

УДК 612.8.015

БИОХИМИЯ

Р. Н. ГЛЕБОВ, Н. М. ДМИТРИЕВА, В. К. ЛУЦЕНКО, Г. Н. КРЫЖАНОВСКИЙ

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ  
И Na<sub>+</sub>-К-АТФазы ПРИ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ  
ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ ГОЛОВНОГО  
МОЗГА КРЫС

(Представлено академиком С. Е. Северинным 19 XII 1973)

Недавно было обнаружено, что электрическое раздражение супензии синаптосом вызывает возбуждение нервных окончаний и секрецию веществ с медиаторной функцией (<sup>4, 5, 12</sup>). Таким образом, существенные этапы процесса синаптической передачи, изучавшиеся ранее лишь в физиологических экспериментах, в настоящее время стали доступными для биохимического анализа.

В настоящей работе исследовано влияние электрического раздражения синаптосом на активность двух специфических ферментов синаптических мембран — транспортной Na<sub>+</sub>-К-АТФазы (КФ. 3.6. 1.3.), являющейся важнейшим элементом Na<sub>+</sub>-насоса, и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) (КФ 1.1. 1.7.), играющей, как известно, главную роль в регулировании продолжительности синаптического действия ацетилхолина (АХ).

Изучали активность ферментов фракции «легких» (холинергических) синаптосом, выделенных из серого вещества коры головного мозга крыс (вес 150–180 г) при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы (0,8–1,0–1,1–1,2 M) неочищенной фракции грубых митохондрий по ранее описанной методике (<sup>3</sup>). Фракцию (слой между 1,0–1,1 M сахарозой) отбирали и разбавляли 0,1 M сахарозой. Полученный при 140 000 g в течение 40 мин. (MSE Superspeed-65, Англия) осадок «легких» синаптосом супензировали в среде Кребса — Рингера (NaCl 124 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,3 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,75 mM; глюкоза 10 mM, pH 7,4) с содержанием белка 1 мг/мл, после чего пробы объемом 4–5 мл помещали в прецизионный ультратермостат ЛКБ-7601А (Швеция). Среда указанного состава обеспечивает оптимальные условия для функционирования синаптосом (<sup>4, 5</sup>).

После 12 мин. преинкубации при 30° (или 37° в зависимости от задачи) часть проб подвергали 30-минутной электростимуляции по Брэдфорду (<sup>5, 6</sup>), другие пробы служили контролем. Раздражение супензии синаптосом проводили посредством погруженных платиновых электродов при непрерывном перемешивании супензии. Агрегацию частиц при электростимуляции не наблюдали. Использовали прямоугольные импульсы переменной полярности (0,4 мсек., 100 гц) с выхода стимулятора ЭСУ-1. Применили две интенсивности раздражения: 10 в (средний ток 1,5 ма) и 100 в (средний ток 15 ма).

Определение активности АХЭ проводили в препаратах, стимулированных при 37°. Активность определяли спектрофотометрически по методу (<sup>9</sup>), регистрируя в течение 5 мин. инкубации (при 20°) поглощение при 412 ммк (Spektromet-230, Венгрия). Состав пробы: ацетилтиохолиниодид (АТХ) 0,5 mM, 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота 0,31 mM, трис-HCl pH 7,9 20 mM; 40–60 мкг белка на 1 мл. Белок определяли по Лоури. В предварительных опытах было установлено, что оптимальной температурой для изучения активности АТФазы является 30°, поэтому электро-раздражение синаптосом в этом случае проводили при 30°. После электро-

Таблица 1

Изменение активности АХЭ и Na<sub>+</sub> К-АТФазы при электрораздражении супензии синаптосом мозга крыс

Фермент	Условия электростимуляции	Параметры	Контроль	Электростимуляция, 1-й вариант (1,5 ма, 10 в)	Электростимуляция, 2-й вариант (15 ма, 100 в)
Na <sub>+</sub> К-АТФаза	30 мин., 30°	$M \pm m$	$10,70 \pm 0,93$	$9,00 \pm 1,36$	$5,51 \pm 2,60$
		$n$	8	5	5
		%	100	85	51
		$P$	—	0,1—0,2	< 0,05
Mg-АТФаза	то же	$M \pm m$	$9,16 \pm 0,39$	$7,76 \pm 0,73$	$5,45 \pm 0,70$
		$n$	8	5	5
		%	100	85	59
		$P$	—	0,05—0,1	0,001
АХЭ	30 мин., 37°	$M \pm m$	$275,5 \pm 10,7$	$330,6 \pm 16,4$	$358,1 \pm 19,0$
		$n$	6	5	4
		%	100	120	130
		$P$	—	0,05	< 0,05

Примечание. Каждый опыт проводили на синаптосомах, выделенных из 6—7 крыс. Раствор Кребса — Рингера в инкубационных пробах для определения АХЭ разбавлялся в 30 раз. Активность АТФаз выражена в мкмолях  $P_i$  на 1 мг белка в час, АХЭ — в мкмолях АТХ на 1 мг белка в минуту. Статистическую обработку результатов проводили по Стьюденту — Фишеру,  $n$  — число опытов.

