

О.О.Григоров, М.В.Скок, **В.І.Скок**

α -субодиничний склад нікотинових холінорецепторів нейронів підслизового сплетення тонкого кишечника морської свинки

С помощью метода фиксации потенциала patch-clamp в конфигурации «целая клетка» был исследован α -субъединичный состав функциональных никотиновых холинорецепторов нейронов подслизистого сплетения тонкого кишечника морской свинки. В качестве специфических блокаторов мембранных токов, вызванных аппликацией ацетилхолина, использовались антитела, иммунореактивные к определенным наружным участкам каждой из исследуемых субъединиц. $\alpha 3$ - и $\alpha 5$ -специфические антитела при независимом добавлении в перфузирующий раствор вызвали изменение тока ответа нейрона на ацетилхолин на $60 \pm 1,56$ и $65\% \pm 1,62\%$ соответственно. Последовательная аппликация $\alpha 5$ -специфических антител на фоне действия $\alpha 3$ -специфических антител не приводила к большему угнетению ответа нейрона на агонист. $\alpha 7$ -специфические антитела в перфузирующем растворе у 80% исследуемых нейронов вызвали уменьшение амплитуды ацетилхолинового тока на $24\% \pm 1,51\%$, у 20% нейронов – на $67\% \pm 1,5\%$. Добавление $\alpha 4$ -специфических антител во внеклеточный раствор не приводило к достоверному изменению ответов нейронов на ацетилхолин. Во всех случаях добавление атропина в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л не вызывало достоверных изменений амплитуды и кинетики вызванного ацетилхолинового тока, а добавление бензогексония в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л полностью блокировало ответ нейрона на аппликацию ацетилхолина, что свидетельствовало об участии в формировании ответа исключительно никотиновых холинорецепторов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в формировании ответа на ацетилхолин нейронов подслизистого сплетения тонкого кишечника морской свинки принимают участие $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ и $\alpha 7$ -содержащие холинорецепторы. $\alpha 3$ - и $\alpha 5$ -субъединицы ассоциированы в составе одних рецепторов, которые в большинстве нейронов опосредуют основную часть ответов клетки на действие агониста. Однако существуют нейроны, у которых основную роль в формировании ответа играют $\alpha 7$ -содержащие никотиновые холинорецепторы.

ВСТУП

Нікотинові холінорецептори – типові представники класу іонотропних рецепторів, активація яких призводить до швидкого відкриття власного іонного каналу та виникнення трансмембранного електричного струму. Вони широко розповсюджені в організмі людини та тварин, як то: клітини поперечно-смугастих м'язів, нейрони всіх відділів центральної нервової системи, нейрони симпатичних і парасимпатичних гангліїв тощо. Відповідно існує безліч

функцій, в регуляції яких вони беруть участь. Нині відомо, що порушення в їх структурі та функціях можуть викликати такі хвороби, як епілепсія, міастенія, шизофренія, хвороба Альцгеймера тощо [10, 15]. Усе це робить дослідження нікотинових холінорецепторів своєчасними і важливими для розуміння інтегративної діяльності нейронів.

Структура нікотинового холінорецептора являє собою пентамер, який має у своєму складі 5 субодиниць, що формують

© О.О.Григоров, М.В.Скок, В.І.Скок

місце зв'язування ацетилхоліну та іонний канал у центрі рецептора. Про нейрональний нікотинний холінорецептор відомо, що він складається з 9 видів α-субодиниць (α2–α10) та 3 видів β-субодиниць (β2–β4), які у різних комбінаціях можуть входити до його складу [9]. Субодиничний склад має видову та анатомічну специфіку. Нікотинні рецептори автономних гангліїв, як відомо, можуть мати у своєму складі комбінації з α3-, α4, α5, α7, β2 та β4-субодиниць [9–11].

У той час як досить широко досліджуються холінорецептори нейронів центральної нервової системи та симпатичних гангліїв, нейронам ентеральних сплетінь приділяється досить мало уваги, що, в першу чергу, пов'язано з більшою складністю виділення препаратів [2, 3].

