УДК 577.153

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ КРЫС ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ ИНГИБИТОРОМ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НА АКТИВНОСТЬ Na^+, K^+-АТРазы ГОЛОВНОГО МОЗГА

КАЗЕННОВ А. М., МАСЛОВА М. Н., САВИНА Г. В., ШАЛАБОДОВ А. Д.

Изучена активность АХЭ и Na^+, K^+-АТРазы в коре больших полушарий мозга крыс в разные сроки после отравления животных фосфорорганическим ингибитором АХЭ Гд-7 (0,5 мкмоль/кг). Активность АХЭ через 2,5 ч после отравления была ингибирована на 85%; в первые двое суток фермент быстро реактивировался: до 50 и 60% от исходного уровня соответственно через 24 и 48 ч. После введения животным Гд-7 в общей митохондриальной и микросомной фракциях коры больших полушарий уже через 2,5 ч было обнаружено повышение активности Na^+, K^+-АТРазы. В митохондриальной фракции активность Na^+, K^+-АТРазы оказалась повышенной в течение последующих двух суток и была наибольшей через 24 ч (132% от нормального уровня). Изменения в активности Na^+, K^+-АТРазы наблюдались только в случае обработки фракций мозга дезоксихолатом натрия.

В настоящее время системе холинорецептор—ацетилхолин—АХЭ приписывают ведущую роль в процессе проведения нервного импульса в холинергических синапсах НС [1—3]. Этот процесс нарушается при отравлении животных фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ) в результате инактивации АХЭ и накопления избыточных количеств медиатора ацетилхолина (АХ) в синапсах [1].

При тяжелом отравлении ФОИ выжившие животные довольно быстро адаптируются, несмотря на почти полное ингибирование АХЭ головного мозга; однако мало известно о компенсаторных биохимических механизмах этой адаптации. Следует отметить, что при действии АХ и других холиномиметиков в высоких концентрациях, а также антихолинэстеразных соединений развивается стойкая деполяризация постсинаптической мембраны вследствие повышения проницаемости мембран для одновалентных катионов и изменяется внутриклеточное соотношение Na^+ и K^+ [1]. Логично предположить, что для восстановления нормального трансмембранного потенциала постсинаптической мембраны должны изменяться процессы активного транспорта одновалентных катионов, за который ответственна Na^+, K^+-АТРаза, играющая ведущую роль в генерации клеточного потенциала [4].

В литературе имеются единичные сообщения об изменении активности Na^+, K^+-АТРазы при отравлении животных ФОИ. Так, в

работе Jovic и соавт. [5] было показано, что отравление животных смертельными дозами зомана и диизопропилфторфосфата сопровождается снижением активности Na^+, K^+-АТРазы головного мозга на 30—40%. При хроническом (на протяжении 12—24 недель) отравлении крыс диизопропилфторфосфатом Glow и соавт. [6] наблюдали активацию Na^+, K^+-АТРазы в микросомах головного мозга.

В этой работе мы попытались проследить характер изменения активности Na^+, K^+-АТРазы в головном мозгу крысы в первые двое суток после отравления животных легкопроникающим в мозг ФОИ Гд-7—[$(CH_3)(C_2H_5O)P(O)CH_2CH_2SC_2H_5$] [7] в дозе, которая вызывает тяжелое, но не смертельное отравление.

Материалы и методы

Работа была выполнена на белых крысах-самцах массой 180—250 г, которым внутримышечно вводили Гд-7, разведенный на физиологическом растворе. Контрольным животным вводили физиологический раствор в таком же объеме. После введения ФОИ крыс забивали декапитацией через 2,5; 24 и 48 ч, и для исследования брали смешанную (артериальную и венозную) кровь и головной мозг. Мозг после декапитации быстро извлекали, на холоду освобождали от оболочек и выделяли кору больших полушарий. Затем ткань гомогенизировали в 9-кратном объеме 0,25 М сахарозы на 0,05 М трис-буфере (pH 7,4) в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Ядра и неразрушенные клетки удаляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 600 g. Надосадочную фракцию разделяли далее на общую митохондриальную и микросомно-цитоплазматическую фракции центрифугированием при 10000 g в течение 20 мин.

