

УДК 612.8.015

БИОХИМИЯ

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

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ  
И Na, K-АТФазы ПРИ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ  
ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ ГОЛОВНОГО  
МОЗГА КРЫС**

*(Представлено академиком С. Е. Севериным 19 XII 1973)*

Недавно было обнаружено, что электрическое раздражение суспензии синапсом 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 синапсом на активность двух специфических ферментов синаптических мембран — транспортной Na, K-НТФазы (КФ. 3.6. 1.3.), являющейся важнейшим элементом Na, K-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» (холинэргических) синапсом, 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 М) неочищенной фракции грубых митохондрий по ранее описанной методике (<sup>3</sup>). Фракцию (слой между 1,0–1,1 М сахарозой) отбирали и разбавляли 0,1 М сахарозой. Полученный при 140 000 g в течение 40 мин. (MSE Superspeed-65, Англия) осадок «легких» синапсом суспендировали в среде Кребса — Рингера (NaCl 124 мМ, KCl 5 мМ, MgSO<sub>4</sub> 1,3 мМ, NaHCO<sub>3</sub> 26 мМ, CaCl<sub>2</sub> 0,75 мМ; глюкоза 10 мМ, рН 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 синапсом (<sup>4, 5</sup>).

После 12 мин. преинкубации при 30° (или 37° в зависимости от задачи) часть проб подвергали 30-минутной электростимуляции по Врэдфорду (<sup>5, 6</sup>), другие пробы служили контролем. Раздражение суспензии синапсом проводили посредством погружных платиновых электродов при непрерывном перемешивании суспензии. Агрегацию частиц при электростимуляции не наблюдали. Использовали прямоугольные импульсы переменной полярности (0,4 мсек., 100 гц) с выхода стимулятора ЭСУ-1. Применяли 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 спектрофотметрически по методу (<sup>9</sup>), регистрируя в течение 5 мин. инкубации (при 20°) поглощение при 412 мк (Spektromom-230, Венгрия). Состав пробы: ацетилтихохолинйодид (АТХ) 0,5 мМ, 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота 0,31 мМ, трис-HCl рН 7,9 20 мМ; 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 синапсом в этом случае проводили при 30°. После электро-

Таблица 1

Изменение активности АХЭ и Na, К-АТФазы при электрораздражении суспензии синапсом 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, К-АТФаза	30 мин., 30°	$M \pm m$ $n$ % $P$	10,70 $\pm$ 0,93 8 100 —	9,00 $\pm$ 1,36 5 85 0,1—0,2	5,51 $\pm$ 2,60 5 51 < 0,05
Mg-АТФаза	то же	$M \pm m$ $n$ % $P$	9,16 $\pm$ 0,39 8 100 —	7,76 $\pm$ 0,73 5 85 0,05—0,1	5,45 $\pm$ 0,70 5 59 0,001
АХЭ	30 мин., 37°	$M \pm m$ $n$ % $P$	275,5 $\pm$ 10,7 6 100 —	330,6 $\pm$ 16,4 5 120 0,05	358,1 $\pm$ 19,0 4 130 < 0,05

Примечание. Каждый опыт проводили на синапсоммах, выделенных из 6—7 крыс. Раствор Кребса — Рингера в инкубационных пробах для определения АХЭ разбавлялся в 30 раз. Активность АТФаз выражена в мкмольах  $P_i$  на 1 мг белка в час, АХЭ — в мкмольах 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 суспендирования в воде использовали для анализа активности. При промывке теряется часть белка (до 27%), что согласуется с данными Брэдфорда (<sup>5</sup>). Об активности АТФаз (<sup>2</sup>) судили по накоплению неорганического фосфора при 20 мин. инкубации (30°) в среде следующего состава: NaCl 100 мМ, KCl 20 мМ, MgCl<sub>2</sub> 5 мМ, АТФ-Na<sub>2</sub> 3 мМ, трис-HCl pH 7,4 50 мМ, оуабаин 0,1 мМ; 120—250 мкг белка на 1 мл. Фосфор определяли колориметрически при 700 мкм (<sup>11</sup>). Активность Na, К-АТФазы рассчитывали по разнице активностей в отсутствие и в присутствии оуабаина.

Результаты опытов и их обсуждение. Данные об изменении активности АХЭ и Na, К-АТФазы синапсом при их электрораздражении представлены в табл. 1. Из таблицы видно, что активность АХЭ синапсом 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, К-АТФазы синапсом 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 (<sup>5</sup>, <sup>6</sup>) было показано, что изменения в синапсоммах в результате электрораздражения аналогичны метаболическим сдвигам в нервной ткани при ее возбуждении электрическим током или ионами K<sup>+</sup> (увеличение дыхания, гликолиза, концентрации лактата) и четко отличаются от эффектов повреждения. Электрораздражение синапсом, 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 (<sup>4-8</sup>, <sup>12</sup>); 2) снижением концентрации K<sup>+</sup> и небольшим увеличением Na<sup>+</sup> в синапсоммах (<sup>5</sup>); 3) диффузией и образованием ассоциатов синаптических пузырьков возле пресинаптической мембраны, при этом синапсомы остаются морфологически сохранными (<sup>10</sup>). Полученные нами данные подтверждают представление о том, что электростимуляция суспензии синапсом в ионной среде, поддерживающей

нативное состояние синапсов, является адекватным методом возбуждения нервных окончаний *in vitro* (<sup>4, 5</sup>). Отметим, что увеличение концентрации  $K^+$  в среде инкубации до 60 мМ приводит также к деполяризационным эффектам, но менее выраженным, чем при электростимуляции синапсом (<sup>6-8</sup>). Наблюдаемые при электростимуляции синапсом ионные сдвиги (<sup>5</sup>), согласно нашим данным, обусловлены не только ускорением пассивного транспорта  $Na^+$  и  $K^+$ , 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 синапсах при электрораздражении являются биохимическим подтверждением взаимосвязи функционирования  $Na$ ,  $K$ -АТФазы синаптических мембран с механизмами возбуждения. Возможной причиной торможения  $Na$ ,  $K$ -АТФазы при электростимуляции синапсом могут быть ингибирующее действие  $Ca^{2+}$ , накапливающегося в синапсах при секреции медиаторов, или АХ (<sup>1</sup>). Активация АХЭ может объясняться резким изменением ионного состава в синапсах, особенно,  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ , или конформационными изменениями синаптических мембран при электростимуляции синапсом.

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. Клыжковский, Р. Н. Глебов и др., Бюлл. эксп. биол., № 1 (1974). <sup>3</sup> В. В. Шевцов, О. М. Поздняков и др., Бюлл. эксп. биол., № 1, 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 Belleruche, H. F. Bradford, J. Neurochem., v. 19, 585 (1972). <sup>7</sup> J. S. de Belleruche, H. F. Bradford, J. Neurochem., v. 19, 1817 (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).