

Е. А. ВУЛЬФИУС, О. П. ЮРЧЕНКО

ВЛИЯНИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И ЕГО АНАЛОГОВ НА НЕЙРОНЫ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ

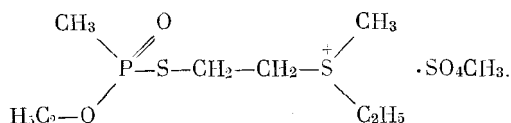
(Представлено академиком Г. М. Франком 18 XI 1971)

В нервной системе брюхоногих моллюсков *Helix pomatia* (¹, ²), *Aplysia californica* (³, ⁴), *Limnaea stagnalis* (⁵) биохимическим методом обнаружена холинэстераза. По ряду признаков (гидролиз мехолила, торможение избытком субстрата, чувствительность к избирательным ингибиторам истинной холинэстеразы (АХЭ)) холинэстеразы из гомогенатов ганглиев и апализии и прудовика оказались более сходными с АХЭ позвоночных. Однако они катализировали также гидролиз бутирилхолина (БХ), а холинэстераза прудовика тормозилась не только эзеринем, но и диизопропилфторфосфатом (ДФФ).

При гистохимическом исследовании холинэстеразной активности в ганглиях прудовика и виноградной улитки (⁶) реакция с бутирилтиохолином была более интенсивна, чем с ацетилтиохолином, и ослаблялась ДФФ; однако ни эзерин, ни ДФФ полностью не уничтожали реакцию с тиохолиновыми эфирами. На этом основании авторы сделали вывод о том, что в ганглиях этих моллюсков присутствует холинэстераза, сходная с ложной холинэстеразой (ХЭ) позвоночных, и, кроме того, неспецифическая эстераза — арилэстераза.

Таким образом, в вопросе о специфичности холинэстераз ганглиев брюхоногих моллюсков нет окончательной ясности. Об активности и специфичности холинэстеразы косвенно можно судить по увеличению ответа клетки на ацетилхолин (АХ) и другие субстраты АХЭ и ХЭ после обработки ганглиев антихолинэстеразными веществами. Ранее на нейронах прудовика нами было показано, что добавление в омывающий раствор фосфорорганического ингибитора ХЭ позвоночных ГТ-165 вызывает повышение активности АХ и субстратов ХЭ — суберилдихолина (Д-6) и БХ (⁷). Был сделан вывод о высокой активности в мозге прудовика холинэстеразы, близкой по субстратной специфичности с ХЭ позвоночных. Однако, наряду с усилением активности Д-6 и БХ, наблюдалось повышение активности мехолила — субстрата АХЭ. Последнее можно объяснить, если исходить из двух предположений. Либо в ганглиях прудовика есть две холинэстеразы и ГТ-165 в силу недостаточной избирательности тормозит и вторую, сходную, с АХЭ, либо один фермент гидролизует субстраты и АХЭ, и ХЭ.

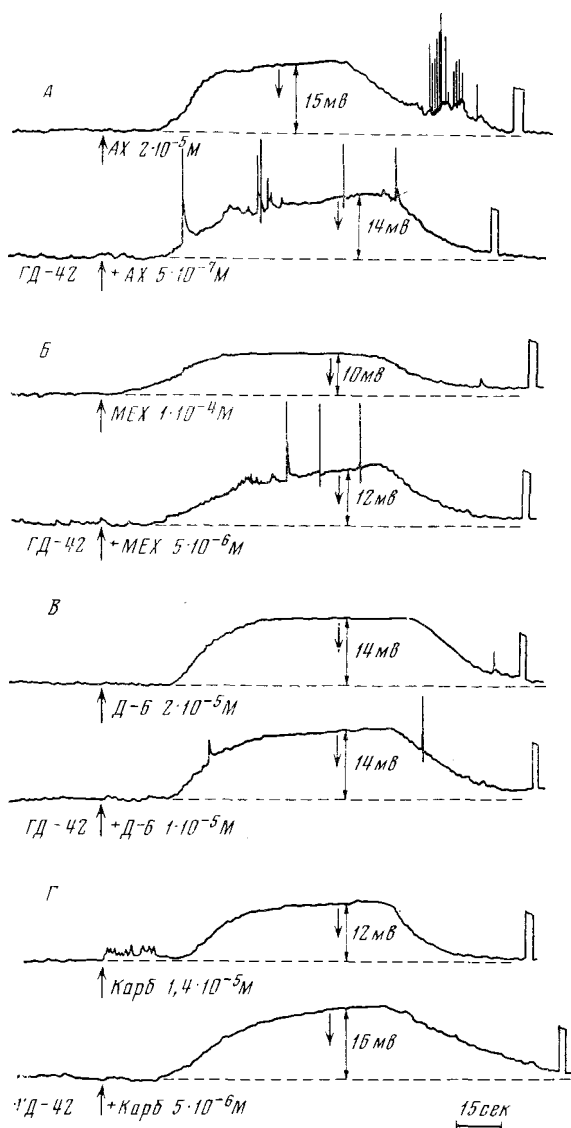
В настоящей работе предпринята попытка проверить эти предположения с помощью необратимого ингибитора АХЭ Гд-42 (коэффициент избирательности по отношению к АХЭ позвоночных 24 (⁸)).