В полученных фракциях определяли активность АХЭ по методу Ellman [8] в нашей модификации [9], содержание белка по методу Lowry [10] и активность Mg^{2+}-АТРазы и Na^+, K^+-АТРазы [11]. Для выявления максимальной активности АТРаз использовали методический прием, заключающийся в предварительной обработке фракций мозга детергентом дезоксихолатом натрия (ДОХ) с целью разрушения замкнутых мембранных структур, которые образуются при гомогенизации и могут «экранировать» активные центры мембраносвязанных ферментов [11, 12]. Для этого к 0,2 мл изучаемой фракции добавляли 0,2 мл 0,25% раствора ДОХ, приготовленного на 0,25% М растворе сахарозы в 0,05 М трис-буфере (pH 7,4) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После этого общий объем пробы доводили до 2,0 мл раствором сахарозы, и 0,1 мл получившейся смеси вводили в инкубационную среду для определения активности АТРаз (общий объем 0,4 мл). Инкубация продолжалась 30 мин при 30°.

Результаты и обсуждение

В предварительной серии опытов была подобрана максимально переносимая крысами доза Гд-7. Она составила 0,5 мкмоль/кг массы животных. Первые признаки интоксикации развивались через 25—30 мин и проявлялись в беспокойстве животных и выраженном бронхоспазме. Еще через несколько минут развивались фибрилляция мышц и парез конечностей. Через 2—2,5 ч признаки интоксикации начинали ослабевать, а еще через 1 ч крысы начинали активно двигаться и на следующий день практически не отличались от контрольных.

Таблица 1

Активность АХЭ (мкмоль/мг белка/ч) головного мозга и ХЭ (мкмоль/мл/ч) крови в разные сроки после отравления крыс Гд-7

Ткань	Контроль	Срок после введения Гд—7		
		2,5 ч n=7	24 ч n=7	48 ч n=6
Общая митохондриальная фракция коры больших полушарий	3,08±0,18	0,52±0,05 (17%)*	1,70±0,07 (55%)	2,00±0,12 (65%)
Микросомно-цитоплазматическая фракция коры больших полушарий	2,27±0,17	0,25±0,02 (11%)	1,14±0,06 (50%)	1,30±0,09 (57%)
Кровь	52,5±1,4	3,0±1,1 (5,5%)	13,5±2,3 (26%)	31,0±0,9 (59%)

* в скобках указана относительная активность АХЭ и ХЭ в % к контролю

При изучении активности АХЭ в головном мозгу и холинэстеразы (ХЭ) крови у отравленных крыс были получены следующие результаты (табл. 1). Гд-7 в дозе 0,5 мкмоль/кг вызывал через 2,5 ч угнетение активности ХЭ крови на 95%, а активности АХЭ мозга приблизительно на 85%. В первые два дня после введения животным ФОИ наблюдалось довольно быстрое восстановление активности АХЭ в головном мозгу и ХЭ в крови, причем в мозгу реактивация АХЭ за первые сутки составила около 45%, за вторые—около 10%, а в крови соответственно 20 и 35%. Такое быстрое восстановление активности фосфорилированной АХЭ наблюдали и другие исследователи [13, 14], применявшие сходные по химическому строению ФОИ. Считают, что это происходит в основном за счет спонтанной реактивации фермента.

У контрольных и отравленных Гд-7 животных в общей митохондриальной и микросомно-цитоплазматической фракциях была определена активность Mg^{2+}-АТРазы и Na^+, K^+-АТРазы до и после инкубации их с ДОХ. В необработанных ДОХ митохондриальной и микросомной фракциях коры больших полушарий контрольных животных активность Na^+, K^+-АТРазы составила соответственно 1,44 и 0,77

мкмоль/мг белка/ч и была приблизительно в 2 раза меньше, чем активность Mg^{2+}-АТРазы. После инкубации обеих фракций с ДОХ происходило повышение активности Na^+, K^+-АТРазы, причем это повышение оказалось более выраженным в митохондриальной фракции (в 5,6 раза), чем в микросомной (в 2 раза). Активность Mg^{2+}-АТРазы под действием ДОХ изменялась в меньшей степени: в митохондриальной фракции она повышалась на 60%, а в микросомной снижалась в 2 раза (табл. 2).

Таблица 2

Влияние отравления крыс Гд-7 на активность АТРаз (мкмоль/мг белка/ч) в общей митохондриальной и микросомно-цитоплазматической фракциях коры больших полушарий головного мозга

