

Участие мускариновых ацетилхолиновых рецепторов 1-го подтипа и свободнорадикальных процессов в механизмах амфетаминовой нейротоксичности¹

МАЛИКОВА Л.А.
ПАНЧЕНКО Л.Ф.
БАНИН А.Ф.
ПРАСТ Г.
БАШКАТОВА В.Г.

к.б.н., ст. н. с., ГУ НИИ фармакологии им. В.В.Закусова РАМН, Москва
д.м.н., профессор, академик РАМН, рук. лаборатории, ННЦ наркологии Росздрава, Москва
рук. лаборатории, Институт химической физики РАН, Москва
профессор кафедры, Институт фармакологии и токсикологии, университет г. Инсбрука, Австрия
д.б.н., вед. н. с., ГУ НИИ фармакологии им. В.В.Закусова РАМН, Москва

Представлены результаты определения генерации оксида азота (NO) и содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в стриатуме мозга крыс линии Спрег-Дули в условиях субхронического введения психостимулятора амфетамина (АМФ, 5 мг/кг, внутривнутрибрюшинно, 4-кратно, каждые 2 ч) и модуляторов активности М1-холинорецепторов. Генерацию NO оценивали методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), интенсивность процессов ПОЛ — спектрофотометрически по уровню продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРП). Впервые показано, что агонист М1-рецепторов 4-[N-(3-Хлорфенил)карбамоилокси]-2-бутилилтриметиламмоний хлорид (200 мкг, интрацеребровентрикулярно—и.ц.в.) увеличивает уровни NO и ТБКРП, а антагонист этих рецепторов пептид MT7 (2 мкг, и.ц.в.) предупреждает интенсификацию свободнорадикальных процессов, инициируемую АМФ.

Введение

Амфетамин (АМФ) и его аналоги представляют собой группу соединений с психостимулирующими свойствами, которые имеют не только медицинское применение, но, благодаря своему эйфоризирующему действию, находят широкое использование в качестве препаратов, вызывающих пристрастие, что впоследствии приводит к развитию наркотической зависимости. При повторных инъекциях или применении высоких доз этих препаратов наблюдается развитие нейротоксического эффекта и это делает актуальной проблему поиска и изучения механизма действия новых возможных нейропротективных средств [3].

В настоящее время не вызывает сомнения, что ведущим звеном в развитии патологических процессов при введении АМФ и его производных является нарушение дофаминергической нейротрансмиссии [1]. Однако феномен амфетаминовой нейротоксичности имеет сложную природу, и для проявления токсического эффекта данного психостимулятора и его аналогов необходимо одновременное участие многих патогенетических факторов. В наших ранее выполненных работах [2, 6] по изучению высвобождения нейротрансмиттеров и аминокислот было показано, что при субхроническом введении АМФ крысам наблюдаются значительные изменения в холинергической системе мозга. В настоящее время установлено, что холинорецепторы мозга относятся преимущественно к мускариновому типу и представлены пятью подтипами (М1—М5). Предполагается, что именно М-холинорецепторы выполняют важную роль, осуществляя взаимосвязь между дофаминергической нейротрансмиссией и другими нейротрансмиттерными системами мозга [8, 9, 11], однако механизмы такого взаимодействия и вовлечения других систем в нейрональные повреждения мозга, вызываемые введением АМФ, остаются малоизученными.

С учетом вышеизложенного, целью данной работы явился анализ участия М1-холинорецепторов, а также генерации NO и продуктов ПОЛ в стриатуме мозга крыс при нейротоксическом повреждении, обусловленном воздействием АМФ.

Материал и методы исследования

Эксперименты были выполнены на крысах линии Спрег-Дули массой 180—200 г из питомника Университета г. Инсбрука (Австрия). В работе была использована схема субхронического введения АМФ в дозе, однократное введение которой вызывает выраженный психостимулирующий эффект, но не сопровождается признаками повреждения нейронов. D,L-амфетамин (Sigma) в дозе 5 мг/кг вводили внутривнутрибрюшинно (в/б) четырехкратно с 2-часовым интервалом между введениями. Животным контрольной группы по этой же схеме вводили физиологический раствор хлорида натрия. С целью анализа механизма действия АМФ использовали модуляторы активности М1-холинорецепторов. Были изучены эффекты двух модуляторов: селективного агониста М1-холинорецепторов 4-[N-(3-Хлорфенил)карбамоилокси]-2-бутилилтриметиламмоний хлорида (McN-A-343, Sigma, 200 мкг) и антагониста этих же рецепторов мускаринового пептида (MT7, Peptides International, 2 мкг). Оба вещества вводили крысам под уретановым наркозом (1,2 г/кг, в/б) через билатерально вживленные канюли по координатам: AP —0,8; L 1,5; V —4,8. Группу сравнения составили животные, получавшие модуляторы активности М1-холинорецепторов и изотонический раствор вместо АМФ. В каждой экспериментальной группе число животных 5—7.

