

В. В. ПОРТУГАЛОВ и В. А. ЯКОВЛЕВ

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ
В ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ**

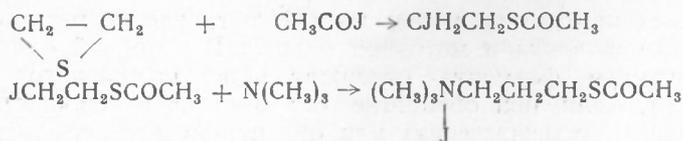
(Представлено академиком А. И. Опариным 19 IV 1951)

При изучении механизмов нервной деятельности существенное значение приобретает вопрос о распределении ферментно-активных веществ в нервной и иннервируемой тканях. Характер распределения ферментов в микроструктурах тканей может служить прямым указанием на значение тех или иных обменных процессов и связь между ними и функциональными отправлениями тканевых и клеточных элементов.

Локализация холинэстеразы в микроструктурах тканей до последнего времени не изучалась, хотя такой подход к решению вопроса о роли этого фермента в осуществлении функций нервной ткани может служить существенным дополнением к физиологическим и биохимическим методам (1).

Недавно было предложено два гистохимических метода определения локализации холинэстеразы. Первый метод (2) основан на гидролитическом расщеплении холиновых эфиров высокомолекулярных карбоновых кислот под действием холинэстеразы. Выделяющиеся в местах локализации фермента карбоновые кислоты осаждаются в форме кальциевых солей, распределение осадков которых отражает распределение холинэстеразы. Метод этот, однако, оказывается неудовлетворительным по двум причинам: активность холинэстеразы по отношению к холиновым эфирам высокомолекулярных карбоновых кислот ничтожно мала, а способ фиксации ткани, предложенный автором метода, как показали наши опыты, приводит к значительной инактивации фермента. Более совершенным является метод, основанный на энзиматическом гидролизе ацетилтиохолина под влиянием холинэстеразы, в результате чего образуется тиохолин, осаждающийся в местах локализации фермента в форме нерастворимой бесцветной медной соли (3). Обработка препарата сернистым натрием приводит к превращению медного производного холина в окрашенный осадок сульфида меди. Согласно этому методу, следовательно, локализация холинэстеразы в конечном счете выявляется по распределению темнокоричневого осадка сернистой меди в микроструктурах ткани.

Нами была произведена экспериментальная проверка этого метода и дальнейшее его усовершенствование. Необходимый для этих целей ацетилтиохолиниодид был синтезирован С. З. Ивиным по разработанной им оригинальной схеме:



Эта схема синтеза значительно проще и дает лучшие выходы конечного продукта, чем описанный в литературе многостадийный метод Реншау (4). В результате проверки метода выявилась его ограниченная пригодность для обнаружения локализации холинэстеразы лишь в поверхностно расположенных структурах.

На препарате поперечнополосатой мышцы кролика после проведения на ней реакции окрашенный осадок сульфида меди обнаруживается под микроскопом только в области моторных бляшек, повторяя их очертания (см. рис. 1а на вклейке). Ферментно-активными оказываются только места контакта нерва с мышцей, других деталей на таких препаратах при малом увеличении обычно обнаружить не удастся. При больших увеличениях в моторной бляшке иногда можно различить ядра ее подошвы. Вещество мышечных волокон остается бесцветным. Мякотные нервные волокна также оказываются оптически пустыми, или же на их поверхности определяется едва заметный осадок сульфида меди, как бы намечающий контуры нерва.

При выявлении холинэстеразы в мышце языка лягушки (рис. 1б), где нервно-мышечные соединения имеют форму пластинок или гроздьев, обнаруживается, что и здесь локализация фермента ограничивается зоной контакта нерва с мышцей. Распределение холинэстеразы соответствует распределению шванновских элементов, сопровождающих аксон в зоне органного синапса. В других структурах осадка сульфида меди не обнаруживается. На препарате видны подходящие к мышце нервные волокна. Однако по ходу нервного волокна активность холинэстеразы проявляется крайне незначительно.

