

УДК 591.543.421.591.88+577.150.4+578.083

Т. К. Высочина

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА СУСЛИКОВ

Предполагают, что различия в устойчивости к низким температурам у гибернаторов и гомойотермов состоят в особенностях клеточных мембран [13] и мембранных ферментов [20, 22]. Некоторые особенности тканей млекопитающих, способных гибернировать, проявляются, когда организм еще не готов к зимней спячке. Однако при подготовке к спячке и во время нее многие функции изменяются, и появляются новые свойства тканей и ферментов [11, 16]. Система ацетилхолин — холинэстераза участвует в регуляции цикла бодрствование — зимняя спячка [9]. Смена физиологических состояний, в частности при адаптации к экстремальным условиям, сопровождается появлением новых форм холинэстераз (ХЭ) с новыми свойствами чаще всего анионного центра [18]. Одним из свойств ХЭ является регуляция их активности кальцием. Среди механизмов регуляции метаболизма самым древним является регуляция его катионами. Есть данные об уникальной биологической роли Ca^{2+} среди металлических катионов [19]. Известно, что он регулирует состояние клеточных мембран и ряда ферментов. В литературе много данных о влиянии солей на гидролиз ацетилхолина (АХ) под действием ХЭ, однако окончательно этот вопрос все еще не решен [1, 4, 7, 23].

Мы исследовали влияние хлоридов Ca^{2+} на активность ХЭ разных отделов мозга сусликов в состоянии бодрствования и зимней спячки.

Методика исследований

В опыте использовались суслики *Citellus erythrogenys* Brandt. Зимняя спячка их проходила в специально оборудованной комнате при 4—5 °С. Бодрствующих сусликов содержали в обычном помещении на естественном корме. В опыте находились две группы: I — суслики в состоянии зимнеспячного оцепенения (продолжительность спячки 8 мес), II — бодрствующие суслики, спустя один месяц после выхода из зимней спячки. Животных забивали декапитацией в 9—11 ч утра. Мозг хранили при —25 °С и использовали после однократного замораживания и оттаивания. В гомогенатах мозга определяли суммарную активность ХЭ по методу Хестрина [17] через 60 мин инкубации при 25 и 36 °С, используя в качестве субстрата ацетилхолинхлорид ($5 \cdot 10^{-3}$ моль). Гомогенат готовили на дистиллированной воде (1:10).

Объем инкубационной среды 4,5 мл содержал около 10 мг ткани/мл инкубата, трис-НСI 0,05 М, рН 7,8. В опытные пробирки добавляли хлористый кальций в конечной концентрации 18 ммоль. CaCl_2 добавляли в эталоны для построения калибровочной кривой. Удельная активность фермента выражена числом мкмоль субстрата, гидролизованного 1 г сырой ткани или 1 г белка за 1 ч инкубации. Белок определяли по Лоури в модификации [24].

При статистической обработке данных, имея сопряженные пары с одинаковым числом вариантов в обеих совокупностях, пользовались методом сравнения совокупностей с попарно связанными вариантами [8]. В таблице данные представлены в виде среднеарифметической и среднеквадратичной ошибки ее.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследований, показывающие изменения активности ХЭ под действием Ca^{2+} (18 ммоль), представлены в табл. 1 и 2, из которых видно, что у бодрствующих сусликов спустя 1 мес после зимней спячки кальций *in vitro* вызывает увеличение удельной активности ХЭ в разных отделах мозга. Наиболее выражено повышение удельной активности ХЭ при обеих исследованных температурах в продолговатом мозге и варолиевом мосте. Но активность ХЭ в этих отделах не повышается до наблюдаемой у спящих сусликов. Следовательно, если механизм ионной регуляции активности ХЭ участвовал в повышении ее уровня при залегании в спячку, то кроме него должны участвовать и другие механизмы, активирующие ХЭ в этом отделе мозга, а также в мозжечке. Однако, в коре больших полушарий могут быть достигнуты активности ХЭ, характерные для спячки с помощью повышения концентрации Са.