Метою нашої роботи було встановлення α-субодиничного складу функціональних нікотинних холінорецепторів нейронів підслизового сплетення тонкого кишечника на прикладі морської свинки за допомогою електрофізіологічних методів.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на дисоційованих нейронах підслизового сплетення тонкого кишечника морської свинки за допомогою метода фіксації потенціалу patch-clamp у конфігурації “ціла клітина” [7]. Для з'ясування субодиничного складу нікотинних холінорецепторів використовували моноклональні мишині антитіла, специфічні до α3- та α5-субодиниць рецептора, та поліклональні кролячі антитіла, специфічні до α4- і α7-субодиниць. Синтез та очищення антитіл проводили за методом, описаним раніше [17, 18]. Поліпептидні фрагменти кожної з досліджуваних субодиниць, проти яких були синтезовані антитіла, знаходяться на зовнішньоклітинній частині рецептора поблизу агоністзв'язувального центру. Завдяки цьому відповідні антитіла використовували як специфічні конкурентні блокатори.

Для дослідів брали морських свинок масою 200–300 г незалежно від статі. Тварин декапітували при неглибокому наркозі. Виділення та підготовку нейронів підслизового сплетення тонкого кишечника проводили за методом, описаним раніше [5, 8]. Всі досліди проводили при 18–24 °С. Викликані трансмембранні струми реєстрували при фіксації мембранного потенціалу на рівні –50 мВ. Для зовнішньоклітинної перфузії використовували наступний розчин ($\times 10^{-3}$ моль/л): NaCl – 164, KCl – 4, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 1, MOPS (3-[N-morpholino]propanol-sulfonic acid) – 5, глюкоза – 11; рН 7,4. Patch-мікропіпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином наступного складу ($\times 10^{-3}$ моль/л): глюконат калію – 144; KCl – 20, NaCl – 5; MgCl₂ – 1; CaCl₂ – 1; EGTA – 11; HEPES – 5; рН 7,4. Аплікацію агоніста, тривалістю 2,5 с, у контролі (нормальний зовнішньоклітинний розчин) чи на фоні дії антитіл проводили за допомогою іонофорезу через мікроелектрод, заповнений розчином ацетилхолінхлориду в концентрації 1 моль/л з інтервалом у 2 хв. Цього часу було достатньо для виходу рецепторів зі стану десенситизації. Аплікацію блокаторів, тривалістю 12–16 хв, проводили через перфузію з нормальним зовнішньоклітинним розчином. Час аплікації обмежувався досягненням максимальної дії антитіл, про що говорила стабілізація амплітуди відповіді клітини.

РЕЗУЛЬТАТИ

Досліди з атропіном та бензогексонієм. На першому етапі треба було встановити, які типи рецепторів будуть брати участь у відповіді нейрона на введення ацетилхоліну. Це було перевірено за допомогою специфічного блокатора мускаринових рецепторів атропіну та специфічного блокатора нікотинних рецепторів бензогексонію.

Додавання у перфузуючий розчин атропіну в концентрації $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л не виявило

достовірних змін амплітуди та кінетики викликаного ацетилхолінового струму. Бензогексоній у концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л при додаванні у зовнішньоклітинний розчин повністю блокував відповіді клітини на аплікацію ацетилхоліну. Це дозволило нам стверджувати, що у формуванні струмів відповіді нейронів на ацетилхолін у даній постановці експерименту беруть участь виключно нікотинові холінорецептори.

Досліди з антитілами. Поліпептидні фрагменти кожної з досліджуваних субодиниць, проти яких були отримані антитіла, знаходяться на зовнішньоклітинній частині рецептора поблизу агоністзв'язувального центру. Завдяки цьому відповідні антитіла конкурентно блокували мембранні струми, викликані аплікацією ацетилхоліну в нейронах верхнього шийного та інтракардіального гангліїв шурів [13, 27] та синаптичні струми в нейронах нижнього брижового ганглія морської свинки [10]. Всі антитіла

використовували в концентрації $4 \cdot 10^{-2}$ г/л. Її підвищення до $5 \cdot 10^{-2}$ г/л не збільшувало ефекту їх дії, тому така концентрація була визначена як достатня та насичуюча.

