

УДК 612.822.1:615.214.2

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 И ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ НА М-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ СИНАПСОМ МОЗГА КРЫСЫ

Московский Г.Н., Кичикулова Т.П., Манухин Б.Н.

*Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова
АН СССР, Москва*

Показано, что целый яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxidana* и его мембраноактивный компонент фосфолипаза A_2 вызывают в синапсомозге крысы изменение основных параметров кинетики связывания специфического блокатора М-холинорецепторов [3H]хиноклидинилбензилата. Плотность мест связывания [3H]хиноклидинилбензилата снижается при действии целого яда в концентрациях 1, 10, 100 мкг/мл на 43, 63 и 79%. Фосфолипаза A_2 в тех же концентрациях снижает плотность мест связывания лиганда на 48, 49 и 65%. Величина K_d при действии исследованных веществ также снижается. Обсуждается значение функционального состояния клеточных мембран для специфической активности М-холинорецепторов.

* * *

На изолированном отрезке тонкой кишки крысы было показано, что яд среднеазиатской кобры и выделенная из него фосфолипаза A_2 вызывают характерные достоверные изменения в основных параметрах М-холинэргической реакции [1]. Однако изолированная тонкая кишка крысы представляет сложную гетерогенную тканевую систему, изменение реакции которой на АХ может быть совокупным результатом воздействия яда и фосфолипазы A_2 на специфические рецепторы мышечных элементов, клеточную мембрану, нервные сплетения и др. Поэтому для уточнения локализации действия яда кобры и его компонента на М-холинэргическую реакцию необходимо было использовать простую экспериментальную модель, которая структурно является более однородной системой. Одной из наиболее адекватных моделей для изучения элементарных нейрохимических процессов являются синапсомы. Они сохраняют ряд основных свойств нервных окончаний и постсинаптических мембран, в частности, способность их рецепторов соединяться со специфическими лигандами, что изменяет трансмембранный транспорт ионов и нейротрансмиттеров.

Задачей представленной работы было изучение влияния яда среднеазиатской кобры и его активного компонента фосфолипазы A_2 на первый этап холинэргического процесса — связывание синапсомозга крысы специфического М-холинблокатора [3H]хиноклидинилбензилата.

Синаптосомы из коры мозга крыс линии *Wistar* выделяли по методу Hajos [2]. Суспензию синаптических мембран инкубировали при 37° в течение 15 мин в присутствии яда кобры или фосфолипазы A₂ в концентрациях 1, 10, 100 мкг/мл. После охлаждения в ледяной бане и добавления 15-кратного объема холодного раствора Тироде, суспензию синаптосом центрифугировали дважды при 14000 об/мин в течение 20 мин. Полученные осадки суспендировали в 0,05 М фосфатном буфере и использовали для радиолигандного анализа.

При радиолигандном анализе общий объем инкубационной среды составлял 500 мкл, объем суспензии синаптосом — 50 мкл, концентрация [³H]хинуклидинилбензилата 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0 нМ. Для определения неспецифического связывания использовали атропин в концентрациях 10⁻⁵ — 10⁻⁶ М. Инкубацию проводили при температуре 25° в течение 60 мин. Связывание останавливали быстрым охлаждением в ледяной бане. Разделение связанного с синаптосомами и несвязанного радиолиганда проводили центрифугированием при 14000 об/мин или фильтрацией в условиях вакуума через фильтры GF/B («Whatman», Англия) с последующей промывкой 6—8-кратными объемами фосфатного буфера. Осадки после центрифугирования промывали 2-кратным объемом фосфатного буфера и инкубировали сутки в 0,5 мл 1%-ного раствора Тритона X-100. Растворившиеся осадки или фильтры после фильтрации переносили во флаконы с сцинтилляционной жидкостью ЖС-8. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике SL-4000 (Франция).