стимуляции пробы быстро охлаждали до 0—4° и центрифугировали при 12 000  $g$  (20 мин.). Осадок промывали деионизированной водой и после супензирования в воде использовали для анализа активности. При промывке теряется часть белка (до 27%), что согласуется с данными Брэдфорда (5). Об активности АТФаз (2) судили по накоплению неорганического фосфора при 20 мин. инкубации (30°) в среде следующего состава: NaCl 100 mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, АТФ-Na<sub>2</sub> 3 mM, трис-HCl pH 7,4 50 mM, оуабаин 0,1 mM; 120—250 мкг белка на 1 мл. Фосфор определяли колориметрически при 700 мкк (11). Активность Na<sub>+</sub> К-АТФазы рассчитывали по разнице активностей в отсутствие и в присутствии оуабаина.

Результаты опытов и их обсуждение. Данные об изменении активности АХЭ и Na<sub>+</sub> К-АТФазы синаптосом при их электрораздражении представлены в табл. 1. Из таблицы видно, что активность АХЭ синаптосом увеличивается при обеих интенсивностях электростимуляции, причем во 2-м варианте (отличающемся от 1-го параметрами тока, приводящего к интенсивной деполяризации синаптических мембран) более значительно (до 30%,  $P < 0,05$ ). Активность транспортной Na<sub>+</sub> К-АТФазы синаптосом в условиях электрического раздражения снижалась. При электрораздражении большей силы это уменьшение активности статистически достоверно (на 49%). Примерно в той же степени электрораздражение угнетает активность Mg-АТФазы. В работах (5, 6) было показано, что изменения в синаптосомах в результате электрораздражения аналогичны метаболическим сдвигам в нервной ткани при ее возбуждении электрическим током или ионами K<sup>+</sup> (увеличение дыхания, гликогенолиза, концентрации лактата) и четко отличаются от эффектов повреждения. Электрораздражение синаптосом, подобно возбуждению интактных нервных окончаний, сопровождается: 1) секрецией веществ с медиаторной функцией (ГАМК, глицин, АХ, нейросекреты гипоталамуса), требующей для своего осуществления наличия Ca<sup>2+</sup> в окружающей среде (4—8, 12); 2) снижением концентрации K<sup>+</sup> и небольшим увеличением Na<sup>+</sup> в синаптосомах (6); 3) диффузией и образованием ассоциатов синаптических пузырьков возле пресинаптической мембранны, при этом синаптосомы остаются морфологически сохранными (10). Полученные нами данные подтверждают представление о том, что электростимуляция супензии синаптосом в ионной среде, поддерживающей

нативное состояние синапсов, является адекватным методом возбуждения нервных окончаний *in vitro* (<sup>4, 5</sup>). Отметим, что увеличение концентрации K<sup>+</sup> в среде инкубации до 60 mM приводит также к деполяризационным эффектам, но менее выраженным, чем при электростимуляции синаптосом (<sup>6-8</sup>). Наблюдаемые при электростимуляции синаптосом ионные сдвиги (<sup>5</sup>), согласно нашим данным, обусловлены не только ускорением пассивного транспорта Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, но также и частичным выключением Na, K-насоса. Литературные данные (<sup>1</sup>) свидетельствуют о том, что проведение нервного импульса происходит на фоне снижения активного транспорта одновалентных катионов. Наши экспериментальные данные об уменьшении активности Na, K-АТФазы в синаптосомах при электрораздражении являются биохимическим подтверждением взаимосвязи функционирования Na, K-АТФазы синаптических мембран с механизмами возбуждения. Возможной причиной торможения Na, K-АТФазы при электростимуляции синаптосом могут быть ингибирующее действие Ca<sup>2+</sup>, накапливающегося в синапсах при секреции медиаторов, или АХ (<sup>1</sup>). Активация АХЭ может объясняться резким изменением ионного состава в синапсах, особенно, K<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>, или конформационными изменениями синаптических мембран при электростимуляции синаптосом.

Институт нормальной и патологической  
физиологии  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
8 XII 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. D. M. Paton, D. Vizi et al., J. Physiol., v. 215, 819 (1971). <sup>2</sup> Г. Н. Крыжановский, Р. Н. Глебов и др., Бюлл. эксп. биол., № 1 (1974). <sup>3</sup> В. В. Шевцов, О. М. Поздняков и др., Бюлл. эксп. биол., № 4, 94 (1972). <sup>4</sup> H. F. Bradford, Biochem. J., v. 117, 36P (1970). <sup>5</sup> H. F. Bradford, Brain Res., v. 19, 239 (1970). <sup>6</sup> J. S. de Belleroche, H. F. Bradford, J. Neurochem., v. 19, 585 (1972). <sup>7</sup> J. S. de Belleroche, H. F. Bradford, J. Neurochem., v. 19, 1847 (1972). <sup>8</sup> J. A. Edwardson, G. W. Bennet, H. F. Bradford, Nature, v. 240, 554 (1972). <sup>9</sup> G. Ellman et al., Biochem. Pharmacol., v. 7, 88 (1961). <sup>10</sup> D. G. Jones, H. F. Bradford, Brain Res., v. 28, 491 (1971). <sup>11</sup> O. H. Lowry, J. A. Lopez, J. Biol. Chem., v. 162, 421 (1946). <sup>12</sup> R. H. Osborne, H. F. Bradford, J. Neurochem., v. 21, 407 (1973).