

УДК 576.311.347

ПОГЛОЩЕНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ  
МЕМБРАННЫМИ ФРАКЦИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
КРЫСЫ И НЕРВА ЛЯГУШКИ

КРАВЦОВ Г. М., МАКСИМОВ Г. В., ОРЛОВ С. Н., ПОКУДИН Н. И.,  
РЯЖСКИЙ Г. Г., СВЕРДЛОВА Е. А.

С помощью метода меченых атомов исследовалось поглощение кальция мембранными фракциями, выделенными из головного мозга крысы и нервного волокна лягушки. Определены параметры АТР-независимого поглощения (связывания) и энергозависимого поглощения (аккумуляции) кальция плазматическими мембранами, митохондриями и микросомами этих тканей. Показана ведущая роль аккумуляции кальция митохондриями головного мозга и плазматическими мембранами нерва в регуляции концентрации свободного внутриклеточного кальция. Исследованы зависимости  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей способности этих фракций от концентрации АТР.

Проведение возбуждения нервной тканью сопровождается увеличением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток за счет его поступления по электрохимическому градиенту через потенциалзависимые каналы. Повышение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к увеличению проводимости аксолеммы для  $\text{K}^+$  и ее реполяризации, что во многом определяет параметры проведения возбуждения по нервным волокнам [1, 2]. Повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в нервном окончании служит триггерным сигналом для секреции нейротрансмиттеров [3, 4]. В обоих случаях механизмы, поддерживающие электрохимический градиент  $\text{Ca}^{2+}$ , изучены недостаточно. Предполагается, однако, что системы регуляции внутриклеточного распределения  $\text{Ca}^{2+}$  в нервном волокне и нервном окончании отличны друг от друга [5]. В связи с этим в настоящей работе исследовались особенности связывания и аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  мембранными фракциями, изолированными из нервного ствола лягушки и головного мозга крысы.

**Материалы и методы**

В работе использовались крысы-самцы линии Вистар в возрасте 12–16 недель и массой 200–250 г. Головной мозг крысы за исключением мозжечка (3,7–4,2 г) гомогенизировали в 5-ти объемах раствора, содержащего 0,32 М сахарозу и 5 мМ ХЕПЕС-НаОН буфер (рН 7,5; 0–2°). Для гомогенизации использовали гомогенизатор тefлон-стекло (клиренс 0,06–0,08 мм, 30 с, 600 об/мин). Гомогенат разбавляли сре-

дой гомогенизации в 2 раза и центрифугировали (3000 g, 5 мин). Полученный супернатант ссаждали (20 000 g, 25 мин; осадок Р, супернатант S). Дальнейшую обработку осадка Р проводили в соответствии с методом Whittaker [6]. Осадок доводили до объема 30 мл и наносили по 5 мл на ступенчатый градиент фикола (7,5—12—17%), приготовленного на основе среды гомогенизации. После центрифугирования (25 000 об/мин, ротор SW-27, «Beckman») фракции на границах раздела фаз сахароза—7,5; 7,5—12, 12—17% фикол и на дне пробирки (фракции К<sub>1</sub>, К<sub>2</sub>, К<sub>3</sub> и К<sub>4</sub> соответственно), а также ссадок, полученный при центрифугировании супернатанта S (30 000 g, 40 мин, фракция К<sub>5</sub>), промывали в 80 мл 0,32 M сахарозы (57 000 g, 30 мин). Супернатант, полученный после центрифугирования при 30 000 g, осаждали 90 мин при 120 000 g. Полученный осадок (фракция К<sub>6</sub>) промывали при тех же условиях центрифугирования 0,32 M сахарозой.

Фракцию К<sub>2</sub>, охарактеризованную как синаптосомы, подвергали гипоосмотическому шоку путем добавления 8-кратного объема 5 mM трип-НСl буфера (рН 8,1; 60 мин, постоянное перемешивание, 0,2°). Лизат центрифугировали (54 000 g, 30 мин), и осадок ресусспендировали в 0,32 M сахарозе и наносили по 5 мл в две пробирки, содержащие ступенчатый градиент фикола (3; 7,5; 9; 12; 17%), приготовленного на 0,32 M сахарозе. После центрифугирования (22 000 об/мин, 90 мин, ротор SW-27) фракции, находящиеся на границе раздела фаз сахароза-фикол (К<sub>7</sub>) и различных концентраций фикола (К<sub>7</sub>—К<sub>11</sub>), а также на дне пробирки (К<sub>12</sub>), промывали в 0,32 M сахарозе (110 000 g, 40 мин).

