

Р. Н. ГЛЕБОВ, Г. М. ДОЛГАНОВ, Г. Н. КРЫЖАНОВСКИЙ

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СИНАПТИЧЕСКИХ СТРУКТУР КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

(Представлено академиком С. Е. Севериным 16 VII 1974)

Функционирование ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ 3.1.1.7) в синапсах определяется уровнем квантовой секреции медиаторов. Состояние активности АХЭ синаптических мембран при возбуждении нервных окончаний может регулироваться изменениями ионного состава терминалей (¹). Известно влияние некоторых ионов на активность АХЭ электрического органа ската (², ³), эритроцитов (⁴, ⁵) и синапсом мозга млекопитающих (⁶). Целью настоящей работы является изучение влияния хлоридов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} в широких пределах концентраций на активность и кинетические параметры АХЭ обогащенной фракции синаптических мембран мозга крыс.

Фракции грубых митохондрий (ГМит), синаптических мембран, легких синапсом и микросом (из постмитохондриальной надосадочной жидкости при 140 000 *g*, 40 мин.) получали из серого вещества коры больших полушарий мозга крыс весом 200 г по ранее описанной методике (⁷). Фракции хранили при -10° в течение 1–2 недель в деионизированной воде и использовали после однократного замораживания – оттаивания. Белок определяли по Лоури. Активность АХЭ определяли по методу Эллмана (⁸). Состав инкубационной среды (3,22 мл) в ммольях: трис-НСI, рН 7,9, 20; 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота (ДТНБ) 0,31; ацетилтиохолиниодид (АТХ) 0,5; белок 30–100 мкг/мл. После 5 мин. инкубации при 20° измеряли ΔE_{412} между опытной и контрольной (без АТХ) пробями. Метод Эллмана, позволяющий определить начальную скорость реакции, по нашим данным в 30 раз чувствительнее метода Хестрина (⁹) и требует в 5–7 раз меньшее количество ферментного препарата. Константу Михаэлиса (K_M) и максимальную скорость реакции (V) определяли по методу Эди-Хофсти (см. (¹⁰)). Коэффициент Хилла (n), т. е. степень взаимодействия аллостерических центров, связывающих субстрат, рассчитывали разностным методом анализа уравнения Хилла для активаторов (¹¹). Растворы солей NaCl и KCl (ос.ч.), CaCl_2 (ос.ч.) и MgCl_2 (х.ч.) готовили на деионизированной воде. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Уилкинсона – Манна – Уитни.

Оптимальная концентрация АТХ для АХЭ фракции обогащенных синаптических мембран составляет 0,3–0,5 мМ, субстратное торможение для АТХ, как и для АХ (метод Хестрина) наблюдается при 8–10 мМ. Оптимальная концентрация Na -фосфатного буфера рН 7,9 при определении АХЭ по Эллману находится в области 30–100 мМ, трис-НСI-буфера рН 7,9 – в области 5–40 мМ, при дальнейшем увеличении концентрации наблюдается снижение активности АХЭ. В пределах концентраций 5–50 мМ активность АХЭ в трис-НСI рН 7,9 на 16% ниже, чем в Na -фосфатном буфере. Активность АХЭ во фракциях ГМит, легких синапсом, синаптических мембран и микросом составляет 232, 282, 374 и 412 мкмоль АТХ на 1 мг белка в 1 мин. соответственно.

Из рис. 1 следует, что активирующее действие Na^+ и K^+ на АХЭ фракции синаптических мембран односторонне, их влияние становится заметным в концентрации 10 мМ и достигает максимума (40% активации) при концентрации 100–125 мМ. При увеличении концентрации до 500 мМ активирующий эффект Na^+ не изменяется, а K^+ несколько ослабляется. Влияние Mg^{2+} и особенно Ca^{2+} на АХЭ было более чувствительным. Достоверное активирующее действие (10%) ионов Mg^{2+} проявляется при концентрации 0,5 мМ, а для CaCl_2 — при 0,03 мМ. Максимальный активирующий эффект для Mg^{2+} наблюдается при 25 мМ (64%), а для Ca^{2+} — при 2,5 мМ

