

Т. В. ПРАВДИЧ-НЕМИНСКАЯ

**ОБ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ТКАНЯХ  
И СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

(Представлено академиком К. М. Быковым 30 XII 1948)

В данной работе приводятся результаты определений активности холинэстеразы в верхнем шейном симпатическом узле и других объектах. Верхний шейный симпатический узел может быть использован как модель для прижизненного изучения процессов, происходящих в центральной нервной системе. Указанные определения производились микрометодом, разработанным мною. Этот микрометод является видоизменением метода Stedman и Stedman (1). Согласно этому микрометоду, уксусная кислота, образующаяся за счет ферментативного распада ацетилхолина при определенных условиях, оттитровывается раствором едкого натрия, и отсюда рассчитывается количество ацетилхолина, распавшегося за время опыта. Мерой активности холинэстеразы служит величина процента распада ацетилхолина за единицу времени. Определение ведется в пробирках из стекла пирекс. Для каждого определения используются две пробирки: опытная и контрольная. Опытная пробирка содержит: субстрат — ацетилхолин, источник фермента и реакционную среду. Контрольная пробирка содержит: источник фермента и реакционную среду. Общий объем реакционной смеси 2 мл. Количество ацетилхолина 2 мг. Индикатор — крезолрот ( $\text{pH} = 7,2-8,8$ ), три капли. Реакционная среда — физиологический раствор (0,9% NaCl), доведенный до  $\text{pH} = 7,6$  с помощью  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $38^\circ\text{C}$ . Титрование раствором едкого натра производится из микробюретки с делениями до 0,001 мл.

Количество источников фермента	Время инкубации в термостате при $38^\circ\text{C}$
Сыворотка . . . . . 0,1 мл	30 мин.
Ликвор . . . . . 0,5 »	60 »
Экстракты тканей . . . . . 0,1 » (1:4)	60 »

По изъятии из термостата при большом числе проб реакцию можно купировать эзерином в концентрации, вызывающей моментальное и полное торможение активности холинэстеразы. Метод позволяет обходиться без буферов, обладающих большой буферной емкостью и понижающих этим чувствительность определения. Возможен отказ от применения эзерина в контроле во время инкубации (что имеет место у некоторых авторов), так как прибавленный эзерин подвергается распаду в термостате и подкисляет среду, благодаря чему может создаваться ложное впечатление об отсутствии холинэстеразной активности в исследуемом объекте. Применяется контроль (отсутствующий у Stedman), которым учитывается: подкисление среды (за время опыта) за счет различных других процессов; влияние атмосферных условий.

Спонтанный гидролиз ацетилхолина в условиях опыта составляет 1—2% распада от общего количества его, тогда как у ряда авторов (1-3) он дает значительную величину (благодаря величине рН среды, равной 8,5). Концентрация субстрата 2 мг, при которой процент распада ацетилхолина представляет величину, обеспечивающую нормальный ход ферментативной реакции гидролиза; абсолютная скорость реакции такова, что образующиеся продукты гидролиза не тормозят ее, в силу чего отпадает необходимость „длительного титрования“, применяемого Stedman и Stedman\*; у этих авторов количество ацетилхолина составляет 25 мг на 0,1 мл сыворотки, благодаря чему абсолютная скорость реакции велика (при небольшом проценте распада), что ведет к накоплению продуктов реакции и торможению процесса гидролиза, а отсюда к необходимости применения „длительного титрования“ для