Отпрепарированные волокна седалищного нерва лягушки *Rana temporaria* измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Polytron (4 раза по 15 с с 15-секундными интервалами) в 10-кратном объеме среды, содержащей 0,25 M сахарозу, 10 mM трип-НСl буфер и 1 mM ЭДТА (рН 7,4; 0—2°), после чего гомогенат обрабатывали в гомогенизаторе тefлон-стекло (300 об/мин, 2 мин) и центрифугировали при 27 000 g 30 мин (осадок Р, супернатант S). Осадок Р ресусцинировали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Полученный супернатант центрифугировали (27 000 g, 30 мин), и осадок наносили на 7% раствор фикола, приготовленный в среде гомогенизации. После центрифугирования (22 000 об/мин, 45 мин, ротор SW-27) фракции, находящиеся над раствором фикола и на дне пробирки (фракции Л<sub>1</sub> и Л<sub>2</sub> соответственно), промывали раствором 0,25 M сахарозы (27 000 g, 30 мин). Супернатант S осаждали (120 000 g, 90 мин). Осадок (фракция Л<sub>3</sub>) промывали 0,25 M сахарозой при тех же условиях центрифугирования.

Определение активностей ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) описано ранее [7, 8]. Состав среды инкубации для определения активностей 5'-нуклеотидазы и глюкозо-6-фосфатазы предложен в ряде исследований [9, 10]. Содержание Р<sub>i</sub>, образовавшегося в этих реакциях, определяли по методу Rathbun и соавт. [11].

<sup>45</sup>Ca и мембранные фильтры (НЛ, Millipore, США) были использованы для определения связывания и аккумуляции Ca<sup>2+</sup> мембранны-

ми фракциями. Подробности этого подхода описаны нами ранее [12]. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [13].

### Результаты и обсуждение

**Характеристика мембранных фракций.** Среди фракций К<sub>1</sub>—К<sub>4</sub>, полученных на ступенчатом градиенте фикола, наибольшей активностью ферментов-маркеров плазматической мембраны обладает фракция К<sub>2</sub>. Активность СДГ в этой фракции составляет всего 7,2% от общей активности фермента во фракциях К<sub>1</sub>—К<sub>6</sub>. Эта фракция идентифицирована нами как синаптосомы, что согласуется с результатами других исследований [4, 6]. Фракция К<sub>4</sub> в большей степени обогащена митохондриями и составляет 48,4% от общей активности СДГ (табл. 1). Фракция К<sub>1</sub>, расположенная над верхней ступенькой фикола, по-видимому, образована миеллином [4]. Фракции К<sub>3</sub> и К<sub>5</sub> представляют собой смесь синаптосом и митохондрий. Во фракции К<sub>6</sub>, полученной после высокоскоростного центрифугирования, обнаружена максимальная активность 5'-нуклеотидазы и АХЭ; примесь митохондрий в этой фракции минимальна. Следует, однако, отметить, что эта фракция обладает также максимальной активностью глюкозо-6-фосфатазы — фермента, который в печени и почках считается маркером эндоплазматического ретикулума [10]. На основании полученных данных можно допустить, что в головном мозгу глюкозо-6-фосфатазной активностью обладают плазматические мембранные несинаптосомного происхождения, либо мембранны эндоплазматического ретикулума обогащены 5'-нуклеотидазой и АХЭ.

Таблица 1  
Относительная активность маркерных ферментов во фракциях мембран из мозга  
крысы (К<sub>1</sub>—К<sub>12</sub>) и керна лягушки (Л<sub>1</sub>—Л<sub>3</sub>)

Фракции	Белок (% к белку гомогената)	СДГ (%)	АХЭ (%)	5'-нуклеотидаза (%)	Глюкозо-6-фосфатаза (%)
К <sub>1</sub>	4,3	6,6	2,7	24	0,5
К <sub>2</sub>	2,1	7,2	8,9	25	0,5
К <sub>3</sub>	2,7	24,2	6,3	10	0,5
К <sub>4</sub>	1,5	48,4	3,4	2	—
К <sub>5</sub>	2,1	12,1	11,5	11	0,5
К <sub>6</sub>	2,2	1,5	67,2	28	98
К <sub>7</sub>	0,2	3,0	15,0	—	0
К <sub>8</sub>	0,6	5,0	60,0	—	0
К <sub>9</sub>	0,1	12,0	10,0	—	0
К <sub>10</sub>	0,2	10,0	5,0	—	0
К <sub>11</sub>	0,3	30,0	8,0	—	0
К <sub>12</sub>	0,4	40,0	2,0	—	0
Л <sub>1</sub>	11,2	3,0	0	74,0	—
Л <sub>2</sub>	1,2	94,0	0	7,0	—
Л <sub>3</sub>	7,3	3,0	0	19,0	—

Примечание. За 100% принято значение суммарной активности во фракциях (К<sub>1</sub>—К<sub>6</sub>), (К<sub>7</sub>—К<sub>12</sub>) и (Л<sub>1</sub>—Л<sub>3</sub>)

После лизиса синаптосом была исследована активность маркерных ферментов в субсинаптосомных фракциях (К<sub>7</sub>—К<sub>12</sub>). Максимальная активность АХЭ обнаружена во фракции К<sub>8</sub>, а СДГ — во фракции К<sub>12</sub>.