Возникает вопрос, соответствует ли наблюдаемая морфологическая картина истинному распределению фермента в ткани. Из физиологических работ известно, что и в мышечной клетке и в нервном волокне концентрация холинэстеразы достаточно велика. Таким образом, или примененный метод позволяет выявить только фермент, локализованный в области органного синапса, или физиологические представления о распределении энзима в ткани не достоверны. Решение этого вопроса потребовало усовершенствования методики определения локализации холинэстеразы. Дело в том, что ацетилтиохолин, являющийся, как и ацетилхолин, четвертичным аммонийным соединением, плохо или совсем не проникает в глубь клетки. Ограниченная проницаемость клеток для ацетилтиохolina может быть и причиной выявления фермента лишь в поверхностно расположенных элементах, обладающих эстеразной активностью.

Для того чтобы облегчить проникание ацетилтиохolina внутрь клеток, нами была применена предварительная обработка ткани ацетоном при температуре -15° . Такая обработка приводит к разрушению содержащих липиды мембран и тем самым улучшает проницаемость клеток. Предотвращение инактивации тканевой холинэстеразы обеспечивается поддержанием низкой температуры. Действительно, после предварительной обработки ткани в течение 3—12 час. ацетоном на холоду и последующей обработки срезов ацетилтиохoliном картина распределения холинэстеразы на препаратах оказывается несколько иной. Наряду с большой холинэстеразной активностью в области нервно-мышечного соединения фермент обнаруживается и в мышечных волокнах (рис. 1в). Наибольшее количество энзима определяется в ядрах, значительно меньше в саркоплазме. Аналогичные картины наблюдаются и на мышцах теплокровных. На препарате, приготовленном из мышечной ткани языка крысы, мы имеем возможность рассмотреть все элементы и мышечного волокна и моторной бляшки. В моторной бляшке наибольшее количество фермента содержат ядра шванновского симпласта (рис. 1г, д). Если при обработке без ацетона в нервных волокнах не обнаруживается холинэстераза или обнаруживаются ее следы, то после

обработки ацетоном фермент выявляется достаточно отчетливо в шванновских ядрах и шванновской протоплазме безмякотных нервов, а также в мякотной оболочке нервного волокна, где холинэстераза оказывается распределенной довольно равномерно в толще оболочки. Однако ни при каких обстоятельствах выявить холинэстеразу в осевых цилиндрах не удается (рис. 1e).

Для подтверждения того, что при обработке ацетоном выявляются именно внутриклеточные энзимы, а не артефакты, связанные с диффузией продуктов энзиматического гидролиза, были поставлены опыты обработки ткани прозеринном — веществом, угнетающим холинэстеразу и по своим свойствам являющимся четвертичным аммонийным соединением, плохо проникающим через клеточные мембраны.

Мышцы языка лягушки перед обработкой ацетилтихолином подвергались воздействию раствора прозерина 1 : 10 000 в течение 30 мин. После тщательной отмывки прозерина реакция выявления активности холинэстеразы проводилась по обычной схеме. При этом оказалось, что практически вся холинэстераза инактивировалась прозеринном. Фермент в зоне нервно-мышечного соединения не обнаруживался или выявлялись только его следы. В других опытах мышца языка лягушки, после обработки прозеринном и отмывания его рингеровским раствором, фиксировалась ацетоном, вслед за чем на ней проводилась реакция выявления холинэстеразы. При такой постановке эксперимента фермент обнаруживается только в ядрах мышечных волокон. Таким образом, при обработке мышцы прозеринном ферменты, расположенные в поверхностных слоях клеток, теряют способность гидролизовать субстрат, т. е. инактивируются. Внутри клеток, куда прозерин не может проникнуть, а ацетилтихолин получил доступ только после обработки ацетоном, гидролиз субстрата имеет место, что является прямым указанием на наличие внутриклеточной холинэстеразы. Из этих опытов следует, что предварительная обработка ткани на холоду ацетоном, не нарушая активности холинэстеразы, делает возможным изучение локализации фермента не только в поверхностных, но и в глубоко расположенных и трудно доступных слоях клеток.