Таблица 1

Дата	Пол	Вес узла в мг		Активность холинэстеразы в % распада ацетилхолина	
		правый	левый	правый узел	левый узел
26 VII 1948	♀	7,8	8,8	11,83	11,36
28 VII		4,2	2,8	10,61	10,52
29 VII		7,0	8,6	5,63	5,59
29 VII		3,8	4,8	13,31	11,27
30 VII		6,0	5,9	16,19	15,45
31 VII		3,2	4,2	19,61	24,73
2 VIII		6,6	7,4	10,28	10,43
3 VIII		4,4	8,4	15,09	13,23
4 VIII		6,8	7,4	6,33	8,47
5 VIII		5,2	6,0	6,51	6,98
7 VIII		6,6	7,9	8,93	8,57
9 VIII		8,1	5,8	6,98	12,29
6 IX		7,0	7,1	13,63	14,07
7 IX		6,9	7,5	14,95	10,99
7 IX		6,2	6,3	13,81	14,77
8 IX		4,8	5,0	16,27	12,31
9 IX		6,1	7,2	10,11	8,62
10 IX		5,5	5,7	14,33	15,65
11 IX		8,5	9,1	6,86	6,38
13 IX		9,8	9,72	10,38	10,62
15 IX	6,8	5,6	11,61	12,49	
23 XI	4,8	4,9	12,95	16,53	
25 XI	5,3	5,0	11,61	12,75	
8 XII	6,1	6,1	7,18	7,90	

Таблица 2

Животное	Зрительный бугор	Полосатое тело	Кора	Мозжечок	Продолговатый мозг	Средний мозг
Кошка . . . . .	17,2	26,8	7,0	24,1	14,4	—
Собака . . . . .	27,34		6,5	7,0	14,1	—
Кролик . . . . .	44,5		11,9	18,7	17,9	—
Морская свинка . . . . .	13,6		3,4	8,7	11,6	6,8
Крыса . . . . .	17,8		—	7,0	12,1	18,7

\* Т. е. повторные титрования пробы за время нахождения в термостате.

удаления больших количеств уксусной кислоты. Также у Glick количество ацетилхолина составляет 20 мг на 0,1 мл сыворотки. Преимуществом является также отказ от подщелачивания (применяемого Stedman и Stedman) опытных и контрольных проб до цвета стандарта в присутствии индикатора, как неточного за счет белковой ошибки последнего. Небольшой объем реакционной смеси — 2 мл (тогда как у Stedman он составляет 100 мл). Метод дает возможность одновременного проведения большого числа анализов. Определения этим методом отличаются от определений манометрическим методом (на аппарате Варбурга) на  $\pm 2-3\%$ .

Таблица 3

Средние значения активности холинэстеразы в процентах распада ацетилхолина за время опыта

	Собака	Кошка	Кролик	Морская свинка	Крыса
Мозг . . . . .	4,21	10,75	9,92	11,95	7,77
Печень . . . . .	28,0	17,36	14,34	1,9	10,46
Панкреас . . . . .	29,1	8,87	9,0	45,8	7,0
Селезенка . . . . .	5,84	19,1	12,27	6,44	8,38
Сердце . . . . .	4,03	4,12	5,11	6,29	11,45
Почка . . . . .	4,2	2,1	3,13	3,9	5,83
Мышцы . . . . .	4,32	5,45	6,17	4,33	6,80

Определялась активность холинэстеразы правого и левого верхнего шейного симпатического узлов кошки. Опыты проводились на животных, подвергнутых эфир-хлороформенному наркозу (табл. 1).

Проведено 24 опыта, из которых среднее значение активности холинэстеразы для правого узла составляет 11,54%, а для левого — 11,75% (значения даны в процентах распада ацетилхолина за время опыта, являющихся мерой активности холинэстеразы). Результаты, полученные микрометодом, сходны с литературными данными. Согласно последним, 1 мг ткани верхнего шейного ганглия расщепляет 0,1  $\gamma$  ацетилхолина за 1 сек. (4,5). По моим определениям, экстракт из 1 мг ткани верхнего шейного ганглия расщепляет 0,11  $\gamma$  ацетилхолина за 1 сек. Определялась активность холинэстеразы в различных отделах мозга разных животных (табл. 2).

Результаты определений активности холинэстеразы в различных тканях животных в большинстве случаев подтверждают имеющиеся литературные данные (3,6,7) (табл. 3).

Проводились определения активности холинэстеразы в сыворотке артериальной, а также венозной крови собак и других животных. Определения показали, что значения активности холинэстеразы колеблются у одного и того же животного в течение ряда дней, например: 16,5—33,2%; 21,5—41,4%; 25,5—38,1%; 28,5—46,3%; 11,6—36,6%; 7,6—41,3%; 2,7—39,8%.