Усього було досліджено 25 нейронів підслизового сплетення тонкого кишечника морської свинки. Оскільки дія антитіл була звичайно незворотна, досліди проводили тільки на одному нейроні з кожного препарата.

Дію $\alpha 3$ -специфічних антитіл було досліджено на 5 нейронах. Додавання цих антитіл у перфузуючий розчин пригнічувало амплітуди ацетилхолінвикликаних струмів на $60\% \pm 1,56\%$ ($n=5$) порівняно з контрольним значенням (рис. 1,а). Подібний ефект спостерігали і при дії $\alpha 5$ -специфічних антитіл. Їх додавання до перфузуючого розчину викликало зменшення амплітуди викликаних струмів на $65\% \pm 1,62\%$ ($n=5$) порівняно з контролем (див.рис. 1,б). На 3 нейронах було перевірено сумісну дію $\alpha 3$ -

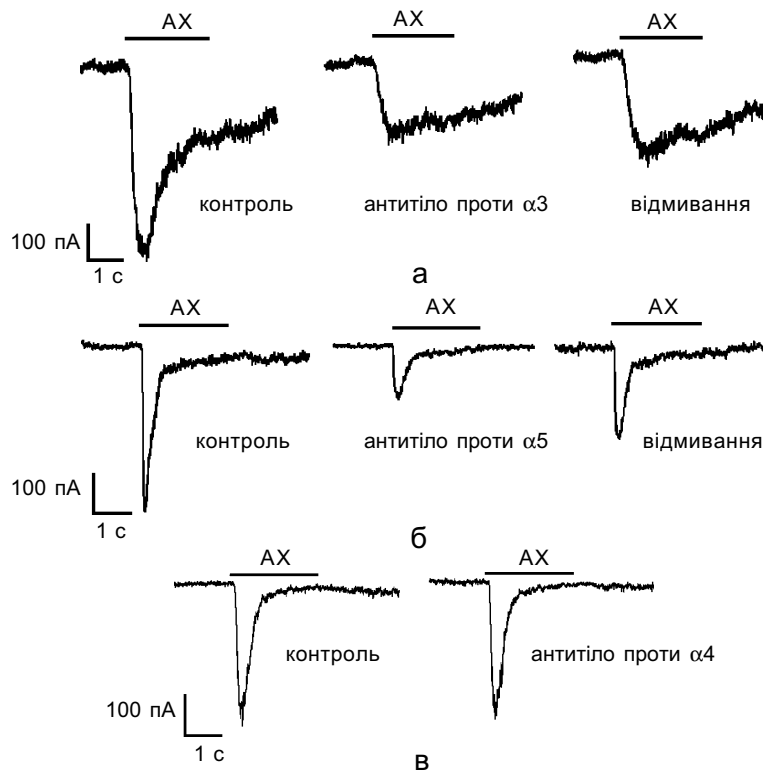


Рис. 1. Ефект дії антитіла, імуноспецифічного до $\alpha 3$ -субодиниці (а), $\alpha 5$ -субодиниці (б) та $\alpha 4$ -субодиниці (в) нікотинового холінорецептора, на ацетилхолінвикликані струми. Тут і на рис. 2: фіксація потенціалу -50 мВ

і α5-специфічних антитіл. Додавання α5-специфічних антитіл у перфузуючий розчин, який уже містив α3-специфічні антитіла, не призводило до подальшого достовірного зменшення амплітуди ацетилхолінового струму.

α4-специфічні антитіла, дія яких була досліджена на 5 нейронах, при додаванні у зовнішньоклітинний розчин не призводили до змін показників викликаних ацетилхолінових струмів (див.рис. 1,в).