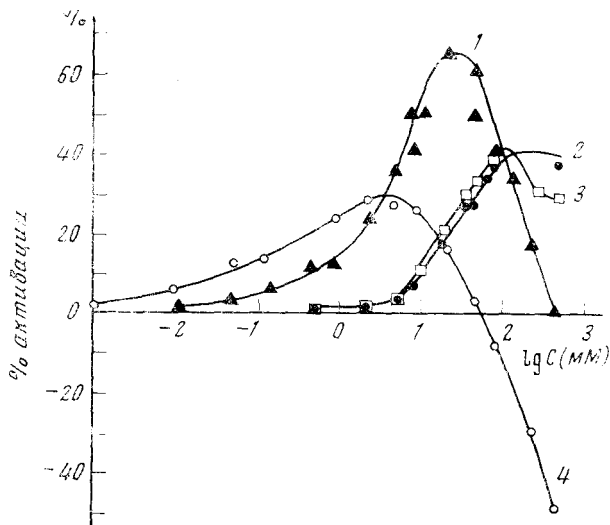


Рис. 1. Зависимость активности АХЭ фракции синаптических мембран от концентрации катионов. 1 — Mg^{2+} , 2 — Na^+ , 3 — K^+ , 4 — Ca^{2+} . Препрекубация 5 мин., 20°. Приведены средние данные из 5–7 опытов. Значения эффектов $\geq 10\%$ статистически достоверны ($P \leq 0,05$)

(28%). Как видно из рис. 1, дальнейшее увеличение концентрации Mg^{2+} и Ca^{2+} приводит к снижению активирующего действия и полному снятию активации при 500 мМ для Mg^{2+} и при 70 мМ для Ca^{2+} ; Ca^{2+} в концентрации 500 мМ ингибирует АХЭ на 50%. Отметим, что ионы Ca^{2+} активируют в очень низких концентрациях. Из этих данных следует также, что характер влияния катионов на АХЭ в наших экспериментах более всего зависит от природы катионов (и от их концентрации), чем от полной силы раствора реакционной смеси. При высокой ионной силе ($>0,1 M$) эффект катионов различается между собой. При ионной силе больше, чем 0,3 M, возможна солиubilизация и диссоциация АХЭ^(2, 12). Полученные нами эффекты при физиологических концентрациях катионов, по-видимому, характерны для мембранно-связанной АХЭ.

Учитывая двухфазность действия эффекторов и невозможность оценить величину V из экспериментальных данных, мы использовали разностный метод Б. И. Курганова для определения значения n . Анализ данных рис. 1 для фазы нарастания активации позволил рассчитать значения n для Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ и K^+ , равные 1,16; 0,88; 1,95 и 1,78 соответственно. Очевидно, ионы Na^+ и K^+ являются аллостерическими регуляторами АХЭ. Ранее была известна лишь конкуренция Ca^{2+} (1 мМ) и АХ за аллостерический центр АХЭ электрического органа ската⁽³⁾. Можно согласиться с предположением Шавже⁽²⁾, что аллостерическая регуляция может быть объяснена различием конформационных состояний АХЭ поляризованной и деполаризованной мембраны.

Влияние катионов * на кинетические параметры АХЭ

Эффектор	Концентрация, мМ	K_M	V , мкмол. АТХ на 1 мг белка в 1 мин.	$V_{\text{эффектора}}/V$
—	—	27	397	1,00
Ca^{2+}	2,5	69	405	1,35
Na^+	100	73	467	1,50
K^+	100	90	495	1,60
Mg^{2+}	25	98	500	1,60

* Для катионов приведены кажущиеся значения K_M и V .

На рис. 2 представлены данные по влиянию исследуемых катионов (в концентрациях, максимально активирующих) на активность АХЭ в зависимости от концентрации субстрата — АТХ. Из рис. 2 и табл. 1 видно, что характер действия катионов однотипный, во всех случаях отмечается увеличение K_M и V , что отмечается также и в литературе (2, 4, 5). Однако есть данные, указывающие и на отсутствие изменений K_M при действии катионов на АХЭ (13).