Активность АХЭ определяли модифицированным методом Элмана [3], содержание белка — по Lowry. Экстинкцию измеряли на спектрофотометре Spekol-21 (ГДР) при длине волны 420 нм для АХЭ и 750 нм для белка. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Реактивы для радиолигандного анализа — [³H]хинуклидинилбензилат («Amersham», Англия), У.А. 12,3 Ки/ммоль, атропин («Reanal», Венгрия), лиофилизированный яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и фосфолипаза A₂ (Институт биохимии АН Узбекской ССР).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены результаты одного из типичных опытов действия яда и фосфолипазы A₂ в концентрациях 1 мкг/мл на специфическое и неспецифическое связывание синаптосомами радиолиганда. Видно, что специфическое связывание лиганда — типичный насыщаемый процесс. Неспецифическое связывание лиганда на фоне атропина линейно зависит от концентрации лиганда. Яд кобры и фосфолипаза A₂ не изменяют общий характер связывания лиганда, но уменьшают его величину. Значительно меньше, недостоверно эти вещества изменяют неспецифическое связывание. Фосфолипаза A₂ в данном случае сильнее ингибирует связывание лиганда, чем цельный яд. Графический анализ результатов этого опыта

в координатах Хофсти-Скэтчарда (рис.2) показывает, что под влиянием яда и фосфолипазы происходит уменьшение концентрации мест связывания лиганда. Величина K_d в этих условиях также снижается. Из графика, приведенного на рис. 2, следует, что рецепторы, связывающие [3 H]хиноклидинилбензилат, являются одним пулом.

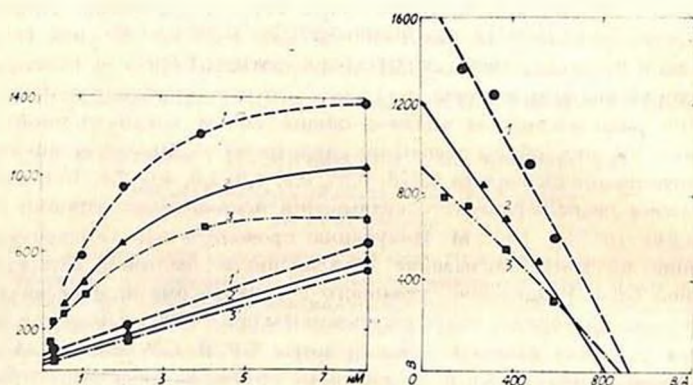


Рис.1. Действие яда среднеазиатской кобры и фосфолипазы A_2 в концентрации 1 мкг/мл на специфическое и неспецифическое связывание синаптическими мембранами коры головного мозга крысы [3 H]хиноклидинилбензилата. По оси абсцисс — концентрация [3 H]хиноклидинилбензилата в инкубационной среде, по оси ординат — концентрация связанного мембранами [3 H]хиноклидинилбензилата. 1,1' — контроль, специфическое и неспецифическое связывание лиганда; 2,2' — действие яда кобры, специфическое и неспецифическое связывание лиганда; 3,3' — действие фосфолипазы A_2 , специфическое и неспецифическое связывание лиганда

Рис.2. Действие яда среднеазиатской кобры и фосфолипазы A_2 в концентрации 1 мкг/мл на связывание [3 H]хиноклидинилбензилата синаптическими мембранами коры мозга крысы. По оси абсцисс — отношение концентраций связанного и свободного [3 H]хиноклидинилбензилата (фмоль/мг белка/нМ), по оси ординат — концентрация связанного лиганда (фмоль/мг белка). 1 — контроль, 2 — связывание после действия яда, 3 — связывание после действия фосфолипазы A_2

В таблице приведены результаты опытов по действию яда кобры и фосфолипазы A_2 на связывание лиганда. Видно, что оба исследованных вещества во всех трех испытанных концентрациях изменяют как плотность мест связывания лиганда (B), так и величину K_d комплекса лиганд — рецептор. При этом цельный яд и фосфолипаза A_2 вызывают близкие по величине изменения параметров, характеризующих связывание лиганда. Различия в активности фосфолипазы A_2 и цельного яда во всех вариантах опыта статистически недостоверны. Величина ингибиторного действия этих активных веществ возрастает по мере увеличения их концентрации. Так, при нарастании концентрации яда с 1 мкг/мл до 10 и 100 мкг/мл плотность мест связывания снижается на 43, 63 и 79% соответственно (таблица). Действие фосфолипазы A_2 в таких же концентрациях приводит к уменьшению мест связывания лиганда на 48, 49 и 65%. Одновременно происходит

снижение величины K_d при действии яда и фосфолипазы A_2 во всех исследованных концентрациях. Однако вследствие большого разброса данных это снижение не во всех вариантах опытов достоверно.

