Доклады Академии наук СССР
1955. Том 100, № 3

*ФИЗИОЛОГИЯ*

Н. Н. ДЕМИН, С. Н. НИСТРАТОВА и Л. С. РОЗАНОВА

# ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И РАЗДРАЖЕНИЯ БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА НА СОДЕРЖАНИЕ «СВОБОДНЫХ» СУЛЬФГИДРИЛЬНЫХ ГРУПП В ТКАНЯХ

*(Представлено академиком Л. А. Орбели 5 XI 1954)*

Многочисленными работами Х. С. Коштоянца и его сотрудников была установлена тесная зависимость между осуществлением нервного влияния и обменом веществ, что послужило обоснованием для его энзимохимической гипотезы возбуждения ([1], [2]). По Коштоянцу так называемые медиаторы, интимно связанные со специфическим метаболизмом нервных элементов, вызывают тот или другой эффект, лишь включаясь в биохимические превращения в иннервируемых тканях. Особое внимание обращается при этом на роль белков и их активных группировок, в частности сульфгидрильных ([3–7]). В опытах Т. М. Турпаева ([7]) были установлены конкурентные взаимоотношения между ацетилхолином и $HgCl_2$ при их воздействии на SH-группы белков сердца лягушки, что указывает на возможность непосредственного взаимодействия между ацетилхолином и тканевыми белками через их SH-группы.

Ранее на различных объектах одним из нас было показано ([8], [9]), что ацетилхолин даже в относительно больших концентрациях (до $1 \cdot 10^{-3}$), не приводя к денатурационным изменениям тканевых белков, вызывает изменения активности SH-групп различных экстрактов и суспензий измельченных тканей — в большинстве случаев ее повышение. Однако измельчение тканей и приготовление из них различных препаратов может само по себе явиться причиной изменения белков типа денатурации. Поэтому казалось желательным изучить влияние ацетилхолина на тканевые SH-группы в более щадящих условиях. С другой стороны, вызывал интерес вопрос, будет ли влиять на содержание «свободных» SH-групп в тканях раздражение иннервирующих их холинэргических нервов, сопровождаемое выделением ацетилхолина в физиологических условиях.

Требованиям быстроты обработки тканей с немедленной фиксацией их белков и быстроты дальнейшего выявления SH-групп удовлетворяют гистохимические методы. В нашей работе мы остановились на доступном, хотя и не совершенном, гистохимическом феррицианидном методе определения SH-групп Шевремона и Фредерика ([10]). Небольшие кусочки исследуемой ткани (или целое сердце лягушки), как можно быстрее после извлечения из организма, замораживались жидким воздухом и при помощи замораживающего микротома из них готовились срезы, толщиной в 15—30 $\mu$.

При исследовании действия ацетилхолина полученные срезы помещались обычно по 10 шт. в две кюветы, из которых одна содержала 0,9% NaCl (контрольные пробы), а другая — $1 \cdot 10^{-5}$ раствор хлористого ацетилхолина, приготовленный на 0,9% NaCl и содержавший сернокислый эзерин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$. В случае тканей лягушки концентрация NaCl равнялась 0,65%. Для фиксации белков с закреплением их структуры ([11]) после 10-минутной обработки срезов ацетилхолином при ком-

натной температуре срезы переносились на 20 мин. в кюветы с нейтральным 5% раствором формальдегида (разбавленный в 8 раз крепкий формалин), содержащим 0,9% (или 0,65%) NaCl. В опытах с нервным раздражением срезы с микротома сразу помещались в формалин.

После фиксации срезы тщательно отмывались от формальдегида дестиллированной водой и переносились на предметные стекла, на которых обрабатывались по Шевремону — Фредерику смесью 0,1% $K_3Fe(CN)_6$ и 1% $Fe_2(SO_4)_3$ и после этого промывались дестиллированной водой.

При рассматривании срезов под микроскопом по синему окрашиванию от берлинской лазури, образующемуся в месте нахождения SH-групп, можно установить распределение последних. По общей же интенсивности окраски, путем сравнения, можно судить об относительном содержании SH-групп в разных срезах, оценивая его, однако, только визуально.