Таблица 1
Удельная активность холинэстераз мозга сусликов (мкмоль/г белка)

Отделы мозга	Температура, °C	Бодрствование		% увеличения активности	$p \leq$	Спячка	
		контроль	Са			контроль	Са
Продолговатый мозг + варолиев мост	36	946,2 ± 134,9 (6)*	1205,3 ± 38,0 (6)	27,3	0,05	2443,4 ± 163,9 (6)	2552,7 ± 190,0 (6)
	25	643,1 ± 107,0 (5)	1042,2 ± 212,7 (6)	64,4	0,001	2254,1 ± 91,0 (6)	2245,3 ± 118,0 (6)
Кора больших полушарий	36	1153,2 ± 224,2 (3)	2356,5 ± 293,1 (3)	104,3	0,005	1754,2 ± 98,4 (4)	1948,3 ± 261,6 (3)
	25	1202,8 ± 277,5 (5)	1253,7 ± 205,4 (5)	4,0	0,05	2047,3 ± 126,9 (5)	2120,7 ± 281,3 (5)
Мозжечок	36	2069,1 ± 298,4 (6)	2425,2 ± 292,1 (6)	17,2	0,05	4923,9 ± 783,1 (5)	—
	25	1968,9 ± 226,7 (6)	2591,8 ± 107,5 (6)	31,6	0,05	3369,0 ± 346,1 (5)	—
Средний + промежуточный мозг	36	1990,0 ± 227,2 (5)	2363,3 ± 121,7 (5)	18,8	0,05	2202,7 ± 180,8 (5)	1932,4 ± 373,2 (5)
	25	1496,9 ± 267,4 (5)	1848,5 ± 233,4 (5)	23,5	0,05	1547,6 ± 109,0 (6)	1806,5 ± 302,9 (6)

* В скобках число животных.

Ca^{2+} является биологически адекватным регулятором активности ХЭ (в данном случае имеется в виду комплекс ферментов, основной особенностью которых является способность гидролизовать сложные эфиры холина). Механизм повышения активности ХЭ кальцием включается в такие быстропротекающие процессы в мозге, как проведение нервного импульса, и может быть использован в долговременной регуляции активности фермента. Приходящий к нервному окончанию импульс обеспечивает мгновенное и массивное вхождение ионов Са в толщу мембраны. В среде без Са невозможно проведение нервного импульса [21]. Кальциевые рецепторы участвуют в образовании пор и

выделении квантов АХ. При увеличении концентрации Са до 10 ммоль высвобождение АХ увеличивается вдвое, а при более высоких концентрациях — уменьшается и даже прекращается [14]. Но кальций регулирует не только поступление АХ в синаптическое пространство и тем самым химическую передачу импульса. Весьма важна способность Ca^{2+} в широком диапазоне концентраций [4] активировать ХЭ и тем быстрее прерывать действие АХ в синаптическом пространстве. Повышение активности ХЭ мозга под действием Ca^{2+} в состоянии бодрствования сусликов биологически целесообразно, т. к. обеспечивается один из каналов саморегуляции процесса возбуждения, воздействуя на активность ХЭ, разрушающих АХ. Повышение активности ХЭ ускоряет протекание процессов в синаптической передаче импульса, что так необходимо в период бодрствования. Как видно из данных, ХЭ мозга сусликов в спячном оцепенении не чувствительны к повышению концентрации Ca^{2+} . Ни в одном из рассмотренных отделов мозга сусликов в период сна не наблюдалось стимулирующего действия Ca^{2+} данной концентрации на холинэстеразную активность. Добавление Ca^{2+} в инкубационную среду не ведет к повышению уже возросшей во время сна холинэстеразной активности. В период сна повышенная активность ХЭ, особенно в отделах продолговатый мозг + варолиев мост, вероятно, может постоянно обеспечивать быстрое разрушение АХ вне зависимости от быстротечных изменений концентрации Ca^{2+} , сопровождающих проведение импульса, и тем предохранять клетки от действия АХ, т. е. от пробуждения.

Таблица 2

Удельная активность холинэстераз мозга сусликов (мкмоль/г сырой ткани)

Отделы мозга	Температура, °С	Бодрствование		p	Спячка	
		контроль	Са		контроль	Са
Продолговатый мозг + варолиев мост	36	125,4±140,0 (6)	165,5±10,6 (6)	≤0,001	269,9±22,0 (6)	273,0±20,0 (6)
	25	89,8±15,7 (5)	125,8±18,3 (5)	≤0,001	242,4±19,2 (6)	238,8±20,1 (5)
Кора больших полушарий	36	147,8±8,6 (5)	189,1±52,7 (5)	≤0,05	201,9±24,6 (5)	220,3±16,1 (5)
	25	143,3±27,9 (5)	134,9±25,5 (5)	>0,05	206,6±17,6 (6)	266,0±21,8 (6)
Мозжечок	36	273,3±42,3 (6)	316,4±45,9 (6)	>0,05	507,2±78,6 (5)	—
	25	283,5±35,2 (6)	338,1±20,7 (6)	≤0,05	338,0±41,4 (5)	—
Средний + промежуточный мозг	36	258,0±29,8 (5)	303,6±17,4 (5)	≤0,05	241,9±19,1 (5)	222,2±26,6 (5)
	25	191,9±36,8 (5)	236,6±31,9 (6)	>0,05	184,1±15,2 (6)	202,3±17,9 (5)