Для прямого количественного определения содержания NO в мозге применяли метод ЭПР, основанный на использовании диэтилдитиокарбамата в качестве ловушки свободных радикалов [5]. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали спектрофотометрическим методом [14] по уровню ТБКРП. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических критериев Фишера и Манна—Уитни.

¹ Работа поддержана грантами РФФИ (03-04-49050) и РГНФ (03-06-00085а и 04-06-00201а).

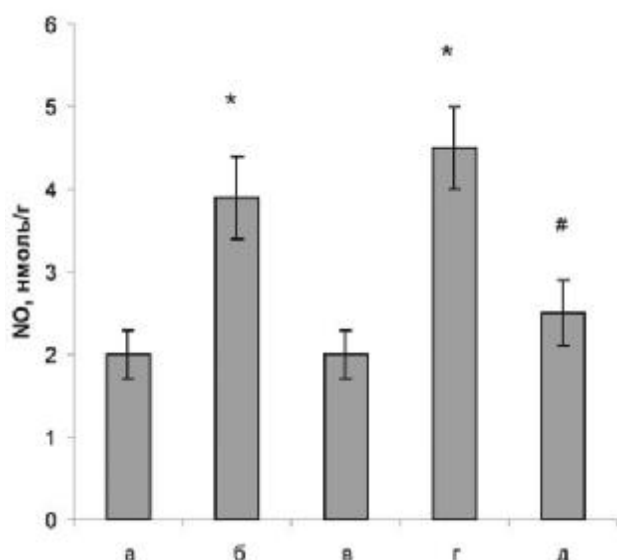


Рис. 1. Влияние модуляторов M1-холинорецепторов и амфетамина (АМФ) на генерацию NO в стриатуме мозга крыс линии Спрег-Дуули. а — контроль: изотонический раствор по схеме введения АМФ (NaCl); б — агонист M1-рецепторов McN-A-343 (200 мкг, интрацеребровентрикулярно — и.ц.в.) + NaCl; в — антагонист M1-рецепторов MT7 (2 мкг, и.ц.в.) + NaCl; г — АМФ (5 мг/кг, в/б, 4-кратно); д — MT7 (2 мкг, и.ц.в.) + АМФ (5 мг/кг, в/б, 4-кратно). М — S.E.M; * — $P < 0,05$ — отличие по сравнению с контролем; # — $p < 0,05$ — отличие по сравнению с АМФ.

Для выполнения данной работы нами были проведены эксперименты с животными группы сравнения по выявлению возможного влияния агониста мускариновых ацетилхолиновых рецепторов первого подтипа McN-A-343 на процессы генерации NO и ПОЛ в мозге крыс линии Спрег-Дуули. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 1 и 2. Доза данного агониста была выбрана в соответствии с результатами ранее выполненной работы по изучению высвобождения ацетилхолина в прилежащем ядре мозга крыс Спрег-Дуули [12]. Если у контрольных животных, получавших изотонический раствор, уровень NO был $2,11 \pm 0,31$ нмоль/г, то после введения McN-A-343 он увеличивался и достигал значений $3,98 \pm 0,43$ нмоль/г, что превышало исходный уровень в 2 раза (рис. 1б). Концентрация ТБКРП в условиях введения агониста M1-рецепторов также значительно увеличивалась и по сравнению с контрольной группой ($74,8 \pm 9,9$ нмоль/г) возрастала почти на 150% (рис. 2б). Полученные данные свидетельствуют, что активация M1-холинорецепторов сопровождается значительным увеличением генерации NO и содержания продуктов ПОЛ в мозге.

Результаты изучения генерации NO и продуктов ПОЛ в стриатуме мозга крыс Спрег-Дуули в условиях моделирования дофаминергической нейротоксичности, обусловленной субхроническим введением АМФ, представлены на рис. 1 и 2г. После последнего, 4-го, введения АМФ обнаружено более чем 2-кратное по сравнению с контролем увеличение как содержания NO, так и уровня ТБКРП. Полученные результаты свидетельствуют, что при субхроническом введении АМФ наблюдается интенсификация свободнорадикальных процессов, что может рассматриваться как проявление нейротоксического эффекта данного психостимулятора. Этот эффект АМФ как по величине, так и по направленности совпадает с результатами определения уровня NO и ТБКРП, полученными в пер-

