

УДК 577.352.5:612.822

БИОХИМИЯ

А. М. Геворкян, С. Н. Айрапетян

**О механизме действия ацетилхолина на внутриклеточный ионный состав гигантского нейрона улитки**

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 11/III 1979)

В настоящее время биохимическими исследованиями показано, что ацетилхолин (АХ) имеет тормозящее действие на  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазную активность мембраны (1,2). Было установлено, что указанный эффект АХ проявляется лишь в мембранах возбудимых образований и не действует на активность этого фермента, полученного из печени, эритроцитов и глии (1,2). Интересно отметить, что инактивирующее действие АХ на АТФазу зависит от соотношения ионов  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , и даже, в определенных условиях, малые концентрации АХ могут служить активатором этого фермента (4).

Если существующие в литературе биохимические данные относительно действия АХ на  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазную активность мембраны однозначно говорят о его инактивационном действии, то данные физиологических экспериментов относительно указанного вопроса весьма разноречивы и трудны для интерпретации (5-7). Сложность интерпретации данных физиологических экспериментов можно объяснить тем, что во время действия АХ вместе с изменением ферментативных свойств мембраны также происходит катастрофическое изменение ее пассивной проницаемости, в частности, для ионов натрия.

В настоящей работе, с целью выяснения характера действия АХ на активный транспорт ионов, мы исследовали изменение внутриклеточного ионного состава нейронов улитки в первые минуты его действия. Для упрощения модели в данной работе исследования были проведены в условиях отсутствия внеклеточного натрия. Для чего ганглии, предварительно инкубированные в течение одного часа в бескальциевом холодном рингеровском растворе, переносили в бескальциевый-безнатриевый холодный изотонический раствор, где они полностью теряли внеклеточный натрий. Затем эти ганглии реникубировались в соответствующих тестирующих кальциевых растворах в условиях комнатной температуры.

Концентрации ионов натрия и калия в нейронах определялись на пламенном фотометре, после выдерживания изолированных ганглиев в соответствующих средах. Внутриклеточное содержание ионов рассчитывали согласно формуле

$$C_{\text{внутр.}} = \frac{C_{\text{гангл.}} - C_{\text{внечк.л.}}}{A_{\text{гангл.}} - A_{\text{внечк.л.}}}, \quad (1)$$

где  $C$  и  $A$  — концентрации ионов и количества воды, соответственно.

Внеклеточный объем воды определяли следующим образом: после инкубации в соответствующих средах в некоторых ганглиях сразу определяли общее содержание натрия, а в остальных — после 15-минутной инкубации их в безнатриево- и бескальциевом холодном рингеровском растворе. Разницу между общим содержанием натрия в ганглиях, неинкубированных и инкубированных в безнатриево- и бескальциевом растворе, принимали за внеклеточное содержание натрия и, зная концентрацию натрия в исходном растворе Рингера, рассчитывали внеклеточный объем воды.