АХ имеет в своей структуре положительно заряженный четвертичный азот, и его сорбция на АХЭ определяется кулоновским взаимодействием катионной группы АХ с анионным участком активного центра ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Кроме того, при больших концентрациях субстрата (в нашем опыте 5 ммоль) катионная группа АХ взаимодей-

ствует с аллостерическим центром фермента. Это приводит к изменению оптимальной конформации активного центра АХЭ и понижает его каталитическую активность (субстратное торможение) [1]. Ca^{2+} конкурирует с катионной группой АХ в процессах сорбции в первую очередь на аллостерическом центре и активность АХЭ повышается, т. к. Са препятствует субстратному торможению и изменению конформации активного центра [1, 7]. Вероятно, летом большие концентрации АХ лучше предохраняются от разрушения, тормозя активность АХЭ по механизму субстратного торможения, а Ca^{2+} защищает активность АХЭ. В период спячки, возможно, появляются формы АХЭ с иными регуляторными свойствами, менее подверженные субстратному торможению, и защитная роль Ca^{2+} в этом случае теряется.

Во время спячки возможно повышение концентрации Ca^{2+} в некоторых органах. Так, в сердце хомяка во время спячки наблюдалось увеличение концентрации Ca^{2+} вдвое [15]. Не исключено, что кальциевый механизм повышения холинэстеразной активности способствует созданию высоких уровней активности ХЭ во время спячки в ряде отделов мозга, но не в среднем и промежуточном. В этих отделах не обнаружено повышения активности ХЭ во время спячки, но она, как и ХЭ других отделов мозга, теряет способность повышать свою активность при действии Ca^{2+} , обнаруживаемую летом. Этот факт может указывать на появление во время спячки форм ХЭ с иными регуляторными центрами, не чувствительными к действию Ca^{2+} при данной концентрации. В литературе есть данные о существовании взаимопревращающихся форм фермента с разными регуляторными свойствами [10, 12, 24—26]. Они дают возможность предполагать, что именно такая смена форм происходит в цикле зимняя спячка — бодрствование. Следует учесть, что в разных отделах мозга имеются разные наборы форм ХЭ. Некоторые формы ХЭ присущи лишь определенным анатомическим частям мозга. Для коры больших полушарий типичны высокомолекулярные формы АХЭ. Они еще встречаются в продолговатом мозге и мозжечке, но отсутствуют в других отделах. Смешанные формы со свойствами АХЭ и бутирилхолинэстераз обнаруживаются лишь в продолговатом мозге [26]. Разнообразие форм ХЭ в различных частях центральной нервной системы и их смена может лежать в основе наблюдаемых нами явлений различной чувствительности отделов мозга к регуляторам ХЭ при изменении физиологических состояний сусликов.

Итак, спячка сусликов сопровождается повышением холинэстеразной активности большинства отделов мозга и снижением Na , K -АТФазной [2]. Факт реципрокного отношения активностей ХЭ и Na , K -АТФазы при смене состояний зимняя спячка — бодрствование напоминает о существовании принципа динамической полифункциональности белков. Такой принцип на примере системы холинэстераза — холинорецептор — Na , K -АТФазы был рассмотрен Мустафиным [6]. Имеющиеся литературные данные и результаты собственных работ позволяют сделать вывод, что специфическая холинэстераза, холинорецептор и Na , K -АТФаза образуют функциональную цепь, основу которой составляет один белок (возможно большая субъединица Na , K -АТФазы). Их функционирование осуществляется в режиме постоянных дополнительных переходов по схеме холинэстераза $\rightleftharpoons$ холинорецептор $\rightleftharpoons$ Na , K -АТФаза. Во всех этих превращениях важным фактором является АХ [6] и, как нам представляется, Ca^{2+} . Экранируя анионные центры холинэстеразы и холинорецептора катионной головкой, имеющей в своем составе три гидрофобные метильные группы, АХ усиливает гидрофобные свойства этих белковых молекул и тем способствует их погружению в липидный слой