Таблица

Влияние яда среднеазиатской кобры и фосфолипазы A_2 (ФЛ- A_2) на связывание [3H] хинуклидинилбензилата синаптическими мембранами коры мозга крысы ($p < 0,01$)

Вещество	Концентрация (мкг/мл)	K_d , нМ	Связывание (В), фмоль/мг белка	$E = B/2K_d$
контроль	—	$1,91 \pm 0,29$	1730 ± 20	453
яд	—	$1,22 \pm 0,24$	995 ± 80^a	407
ФЛ- A_2	1	$1,03 \pm 0,12^a$	897 ± 43^a	435
контроль	—	$1,25 \pm 0,30$	402 ± 18	161
яд	—	$1,21 \pm 0,17$	147 ± 12^a	60
ФЛ- A_2	10	$1,06 \pm 0,17$	207 ± 22^a	66
контроль	—	$2,49 \pm 0,19$	568 ± 32	114
яд	—	$1,56 \pm 0,46$	118 ± 13^a	38
ФЛ- A_2	100	$2,08 \pm 0,08$	200 ± 47^a	48

Общую количественную оценку процесса связывания лиганда характеризует величина эффективности ($E = B/2K_d$) [4]. В данном случае эта величина показывает количество связанного лиганда (фмоль/мг белка) на нМ лиганда при его концентрации в среде, равной K_d . Данные, приведенные в таблице, показывают, что, несмотря на значительную разницу в степени снижения плотности мест связывания лиганда при действии яда и фосфолипазы A_2 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл, эффективность связывания лиганда изменяется одинаково. Целый яд снижает величину E на 67 и 70%, а фосфолипаза A_2 на 58 и 59% (таблица). В концентрации 1 мкг/мл целый яд и фосфорилаза A_2 уменьшают количество мест связывания на 43 и 48%, снижается также K_d . Однонаправленное изменение двух основных параметров приводит к тому, что эффективность связывания (E) лиганда практически сохраняется на уровне контроля (снижение на 10 и 4%). Эти результаты хорошо коррелируют с данными о действии яда кобры и фосфолипазы A_2 из этого яда на физиологическую М-холинергическую реакцию [1]. Эффект этих веществ на физиологическую реакцию проявляется в однонаправленном изменении основных параметров реакции (K_d и V), что, как и в представленных опытах, но значительно сильнее, ослабляло ингибирующее действие яда и его компонента фосфолипазы A_2 .

Из приведенных данных видно, что целый яд и фосфолипаза A_2 вызывают сходные изменения способности синапсом связывать [3H] хинуклидинилбензилат при несколько более сильном действии яда в концентрации 10 и 100 мкг/мл. При концентрации 1 мкг/мл их эффекты сравниваются. Известно, что в яде среднеазиатской кобры основными компонентами являются фосфолипазы, цитотоксины, нейротоксины. Показано, что цитотоксины усиливают действие фосфолипаз на липиды мембран [5]. Для потенцирования действия фосфолипаз, по-видимому, нужна определенная концентрация цитотоксина, которая достигается при действии яда в концентрации 10 и 1000 мкг/мл. При концентрации яда кобры 1 мкг/мл цитотоксина, вероятно, недостаточно для усиления эффекта

фосфолипазы, чем можно объяснить более слабый эффект яда, чем фосфолипазы A_2 .