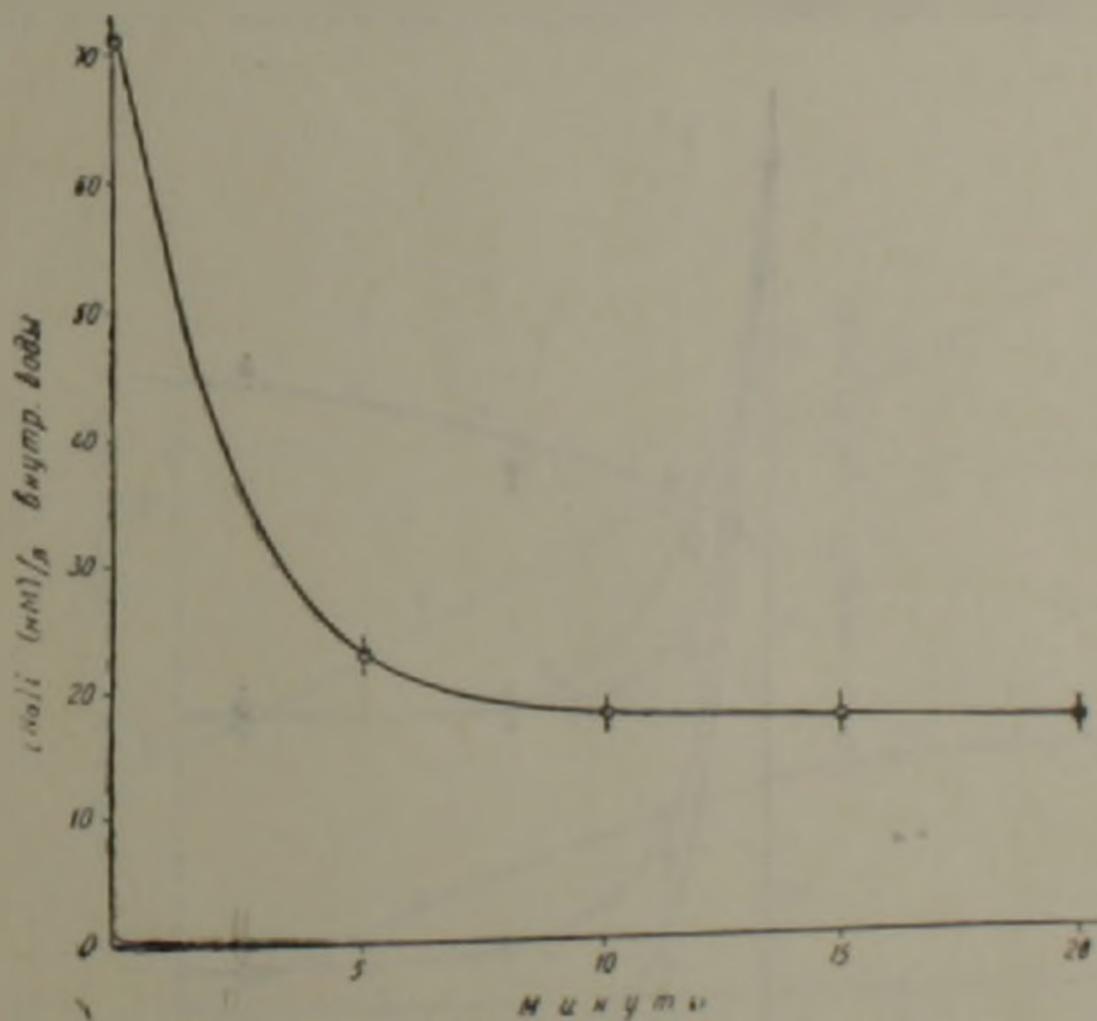


Рис. 1. Изменение общего содержания ионов натрия в ганглиях в различные периоды их инкубации в условиях безнатриевого и бескальциевого холодного рингеровского раствора

На рис. 1 показано содержание ионов натрия в ганглиях в различные периоды инкубации в безнатриево- и бескальциевом растворе. Как видно, после 10—15 минут инкубации количество натрия в ганглиях было постоянным. Исходя из этих данных, мы предполагали, что весь внеклеточный натрий вышел в перфузат и оставшийся натрий можно отнести к внут-

риклеточному содержанию. Таким образом, вышеприведенная формула принимает следующий вид:

$$C_{\text{внутрир.}} = \frac{C_{\text{станд.}}}{A_{\text{станд.}} - A_{\text{клет.}}} \quad (2)$$

Рассчитывая внутриклеточное содержание натрия по этой формуле, мы получили величину, очень близкую к той, которую получил Томас с помощью нонселективных микроэлектродов (8).

Известно, что обогащенные натрием и обедненные калием нейроны в нормальном рингеровском растворе при комнатной температуре в результате функционирования натрий-калиевого насоса интенсивно теряют внутриклеточный натрий и аккумулируют калий (9). С целью выяснения действия АХ на активный выход ионов натрия из клетки был исследован процесс восстановления ионного состава нейронов в условиях присутствия и отсутствия АХ в инкубационной среде. Как отмечалось выше, чтобы исключить действие усиленного входящего тока ионов натрия под воздействием АХ на внутриклеточный состав ионов натрия, исследования действия АХ на процесс восстановления ионного состава нейронов были проведены в условиях отсутствия ионов

