20 ч. В случае краниального шейного ганглия этот рост составил 82 и 22% соответственно, $P < 0,05$. При этом, естественно, культуральная жидкость утрачивала трипсинингибиторные свойства. В случае узлоvidного ганглия эти величины соответствовали 82 и 74%, $P < 0,05$.

Табл. 3. Влияние добавления атропина и пилокарпина в органотипические культуры вегетативных ганглиев на протеолитическую активность и трипсин-ингибиторные свойства культуральной жидкости (по лизису казеина в тонком слое агарового геля, мм²)

Варианты эксперимента		Протеолитическая активность
Краниальный шейный ганглий,	3 ч	64 ± 1
	20 ч	64 ± 4
Узловидный ганглий,	3 ч	64 ± 4
	20 ч	64 ± 4
Краниальный шейный ганглий + атропин,	3 ч	81 ± 6*
	20 ч	81 ± 6*
Краниальный шейный ганглий+ пилокарпин,	3 ч	64 ± 4
	20 ч	64 ± 4
Узловидный ганглий + атропин	3 ч	64 ± 4
	20 ч	64 ± 4
Узловидный ганглий+ пилокарпин,	3 ч	64 ± 4
	20 ч	64 ± 4
Трипсин,	3 ч	100 ± 1
	20 ч	196 ± 4
Трипсин + краниальный шейный ганглий,	3 ч	144 ± 4
	20 ч	144 ± 4
Трипсин + краниальный шейный ганглий+ атропин,	3 ч	144 ± 2
	20 ч	144 ± 2
Трипсин + краниальный шейный ганглий+ пилокарпин,	3 ч	182 ± 4*
	20 ч	240 ± 4*
Трипсин + узловидный ганглий,	3 ч	100 ± 1
	20 ч	196 ± 4
Трипсин+ узловидный ганглий + атропин,	3 ч	100 ± 1
	20 ч	196 ± 4
Трипсин+ узловидный ганглий+ пилокарпин,	3 ч	182 ± 4*
	20 ч	342 ± 2*

Эти факты наводят на мысль, что пилокарпин, по-видимому, снижает резистентность клеток культур ганглиев к трипсину и, возможно, вызывает «выброс» в культуральную жидкость внутриклеточных нейтральных протеиназ. Эти моменты в настоящее время остаются неясными, раскрытие их составляет задачу дальнейших самостоятельных исследований.

Итак, М-холинолитик атропин и М-холиномиметик пилокарпин способны оказывать воздействие на реакции протеолиза в клетках нервной ткани вегетативных ганглиев. Эффект данных соединений существенно различается, причем таковой пилокарпина ведет к достаточно быстрой деструкции ткани ганглиев. Однако полученные результаты не позволяют усмотреть прямую связь последней с активацией тех звеньев протеолиза, изучение которых проведено на настоящем этапе работы. К тому же, в целом, не складывается впечатление, что наблюдаемые в культуральной жидкости вегетативных ганглиев изменения активности компонентов протеолиза обусловлены именно воздействием на М-холинореактивные структуры. Мы более склонны считать выявленные эффекты следствием общего воздействия соединений на клетки, характер которого определяется структурой и физико-химическими свойствами атропина и пилокарпина.

Литература:

- [1]. Корягина И. Ю., Зарембский Р. А., Бялыбина М. Д. // Лаб. дело. 1990. № 2. С. 10–13.
- [2]. Мардас Д. К. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2005. № 5. С. 28–31.
- [3]. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2008. № 1. С. 4–22.
- [4]. Пыжова Н. С., Никандров В. Н. // Биоорг. химия. 2008. Т. 34. С. 382–391.
- [5]. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. М., 1976.
- [6]. Mardas D. K. // Медико-биологические проблемы термофизиологии. Докл. и сообщения междунар. симпоз. Минск, 2002. Р. 99.

Поступила в редакцию: 07.06.2010 г.

V. N. NIKANDROV, D. K. MARDAS, E. F. POLUKOSHKO

ATROPINE AND PILOCARPINE EFFECT ON THE ACTIVITY OF PROTEOLYSIS COMPONENTS IN THE ORGANOTYPICAL CULTURES OF VEGETATIVE GANGLIA

Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Summary

The influence of atropine and pilocarpine on the activity of proteolysis components in organotypic cultures of vegetative ganglia. The effect of adding of the atropine (M-cholinergic antagonist) and the pilocarpine (M-cholinomimetic) to the organotypic culture of cranial cervical and nodal vagus of a rat ganglia on their morphology, as well as on the activity of trypsin proteinase, proteinase inhibitors (on the hydrolysis of benzoyl-arginine-3- nitroanilide) in culture fluid, splitting casein by it in a thin layer of agar gel and its effect on caseinolytical activity of trypsin has been studied. It is shown that the effect of these compounds differ significantly, and that pilocarpine leads to fairly rapid destruction of ganglia tissues. These results do not allow us to see a direct connection the last one with the activation of the studied units of proteolysis. On the whole, it doesn't seem that the observed changes of proteolysis components' activity in the culture fluid of ganglia are caused exactly by the impact on M-cholinereactive structure. Most likely, the identified effects is a consequence of the overall impact of compounds on cells, whose character is determined by the structure and physicochemical properties of atropine and pilocarpine.

Key words: atropine, pilocarpine, organotypic culture, autonomic ganglions, morphology, proteolysis components.