Фракция	Ферментативная активность	Детергент	Контроль n=10	Срок после введения Гд-7		
				2,5 ч n=7	24 ч n=7	48 ч n=6
Общая митохондриальная	Σ АТРаза	—	4,70±0,17	4,80±0,25	5,37±0,26	5,10±0,13
		ДОХ	13,28±0,42	14,83±0,74	15,90±0,57	14,62±0,33
	Mg^{2+}-АТРаза	—	3,24±0,14	3,43±0,24	3,75±0,16	3,49±0,14
		ДОХ	5,19±0,32	4,82±0,32	5,21±0,36	5,05±0,20
	Na^+, K^+-АТРаза	—	1,44±0,07	1,45±0,13	1,60±0,11	1,61±0,06
		ДОХ	8,09±0,32	10,05±0,52**	10,69±0,30***	9,56±0,45*
Микросомно-цитоплазматическая	Σ АТРаза	—	1,92±0,06	2,12±0,06	1,93±0,07	1,73±0,10
		ДОХ	2,12±0,11	2,60±0,16	2,49±0,20	1,95±0,07
	Mg^{2+}-АТРаза	—	1,15±0,05	1,43±0,15	1,19±0,06	1,07±0,09
		ДОХ	0,62±0,05	0,67±0,04	0,66±0,04	0,67±0,05
	Na^+, K^+-АТРаза	—	0,77±0,05	0,79±0,04	0,74±0,04	0,65±0,02
		ДОХ	1,50±0,14	1,92±0,15*	1,83±0,22	1,27±0,05

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

В табл. 2 представлены также данные активности Mg^{2+}-АТРазы и Na^+, K^+-АТРазы во фракциях коры больших полушарий мозга крыс в разные сроки после отравления животных Гд-7. Следует отметить, что изменений активности Na^+, K^+-АТРазы в необработанных ДОХ фракциях мозга через 2,5; 24 и 48 ч после введения ФОИ по сравнению с контрольными животными не было обнаружено. Однако в случае применения ДОХ имело место повышение активности Na^+, K^+-АТРазы в микросомной фракции уже через 2,5 ч после введения животным Гд-7 (на 28%), которое сохранялось через 24 ч, однако через 48 ч активность фермента снижалась до уровня ниже исходного. Заметный прирост активности Na^+, K^+-АТРазы, выявляемой с помощью ДОХ, наблюдался в общей митохондриальной фракции коры больших полушарий уже через 2,5 ч (на 23%) и особенно через сутки (на 32%); активность фермента оставалась повышенной и через 48 ч (на 18%). Активность Mg^{2+}-АТРазы в обеих фракциях коры больших полушарий не изменялась как в случае определения ее в исходных

фракциях, так и во фракциях, обработанных ДОХ. Приведенные данные свидетельствуют о том, что при отравлении ФОИ АХЭ Гд-7 в митохондриальной и микросомной фракциях коры больших полушарий крыс имеет место повышение активности Na^+, K^+-АТРазы.

Как известно, в общей митохондриальной фракции 80% активности Na^+, K^+-АТРазы сосредоточено в синаптосомах, а остальная часть—в крупных фрагментах плазматической мембраны [15, 16]. В микросомной фракции большая часть фермента сосредоточена в мелких фрагментах плазматической мембраны [17]. Таким образом, можно сделать вывод, что обнаруженная активация Na^+, K^+-АТРазы под действием ДОХ в митохондриальной фракции происходит за счет разрушения (или повышения проницаемости мембран) синаптосом и крупных везикул плазматической мембраны, а в микросомной фракции—за счет дезинтеграции мелких везикул плазматической мембраны.

Обнаруженные изменения активности Na^+, K^+-АТРазы не были обусловлены гипоксией, которая имеет место при отравлении ФОИ, так как в специальной серии опытов, в которой животных подвергали воздействию гипоксической гипоксии (экспозиция в течение 2 ч в барокамере при разрежении воздуха, соответствующем 8000 м над уровнем моря), не было обнаружено изменения активности этого фермента, а также активности АХЭ.

Можно сделать вывод, что выявленные изменения активности Na^+, K^+-АТРазы в больших полушариях мозга при отравлении животных Гд-7 являются следствием действия самого ФОИ.

Работами Елаева и соавт. [18—20] показано, что как *in vivo*, так и в модельной системе *in vitro* АХ и другие холиномиметические вещества способны в короткие сроки (в течение 1,5 ч) активировать Na^+, K^+-АТРазу, а также синтез РНК и белка в нервных клетках. В исследовании Clouet, Waelsch [21] продемонстрировано, что угнетение АХЭ мозга крыс ФОИ на 90% вызывает ускорение включения ^{14}C-лизина в белки мозга в первые двое суток после введения ФОИ животным.

Основываясь на этих работах, можно предположить, что повышение активности Na^+, K^+-АТРазы, выявленное при отравлении крыс Гд-7, обусловлено индукцией синтеза ферментативного белка в нервных клетках, причем это свойственно лишь той части фермента, которая выявляется после обработки субклеточных фракций ДОХ и, следовательно, сосредоточена в непроницаемых для АТР везикулярных структурах плазматической мембраны.

