

СОПРЯЖЕНИЕ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛЬНОГО ЦИКЛА
С ТРАНСПОРТОМ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ЧЕРЕЗ
МЕМБРАНУ СИНАПТОСОМ МОЗГА КРЫССЕЛИЩЕВА А. А., БРУСОВАННИК В. И., КРАВЦОВ Г. М.,
КОЗЛОВ Ю. П., ШРАГИН А. С.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Исследовали влияние активации фосфатидилинозитольного цикла на потенциалзависимое поступление Ca^{2+} в синапсомы головного мозга крыс. При инкубации синапсом с фосфолипазой С из *Bacillus cereus*, специфичной к фосфатидилинозитам, обнаружено увеличение поступления Ca^{2+} в синапсомы в среде, сохраняющей их трансмембранный потенциал. В среде, деполаризующей синаптические мембраны, влияния этой фосфолипазы на поступление Ca^{2+} не установлено. Фосфатидная кислота и фосфолипаза Д в низких концентрациях действовали аналогичным образом. Блокатор потенциалзависимых кальциевых каналов верапамил уменьшает активирующие эффекты фосфолипаз. Неспецифичные фосфолипазы С и A_2 не оказывали влияния на поступление Ca^{2+} в синапсомы, как и активатор протеникиназы С β -форболовый эфир, а также некоторые жирные кислоты. Напротив, арахидоновая кислота увеличивала накопление Ca^{2+} в среде, сохраняющей трансмембранный потенциал синапсом. Полученные данные свидетельствуют о возможности регуляции проницаемости синаптических мембран для Ca^{2+} продуктами метаболизма фосфатидилинозитов.

Взаимодействие некоторых агонистов с рецепторами клеточных мембран сопровождается увеличением скорости поступления Ca^{2+} через плазматические мембраны и активацией метаболизма минорных компонентов бисмембран—фосфатидилинозитов (ФИ). В этой связи было выдвинуто предположение о существовании сопряжения между этими процессами [1]. На первой стадии превращения ФИ и полифосфоинозитид (ПФИ) гидролизуются специфичной фосфолипазой С до 1,2-диглицерола (ДАГ), который остается в мембране, и инозитолфосфатов, растворимых в воде, на второй стадии реакции образуется фосфатидная кислота (ФК). Инозитолфосфаты и ФК регулируют уровень внутриклеточного кальция различными способами: ФК является ионофором кальция, а инозитолфосфаты вызывают выход кальция из эндоплазматического ретикулума в цитозоль. ДАГ активирует протеникиназу С, которая способна изменить (увеличивать или понижать) уровень внутриклеточного кальция [2]. Наряду с этим ДАГ может активировать фосфолипазу A_2 [3].

В последние годы резко возрос интерес к изучению метаболизма ФИ и ПФИ в нейрональной ткани. Показано, что ускорение распада и ресинтеза ФИ и ПФИ в нейрональной ткани может быть вызвано рядом факторов: медиаторами [4], деполяризацией мембран высокими концентрациями K^+ [5], обработкой синапсом электрическим током [6]. Однако оказалось, что существуют медиаторы, способные ускорять метаболизм ФИ, не оказывая какого-либо действия на базальное поступление ионов кальция в синапсомы [7]. Вопрос об участии метаболитов ФИ в регуляции поступления Ca^{2+} по потенциалзависимым каналам практически не исследован. В связи с этим задачей настоящей работы явилось установление принципиальной возможности участия гидрофобных метаболитов ФИ (ДАГ и ФК) в регуляции транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану изолированных нервных окончаний. Для этого исследовалось влияние специфичной к ФИ фосфолипазы С на поступление Ca^{2+} в синапсомы и ее действие сопоставлялось с действием фосфолипазы С, не обладающей такой специфичностью. Также было оценено влияние на транспорт Ca^{2+} арахидоновой кислоты, образование которой сопряжено с активацией ФИ-цикла.

Материалы и методы

В экспериментах использовали крыс-самцов линии Wistar массой 150—180 г. После декапитации животных готовили 10%-ный гомогенат коры мозга в среде, содержащей 0,32 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ трис, pH 7,4 в гомогенизаторе стекло-тефлон («В. Вагн», ФРГ). Гомогенат центрифугировали при 1300 g 5 мин, затем полученный супернатант осаждали при 18000 g 20 мин. Осадок грубой митохондриальной фракции наносили на ступенчатый сахарозный градиент и синапсомы далее выделяли по методу Hajos [8]. Выделенные синапсомы ресуспендировали в растворе сахарозы (0,32 М) и содержали при 0°. Все вышеописанные процедуры проводились с охлажденными растворами при температуре не выше 2°. Оценка сохранности синапсом и чистоты их выделения производили с помощью электронной микроскопии, а также определения уровня активности лактатдегидрогеназы [9] по фракции интактных синапсом в отсутствие и в присутствии 1%-ного тритона X-100. Белок определяли по методу Bradford [10]. Транспорт Ca^{2+} внутрь синапсом исследовали методом изотопной метки с помощью мембранной фильтрации. Вход [^{45}Ca] в синапсомы регистрировали в среде, сохраняющей трансмембранный потенциал (так называемой среде покоя) (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,3 мМ $MgCl_2$, 20 мМ HEPES, 5 мМ $NaHCO_3$, 10 мМ глюкозы) и в деполяризующей среде, которая отличалась от среды покоя только содержанием калия и натрия (145 мМ KCl и 5 мМ NaCl). В среде инкубации с соответствующими добавками синапсомы (1 мг белка/мл) выдерживали при 37° в течение 5 мин, после чего в ячейку вводили ^{45}Ca (2 μ Kи/мл), общая концентрация кальция составляла 1 мМ. Через 10 мин после начала инкубации с меткой аликвоты из инкубацион-