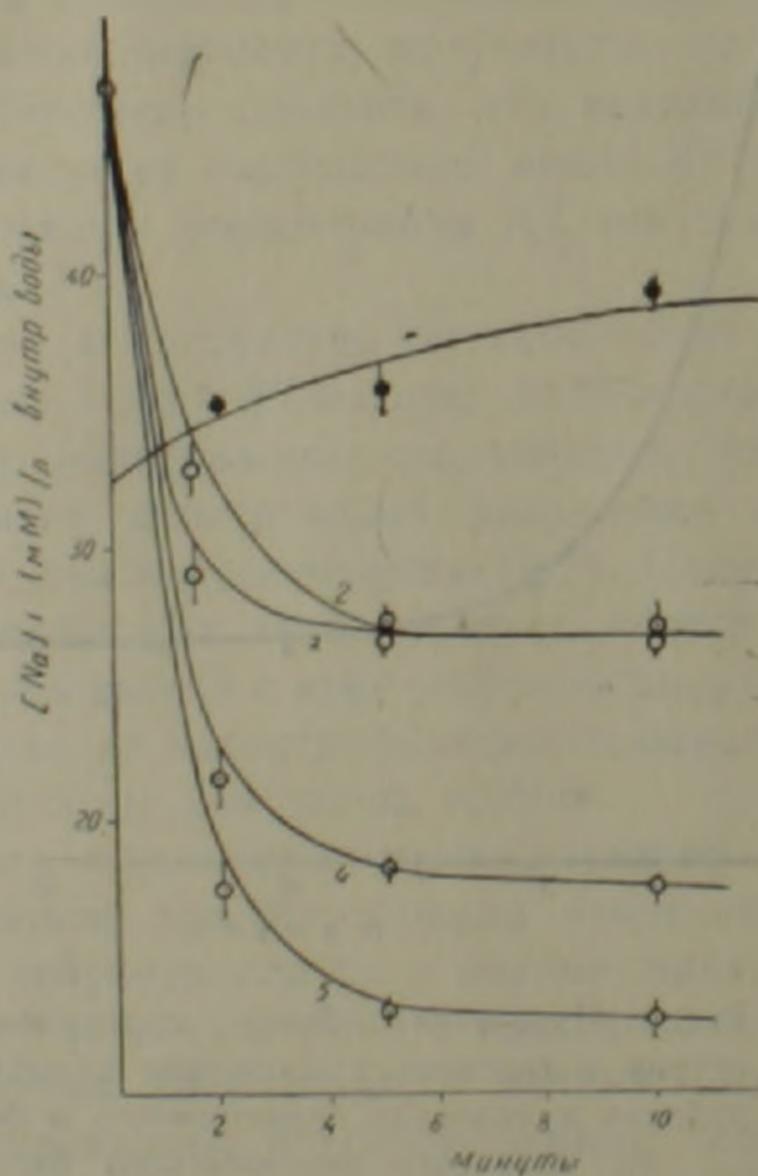


Рис. 2. Действие АХ на внутриклеточный ионный состав: 1, 2—внутриклеточные содержания ионов калия (темные кружки) и натрия (светлые кружки) в норме, 3—5—внутриклеточные содержания ионов натрия (светлые кружки) под действием 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> М АХ, соответственно

натрия в инкубационной среде, где через 10—15 мин ганглии полностью теряли внеклеточный натрий. На рис. 2 показаны кривые потери внутриклеточного натрия в условиях отсутствия и присутствия АХ и кривая реаккумуляции ионов калия в норме, после 15 минутной инкубации нейронов, обогащенных натрием, в безнатриевой среде. Из представленных данных видно, что добавление в среду АХ в первые две минуты вызвало существенное усиление выхода ионов натрия из клеток. Указанное воздействие АХ на выход ионов натрия из клеток оказалось сильно зависимым от его концентрации в инкубационной среде (рис. 3). Как видно из этого рисунка, по мере увеличения концентрации АХ в среде увеличивалась потеря внутриклеточного содержания натрия. Однако в отличие от восстановительного процесса в нормальных растворах (при отсутствии АХ), где потеря внутриклеточного натрия сопровождается аккумуляцией калия в клетке (см. рис. 2), в присутствии АХ выход ионов натрия сопровождался потерей также внутриклеточного содержания калия (рис. 3).