Дія α7-специфічних антитіл на трансмембранний струм, викликаний аплікацією агоніста, була різною для різних нейронів (рис.2). У 8 з 10 досліджених нейронів α7-специфічні антитіла викликали зменшення амплітуди відповіді на ацетилхолін на $24\% \pm 1,51\%$ порівняно з контролем. У 2 з 10 досліджених клітин ці антитіла призводили до пригнічення амплітуди ацетилхолінових струмів на $67\% \pm 1,5\%$ від контрольного значення.

ОБГОВОРЕННЯ

При даній постановці експерименту у внутрішньоклітинний розчин, яким заповнювали patch-піпетки, не були додані будь-

які речовини, які могли б відігравати роль вторинних посередників. Оскільки об'єм patch-піпетки значно більший за об'єм клітини, то впродовж декількох перших хвилин після проривання мембрани нейрона його внутрішнє середовище повинно повністю замінитися на розчин, яким заповнена піпетка. Відсутність у ньому вторинних посередників повинна виключати відповідь мускаринових рецепторів на ацетилхолін, які, на відміну від нікотинних, є метаболічними. Те, що атропін не виявляв жодного впливу на досліджувані струми нейронів підслизового сплетення, а бензогексоній у концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л повністю їх блокував, підтверджує участь у формуванні цих струмів виключно нікотинних холінорецепторів.

Як видно з наших результатів, на досліджених нейронах підслизового сплетення тонкого кишечника морської свинки наявні нікотинні холінорецептори, що мають у своєму складі α3-, α5 та α7-субодиниці, але відсутні функціональні рецептори з α4-субодиницею. Це добре узгоджується з отриманими нами раніше даними імуноцитохімічних досліджень [6], а також з загальноприйнятим положенням, що експ-

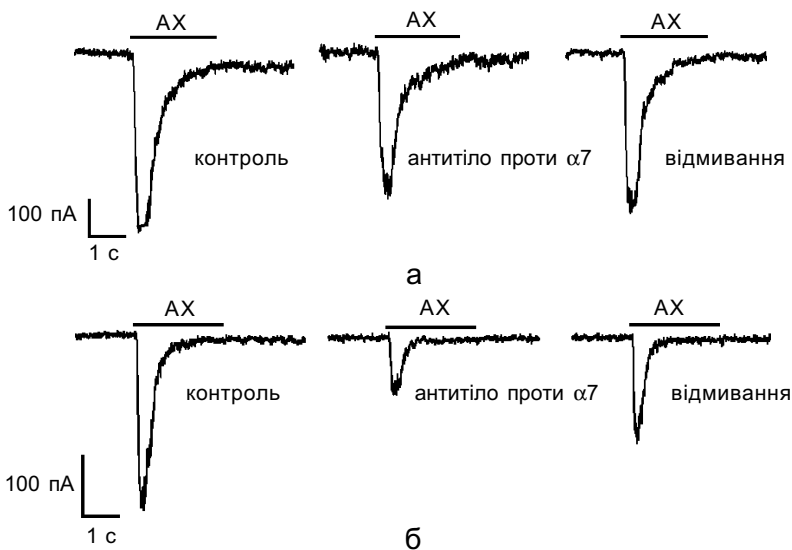


Рис. 2. Ефект дії антитіла, імуноспецифічного до α7-субодиниці нікотинного холінорецептора, на ацетилхолінвикликані струми низькочутливого (а) та високочутливого (б) до дії α7-специфічних антитіл нейрона

ресія $\alpha 4$ -вмісних холінорецепторів притаманна нейронам центральної, а не периферичної нервової системи. $\alpha 3$ -вмісні холінорецептори, навпаки, найбільше властиві нейронам автономних гангліїв [9].

Відомо, що $\alpha 5$ -субодиниця формує функціональні рецептори лише в комбінації з $\alpha 3$ - чи $\alpha 4$ -субодиницями [11, 14]. $\alpha 4$ -специфічні антитіла не виявили достовірного впливу на відповідь досліджуваних нейронів на дію агоніста. Водночас ступінь блокування викликаних ацетилхолінових струмів $\alpha 3$ - та $\alpha 5$ -специфічними антитілами була приблизно однаковою. Виходячи з цього, ми припустили, що $\alpha 5$ -субодиниця в даних нейронах асоційована у складі одних рецепторів саме з $\alpha 3$ -субодиницею. Результати сумісної дії $\alpha 3$ - та $\alpha 5$ -специфічних антитіл, в яких $\alpha 5$ -специфічні антитіла не викликають подальшого зменшення амплітуди викликаних струмів, що вже заблоковані $\alpha 3$ -специфічними антитілами, підтверджують цей факт.