Весьма интересно сопоставление распределения холинэстеразы в нетонических и тонических мышцах. В нетонической (вернее, слабо тонической) мышце языка лягушки нами была выявлена холинэстераза не только в моторной бляшке, но и в толще мышечного волокна, в основном, в ядрах. Однако наибольшее количество фермента в мышечном волокне обнаруживается в зоне нервно-мышечного соединения. Активность фермента в структурах мышечного волокна довольно быстро убывает по мере удаления от зоны нервного окончания. На каком-то расстоянии от моторной бляшки активность энзима может перестать выявляться, и тогда между активной и неактивной зонами бывает возможно установить довольно отчетливую границу. Средняя протяженность мышечного волокна, показывающая холинэстеразную активность, оказывается не одинаковой у одного и того же животного в разных мышцах; нередко волокна, входящие в состав одной мышцы, обладают зонами холинэстеразной активности разной протяженности. Так, в исследованных нами случаях у кошек и крыс наименьшая протяженность зоны холинэстеразной активности в мышечном волокне была обнаружена в межреберных мышцах, несколько большая в икроножных мышцах и мышцах языка, а наибольшая в мышцах щеки.

При изучении распределения холинэстеразы в тонической мышце *retractor capitis* черепахи мы получили несколько иные отношения. При обработке мышцы без фиксации ацетоном энзиматическая активность бывает представлена только в зоне моторных нервных окончаний, которые у черепахи, как и у бесхвостых амфибий, имеют вид пластинок и гроздьев. После обработки ацетоном ферментная активность обнару-

живается не только в зоне моторной бляшки, но и в ядрах всех отделов мышечного волокна. Таким образом, между данными, полученными физиологами, и нашими данными, полученными гистохимическим методом, можно усмотреть соответствие. Согласно А. Г. Гинецинскому⁽⁵⁾, степень тоничности мышцы, т. е. ее способность реагировать контрактурой на ацетилхолин, коррелирует с распределением холинэстеразы в мышечном волокне. Наши данные, полученные гистохимическим методом, находятся в соответствии с этим представлением. В нетоническом мышечном волокне содержащая холинэстеразу зона распространяется на небольшие пространства вблизи моторной бляшки. В тоническом мышечном волокне холинэстераза содержится на всем протяжении волокна. Такие различия в локализации холинэстеразы, возможно, объясняют функциональные особенности волокон обоих типов.

Еще в 1939 г. Р. Г. Лейбсон⁽⁶⁾ было показано, что приобретение мышцей млекопитающих (кролика) тонических свойств в результате денервации сопровождается повышением их холинэстеразной активности. Тогда же Гинецинским было высказано предположение, что денервация у кролика сопровождается увеличением протяженности зоны мышечного волокна, содержащего холинэстеразу.

Дополнительные данные о различии между тоническими и нетоническими мышцами были получены нами в опытах с денервацией мышц. В денервированной ткани локализация холинэстеразы отличается от того, что наблюдается в мышце с ненарушенными нервными связями. Как уже указывалось выше, в нормальной мышце холинэстераза сосредоточена в области моторной бляшки и непосредственно прилегающих к ней участках мышечного волокна. На 26-й день после денервации икроножной мышцы кролика, которая к этому времени, как известно, приобретает тонические свойства, холинэстераза обнаруживается в участках мышечного волокна, весьма далеко отстоящих от моторной бляшки, вплоть до соединений с сухожилием. На рис. 1ж, з приведены соответствующие микрофотографии препаратов мышц с нормальной иннервацией (ж) и денервированных (з).

У кроликов и крыс в разные сроки после денервации икроножной мышцы, при обработке ткани без ацетона активность шванновских элементов подошвы моторной бляшки была не одинакова, но всегда достаточно высока. Это наблюдение указывает, что обменные процессы шванновской клетки резко отличаются от процессов, происходящих в аксоне, и не теряют своей специфичности при потере связи с последним.

Институт биофизики
Академии медицинских наук СССР

Поступило
30 III 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Я. Михельсон, Действие наркотиков на холинэстеразу, Л., 1948.
² G. Gomori, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 68, 354 (1948). ³ G. Koelle and J. Friedenwald, *ibid.*, 70, 617 (1949). ⁴ R. Renshaw, P. Dreisbach, M. Ziff and D. Green, Journ. Am. Chem. Soc., 60, 1765 (1938). ⁵ А. Г. Гинецинский, Физиол. журн. СССР, 33, 313 (1947). ⁶ Р. Г. Лейбсон, Бюлл. эксп. биол. и мед., 7, в. 6, 518 (1939).