(табл. 1). Активности глюкозо-6-фосфатазы в этих фракциях не обнаружено.

Для характеристики мембранных фракций, полученных из нервного волокна лягушки, были определены активности СДГ и 5'-нуклеотилазы. Активности АХЭ как в гомогенате, так и во фракциях  $L_1$ — $L_3$  не обнаружено. Фракция  $L_1$ , составляющая основную часть мембранных фракций (11,2% от общего белка гомогената), обладает в 7—10 раз большей активностью 5'-нуклеотидазы, чем фракции  $L_2$  и  $L_3$ . Активность СДГ во фракции  $L_1$  минимальна, и ее можно охарактеризовать как обогащенную плазматическими мембранами (табл. 1). Фракция  $L_2$ , наименее представленная в нервном волокне (1,2% от общего белка гомогената), в основном содержит митохондрии. На это указывает высокая активность СДГ (в 30 раз выше, чем во фракциях  $L_1$  и  $L_3$ ). Полученная после центрифугирования при 120 000 g фракция микросом ( $L_3$ ) содержит минимальное количество митохондрий.

В дальнейших экспериментах включение  $^{45}\text{Ca}$  изучали во фракциях  $K_4$  (митохондрии),  $K_6$  (микросомы),  $K_8$  (плазматические мембранные синаптосомы),  $L_1$  (плазматические мембранные нервного волокна),  $L_2$  (митохондрии нервного волокна) и  $L_3$  (микросомы нервного волокна).

Таблица 2

Зависимость  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей способности мембранных фракций от состава среды инкубации

Ткань	Фракция	$\text{Ca}^{2+}$ (нмоль/мг белка/20 мин)				
Мозг	Плазматические мембранные	25	52	169	180	4,7
	Митохондрии	15	36	65	105	3,1
	Микросомы	14	30	49	75	1,9
Нерв	Плазматические мембранные	0,9	30	51	93	1,8
	Митохондрии	15	55	145	213	6,2
	Микросомы	0,8	19	32	41	1,2
Состав среды инкубации (мМ)		Имидазол- $\text{HCl}$ —40, pH 7,4				
		$\text{CaCl}_2$ —0,015	$\text{CaCl}_2$ —0,025	$\text{CaCl}_2$ —0,050	$\text{CaCl}_2$ —0,1	$\text{CaCl}_2$ —0,050 $\text{KCl}$ —120 $\text{NaCl}$ —20 $\text{MgCl}_2$ —5

**Связывание и аккумуляция кальция.** При сравнении АТР-независимого поглощения (связывания)  $^{45}\text{Ca}$  с вышеперечисленными фракциями оказалось, что плазматические мембранные синаптосомы и митохондрии нервного волокна обладают наибольшей  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей способностью (табл. 2). В случае, когда среда инкубации содержит  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , связывание кальция существенно снижается во всех мембранных фракциях, что свидетельствует о конкуренции этих катионов с  $\text{Ca}^{2+}$  за места связывания, либо об уменьшении доступности  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих групп под влиянием повышения ионной силы.

Как видно из рис. 1, связывание  $\text{Ca}^{2+}$  мембранами из нерва лягушки достигает насыщения уже к третьей минуте, в то время как энергозависимое поглощение (аккумуляция)  $\text{Ca}^{2+}$  более медленный процесс. Аналогичные результаты получены для мембран, выделенных из мозга крысы. В соответствии с результатами этих экспериментов для определения скорости аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  время инкубации ограничивали 1 мин, а для определения  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей способности (максимального количества  $\text{Ca}^{2+}$ , поглощаемого мембранный фракцией за счет функционирования  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем) — 20 мин. Данные этих определений приведены в табл. 3.