мембраны, осуществляет конформационные изменения [6]. Происходит объединение с фосфолипидами, которые необходимы для Na, K-АТФазной активности. Вероятно, таким способом малые концентрации АХ увеличивают Na, K-АТФазную активность [5]. Ca^{2+} же конкурируя с АХ, занимает анионные места на субъединицах и снижает их гидрофобность, вследствие чего они не могут находиться в липидном слое мембран и выталкиваются на поверхность мембраны. Известно, что Ca^{2+} тормозит фосфорилирование промежуточного продукта в АТФазе, транспортирующей Na из клетки. На две вошедших единицы Na в клетку, выбрасывается одна Ca^{2+} [12], возможно этим механизмом «флип-флоп». Уменьшается Na, K-АТФазная активность, а субъединицы, вытолкнутые из липидного слоя, могут проявлять ацетилхолинэстеразную активность. Динамическое равновесие в указанной системе под влиянием Са сдвигается влево. В рассматриваемой системе сдвиг влево характерен для периода спячки. Этому могут способствовать, например, увеличение гидрофобности мембран, появление новых форм субъединиц, с уменьшенным числом анионных мест для посадки АХ и Са, которым труднее принимать более гидрофобное состояние под действием АХ и проникать в липидный слой мембраны.

Какие бы ни были механизмы повышения активности ХЭ под действием Ca^{2+} в период бодрствования сусликов и постоянно высокого уровня активности ХЭ во время спячки, они биологически целесообразны.

Механизм повышения активности ХЭ кальцием необходим в условиях частого импульсного возрастания Са в синапсах и массивного поступления АХ при высоком уровне метаболизма летом. Этот механизм обеспечивает один из каналов саморегуляции процесса возбуждения, и ускоряет протекание процессов в синапсах. В период спячки уменьшается поступление нервных импульсов и, следовательно, нет повышенных концентраций Са, сопровождающих импульс. В такой ситуации механизм регуляции активности ХЭ кальцием элиминируется на период зимней спячки. На это время необходима постоянно высокая активность ХЭ, не ингибируемая высокими концентрациями АХ, надежно охраняющая определенные отделы мозга от пробуждающего действия АХ. Следует учесть также, что во время спячки механизмы регуляции активности ферментов катионами становятся ненадежными, т. к. в период спячки возможны значительные изменения их концентраций в тканях сусликов [3]. Организм в этот период может пребывать в состоянии спячки, уходя из-под влияния резко меняющихся параметров. Наблюдается «десенсбилизация» ХЭ, уход их из-под регулярного влияния Ca^{2+} . Система АХ — АХЭ участвует в поддержании состояния зимней спячки, принимая качественно новые состояния, утрачивая чувствительность к регуляторному действию Ca^{2+} .

Выводы

1. Ca^{2+} (18 ммоль) повышает каталитическую активность холинэстераз ряда отделов мозга бодрствующих сусликов.
2. Во время спячного оцепенения ХЭ мозга сусликов «десенсбилизуются». Утрачивается способность этого регулярного фермента к активации кальцием без нарушения каталитической активности.
3. Повышение каталитической активности ХЭ ряда отделов мозга и снижение их чувствительности к активирующему действию Са в период спячки сусликов биологически целесообразно, т. к. способствует сохранению состояния спячки.