Данным методом изучалась кинетика ферментативного распада ацетилхолина. Опыты ставились на экстрактах различных органов и сыворотке разных животных (табл. 4).

Константа скорости реакции рассчитывалась по формуле

$$k' = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x},$$

где  $k' = k/2,303$ ,  $a$  — исходное количество вещества,  $x$  — количество вещества, превратившегося за время  $t$ .

Наблюдаемое постоянство констант скорости реакции совпадает (в большинстве случаев) с литературными данными, согласно которым

Таблица 4

Источник фермента в мл	% распада ацетилхолина	$k \cdot 10^3$	$t'$	Источник фермента в мл	% распада ацетилхолина	$k \cdot 10^3$	$t'$
Сыворотка собаки				Печень кролика			
0,01	4,10	0,74	30	0,1	7,65	1,13	30
	8,1	0,73	60		18,72	1,48	60
0,02	7,9	1,23	30	0,2	18,72	2,96	30
	16,6	1,29	60		32,3	2,84	60
0,03	16,2	2,43	30				
	30,0	2,20	60				
0,04	18,5	3,23	30				
	33,0	3,60	60				
0,05	23,4	3,96	30	Сыворотка кролика			
	43,2	4,09	60	0,05	3,73	0,96	15
0,075	30,6	7,20	30		6,8	1,05	30
	65,5	7,75	60		11,9	0,93	60
0,08	34,2	8,01	30	0,1	7,65	2,25	15
	69,3	8,55	60		13,72	2,10	30
0,1	37,8	12,02	30		23,05	2,37	60
	82,8	12,74	60	0,2	12,72	3,86	15
					23,4	3,68	30
					40,8	3,82	60
Сыворотка человека				Сыворотка собаки			
0,025	5,94	1,78	15	0,05	12,1	4,03	15
	12,55	1,70	30		16,13	4,04	20
0,05	12,55	3,37	15		31,92	4,01	45
	20,38	3,32	30		54,33	4,65	80
0,1	25,47	6,53	20	0,1	31,07	8,53	20
	37,36	6,80	30		41,6	8,40	30
Селезенка кролика				Мозг кролика			
0,05	2,5	0,266	30	0,025	3,5	0,44	30
	3,6	0,256	60		6,4	0,41	60
0,1	4,7	0,60	30	0,05	6,1	0,89	30
	8,5	0,68	60		11,7	0,88	60
0,2	8,65	1,30	30	0,075	2,7	1,44	30
	13,6	1,40	60		4,8	1,40	60
Печень кошки				0,1	13,4	2,18	30
0,1	8,65	1,28	30		23,6	2,01	60
	16,6	1,35	60				
0,2	13,7	2,18	30				
	24,6	2,03	60				

реакция ферментативного распада ацетилхолина выявляет характер мономолекулярной реакции ( $6^{\circ}$ ,  $8^{\circ}$ ) и др.).

В дальнейшем эксперименты будут посвящены изучению колебаний активности холинэстеразы при различных физиологических состояниях.

Институт экспериментальной и клинической  
хирургии им. А. В. Вишневского  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
30 XII 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Ed. Stedman, El. Stedman and L. Easson, *Biochem. J.*, 26, 2058 (1932).  
<sup>2</sup> D. Glick, *ibid.*, 31, No. 4, 521 (1937). <sup>3</sup> F. Bernheim and M. Bernheim, *J. Pharm.*, 57, No. 1—4 (1936). <sup>4</sup> D. Glick, *Nature*, 140, 426 (1937). <sup>5</sup> D. Glick, *J. Gener. Physiol.*, 21, No. 4, 431 (1938). <sup>6</sup> F. Plattner u. H. Hinter, *Pfl. Arch. f. d. ges. Physiol.*, 225, 19 (1930). <sup>7</sup> D. Glick, *Biol. Symposia*, 5 (1941).  
<sup>8</sup> М. Я. Михельсон, *Физиол. журн. СССР*, 32, № 6, 35 (1946).