ной ячейки фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры («Millipore», США) типа HA с величиной пор 0.45 мкм или через стекловолокнистые фильтры типа GF/B («Whatman», Англия). Фильтры промывали средой, содержащей 0.32 М сахарозу, 3 мМ ЭДТА и 5 мМ трис (рН 7.4), а затем вносили во флаконы со сцинтилляционной смесью. Оценку радиоактивности проводили на счетчике «Rackbeta» («LKB», Швеция).

Степень гидролиза мембранных липидов фосфолипазами оценивали по накоплению продуктов гидролиза с помощью ТСХ. После экстракции смесью хлороформ/метанол (2:1) липиды разделяли на пластинках с силикагелем 60 («Merk», ФРГ) в одномерной системе хлороформ/метанол/вода (65:25:4) и двумерной системе хлороформ/метанол/28%-ный аммиак (65:25:5) и хлороформ/ацетон/метанол/уксусная кислота/вода (30:40:10:10:5). Затем определяли липидный фосфор в каждой фракции [11].

Были использованы следующие реактивы: ^{45}Ca («Amersham», Англия), НЕРЕС, сахараза, трис («Serva», ФРГ), изоптин (гидрохлорид верапамилла) («ЛЕК», СФНРЮ), β -форбол (12-О-тетрадеканонилфорбол-13-ацетат) и ЭДТА («Sigma», США), фосфолипаза С из *Bacillus cereus* («Boehringer», ФРГ), фосфатидная кислота («Koch Light», Англия), остальные реактивы отечественного производства.

Фосфолипаза Д из *Streptomyces cinnamomeus* и фосфолипаза С, специфичная к ФИ, из *Bacillus cereus* были выделены и любезно предоставлены нам В. В. Кулене (ВНИИПЭ, Вильнюс). Для получения цитозольной фракции мозг крыс гомогенизировался в гомогенизаторе стекло-стекло в среде выделения, содержащей 50 мМ трис, 1 мМ ЭДТА и 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида, рН 7.4. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 13000 g, затем к супернатанту добавляли 1 мМ уксусную кислоту так, чтобы рН раствора становился равным 5.0. Образующийся при этом осадок отделяли центрифугированием при 1000 g в течение 30 мин. Супернатант лиофилизировали. Фосфолипазная активность цитозольной фракции мозга определялась по отношению к ФИ, диспергированным в растворе дезоксихолата (4 мг/мл), в 50 мМ трис-буфере (рН 7.6), содержащем 4 мМ CaCl_2 . Аликвоты из реакционной ячейки объемом 0.15 мл экстрагировали 0.5 мл смеси хлороформ/метанол (2:1) и в них в водной и хлороформной фазе анализировалось содержание фосфора.

Результаты и обсуждение

Транспорт Ca^{2+} внутрь синапсом происходит по градиенту концентраций и в условиях покоя (в среде, содержащей большую концентрацию Na^+), и в условиях, когда трансмембранный потенциал мембран синапсом близок к нулю (в среде деполяризации, содержащей большую концентрацию K^+). В последнем случае поток Ca^{2+} внутрь синапсом вырастает в 2—3 раза [12]. В таблице приведены величины накопления Ca^{2+} внутри синапсом за 10 мин инкубации в присутствии [^{45}Ca].

Блокатор Ca^{2+} -каналов верапамила ($5 \cdot 10^{-4}$ М) ингибирует потенциалзависимое поступление Ca^{2+} в синапсомы в 3,5 раза и несколько понижает уровень накопления Ca^{2+} в среде покоя лишь на 25%.