Литература

1. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В. Влияние ионной силы органических растворителей на взаимодействие холинэстераз с субстратами и фосфорорганическими ингибиторами.—Биохим., 1970, 35, № 2, с. 382—385.
2. Высочина Т. К. Активность АТФаз синапсом мозга сусликов *Citellus erythrogenys* в периоды бодрствования и зимней спячки.—Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1977, 13, № 4, с. 506—507.
3. Высочина Т. К. Сезонные изменения содержания воды, калия и натрия в органах краснощекого суслика.—В кн.: Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций. Новосибирск: Наука, 1971, с. 217—221.
4. Глебов Р. Н., Долганов Г. М., Крыжановский Г. Н. Влияние ионов на активность ацетилхолинэстеразы синаптических структур коры головного мозга крыс.—Докл. АН СССР, 1974, 218, № 6, с. 1464—1467.
5. Кометиани З. П., Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г. Действие ацетилхолина на Na, K-АТФазу синапсом.—Биохимия, 1975, 40, № 5, с. 1039—1046.
6. Мустафин А. М. Принцип динамической полифункциональности белков на примере холинэстераза-холинорецептор Na, K-АТФаза.—Успехи совр. биол., 1976, 82, с. 276—282.
7. Никольский Б. П., Валиотти А. Б., Никольская Е. Б. Теоретическое и экспериментальное исследование влияния солей на каталитические свойства ацетилхолинэстеразы.—Докл. АН СССР, 1975, 225, № 5, с. 1206—1209.
8. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков.—М., 1963.—415 с.
9. Штарк М. Б. Мозг зимоспящих.—Новосибирск: Наука, 1970.—240 с.
10. Adamson E. D., Ayers S. E., Deussen Z. Analysis of the forms of acetylcholinesterase from adult mouse brain.—Biochem. J., 1976, 147, p. 205—214.
11. Aloia R. C., Pengelley E. T., Bolen J. L., Rouser G. Changes in phospholipid composition in hibernating ground squirrel, *Citellus lateralis* and their relationships to membrane function at reduced temperatures.—Lipids, 1974, 12, N 9, p. 993—999.
12. Bon S., Rieger F., Massoulie J. Propriétés des formes allongées de l'acétylcholinesterase en solution.—Europ. J. Biochem., 1973, 35, p. 372—379.
13. Chapman D. Lipid dynamics in cell membranes.—Pestic Sci., 1973, 4, N 6, p. 839—842.
14. Cook J. D., Okamoto K., Quastel D. The role of calcium in depolarization secretion coupling of the motor nerve terminal.—J. Physiol. (Gr. Brit.), 1973, 228, p. 459—467.
15. Ferren L. G., South F. E., Jacobs H. K. Calcium and magnesium levels in tissues and serum of hibernating and cold-acclimated hamsters.—Cribiology 1971, 8, p. 506—508.
16. Goldman S. S., Willis J. S. Cold resistance of the brain during hibernating. III. Evidence of a lipid adaptation.—Amer. J. Physiol., 1975, 228, N 3, p. 834—839.
17. Hestrin Sh. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application.—J. Biol. Chem., 1949, 180, p. 249—261.
18. Hochachca P. W., Storey K. B., Baldwin J. Design of acetylcholinesterase for its physical environment.—Biochem. Physiol., 1975, 5213, p. 13—18.
19. Lenaz G., Sechi A. M., Parenti-Gastelli G., Landi L., Bertolix E. Activation energies of different mitochondrial enzymes: breaks in Arrhenius plots of membrane-bound enzymes occur at different temperatures.—Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, 49, p. 536—542.
20. Miledi R., Thies R. Tetanic and post-tetanic rise in frequency at miniature end plate potentials in the low calcium solutions.—J. Physiol., 1971, 212, p. 245—257.
21. Raison J. K., Lyons J. M., Mehlhorn R. J., Keith A. D. Temperature-induces phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling.—J. Biol. Chem., 1971, 246, p. 4036—4040.
22. Roufogalis B. D., Wikonson V. M. Acetylcholinesterase: specificity of the peripheral anionic site for cholinergic ligands.—Mol. Pharmacol., 1975, 11, p. 352—360.
23. Silman I., Dudai Y. Structure of membrane-bound acetylcholinesterase.—Proteides of the biological fluids. Proc. 21 collq. Brugge, 1973 /Ed. H. Pecters, 1974, 4, p. 257—261.
24. Shacterle G. R., Pollack R. L. A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material.—Anal. biochemistry, 1973, 51, p. 645—655.
25. Skangiel-Kramaska I., Niemierko S. Soluble and particle-bound acetylcholinesterase and its isoenzymes in peripheral nerves.—J. Neurochemistry, 1975, 24, p. 1135—1141.

26. Tomova E. L. Multiple forms of the cholinesterase in different parts of the central nervous system.— Докл. Болг. АН, 1973, 26, № 11, p. 1569—1572.

Лаборатория прикладной зоологии
Института химизации сельского хозяйства
СО ВАСХНИЛ, Новосибирск

Поступила в редакцию
2.X 1978 г.

T. K. Vysochina

THE EFFECT OF CALCIUM IONS ON CHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE GROUND SQUIRREL BRAIN

Summary

The effect of calcium on cholinesterase activity of some brain regions was investigated in active and hibernating ground squirrels at 36° and 25° C. The stimulatory effect of calcium on cholinesterase activity was found in nonhibernating summer animals, but it was absent during hibernation. The effect of calcium on the cholinesterase activity of the summer ground squirrels may be observed in vitro both at 36° and 25° C. Possible mechanisms of the calcium effect and causes of cholinesterase «desensitization» are discussed.

Laboratory of the Applied Zoology of the Institute
of Agriculture Chemization, Siberian Branch
of the V. I. Lenin All-Union Academy
of Agricultural Sciences, Novosibirsk