Гистохимические определения SH-групп в опытах с ацетилхолином являлись предварительными и контрольными в отношении опытов с нервным раздражением. В этих опытах были использованы срезы сердца лягушки, сердца белой крысы, головного мозга белой крысы, скелетных мышц белой крысы и морской свинки и прямой мышцы живота лягушки.

В подавляющем большинстве случаев в этих опытах наблюдалось, что срезы, обработанные ацетилхолином, оказывались затем более окрашенными, чем контрольные. В некоторых опытах не было отмечено какой-либо разницы. Более слабого окрашивания срезов, обработанных ацетилхолином, по сравнению с контрольными мы ни разу не наблюдали. Следует, конечно, иметь в виду, что при визуальной оценке результатов можно было уловить только относительно большие различия.

В общем, эти гистохимические опыты подтвердили, что ацетилхолин обладает способностью существенно повышать окисляемость SH-групп в ряде биологических объектов ([8], [9]).

В дальнейших опытах гистохимически изучалось содержание «свободных» SH-групп в сердечной ткани лягушки при раздражении блуждающего нерва. Перед опытом лягушки обездвиживались обычным способом путем разрушения спинного мозга. Затем после обнажения продолговатого мозга к нему подводились тонкие серебряные электроды, соединенные со вторичной катушкой индукционного аппарата. В качестве первичного тока использовался постоянный ток от аккумуляторов с напряжением 1,2 в. Раздражение производилось при помощи индукционного тока вторичной катушки силы, немного превышающей пороговую; расстояние между катушками составляло 10 см.

Всегда препарировались параллельно 2 или 3 лягушки, из которых 1 или 2 служили контролем, а одна была подопытной. Для опыта подбирались лягушки одинаковые по полу, приблизительно одинаковые по величине и с примерно одинаковой частотой сокращений сердца.

У подопытного животного производили раздражение продолговатого мозга в течение 3, 5 или 10 сек. в разных опытах. После замыкания тока сердце подопытной лягушки останавливалось. По истечении времени раздражения, отмечавшегося секундомером с точностью до 0,1 сек., сердце подопытной лягушки и нормально работавшие сердца контрольных лягушек как можно быстрее изолировались и бросались в сосуд с жидким воздухом. Полученные затем срезы немедленно подвергались описанной выше обработке для гистохимического выявления SH-групп.

Предварительные контрольные опыты показали, что содержание «свободных» SH-групп в срезах сердец различных нормальных лягушек, даже если они сокращались с разным ритмом (например, с одним сокращением в 1,5 сек. и в 4—5 сек.; с одним сокращением в 2 сек. и в 3 сек.), было одинаковым.

Результаты, полученные в опытах с раздражением блуждающего нерва лягушки, сведены в табл. 1, в которой данные сгруппированы по продолжительности раздражения вагусного центра.

Из приведенных данных следует, что при кратковременном (3 сек.) раздражении блуждающего нерва, сопровождавшемся кратковременной остановкой сердца, содержание «свободных» SH-групп в контрольных сердцах было больше, чем в подопытных. Раздражение блуждающего нерва и следующая за ним остановка сердца вызывали в этих случаях некоторое снижение содержания «свободных» SH-групп.

Таблица 1

Влияние раздражения блуждающего нерва на окисляемость феррицианидом SH-групп в сердечной ткани лягушки (определения феррицианидным гистохимическим методом)

| Дата | Результат | Дата | Результат | Дата | Результат |
|---|---|---|---|---|---|
| Раздражение 3 сек. | | Раздражение 5 сек. | | Раздражение 10 сек. | |
| 28 XI 1951 г. | — | 19 XII 1951 г. | — | 19 XII 1951 г. | + |
| 1 XII | — | 22 XII | ~ | 22 XII | + |
| 23 II 1952 г. | — | 14 II 1952 г. | + | 8 III 1952 г. | + |
| 1 III | — | 16 II | + | 15 III | + |
| 15 III | — | 12 II | + | | |

Примечание. Разница в окраске срезов между сердцами подопытных лягушек и контрольных в случае большего содержания «свободных» SH-групп у подопытных животных обозначена знаком плюс, в случае меньшей — знаком минус; неопределенные результаты обозначены знаком ~.