Наявність $\alpha 7$ -вмісних нікотинових холінорецепторів у ентеральній нервовій системі довгий час була не з'ясована. За даними Zhou та Galligan [19] бунгаротоксин не виявляє блокуючого впливу на мієнтеральні нейрони, тобто на них відсутні рецептори з $\alpha 7$ -субодиницею. Те ж саме було показано для нейронів підшлункової залози [16]. Однак Kirchgessner та Liu [8] виявили $\alpha 7$ -специфічне зв'язування антитіл на нейронах і мієнтерального, і підслизового сплетень. Ми також спотерігали імуноцитохімічне забарвлення нейронів підслизового сплетення $\alpha 7$ -специфічними антитілами [6]. Результати, представлені в даній роботі, свідчать про наявність на нейронах підслизового сплетення функціональних $\alpha 7$ -вмісних холінорецепторів. Крім того, нами виявлена неоднорідність цих нейронів за кількісним внеском $\alpha 7$ -вмісних рецепторів у відповідь на дію агоніста. В більшості досліджених клітин частка $\alpha 7$ -вмісних холінорецепторів у загальній

відповіді нейрона на ацетилхолін досить незначна порівняно з $\alpha 3$ - та $\alpha 5$ -вмісними рецепторами. Але близько у 20 % клітин викликаний ацетилхоліновий струм майже на 70 % блокувався $\alpha 7$ -специфічними антитілами, що свідчить про провідну участь у його формуванні саме $\alpha 7$ -холінорецепторів. Ці результати узгоджуються з даними, отриманими раніше в нашому відділі за допомогою високоспецифічного блокатора $\alpha 7$ -холінорецепторів метилікаконітину [6].

Отже, одержані результати дозволяють зробити висновок, що нейрони підслизового сплетення тонкого кишечника морської свинки експресують $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ та $\alpha 7$ -субодиниці, які входять до складу функціональних нікотинових холінорецепторів. $\alpha 3$ - та $\alpha 5$ -субодиниці асоційовані у складі одних рецепторів, які в більшості нейронів опосередковують основну частину відповіді клітини на ацетилхолін. Проте існують нейрони, у яких провідну роль у формуванні відповіді на дію агоніста відіграють $\alpha 7$ -вмісні нікотинові холінорецептори. Це, ймовірно, свідчить про функціональну неоднорідність нейронів у межах одного ганглія.

O.O. Grigorov, M.V. Skok, V.I. Skok

ALFA-SUBUNIT COMPOSITION OF NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN THE SUBMUCOSAL PLEXUS OF THE GUINEA-PIG

The α -subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in the submucosal plexus of the guinea-pig ileum were studied using the whole-cell patch-clamp technique and affinity-purified antibodies (Abs) against $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ and $\alpha 7$ -subunits of nAChRs. The independent addition of anti- $\alpha 3$ and anti- $\alpha 5$ Abs to extracellular bath solution induced depression of the acetylcholine (ACh)-evoked currents by $60\% \pm 1,56\%$ and $65\% \pm 1,62\%$ correspondingly. Successive application of anti- $\alpha 5$ Abs in the presence of anti- $\alpha 3$ Abs did not have any additional blocking effect on ACh-evoked currents. Anti- $\alpha 7$ Abs evoked depression of ACh-induced currents by $24\% \pm 1,51\%$ in 80% of investigated neurons and by $67\% \pm 1,5\%$ in 20% of neurons. The addition of anti- $\alpha 4$ Abs to extracellular bath solution did not have effect on membrane currents of the investigated neurons. Our data provide evidence of participation of $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ and $\alpha 7$ -containing