Быстрое, уже через 2,5 ч, повышение активности Na^+, K^+-АТРазы в митохондриальной фракции, где ферментативная активность локализована преимущественно в митохондриях синаптосом, также можно объяснить индукцией синтеза фермента, если учесть, что синаптосо-

мы, выделенные из коры больших полушарий крыс, содержат РНК и обладают собственной белоксинтезирующей системой, которая локализована в синаптосомных митохондриях и мембранных компонентах [22]. Высказанное предположение требует дальнейших экспериментальных подтверждений.

Использование детергентов при определении активности Na^+, K^+-АТРазы выявляет значительно большую, чем в интактном гомогенате, ферментативную активность и исключает ее зависимость от проницаемости мембран, что особенно важно при изучении влияния различных экспериментальных воздействий на ферментативную активность.

EFFECT OF ORGANOPHOSPHOROUS INHIBITOR OF ACETYLCHOLINESTERASE (AChE) ON THE ACTIVITY OF BRAIN Na^+, K^+-ATPase

KAZENNOV A. M., MASLOVA M. N., SAVINA G. V., SCHALABODOV A. D.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The effects of organophosphorous compound Gd-7 (0.5 mcmoles/kg, i. m) on the activities of AChE and Na^+, K^+-ATPase in rat cerebral cortex have been studied in vivo. This dose of Gd-7 induced a heavy but not lethal intoxication. The activity of AChE was inhibited by 85% in 2,5 h after injection and restored to 50% and 60% of the normal level in 24 and 48 h, respectively. The injection of Gd-7 caused a significant increase in the activity of Na^+, K^+-ATPase from crude mitochondrial and microsomal fractions; the most pronounced one in the crude mitochondrial fraction—132% of the normal level (80% of the enzymic activity was detected in synaptosomes). These changes in the activity of Na^+, K^+-ATPase were observed only after treatment of the particulate fractions with sodium desoxycholate disrupting the vesicular membrane structures.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Koelle G. B.* (ed.) Cholinesterases and anticholinesterase agents, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, p. 187—298, 570—678, 1963.
2. *Silver A.* The biology of cholinesterases, North-Holland/American Elsevier, Amsterdam-Oxford, 1974.
3. *Келле Дж. Б.*—В кн.: Международный симпозиум. Сравнительная фармакология синаптических рецепторов, Л., Наука, с. 6—15, 1977.
4. *Skou J. C.* Physiol. Rev., 45, 596—617, 1965.
5. *Jovic P., Bachelard H. S., Clark A. G., Nicholas P. C.* Biochem. Pharmacol., 20, 3, 519—527, 1971.
6. *Glow P. H., Opit L. J., Charnock J. S.* Arch. Intern. Pharmacodyn., 198, 22—28, 1972.
7. *Кабачник М. И.* О механизме физиологического действия фосфорорганических соединений, М., Наука, 1965.
8. *Ellman G. L., Courtney K. D., Andress V., Featherstone R. M.* Biochem. Pharmacol., 7, 2, 88—95, 1961.

9. *Маслова М. Н., Резник Л. В.* Укр. биохим. ж., 48, 4, 450—453, 1976.
10. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
11. *Казеннов А. М., Маслова М. Н.* Ж. эвол. бнох. и физиол., 16, 5, 430—435, 1980.
12. *Казеннов А. М., Маслова М. Н., Резник Л. В.* Биохимия, 44, 2, 214—220, 1979.
13. *Рейнер Э.* Бюл. ВОЗ, 44, 1, 113—115, 1972.
14. *Austin L., James K. A. C.* J. Neurochem., 17, 5, 705—707, 1970.
15. *Gilbert J. C., Wyllie M. G.* Brit. J. Pharmacol., 56, 1, 49—57, 1976.
16. *Палладин А. В., Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л.* Биохимия, 35, 2, 404—411, 1970.
17. *Медди Э.* Биохимические исследования мембран, М., Мир, с. 30—51, 1979.
18. *Елаев Н. Р., Семенов Е. В.* Биохимия, 39, 3, 636—640, 1974.
19. *Елаев Н. Р.* Цитология, 20, 8, 970—972, 1978.
20. *Елаев Н. Р.* Биохимия, 45, 10, 1749—1754, 1980.
21. *Clouet D. H., Waelsch H.* J. Neurochem., 10, 1, 51—63, 1963.
22. *Morgan I. G., Austin L.* J. Neurochem., 15, 1, 41—51, 1968.

Институт эволюционной физиологии и
биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград

Поступила 2. III 1982