

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

А. Г. ТРЕТЬЯК, П. В. ГУЛАК, Г. В. КОССОВА, И. М. ЛИМАРЕНКО

К ВОПРОСУ О РОЛИ ФОСФОИНОЗИТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ИОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ В НЕРВНЫХ ВОЛОКНАХ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 14 II 1975)

Фосфоинозитиды (ФИ) в последнее время привлекают все возрастающее внимание исследователей, занимающихся изучением роли фосфолипидов (ФЛ) в возбудимых мембранах. Повышение скорости обмена в ответ на раздражение (¹⁻³), высокое сродство к двухвалентным металлам (⁴), участие в накоплении кальция микросомами (⁵), способность образовывать комплекс с белками (⁶) и быстрый посмертный гидролиз — все эти свойства указывают на активное участие этого класса ФЛ в функционировании нервной ткани. В 1969 г. Дьюрел и Гарланд выдвинули предположение о гидролизе ФИ в присутствии высоких концентраций ацетилхолина (АХ) (⁷). Вскоре Тордой было показано, что вызываемая АХ деполяризация постсинаптической мембраны происходит вследствие превращения трифосфоинозитидов (ТФИ) в дифосфоинозитиды (ДФИ), это превращение осуществляет фермент трифосфоинозитидфосфомоноэстераза, который активируется АХ (⁸). На основании этого мы предположили, что АХ в достаточно высоких концентрациях может вызвать изменение в ФИ составе мембран нервной волокна. Задачей данного исследования было изучить влияние изменения в составе ФИ мембран нервных волокон на их проницаемость для различных ионов.

В качестве объекта мы выбрали немиелинизированные нервы ходильных конечностей травяного краба *Scarcinus maenas*, так как в миелиновые нервные волокна АХ не проникает. В опыте и контроле использовались парные нервы от одного и того же животного. При изучении действия АХ применялся его 20 мМ раствор, приготовленный на физиологическом растворе для крабов. Ионный обмен изучался при помощи метода меченых атомов. Радиоактивность образцов определяли при помощи жидкостного сцинтилляционного спектрометра АВАК SL-40 4К. В опытах с ³²PO₄, ⁴²KCl, ⁴⁵CaCl₂ определяли выход данного радиоактивного изотопа из нервного волокна. Для этого отпрепарированные нервы помещали в физиологический раствор, содержащий 5–10 мкС на 1 мл удельной активности одного из этих изотопов. В таком растворе нервы находились в течение 1,5 час. Затем, после 15 мин. отмывки от внешнего радиоактивного загрязнения, объект помещали в тонкую стеклянную трубку, через которую в течение часа прокачивался физиологический раствор с АХ или без него. Радиоактивность, перешедшую в омывающий раствор, измеряли через каждые 3 мин. В опытах с ²²NaCl определяли его вход в нервное волокно. После 1,5-часовой преенкубации опытных и контрольных нервов в физиологическом растворе с удельной активностью ²²Na 0,7 мкС/мл опытные нервы перепосили в физиологический раствор той же удельной активности, но содержащей АХ. Контрольные нервы оставались в исходном растворе. Затем через определенные промежутки времени проводили измерение радиоактивности. В опытах по изучению влияния АХ на состав ФИ в нервных волокнах экстракцию и хроматографическое разделение ФЛ вели по методу Дворкина и Киселева (^{9, 10}). Хроматограммы сканировали на денситометре, а затем в полосах соответствующих ТФИ, монофосфоинозитидам (МФИ) и фосфатидилсерину (ФС) определяли содержание неорганического фосфо-

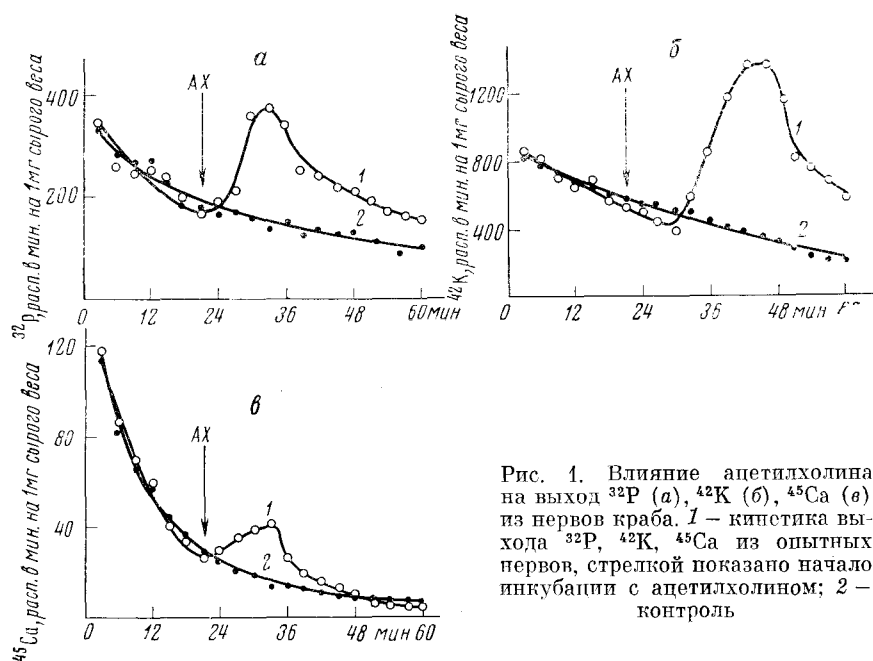


Рис. 1. Влияние ацетилхолина на выход ^{32}P (а), ^{42}K (б), ^{45}Ca (в) из нервов краба. 1 — кинетика выхода ^{32}P , ^{42}K , ^{45}Ca из опытных нервов, стрелкой показано начало инкубации с ацетилхолином; 2 — контроль

ра (P_i) по Бартлетту (¹¹). ДФИ присутствовали в количествах ниже порога чувствительности данных методов. Все результаты обрабатывали статистически по критерию Стюдента, уровень значимости не превышал 0,01.

