

В. А. ТКАЧУК, Ж. К. УСПАНОВА, И. А. ПОПОВА

О ВЛИЯНИИ АЦЕТИЛХОЛИНА НА Na^+ , K^+ -ЗАВИСИМУЮ АТФазу ИЗ РАЗЛИЧНЫХ МЫШЦ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 13 II 1973)

Тормозящее влияние ацетилхолина (АХ) на Na^+ , K^+ -зависимую АТФазу (Na^+ , K^+ -АТФазу) было продемонстрировано в 1963 г. на мембранных препаратах, выделенных из сердца морских свинок (¹). Этот эффект был воспроизведен, и кроме того было показано ингибирующее действие АХ на Na^+ , K^+ -АТФазу сарколеммы скелетных мышц (²⁻⁵). Однако в литературе отмечалось и отсутствие воздействия АХ на Na^+ , K^+ -АТФазу (⁶⁻⁸). Разноречивые данные могли зависеть как от различных условий постановки опытов, так и от различной чувствительности к АХ Na^+ , K^+ -АТФазы из разных объектов (⁴⁻⁹). В связи со сказанным было предпринято сравнительное исследование действия АХ на Na^+ , K^+ -АТФазу сердечной и скелетных мышц из разных объектов.

Объектом исследования была Na^+ , K^+ -АТФаза мембранных препаратов, выделенных из бедренных (смешанных) мышц лягушки, из мышцы сердца кролика, а также из бедренных (белые) и смешанных (белые + красные) мышц голени кролика. Мембранные препараты из сердечной мышцы кролика получали двумя различными способами.

Способ I, разработанный на основе опубликованного ранее материала (^{3, 4}), заключался в следующем. Ткань желудочков сердца тщательно отмывали от крови и гомогенизировали в 8-кратном объеме охлажденного раствора: гистидин (5 мМ) и ЭДТА (1 мМ) (рН доводили трис-буфером до 7,4). Гомогенизацию проводили при 8000 об/мин в течение 3 мин. в гомогенизаторе типа Уорринга. Гомогенат фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали при 2800 g 10 мин. Полученный садок суспендировали в той же среде и центрифугировали в тех же условиях. Осадок от второго центрифугирования суспендировали в 5-кратном объеме (по отношению к весу мышцы) исходной среды, медленно приливали равный объем 1 M раствора бромистого лития и экстрагировали 20—22 часа на холоду. Затем экстракт центрифугировали при 2800 g 20 мин. и осадок суспендировали в 5-кратном объеме (по отношению к весу мышц) 0,6 M раствора KCl, приготовленного на 10 мМ трис-HCl-буфере (рН 8,0). Через 30 мин. экстракт центрифугировали при 2800 g 20 мин. Полученный осадок подвергали той же процедуре, а затем отмывали в исходной среде. Конечный осадок суспендировали в 5—6 мл среды хранения следующего состава: альбумин (0,2%), сахароза (250 мМ), гистидин (10 мМ); рН 7, 4. Выход белка составлял 2—4 мг/г ткани.

Способ II, описанный ранее (¹⁰), заключался в следующем. После тщательной перфузии сердца ткань желудочков гомогенизировали в течение 1 мин. в гомогенизаторе Поттера (1400 об/мин) в растворе: трис-HCl (1 мМ) и Na_2 -ЭДТА (1 мМ) при рН 6,8. Профильтрованный через 2 слоя марли гомогенат центрифугировали при 1000 g 20 мин. и осадок промывали дважды в тех же условиях. После этого осадок суспендировали в растворе трис-HCl (20 мМ) при рН 8,2 и медленно добавляли 2M раствор бромистого лития до конечной концентрации 1 M. Разведение осадка при экстракции бромистым литием составляло 5 мл на 1 г ткани. Экстракция длилась

20 час. на холоду. Суспензию центрифугировали при 600 *g* 20 мин., осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали при 20 000 *g* 20 мин. Полученный осадок промывали дважды, первый раз в исходной среде, второй раз в растворе трис-НCl (1 мМ); рН 7,4. Конечный осадок суспендировали в 2 мл той же среды хранения (способ 1). Выход белка составлял около 2 мг/г ткани.

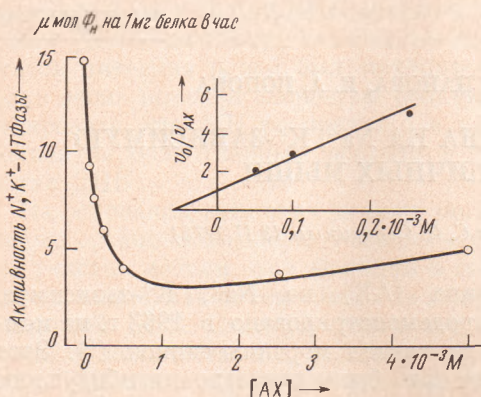


Рис. 1. Характер изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы мембранных препаратов сердечной мышцы кролика в зависимости от концентрации АХ. Белок 50 μg

(в 1 мл); рН 7,4, температура 37°, время инкубации 10 мин. Na^+ , K^+ -АТФазу определяли по разнице в нарастании неорганического фосфата в этой среде и в присутствии 1 μmol оуабаина. Определение неорганического фосфата в пробах после инкубации проводили методом Уайль-Малерба и Грина (¹⁴). Чувствительность этого метода значительно выше чувствительности метода Фиске и Суббарроу, а АХ в концентрации до 10 мМ не влияет на угол наклона калибровочной кривой.