Работа проведена на 41 нервной клетке изолированного мозга прудовика, главным образом на трех гигантских идентифицированных нейро-

нах большого парияетального ганглия. О действии АХ и холиномиметических веществ судили по изменению потенциала покоя клетки при помощи микроэлектродного отведения. АХ, холиномиметические вещества и ингибиторы добавляли в перфузионную жидкость. Препарат Гд-42 применяли в течение 10 мин. в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-5}$ мол/л, ГТ-165 20—30 мин. в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ мол/л. После воздействия в течение этого времени ингибиторы отмывали. Сравнение силы действия одного и того

Рис. 1. Влияние Гд-42 $1 \cdot 10^{-5}$ М на действие АХ и холиномиметических веществ на нейрон прудовика. Запись на ЭПП-09. Обработка Гд-42 10 мин. Стрелками указаны начало и окончание перфузирования ганглиев раствором холиномиметического вещества. В конце каждой осциллограммы калибровка 10 мв. А — ответы клетки на АХ до и после воздействия Гд-42 (после Гд-42 АХ $5 \cdot 10^{-5}$ М вызывает примерно такой же эффект, как АХ $2 \cdot 10^{-5}$ М в контроле). Б — действие мехолила до и после обработки Гд-42 (после торможения холинэстеразы мехолил вызывает такой же ответ, как до торможения, в концентрации, в 20 раз меньшей). В и Г — действие Д-6 и карбахолина до и после применения Гд-42 (после действия Гд-42 Д-6 вызывает такой же ответ, как до ингибирования, в концентрации, в 2 раза меньшей, карбахолин — в концентрации, меньшей примерно в 3 раза)



же вещества до и после обработки ганглиев антихолинэстеразным препаратом проводили по кривым зависимости величины деполяризации клетки от концентрации вещества.

Во всех опытах Гд-42 значительно усиливал действие АХ и мехолила. Записи ответов клетки в одном из таких опытов представлены на рис. 1. Д-6 и БХ усиливались в такой же степени, как карбахолин и тетраметил-аммоний (ТМА), — вещества, не разрушающиеся холинэстеразой. Небольшое усиление карбахолина и ТМА, наблюдавшееся в опытах, мы считали несpezifическим и вводили на него поправку в коэффициент

усиления других веществ*. Средние значения усиления активности веществ после торможения холинэстеразы с поправкой на неспецифическое усиление представлены в табл. 1.

Усиление активности АХ и мехолила без потенцирования действия Д-6 и БХ позволяет предполагать существование двух ферментов, один из которых разрушает АХ и мехолил и тормозится Гд-42, другой нечувствителен к Гд-42, ингибируется ГТ-165 и гидролизует Д-6 и БХ. И дей-

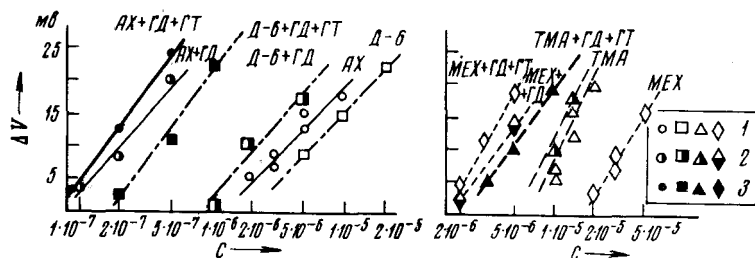


Рис. 2. Зависимость эффекта АХ и Д-6 (слева), мехолила и ТМА (справа) от концентрации до ингибирования холинэстеразы, после применения Гд-42 $1 \cdot 10^{-5}$ М, 20 мин. и после последующего применения ГТ-165 $1 \cdot 10^{-5}$ М, 20 мин. 1 — контрольное испытание веществ, 2 — испытание веществ после первого ингибитора, 3 — после второго ингибитора

ствительно, последовательное применение ГТ-165 после Гд-42 вызывало усиление Д-6 и БХ (табл. 1). Усиление активности АХ и мехолила после второго ингибитора было на уровне неспецифического.