Активирующее действие катионов на АХЭ может объясняться либо взаимодействием ионов с анионным центром, либо с отрицательно заряженными группами поверхности фермента. Учитывая, что K_M в наших опытах увеличивается более резко, чем V , можно предположить влияние катионов не на лимитирующую стадию деацетилирования, а на стадию образования комплекса Михаэлиса (понижение средства фермента к АТХ и увеличе-

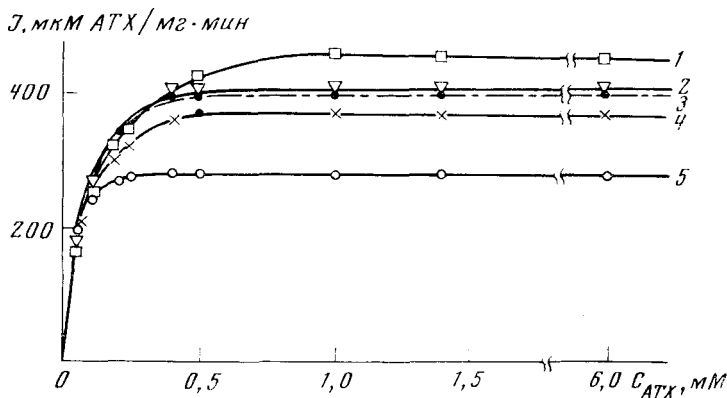


Рис. 2. Зависимость скорости реакции АХЭ от концентрации субстрата в присутствии ионов. 1 — Mg^{2+} (25 мМ), 2 — K^+ (100 мМ), 3 — Na^+ (100 мМ), 4 — Ca^{2+} (2,5 мМ), 5 — в отсутствие солей. Приведены средние данные из 5–7 опытов. Использовали фракцию легких синапсомом

ние каталитической активности). Нами также показано, что комплексом для Ca^{2+} — этиленгликольтетраацетат (ЭГТА) в концентрации 0,1–5,0 мМ и АТФ (3 мМ) слабо активирует (13–18%) АХЭ синаптических мембран (см. табл. 2). При изучении влияния ионной среды различного состава на активность АХЭ отмечено отсутствие конкуренции Na^+ и K^+ и наличие конкурентного взаимодействия Mg^{2+} и Ca^{2+} (5 мМ), выражающееся в снижении активации Mg^{2+} в присутствии ионов Ca^{2+} (см. табл. 2).

Влияние ионной среды различного состава на активность АХЭ фракции синаптических мембран (средние данные из 5—6 опытов)

NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	АТФ	Актив- ная в %	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	АТФ	Актив- ная в %
мМ						мМ					
100	—	—	—	—	40	—	—	5	0,5	—	35
100	20	—	—	—	44	—	—	25	5	—	47
100	20	5	—	—	47	—	—	5	—	—	36
100	20	5	—	3	40	—	100	—	—	—	40
100	20	—	5	—	43	—	25	—	—	—	64
100	20	—	5	3	33	—	—	—	5	—	27
100	20	5	0,5	—	48	—	—	—	0,5	—	20
100	20	5	5	—	35	—	—	—	—	3	15
20	100	5	0,5	—	47	—	—	—	—	—	—

Таким образом, изменения структуры АХЭ при смене состояния покой — возбуждение могут определяться соотношением ионов Ca²⁺ в синапсах и в межклеточной среде.

Институт нормальной и
патологической физиологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
1 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Н. Глебов, Н. М. Дмитриева и др., ДАН, т. 215, № 5 (1974). ² J.-P. Changeaux, J. Mol. Pharmacol., v. 2, 369 (1966). ³ J. Griselet, M. Grajius, P. Wins, Arch. Intern. Physiol. Biochem., v. 78, 259 (1970). ⁴ Л. И. Иванова, Биохимия, т. 32, 975 (1967). ⁵ R. M. Dawson, H. D. Cronk, J. Neurochem., v. 21, 247 (1973). ⁶ J. L. Trotter, R. M. Burton, J. Neurochem., v. 16, 805 (1969). ⁷ В. В. Шевцов, О. М. Поздняков и др., Бюлл. эксп. биол., № 1, 94 (1972). ⁸ G. Ellman et al., Biochem. Pharmacol., v. 7, 88 (1961). ⁹ А. Н. Панюков, Вопр. мед. хим., т. 12, 88 (1966). ¹⁰ Е. В. Петушкова, Введение в кинетику ферментативных реакций, М., 1972, стр. 53. ¹¹ Г. Д. Силонова, Н. В. Ливанова, Б. И. Курганов, Молек. биол., т. 3, 768 (1969). ¹² D. M. Miller, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 40, 716 (1970). ¹³ А. П. Бресткин и др., Биохимия, т. 35, 382, 652 (1970).