Результаты и обсуждение

Препараты Na^+ , K^+ -АТФазы из скелетных мышц имели максимальную активность при 80 мМ NaCl и 60 мМ KCl, что соответствует литературным данным (¹², ¹³), Na^+ , K^+ -АТФаза из сердца кролика была наиболее активна (при обоих способах выделения) при 110–120 мМ NaCl и 30–20 мМ KCl, как это отмечалось ранее (³, ¹⁰). Оптимум рН, определяемый при оптимальном соотношении Na^+/K^+ , составлял 7,4. Отношение общей АТФазы к оуабаин-нечувствительной АТФазе было равно 1,5–2,5 (для некоторых препаратов из сердца 3,0). Величины активности Na^+ , K^+ -АТФазы разных препаратов представлены в табл. 1.

Опыты по исследованию действия АХ на АТФазу сарколеммы проводили в первые 4 дня после выделения препаратов (при этом активность АТФазы существенно не изменялась) в условиях, соответствующих максимальной активности Na^+ , K^+ -АТФазы. АХ не оказывал

Таблица 1

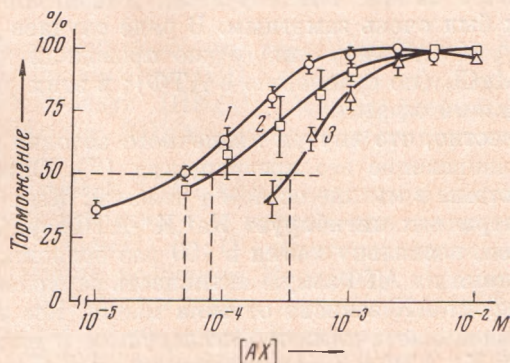
Влияние ацетилхолина на Na^+ , K^+ -АТФазу из различных мышц

Объекты	Мышцы	Na^+ , K^+ -АТФаза μmol Р _n на 1 мг белка в час	Na^+ , K^+ -АТФаза, чувствительная к АХ (% от общей)	K_i для АХ, μM
Кролик	Белые + красные	$25,0 \pm 5,1$	80 ± 6	100 ± 20
	Белые	$18,5 \pm 4,9$	61 ± 8	290 ± 50
	Сердце			50 ± 5
	по способу I	$11,1 \pm 1,8$	87 ± 5	
Лягушка	по способу II	$6,8 \pm 1,5$	20 ± 5	—
	Белые + красные	$3,1 \pm 1,1$	60 ± 20	65 ± 10

влияния на активность Mg-АТФазы. Ингибирующее действие АХ на Na^+ , K^+ -АТФазу было получено на всех исследуемых препаратах, при этом для скелетных мышц кролика была обнаружена зависимость глубины торможения Na^+ , K^+ -АТФазы от величины исходной активности фермента (⁴, ¹⁵). Величины K_i для АХ не зависели от исходной величины ферментативной активности.

Из табл. 1 видно, что удельная активность, а также величина ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы сердца ацетилхолином зависят от способа выделения фермента. Можно думать, что это связано с наличием в препаратах двух фракций Na^+ , K^+ -АТФазы — чувствительной и нечувствительной к АХ. Инактивация или потеря в процессе выделения фракции, Na^+ , K^+ -АТФаза которой чувствительна к АХ, может привести к снижению удельной активности и уменьшению (или даже исчезновению)

Рис. 2. Степень торможения Na^+ , K^+ -АТФазы мембранных препаратов из разных мышц в зависимости от концентрации АХ. Каждая точка — среднее для трех препаратов. 1 — сердечная мышца кролика, 2 — бедренные мышцы лягушки, 3 — бедренные мышцы кролика



ацетилхолинового торможения Na^+ , K^+ -АТФазы. Известно, что Na^+ , K^+ -АТФаза локализована в плазматических мембранах, Т-системе и саркоплазматическом ретикулуме сердца (¹⁶), поэтому нельзя исключить, что препараты мембран сердца, выделяемые методами I и II, морфологически различны.

Неоднородность мембран по отношению к АХ показал З. П. Кометиани, установивший, что фракция синапсом головного мозга крыс содержит два типа мембран — одни мембраны обладают чувствительной, другие — нечувствительной к АХ Na^+ , K^+ -АТФазой (⁹). Возможно, неполное торможение ацетилхолином Na^+ , K^+ -АТФазы скелетных мышц и мышц сердца также объясняется неоднородностью фракции сарколеммы. Исходя из этого, мы определяли K_i для Na^+ , K^+ -АТФазы по концентрации АХ, вызывающей 50% торможение только Na^+ , K^+ -АТФазы, чувствительной к АХ (рис. 1). Это позволяет сравнить чувствительность к АХ Na^+ , K^+ -АТФазы, выделенной из разных мышц, несмотря на то, что на разных препаратах АХ вызывал различное по глубине торможение Na^+ , K^+ -АТФазы.