В ряде работ показано, что снижение активности АХЭ под влиянием фосфорорганических соединений (диизопропилфосфат) сопровождается снижением числа холинорецепторов в гиппокампе и стриатуме [6, 7]. Эти результаты позволили авторам предположить возможность десенситизации мускариновых холинорецепторов в условиях избыточной холинергической стимуляции. Наши опыты *in vitro* не подтвердили наличия взаимосвязи между активностью холинэстеразы и плотностью рецепторов при действии яда и фосфолипазы A_2 на синапсомы мозга. Эти результаты совпадают с данными Кээмбре и соавт. [8], которые не обнаружили снижения активности холинэстеразы при обработке мембранных препаратов мозга крысы не только фосфолипазой A_2 , но и трипсином. Полученные экспериментальные результаты хорошо согласуются с данными Кээмбре и соавт. о действии не змеиной фосфолипазы A_2 на М-холинорецепторы микросомной фракции коры мозга крысы. Авторы показали, что при действии фосфолипазы A_2 происходит быстрое уменьшение, вплоть до исчезновения, связывания [3H]хиноклидинилбензилата. В наших опытах использовали яд и фосфолипазу A_2 в концентрациях, снижающих, но не полностью блокирующих связывание лиганда. Это позволяет проанализировать кинетику ингибиторного действия исследуемых веществ. Анализ кинетики ингибирования связывания лиганда показывает, что оба вещества действуют по типу бесконкурентного ингибирования [9]. Величина ингибиторных констант зависит от концентрации яда и фосфолипазы A_2 . Это указывает на то, что активные вещества не оказывают прямого действия на места связывания М-холиноблокатора. Более вероятно, что наблюдаемые изменения в параметрах связывания [3H]хиноклидинилбензилата вызваны действием фосфолипазы A_2 на плазматическую мембрану. Показано, что фосфолипаза A_2 снижает микровязкость мембран синапсомом мозга крысы и вызывает деполяризацию мембран [10].

Результаты проведенных экспериментов и анализ литературных данных показывает, что специфическая активность М-холинорецепторов в значительной степени определяется функциональным состоянием плазматических мембран, в которых они расположены. Изменения в мембране, в частности, вызванные действием фосфолипазы A_2 , приводят к адекватным сдвигам в специфической активности М-холинорецепторов и, как следствие этого, нарушениям холинергического медиаторного процесса.

EFFECT OF PHOSPHOLIPASE A_2 AND CENTRAL ASIA COBRA VENOM ON M-CHOLINORECEPTORS OF RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

Moskovkin G. N., Kichikulova T. P., Manukhin B. N.

Koltsov Institute of Developmental Biology,
USSR Academy of Sciences, Moscow

The crude venom of Central Asia cobra *Naja naja oxiana* and phospholipase A_2 , its membrane-active component, affect synaptosomes of

rat brain through changes in major parameters of binding kinetics of ^3H -quinuclidinylbenzylate — a specific blocker of M-cholinoreceptors. Crude venom at concentrations 1, 10 and 100 $\mu\text{g/kg}$ decreased the density of binding sites by 43, 63 and 79% respectively. Similar concentrations of phospholipase A_2 reduced the density of ligand binding sites by 48, 49 and 65%. Both substances also decreased K_d value. The significance of functional state of cellular membranes is discussed with reference to the specific activity of M-cholinoreceptors.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кичикулова Т. П., Бердыева А. Т., Манухин Б. Н. Физиол. журн. СССР, т. 74, с. 791—797, 1988.
2. Hajos F. Brain Res., v. 93, p.485—489, 1975.
3. Gorn V., Proinov Y., Baltescu V. Anal. Biochem., v. 86, p.324—326, 1978.
4. Манухин Б. Н. Физиология адренорецепторов, М., Наука, 1968.
5. Красильников О. В., Юкельсон Л. Я., Таимухаммедов Б. А. Научные доклады высшей школы. Биол.науки, N 3, с. 24—27, 1985.
6. Sivam S. P., Norris J., Hoskins B., Ho J.K. J.Neurochem., v. 40, p. 1414—1422, 1983.
7. Yamada S., Hogaï M., Okudaira H., Hayashi E. Brain Res., v. 268, p. 315—320, 1983.
8. Кээмбре Т. Л., Лангел Ю. Л., Ринкен А. А. Нейрохимия, т.3, с. 107—115, 1984.
9. Диксон М., Узбб Э. Ферменты, М., Мир, 1982.
10. Брусованик В.И., Ерин А.Н., Селищева А.А., Горбунов Н.В., Тюрин В.А., Прилипко Л.Л., Каган В.Е. Нейрохимия, т.5, с.3—11, 1986.

Поступила 13.03.1989