Таким образом, в настоящих исследованиях мы имеем два экспериментальных факта, на первый взгляд, противоречащих существующим литературным данным: 1) АХ активирует работу натриевого насоса и 2) выход натрия сопровождается выходом ионов калия из клетки.

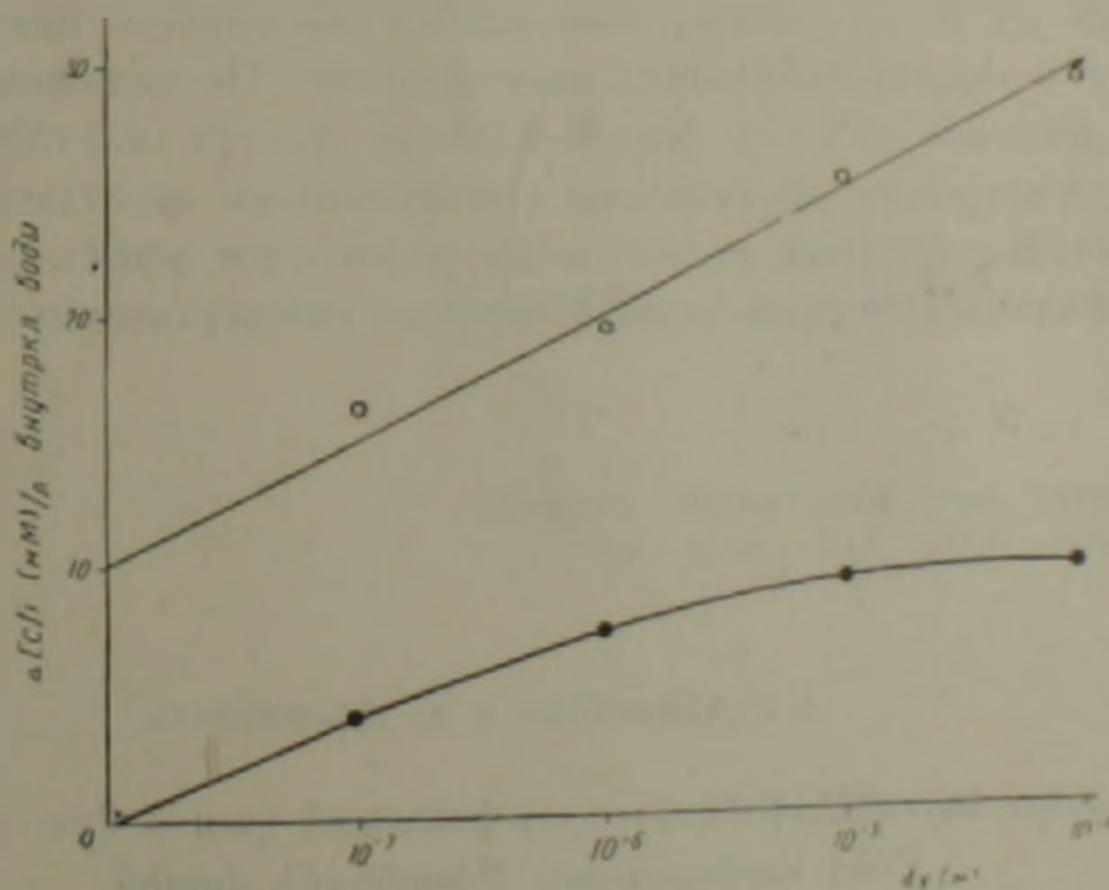


Рис. 3. Доза зависимости действия АХ на внутриклеточные содержания ионов натрия (светлые кружки) и калия (темные кружки)

Как отмечалось выше, биохимиками было убедительно показано, что транспортная АТФаза микросомальной и синапсомальной фракций возбудимых клеток инактивируется под действием АХ (12). В наших ранних работах электрофизиологические данные о том, что посттетаническая гиперполяризация у нейронов, «не чувствительных» к дей-

ствию АХ, подавлялась под действием АХ, без существенного изменения проводимости мембраны, мы также объясняли инактивацией электрогенного натриевого насоса (9). Ацетилхолиновая инактивация электрогенного натриевого насоса у некоторых нейронов виноградной улитки была показана также в лаборатории Керкута (10).