В табл. 1, в которой приведены средние значения, полученные при анализе 4—5 различных препаратов сарколеммы (для каждого типа мышц), представлены K_i для Na^+ , K^+ -АТФазы. Видно, что чувствительность к АХ Na^+ , K^+ -АТФазы быстрых (белых) мышц кролика меньше, чем у медленных (смешанных); Na^+ , K^+ -АТФаза смешанных мышц кролика менее чувствительна к АХ, чем АТФаза смешанных мышц лягушки, а наибольшее сродство к АХ проявляет Na^+ , K^+ -АТФаза сердечной мышцы кролика (при выделении препарата по I способу). Эту зависимость иллюстрирует также рис. 2.

Необходимо отметить одну из особенностей действия АХ на Na^+ , K^+ -АТФазу смешанных мышц. На некоторых препаратах из мышц конечностей лягушки мы наблюдали двухфазное действие АХ: при низких концентрациях АХ (5—25 μM) происходило снижение активности Na^+ ,

K⁺-АТФазы, дальнейшее увеличение концентрации АХ (до 50—100 μ М) не вызывало углубления торможения, а большие концентрации (200—1000 μ М) приводили к более глубокому торможению Na⁺, K⁺-АТФазы. По-видимому, этот факт свидетельствует о гетерогенности препаратов сарколеммы и может указать на присутствие в препарате фракции с большей чувствительностью к АХ, чем чувствительность суммарной фракции, определяемая для этих препаратов по формальному признаку — концентрации АХ, вызывающей 50% торможение чувствительной к АХ Na⁺, K⁺-АТФазы.

Для выявления действия АХ на Na⁺, K⁺-АТФазу важными оказались не только особенности исследуемого объекта или способ выделения препаратов сарколеммы. Как видно на рис. 1, концентрации АХ, превышающие 1 мМ, могут оказать меньшее ингибирующее действие, чем более низкие концентрации. Такой «подъем» кривой в некоторых опытах был очень заметным. В ряде случаев при измерении влияния АХ на Na⁺, K⁺-АТФазу инкубацию проводили при повышенных концентрациях MgCl₂ (по сравнению с АТФ); в этих условиях АХ оказывал гораздо меньший эффект.

Известно, что внутри мышечного волокна содержится АХ и ферменты, обуславливающие его превращения (¹⁷). Однако функция ацетилхолиновой системы в мышце остается неясной. Мы обнаружили, что АХ в низких концентрациях ингибирует Na⁺, K⁺-АТФазу. Это торможение высоко специфично, поскольку холин в 100 раз больших концентрациях не оказывает влияния на АТФазную активность сарколеммы (⁵). Обнаружено также, что эффект АХ зависит от типа мышц. Все это позволяет нам высказать предположение о том, что исследуемое в настоящей работе действие АХ на Na⁺, K⁺-АТФазу характеризует один из механизмов регуляции мышечного сокращения.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
13 II 1972

Институт физиологии
Академии наук КазССР
Алма-Ата

Институт фармакологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Kwang Soo Lee, Dai Hyun Yu, Biochem. Pharm., 12, 1253 (1963).
- ² А. А. Болдырев, Биол. науки, 8, 133 (1968). ³ А. А. Болдырев, В. Б. Петухов и др., Укр биохим. журн., 43, 125 (1971). ⁴ А. А. Болдырев, Биохимия, 36, 826 (1971). ⁵ В. А. Ткачук, О. Д. Лопина, Тез. докл. II Всесоюз. конфер. по биохим. мышечн. системы, 1972, стр. 209. ⁶ J. C. Skou, Symposium on Membrane Transport and Metabolism, Prague, 1960, p. 228. ⁷ J. Jarnfelt, Biochim et biophys. acta, 48, 111 (1961). ⁸ H. J. Portius, K. R. H. Repke, Acta biol. med. german., 19, 907 (1967). ⁹ З. П. Кометпани, В сборн. Вопр. биохим. нервной и мышечной системы, Тбилиси, 1972, стр. 57. ¹⁰ И. А. Попова, Биохимия, 37, 424 (1972). ¹¹ В. А. Ткачук, В сборн. Транспортные АТФазы. Методы выделения и исследования, 1973. ¹² R. J. Voegman, J. F. Manery, L. Pinteric, Biochim. et biophys. acta, 203, 506 (1970). ¹³ P. V. Sulakhe, M. Fedelesova et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 793 (1971). ¹⁴ Г. К. Саев, Изв. центр. лаб. биохим. АН Болгария, 1962, стр. 89. ¹⁵ А. А. Болдырев, В. Б. Ритов, В. А. Ткачук, Биол. науки, 12, 39 (1972). ¹⁶ M. S. Forbes, N. Sperelakis, Zs. Zellforsch., 134, 1 (1972). ¹⁷ О. В. Есыров, Кандидатская диссертация, Алма-Ата, 1968.