Таблица 3

$\text{Ca}^{2+}$ -связывающая способность (1),  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующая способность (2) и скорость аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  (3) мембранными фракциями первой ткани

Ткань	Фракция	$\text{Ca}^{2+}$ (нмоль/мг белка/20 мин)		
		1	2	3
Мозг	Митохондрии	3,2	334,2	170,1
	Плазматические мембранны	1,1	2,4	—
	Микросомы	1,9	120,2	48,1
Нерв	Митохондрии	0,9	19,7	9,3
	Плазматические мембранны	0,1	36,6	13,54
	Микросомы	0,2	23,17	5,79
Состав среды инкубации (мМ)	KCl—100; NaCl—20; MgCl <sub>2</sub> —5; CaCl <sub>2</sub> —0,012 имидацол—HCl— (рН 7,4)—40	Среда инкубации 1 +ATP—4 +K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3	Среда инкубации 2	

Примечание. В случае митохондрий среда инкубации содержала 5 мМ сукцинатата

Так как при физиологических концентрациях одновалентных катионов и  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающая способность мембранных фракций в 10—100 раз меньше их  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей способности (табл. 3), можно предположить, что основную роль в регуляции внутриклеточного распределения кальция в первой ткани выполняют энергозависимые процессы аккумуляции катиона во внутреннем пространстве везикул и органелл.

При пересчете на содержание белка максимальная  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующая способность среди мембранных фракций мозга обнаружена в митохондриях. В отличие от других возбудимых тканей (скелетная, сердечная и гладкая мускулатура), где наибольшая скорость аккумуляции кальция обнаружена в саркоплазматическом ретикулуме или сарколемме [12, 14], скорость аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях мозга в несколько раз выше, чем в микросомах (табл. 3). В связи с этим мы склонны полагать, что митохондрии головного мозга выполняют роль основной  $\text{Ca}^{2+}$ -буферной системы цитоплазмы.

$\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующая способность митохондрий первого волокна в два раза меньше, чем плазматических мембран, и в 1,5 раза меньше по сравнению с микросомами. В плазматических мембранах также обнаружена наибольшая скорость аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  (табл. 3). Таким образом, в отличие от головного мозга плазматические мембранные ствола вносят основной вклад в регуляцию внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при проведении возбуждения.

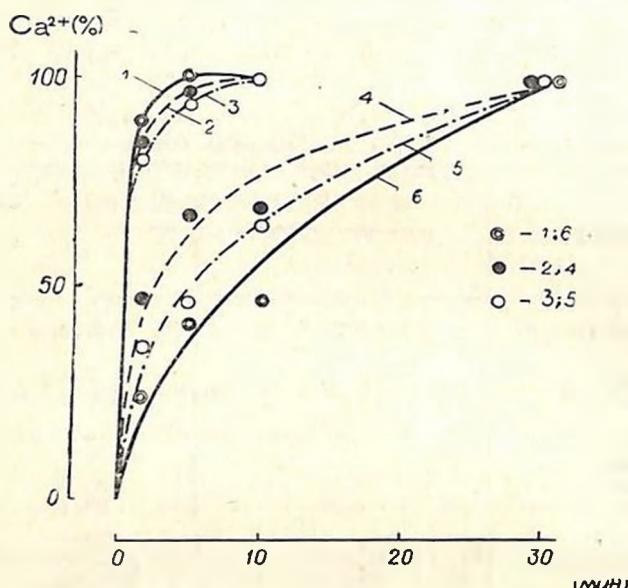


Рис. 1. Кинетика АТР-независимого связывания (1—3) и АТР-зависимой аккумуляции (4—6)  $\text{Ca}^{2+}$ -мембранными фракциями из первого волокна лягушки: 1, 6—микросомы; 2, 4—митохондрии; 3, 5—плазматические мембранные. Состав среды инкубации (мМ): 1—3—имидазол-НCl—40, KCl—100, NaCl—20, MgCl<sub>2</sub>—5, CaCl<sub>2</sub>—0,025, pH—7,4. В случаях 5, 6—то же+ATP—1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>—3; в случае 4—то же+сукцинат-На—5. За 100% принято максимальное значение  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей или  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей способности мембранный фракции

До сих пор мы рассматривали аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  мембранными фракциями при фиксированной концентрации АТР (4 мМ). Известно, однако, что при проведении возбуждения содержание АТР в первой ткани существенно снижается [15]. Как видно из рис. 2, при 2-кратном уменьшении концентрации АТР аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями первого волокна и микросомами мозга снижается на 70—90%, а плазматическими мембранными нерва на 40%. В других мембранных фракциях средство  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей системы к АТР гораздо выше.