Нервные волокна, помещенные в физиологический раствор, содержащий АХ, через 7–12 мин. теряли способность проводить возбуждение, и в них начиналось уменьшение содержания ТФИ. Содержание ФС оставалось постоянным в пределах 78,5 мкг P_i г сырого веса ткани. Отмытые после 15 мин. действия АХ нервные волокна через 10–20 мин. восстанавливали способность проводить возбуждение.

Время инкубации

с АХ, мин.

ТФИ, мкг P_i

МФИ, мкг P_i

	0	5	10	15	20	30
ТФИ, мкг P_i	9,7±0,8	9,4±0,9	7,9±0,8	6,2±0,6	4,9±0,7	3,5±0,6
МФИ, мкг P_i	15,1±1,2	14,8±0,9	16,2±1,1	16,9±1,5	17,3±1,4	18,5±1,2

На рис. 1 представлена кинетика выхода изотопов ^{32}P , ^{42}K и ^{45}Ca для опытных и контрольных нервов. Ниже приведены данные о количественном содержании изотона, оставшегося в контрольных и опытных нервах после 1 часа инкубации в проточной системе. За 100% принято количество изотона перед началом инкубации.

Вид изотопа	^{32}P	^{42}K	^{45}Ca
Опытные нервы, %	30	10	20
Контрольные нервы, %	65	54	34

Далее приведены данные относительно влияния АХ на вход ^{22}Na в нерв. После 1,5 часа инкубации нервных волокон в физиологическом растворе с ^{22}Na в них устанавливалось динамическое равновесие между содержанием ^{22}Na в нерве и окружающем растворе. Удельная активность ^{22}Na в первом волокне далее оставалась постоянной в пределах 500 распадов в минуту на 1 мг сырого веса ткани.

Время инкубации

с АХ, мин.

Удельная радио-
активность,

расп/мин

	5	10	15	20	25	30	45	60
Удельная радио-активность, расп/мин	520±25	466±30	599±18	659±35	691±40	822±45	925±41	1072±50

Приведенные данные указывают на то, что мембраны нервных волокон, обработанных АХ, становятся более проницаемыми для ионов K^+ , Na^+ и Ca^{2+} , чем контрольных нервов. Одновременно с увеличением ионной проницаемости в них происходит значительное уменьшение содержания ТФИ и некоторое увеличение содержания МФИ, по-видимому, вследствие перехода ТФИ в МФИ.

Сравнивая кинетику выхода ^{32}P , ^{42}K и ^{45}Ca , можно отметить совпадение во времени максимальной скорости выхода для ^{32}P и ^{45}Ca . Этот факт можно объяснить тем, что при гидролизе ТФИ из мембраны высвобождаются моноэстерные фосфаты ТФИ. В это же время происходит освобождение кальция, который ранее удерживали в мембране ТФИ. Максимальная скорость выхода ^{42}K отстает по времени от таковой для ^{32}P и ^{45}Ca и наблюдается при более низком содержании ТФИ в нерве.

Вход ^{22}Na в нервное волокно при действии АХ увеличивается значительно позднее, чем выход ^{42}K . Это может быть связано либо с ингибированием $(Na^+ + K^+)$ -АТФазы АХ (¹²), либо с тем, что ФИ непосредственно не связаны с регулированием проницаемости натриевых каналов. Следует отметить еще и тот факт, что исследованное в этой работе действие АХ полностью подавляется после предварительного выдерживания нервов в прозерине (10^{-4} М).

Суммируя полученные данные, мы можем заключить, что ФИ играют важную роль в проведении нервного импульса. Возможно, эта роль заключается в регулировании проницаемости калиевых каналов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. L. White, H. U. Schellhase, J. N. Hawthorne, J. Neurochem., v. 22, 1, 149 (1974).
- ² A. C. Birnberger, K. L. Birnberger et al., J. Neurochem., v. 18, 7, 1291 (1971).
- ³ А. Г. Третьяк, И. М. Лумаренко, Г. В. Коссова, ДАН, т. 221, № 1 (1975).
- ⁴ H. S. Hendrickson, J. L. Reinertsen, Biochem., v. 8, 12, 4855 (1969).
- ⁵ K. Nakamura, K. Konishi, J. Biochem., v. 76, 5, 1129 (1974).
- ⁶ H. S. Hendrickson, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 165, 668 (1969).
- ⁷ J. Durell, J. T. Garland, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 165, 743 (1969).
- ⁸ C. Torda, A Depolarization — Hyperpolarization Cycle. A Molecular Model. Chicago, 1972.
- ⁹ В. Я. Дворкин, Г. В. Киселев, Биохимия, т. 34, 6, 1245 (1969).
- ¹⁰ В. Я. Дворкин, Г. В. Киселев, Вопр. мед. хим., т. 19, 4, 431 (1973).
- ¹¹ G. R. Bartlett, J. Biol. Chem., v. 234, 466 (1959).
- ¹² З. П. Кометиани, А. А. Каландаришвили, Биофизика, т. 14, 2, 213 (1969).