receptors in the response to ACh. α3- and α5-subunits are associated in the same functional nAChRs that provide greater part of response to ACh in the most of submucosal neurons. However, in some neurones α7-containing nAChRs provide greater part of response to agonist.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коваль О.М., Скок М.В., Скок В.І. α-субодиничний склад нікотинових холінорецепторів нейронів нижнього блужового ганглія морської свинки: електрофізіологічне дослідження // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2003. – **35**, № 1. – С. 9–19.
2. Costa M., Furness J.B., Gibbins I.L. Chemical coding in enteric neurons // *Prog. Brain Res.* – 1986. – **68**. – P. 217–239.
3. Evans R.J., Jiang M.M., Surprenant A. Morphological properties and projections of electrophysiologically characterized neurons in the guinea-pig submucosal plexus // *Neuroscience* – 1994. – **59**. – P. 1093–1110.
4. Galligan J.J., LePard K.J., Schneider D.A., Zhou X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system // *JANS.* – 2000. – **81**. – P. 97–103.
5. Glushakov A.V., Glushakova H.Y., Skok V.I. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor activity in submucous neurons by intracellular messengers // *JANS.* – 1999. – **75**. – P. 16–22.
6. Glushakov A.V., Voitenko L.P., Skok M.V., Skok V.I. Distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing different alpha-subunits in the submucosal plexus of the guinea-pig // *Auton Neurosci.* – 2004. – **110**, №1. – P. 19–26.
7. Hamill O.P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cell and cell-free membrane patches // *Pflugers Arch.* – 1981. – **391**. – P. 85–100.
8. Kirchgessner A.L., Liu M.T. Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptors in the guinea-pig bowel and pancreas // *J.Comp. Neurol.* – 1998. – **390**. – P. 497–514.
9. Lindstrom J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. – In: Narahashi T. (ed.). *Ion Channels*. New York:

- Plenum pres. – 1996. – 4. – P. 377–390.
10. Lindstrom J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease // *Molec. Neurobiol.* – 1997. – **15**, №2. – P. 193–222.
 11. Lukas Q.J., Changeux J.P., Le Novere N. et al. International Union of Pharmacology XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits // *Pharmacol. Rev.* – 1999. – **51**, №2. – P. 397–401.
 12. Obaid A.L., Koyano T., Lindstrom J. et al. Spatio-temporal patterns of activity in an intact mammalian network with single-cell resolution: optical studies of nicotinic activity in an enteric plexus // *J. Neurosci.* – 1999. – **19**. – P. 3073–3093.
 13. Purnyn E., Skok M., Rikhalsky O., Skok V. Subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in neurons of the rat intracardiac ganglia // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2002. – **35**, № 1. – P. 203–206.
 14. Ramirez-Latorre J., Yu C.R., Qu X. et al. Functional contribution of alpha 5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels // *Nature*. – 1996. – **380**. – P. 347–351.
 15. Salamone F., Zhou M. Aberrations in nicotinic acetylcholine receptor structure, function, and expression: implications in disease // *McGill J. of Med.* – 2000. – **5**, №2. – P. 90–97.
 16. Sha L., Love A., Ma R.C., Szurszewski J.C. Cholinergic transmission in pancreatic ganglia of the cat // *Pancreas*. – 1997. – **14**. – P. 83–93.
 17. Skok M.V., Voitenko L.P., Voitenko S.V. et al. Alpha subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the rat autonomic ganglia neurones as determined with subunit-specific anti-α(181–192) peptide antibodies // *Neuroscience* – 1999. – **93**. – P. 1427–1436.
 18. Skok M.V., Lykhmus E., Bobrovnik S. et al. Structure of epitopes recognized by the antibodies to α(181–192) peptides of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: extrapolation to the structure of acetylcholine-binding domain // *J. Neuroimmunol.* – 2001. – **121**. – P. 59–66.
 19. Zhou X., Galligan J.J. Nicotinic cholinergic receptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig ileum // *Soc. Neurosci. Abs.* – 1996. – **22**. – P. 335.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;
Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 26.04.2004*