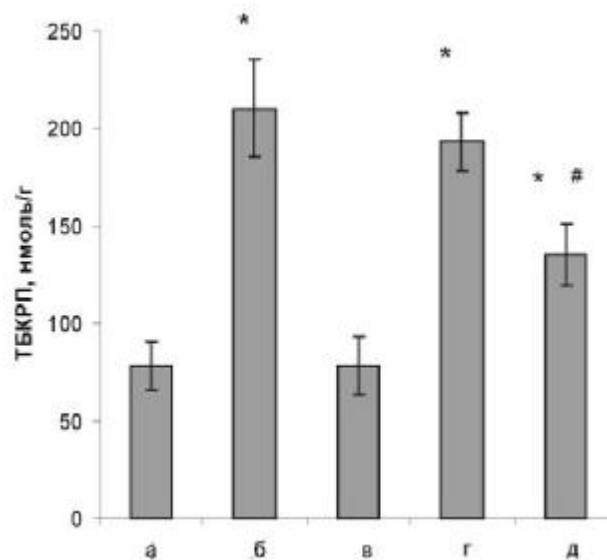


Рис. 2. Влияние модуляторов M1-холинорецепторов и амфетамина (АМФ) на уровень продуктов ПОЛ в стриатуме мозга крыс линии Спрег-Дуули. Обозначения соответствуют рис. 1.

вой серии наших экспериментов по изучению агониста M1-холинорецепторов McN-A-343. Учитывая вышеизложенное, нами была предпринята попытка изучения блокаторов M1-рецепторов с целью выявления возможного нейропротективного эффекта на модели амфетаминовой нейротоксичности. Результаты влияния антагониста M1-рецепторов мускаринового пептида MT7 в дозе 2 мкг представлены на рисунках. Установлено, что данный пептид, введенный животным группы сравнения, т. е. не получавшим АМФ, практически не изменял уровень NO и содержание ТБКРП в стриатуме мозга крыс (рис. 1, 2в). Однако введение антагониста M1-рецепторов перед АМФ полностью предотвращало индуцируемое этим психостимулятором повышение образования NO (рис. 1д), а также значительно, но не полностью предупреждало увеличение содержания ТБКРП (рис. 2д), вызываемое его субхроническим введением. Эти результаты подтверждают участие M1-холинорецепторов в процессах генерации NO и продуктов ПОЛ. Ранее, при изучении эффектов ингибиторов фермента синтеза оксида азота NO-синтазы было высказано предположение, что активация этого фермента может осуществляться не только через глутаматные рецепторы, но эту роль могут также выполнять ацетилхолиновые M1-рецепторы промежуточных, вставочных нейронов [7,4]. Полученные в нашей работе результаты не противоречат этой версии. Более того, принимая во внимание, что как субхроническое введение АМФ, так и инъекции агониста M1-холинорецепторов McN-A-343 приводят к сходным эффектам увеличения уровня NO, можно предположить, что в накопление данных радикалов, вызванное введением АМФ, значительный вклад вносит именно активация M1-рецепторов мозга, возможно, из-за их сопряженности с NO-синтазой. Косвенно о вероятности такого взаимодействия свидетельствуют и данные о высокой плотности ацетилхолиновых рецепторов M1-подтипа на NO-содержащих нейронах стриатума [10]. Возможно, что и увеличение продуктов ПОЛ, обнаруженное нами как при активации M1-рецепторов, так и при введе-

нии АМФ, также осуществляется за счет увеличения количества вновь синтезируемого NO. Известно, что NO легко вступает в реакцию с супероксид-анионом с образованием пероксинитрита, обладающего способностью индуцировать процессы ПОЛ в мембранах [15]. Пероксинитрит может действовать и опосредованно, вызывая образование тиольных радикалов глутатиона, в результате чего последний из антиоксиданта превращается в прооксидант, инициирующий ПОЛ [13]. В условиях амфетаминной нейротоксичности снижение активности M1-рецепторов приводит к уменьшению уровня активных форм кислорода и азота, следовательно, и к снижению нейротоксического воздействия данного психостимулятора. Полученные данные открывают новые возможности разработки фармакологической коррекции нейротоксических эффектов амфетаминоподобных психостимуляторов.

Выводы

Психостимулятор АМФ при субхроническом введении значительно усиливает генерацию NO и интенсивность процессов ПОЛ в стриатуме мозга крыс, что может рассматриваться как проявление нейротоксического эффекта.

Активация мускариновых ацетилхолиновых рецепторов 1-го подтипа сопровождается повышением содержания NO и продуктов ПОЛ в стриатуме мозга крыс, что свидетельствует о наличии тесной взаимосвязи между холинергической системой мозга и свободнорадикальными процессами.

Антагонист ацетилхолиновых M1-рецепторов предупреждает увеличение уровня NO и продуктов ПОЛ, вызванное нейротоксическим эффектом АМФ.