На рис. 2 видно, что кривые зависимости эффекта АХ и мехолила от их концентраций после обработки Гд-42 значительно сдвигаются влево в

Таблица 1

Среднее усиление активности АХ и холиновых эфиров на нейронах прудовика после применения антихолинэстеразных веществ

Ингибиторы	Отношение равноэффективных концентраций до и после ингибитора с поправкой на неспецифическое усиление			
	АХ	Д-6	БХ	мехолил
Гд-42	$6,9 \pm 2,49$	$1,1 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,29$	$4,1 \pm 1,54$
ГТ-165 после				
Гд-42	$1,1 \pm 0,12$	$4,5 \pm 1,54$	$2,2 \pm 0,22$	$1,0 \pm 0$
Гд-42 после				
ГТ-165	$3,2 \pm 1,13$	$1,0 \pm 0$	$1,5 \pm 1,7$	$2,1 \pm 0,47$

сторону меньших концентраций. Сдвиг кривых для Д-6 и ТМА мал. После последующего применения ГТ-165 практически нет усиления АХ и мехолила, а активность Д-6 увеличивается на порядок.

В опытах с обработкой ганглиев сначала ГТ-165, а затем Гд-42 первый ингибитор потенцировал действие Д-6, АХ и мехолила, причем Д-6 в значительно большей степени. Последующее применение Гд-42 вызывало дальнейшее усиление АХ и мехолила, чувствительность клетки к Д-6 не менялась. Результаты опыта с такой последовательностью применения ингибиторов представлены на рис. 3.

* Мы регистрировали изменения потенциала покоя отдельного, но не изолированного от остальных клеток мозга нейрона. Вещества, которые добавляли в перфузионную жидкость, могли воздействовать на исследуемый нейрон как прямо, так и через синаптические входы со стороны других клеток. Если цепь включала возбуждающее холинэргическое звено, то в результате торможения холинэстеразы в этом синапсе влияние со стороны других нейронов, чувствительных к карбахолу или ТМА, должно было усиливаться.

Изложенные данные позволяют предположить, что в нервной системе прудовика, по-видимому, есть два фермента. Один из них по субстратной специфичности и по чувствительности к ингибиторам сходен с АХЭ позвоночных: гидролизует АХ и мехолил и чувствителен к ингибитору АХЭ Гд-42, но отличается от АХЭ тем, что тормозится в некоторой степени ингибитором ХЭ ГТ-165. Второй фермент гидролизует Д-6, БХ и тормо-

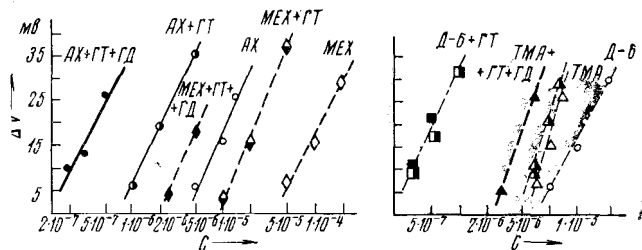


Рис. 3. Зависимость эффекта АХ, мехошила (слева) и ТМА и Д-6 (справа) от концентрации до перфузирования ганглиев ингибиторами, после применения ГТ-165 $1 \cdot 10^{-5}$ М, 37 мин. и после последующего применения Гд-42 $5 \cdot 10^{-6}$ М, 11 мин. Обозначения те же, что на рис. 2

зится ГТ-165. Эти его свойства совпадают со свойствами ХЭ позвоночных, но в отличие от ХЭ он не гидролизует АХ (табл. 1).

Гд-42 был испытан еще на одном брюхономом моллюске *Planorbarius corneus*. Этот ингибитор, как и использованный раньше ГТ-165 (⁷), не усиливал действие АХ и его аналогов. Это говорит о том, что в ганглиях катушки либо низка активность холинэстеразы, либо эта холинэстераза нечувствительна к использованным ингибиторам. Таким образом, эти два вида моллюсков существенно отличаются друг от друга с точки зрения активности и специфичности холинэстераз.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуцзино-на-Оке

Поступило
17 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К.-В. Augustinsson, Biochem. J., 40, 3, 343 (1946). ² К.-В. Augustinsson, Acta physiol. scand., 15, Suppl. 52, 1 (1948). ³ W. D. Dettbarn, P. Rosenberg, Biochim. et biophys. acta, 65, 362 (1962). ⁴ E. Giller, J. H. Schwartz, J. Neurophysiol., 34, 4, 108 (1971). ⁵ J. Varanka, Magyar tud. Akad. Tihanyi biol. kutatoint evk., 35, 93 (1968). ⁶ I. Zs-Nagy, J. Salanki, Nature, 206, 4986, 842 (1965). ⁷ Е. А. Вульфийс, О. П. Юрченко, Э. В. Зеймаль, ДАН, 186, № 6, 1445 (1969). ⁸ В. А. Яковлев, Р. И. Волкова, ДАН, 146, № 1, 217 (1962).