Согласно данным Коветтани и сотр., кроме калиевого и натриевого центров транспортной АТФазы имеется еще X центр, который инактивируется при действии АХ, притом сродство этого центра к АХ находится в сильной зависимости от соотношения К/Na. При увеличении последнего происходит уменьшение инактивационного действия АХ на Na+K-АТФазу (4). Учитывая тот факт, что в условиях нашего эксперимента под действием АХ происходило и уменьшение внутриклеточного содержания калия в результате увеличения проницаемости мембраны для этих ионов, можно думать, что аккумуляция вышедшего из клетки калия в внеклеточной среде может оказывать двоякое действие на работу натриевого насоса. С одной стороны, наблюдается увеличение соотношения К/Na и соответствующее ослабление инактивационного действия АХ на Na+K-АТФазу, а с другой стороны—активация натриевого насоса.

Таким образом вышеприведенные данные о том, что АХ вызвал активацию натриевого насоса с одновременной активацией выхода ионов калия из клетки, позволяют прийти к выводу, что усиливающий эффект АХ на работу натриевого насоса обусловлен накоплением ионов калия в околосмембранном пространстве. По-видимому, инактивационное действие АХ на Na+K-АТФазу длится настолько коротко, что его регистрация доступными современными методами оказывается чрезвычайно трудной, несмотря на то что этот эффект может играть важную физиологическую роль в запуске синаптических ответов.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Армянской ССР

Հ. Մ. ԳԵՎՈՐԴՅԱՆ, Ս. Ն. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ

Խիսունքի հսկա նեյրոնների ներքջային իոնական կազմի վրա ացետիլխոլինի (ԱԽ) ազդեցության մեխանիզմի մասին

Բոցային ֆոտոմետրայի մեթոդով ուսումնասիրվել է ացետիլխոլինի ազդեցությունը նեյրոնների նատրիումական պոմպի աշխատանքի վրա: Ցույց է տրված, որ ԱԽ-ի ազդեցության առաջին 1—2 րոպեների ընթացքում նատրիումի և կալիումի իոնների ելքը արտաքին միջավայր զգալի ուժեղանում է, որը ուղիղ համեմատական է ԱԽ-ի կոնցենտրացիային:

ԱԽ-ի ակտիվացիոն դերը նատրիումական պոմպի աշխատանքի վրա բացատրվում է ԱՏՖ-ազային ֆերմենտի ոչ անմիջական ակտիվացմամբ, այլ մերձմեմբրանային միջավայրում կալիումի իոնների կուտակումով:

Գրականության և ստացված տվյալների հիման վրա քննարկվում է նատ-

ընդհանուր առմամբ վրա կես-ի ակտիվացիոն և ֆեկտի ֆիզիոլոգիական նշանակությունը սինապտիկ պրոցեսների կարգավորման գործում:

#### ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

<sup>1</sup> Z. P. Komeliani, Membrane Transport Processes, 2, 1977. <sup>2</sup> А. А. Болдырев, В. Б. Петухов, В. Б. Ритов, Г. Д. Спиркина, В. А. Ткачук, „Укр. биохимический журн.“ 43, 125 (1971). <sup>3</sup> Л. Г. Цакадзе, З. П. Кометиани, „Биохимия“, 43, 7 (1978). <sup>4</sup> З. П. Кометиани, А. А. Каландаршвили, „Биофизика“, 14, 2 (1969). <sup>5</sup> С. Н. Айрапетян, Э. Г. Геворкян, Биофизика мембран, 1971. <sup>6</sup> С. Н. Айрапетян, Вопросы биохимии мозга, 9, 1974. <sup>7</sup> P. Ascher, J. Physiology, 225, 1972. <sup>8</sup> R. C. Thomas, J. Physiology, 220, 1972. <sup>9</sup> С. Н. Айрапетян, Е. Ф. Назаренко и З. А. Сорокина, „Биофизика“, 16, 1971. <sup>10</sup> G. A. Kerker, K. Ralph, R. Y. Walker, R. Woods, Excitatory synaptic mechanisms, 1971.