Список литературы

1. Арушанян Э.Б. Нейрохимическая природа лекарственной психостимуляции: взгляд на проблему четверть века спустя//Экспер. и клинич. Фармакология. — 2003. — Т. 66, №2. — С. 72–80.
2. Башкатова В.Г., Крауз М., Праст Г., Ванин А.Ф. Внеклеточное содержание ацетилхолина и аденозина и генерация оксида азота в мозге крыс при действии амфетамина// Нейрохимия. — 2003. — Т. 20, №3. — С. 205–209.
3. Башкатова В.Г., Маликова Л.А., Панченко Л.Ф. Механизмы нейротоксического действия амфетаминоподобных психостимуляторов: роль оксида азота// Наркология. — 2004. — №2. — С. 31–38.
4. Башкатова В.Г., Маликова Л.А., Алексеева О.Г., Микоян В.Д., Праст Г., Панченко Л.Ф. Активация мускариновых ацетилхолиновых рецепторов первого подтипа увеличивает генерацию оксида азота в стриатуме мозга крыс// Нейрохимия. — 2004. — Т. 21, №4. — С. 250–253.
5. Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Ванин А.Ф. Оксид азота образуется через L-аргинин зависимый путь в мозге мышей in vivo// Биофизика. — 1994. — Т. 39. — С. 915–918.
6. Bashkatova V., Kraus M., Prast H., Vanin A., Rayevsky K., Philipp A. Influence of NOS inhibitors on changes in ACh release and NO level in the brain elicited by amphetamine neurotoxicity// Neuroreport. — 1999. — Vol. 10. — P. 3155–3158.
7. De Vente J., Markerink-Van Ittersum M., Van Abeelen J., Emson P.C., Axer H. and Steinbusch H.W.M. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain: effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis// Eur J. Neurosci. — 2000. — Vol. 12. — P. 507–519.
8. Di Chiara G., Morelli M., Consolo S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions// Trends Neurosci. — 1994. — Vol. 17. — P. 228–233.
9. Felder C.C., Porter A.C., Skillman T.L. et al. Elucidating the role of muscarinic receptors in psychosis// Life Sci. — 2001. — Vol. 68. — P. 2605–2613.
10. Gracy K.N. and Pickel V.M. Ultrastructural localization and comparative distribution of nitric oxide synthase and N-methyl-D-aspartate receptors in the shell of the rat nucleus accumbens// Brain Res. — 1997. — Vol. 747. — P. 259–272.
11. Graybiel A.M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia// Trends Neurosci. — 1990. — Vol. 13. — P. 244–253.
12. Hornick A., Kraus M.M., Prast H. Activation of M-aceylcholine receptors enhances neurotransmitter release by stimulation of nitric oxide synthesis in the nucleus accumbens// Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — Suppl. 1. — 44 p.
13. Karoui H., Hogg N., Frejaville C. et al. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite — ESP-sprink trapping and oxygen uptake studies// J. Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271. — P. 6000–6009.
14. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction// Anal. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351–358.
15. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide// Arch. Biochem. and Biophys. — 1991. — Vol. 288. — P. 481–487.

THE ROLE OF M(1)-MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS AND FREE RADICAL PROCESSES IN THE MECHANISMS OF NEUROTOXICITY INDUCED BY AMPHETAMINE

MALIKOVA L.A. Ph. D., V.V. Zakusov Institute of Pharmacology, RAMS, Moscow
PANCHENKO L.F. Academician, RAMS, National Research Center Narcology, Ministry of Health, Moscow
VANIN A.F. Prof., N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, RAS, Moscow
PRAST H. Prof., Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Innsbruck, Austria
BASHKATOVA V.G. Dr. Sci., V.V. Zakusov Institute of Pharmacology, RAMS, Moscow

The levels of nitric oxide (NO) and lipid peroxidation (LPO) in the striatum of male Sprague-Dawley rats, treated with repeated administration of amphetamine (AMPH, 5 mg/kg x 4, i.p., every 2 hours) and of M(1) muscarinic acetylcholine (M1ACh) receptors ligands were studied. NO was directly measured using the electron paramagnetic resonance technique. Specific index of LPO, (i.e. thiobarbituric acid reactive substances, TBARS), was determined spectrophotometrically. The administration of M1 AChR receptor agonist 4-[N-(3-chlorophenyl)carbamoyloxy]-2-butynyltrimethylammonium chloride (200ug, intracerebroventricular - i.c.v.) produced the elevation of NO generation and TBARS content in rat striatum, while treatment with M1 antagonist the peptide MT7 (2 mkg, i.c.v.) prevented the free radicals formation induced by amphetamine.