При несколько же более продолжительном раздражении (5 сек.) результаты оказались неопределенными: в одном опыте из пяти содержание «свободных» SH-групп оказалось, как и при 3-секундном раздражении, меньше в подопытном сердце; в одном опыте разницы не было обнаружено, а в трех остальных оказались более интенсивно окрашенными срезы сердец подопытных лягушек.

Наконец, наиболее длительное в наших опытах 10-секундное раздражение вместе с длительной остановкой сердца во всех 4 опытах вызывало явное увеличение содержания окисляемых феррицианидом SH-групп в сердцах, подвергавшихся вагусному раздражению.

Итак, суммарное влияние возбуждения блуждающего нерва и, соответственно, освобождения ацетилхолина на содержание «свободных» SH-групп сердечной ткани в условиях наших опытов чрезвычайно сильно зависело от продолжительности раздражения.

В живом функционирующем сердце лягушки in situ непосредственное влияние биохимических изменений, сопровождающих нервное раздражение, в частности на SH-группы, значительно осложнялось всей совокупностью происходящих в это время физиологических процессов. При кратковременном возбуждении блуждающего нерва в сердце подопытных животных в наших опытах прекращались ритмические сокращения, что не могло не сказываться и на состоянии обмена веществ всей ткани в целом (его снижении?) и на физико-химическом и химическом состоянии ее белков, в то время как сердца контрольных животных продолжали свою нормальную деятельность, ритмически сокращаясь в прежнем темпе. При более же длительном возбуждении освобождающийся ацетилхолин мог вызывать и иные, более глубокие (трофические?) изменения, приводящие, в частности, к увеличению реактивности SH-групп. Возможно, что разница в эффекте вагусного возбуждения при различной продолжительности раздражения (и различного повышения концентрации ацетилхолина в ткани) связана именно с этими обстоятельствами.

Таким образом, можно заключить, что произведенные нами гистохимические определения SH-групп, с одной стороны, подтвердили данные ([8], [9])

о том, что ацетилхолин обладает способностью повышать содержание «свободных» SH-групп в ряде биологических объектов. С другой стороны, было установлено, что подобный же эффект при определенных условиях может быть вызван и в неизолированных из организма тканях (в данном случае в сердце лягушки) при раздражении соответствующих холинэргических нервных элементов, которое сопровождается выделением в тканях определенного количества ацетилхолина. Эти данные делают еще более вероятным, что и в организме в физиологических условиях ацетилхолин может изменять реактивность SH-групп со всеми связанными с этим обширными биохимическими последствиями.

Институт морфологии животных им. А. Н. Северцова
Академии наук СССР

Поступило
12 X 1954

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Х. С. Коштоянц, Юбил. сборн., посвящ. 30-летию Великой Октябрьской социалистической революции, **2**, Изд. АН СССР, 1947, стр. 437. [2] Х. С. Коштоянц, Физиол. журн. СССР, **36**, 92 (1950). [3] Х. С. Коштоянц, Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция, М., 1951. [4] Т. М. Турпаев, Биохимия, **16**, 611, (1951). [5] Т. М. Турпаев, Тр. Инст. морф. животн. АН СССР, **6**, 19 (1952). [6] Т. М. Турпаев, ДАН, **94**, 973 (1954). [7] Т. М. Турпаев, Сов. по пробл. азот. обм. и нервн. регул. обм. вещ., тезисы докладов, Ереван, 1954, стр. 62. [8] Н. Н. Демин, Биохимическая активность ацетилхолина (материалы к изучению биохимических основ трофического влияния нервной системы). Автореф. диссертации, М., 1953. [9] Н. Н. Демин, Сов. по пробл. азот. обм. и нервн. регул. обм. вещ., тезисы докладов, Ереван, 1954, стр. 23. [10] M. Chèvremont, J. Frederic, Arch. de Biol., **54**, 589 (1943). [11] К. И. Страчицкий, Вопр. медиц. химии, **1**, в. 1—2, 292 (1949).