Таким образом, системы регуляции концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в первых волокнах и головном мозгу имеют ряд особын-

ностей. АТР-зависимое поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  плазматическими мембранами—ведущий механизм снижения концентрации свободного кальция цитоплазмы при проведении нервного возбуждения в волокнах. В центральных нейронах ситуация меняется, и митохондрии выдвигаются на первый план как наиболее мощная и кинетически мобильная

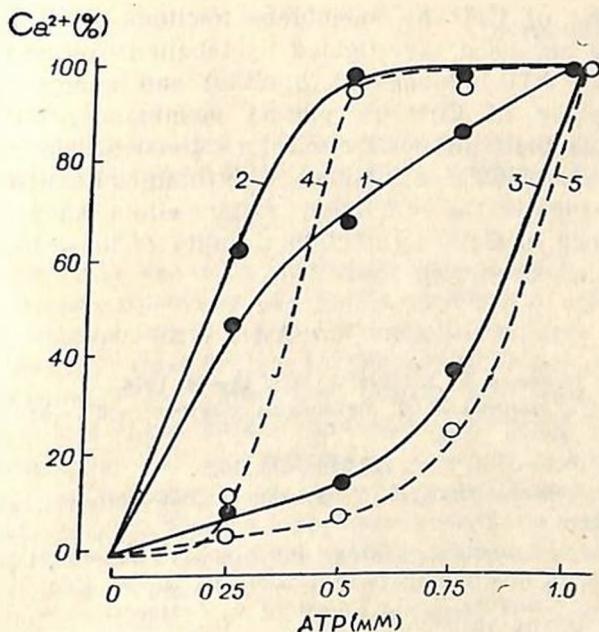


Рис. 2. Зависимость  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей способности мембранных фракций от концентрации АТР. 1—3—фракции от первого волокна лягушки: 1—плазматические мембранные, 2—микросомы, 3—митохондрии; 4, 5—фракции из мозга крысы: 4—митохондрии, 5—микросомы. Состав среды инкубации (мМ): имидазол-НCl—40; KCl—100; NaCl—20; MgCl<sub>2</sub>—5; CaCl<sub>2</sub>—0,025, pH—7,4. За 100% принята  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующая способность при концентрации АТР 1 мМ

система аккумуляции кальция. В первых волокнах от концентрации АТР существенно зависит  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующая способность митохондрий, а в центральных нейронах головного мозга— $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующая система микросом. По-видимому, именно эти системы ответственны за нарушение  $\text{Ca}^{2+}$ -баланса нервной ткани при ухудшении ее энергообеспечения.

# $\text{Ca}^{2+}$ UPTAKE BY MEMBRANE FRACTIONS OF RAT BRAIN AND FROG NERVE FILAMENTS

KRAVTSOV G. M., MAXIMOV G. V., ORLOV S. N., POKUDIN N. I.,  
RIYZHSKY G. G., SVERDLOVA E. A.

Department of Biology, Moscow State University, Moscow

The uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by membrane fractions of rat brain and frog nerve filaments has been investigated by labelled isotope technique. Parameters of both ATP-independent (binding) and energy-dependent (accumulation) uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by plasma membranes, mitochondria and microsomes from these tissues have been estimated. The results point to the essential role of  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation by brain mitochondria and nerve plasma membranes in the regulation of intracellular amount of free  $\text{Ca}^{2+}$ .

Dependence of  $\text{Ca}^{2+}$  accumulating ability of these fractions on ATP concentration has been also studied.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Meech R. W. Standon N. J. Physiol.*, 237, 43—44, 1974.
2. Костюк П. Г., Крышталь О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки, М., Наука, 1981.
3. *Rubin R. P. Pharmacol. Rev.*, 22, 389—428, 1970.
4. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
5. *Sulakhe P. V., St. Louis P. J. Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 35, 135—195, 1980.
6. *Whittaker V. P. Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 15, 39—96, 1965.
7. *Ellman G. L., Courtney K. D., Valentino A., Featherstone R. M. Biochem. Pharmacol.*, 7, 88—95, 1961.
8. *Cooper R. J. Biol. Educat.*, 1, 57—63, 1967.
9. *Potzier G., De Lean A. J. Biol. Chem.*, 249, 316—322, 1974.
10. *Walls M. A., Lygre D. O. Can. J. Biochem.*, 58, 1731—1748, 1980.
11. *Rathbun W. B., Bettach M. V. Analit. Biochem.*, 28, 436—442, 1969.
12. Кравцов Г. М., Покудин Н. И., Орлов С. Н. Биохимия, 44, 2058—2065, 1979.
13. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
14. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Постнов Ю. В. Кардиология, 20, 94—100, 1980.
15. Максимов Г. В. Доклады МОИП за 1972 г., секция биофизики, с. 45, 1974.

Биологический факультет МГУ,  
IV главное управление при МЗ СССР, Москва

Поступила 15. II 1982