Задачей данного исследования явилось выяснение возможности прямого воздействия метаболитов ФИ-цикла на потенциалзависимое поступление Ca^{2+} . Для этого изучали действие специфичной к ФИ фосфолипазы С, выделенной из *Bacillus cereus*, на поступление Ca^{2+} в синапто-

Таблица

Влияние фосфолипазы и метаболитов ФИ-цикла на поступление Ca^{2+} в синапсомы

Вводимые в среду инкубации вещества	Концентрация добавленных веществ	Наличие в среде инкубации верапамила	Накопление Ca^{2+} в синапсомых (нмоль/мг белка) за 10 мин	
			среда покоя	деполяризующая среда
Контроль	—	—	$6,8 \pm 0,6$	$15,0 \pm 1,0$
Контроль	—	+	$4,4 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,3$
Фосфолипаза С, специфичная к ФИ	1,2 мкг/мл	—	$11,6 \pm 0,6$	$14,8 \pm 0,8$
	1,2 мкг/мл	+	$4,6 \pm 0,4$	не измеряли
	0,6 мкг/мл	—	$9,2 \pm 0,3$	$12,7 \pm 0,5$
	0,06 мкг/мл	—	$7,1 \pm 0,7$	$15,0 \pm 1,5$
Цитозольная фракция гомогената мозга*	200,0 мкг/мл	—	$10,1 \pm 0,5$	$15,0 \pm 1,5$
Фосфолипаза С, неспецифичная	1,0 мкг/мл	—	$6,0 \pm 0,4$	$8,4 \pm 1,1$
	0,1 мкг/мл	—	$7,0 \pm 0,3$	$14,1 \pm 0,8$
Фосфолипаза Д	1 мкг/мл	—	67 ± 7	78 ± 8
	1 мкг/мл	+	56 ± 6	61 ± 6
	0,01 мкг/мл	—	$13,0 \pm 1,5$	$16,5 \pm 1,5$
	0,01 мкг/мл	+	$6,7 \pm 0,7$	$8,0 \pm 0,8$
Фосфатидная кислота	100 мкМ	—	$11,3 \pm 1,1$	$14,0 \pm 1,4$
	100 мкМ	+	$6,1 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,6$
β-форбол	50 нМ	—	$8,2 \pm 0,4$	$18,0 \pm 1,8$
Арахидоновая кислота	10 мкМ	—	$7,0 \pm 0,7$	$16,0 \pm 1,5$
	100 мкМ	—	$20,0 \pm 1,0$	$15,0 \pm 1,5$
Линолевая кислота	100 мкМ	—	$7,0 \pm 0,7$	$15,0 \pm 1,5$
Олеиновая кислота	100 мкМ	—	$7,0 \pm 0,7$	$15,0 \pm 1,5$
Фосфолипаза А ₂	10 мкг/мл	—	$5,2 \pm 0,5$	$13,0 \pm 1,3$

Примечание. Содержание фосфолипазы С, специфичной к ФИ, в цитозольной фракции гомогената мозга не превышает 5%.

сомы. Данный фермент гидролизует фракцию только ФИ и полифосфоинозитидов с образованием водорастворимых инозитолфосфатов и гидрофобного 1,2-диглицерина (1,2-ДАГ). Установлено, что специфичная фосфолипаза С вызывает активацию транспорта Ca^{2+} в концентрациях от 0,1 до 1,2 мкг/мл. Активирующий эффект фосфолипазы С блокировался верапамилом в тех концентрациях, что и потенциалзависимый транспорт Ca^{2+} . В среде деполяризации данная фосфолипаза достоверно не снижала уровень поступления Ca^{2+} в синапсомы (таблица). Необходимо было оценить, гидролизует ли эндогенная фосфолипаза С фракцию ФИ в тех же пределах, в каких это происходит при действии физиологических стимулов (например, гормонов или медиаторов). Однако эти попытки не увенчались успехом в связи с тем, что содержание ФИ в нейрональной ткани не превышает 6—8%, а процент гидролиза фос-

фолипидов фосфолипазой данного типа, как оказалось, невелик. Поэтому для приблизительной оценки активности фосфолипаз различных типов, применяемых в данной работе, измеряли процент гидролиза меченых фосфолипидов в составе липосом. В случае специфичной фосфолипазы С помимо определения процента гидролиза ФИ той концентрацией фермента, которая оказывала эффект на Ca^{2+} -транспорт в синапсомы, необходимо было подтвердить специфичность применяемого препарата. Дело в том, что из одного и того же источника—микроорганизма *Bacillus cereus* можно выделить две фосфолипазы С, различающиеся по специфичности. Поэтому фермент инкубировали одновременно с двумя различными фосфолипидами—фосфатидил-[^3H]инозитолом, содержащим метку в полярной части молекулы, и с негидролизующимся этим ферментом 1-пальмитоил-2-9-10[^3H]-пальмитоилфосфатидилхолином, который содержал метку в гидрофобной части молекулы. После окончания инкубации смесь экстрагировали смесью хлороформ/метанол (2:1) и измеряли наличие радиоактивности в водной и хлороформной фазе. Наличие меченого водорастворимого продукта свидетельствовало об активности специфичной фосфолипазы С, а отсутствие радиоактивности в хлороформной фазе—о том, что исследуемая специфичная фосфолипаза С не содержит в качестве примесей фосфолипазу С, не обладающую такой специфичностью.

При определении активности специфичной фосфолипазы С с помощью липосом, состоящих из ФХ и меченого [^3H]ФИ оказалось, что в течение 10 мин инкубации с ферментом гидролизует не более 2% ФИ. Если допустить, что активность специфичной фосфолипазы С не изменяется принципиально при переходе от липосом к синапсоме, то эффективность активации Ca^{2+} -транспорта под действием данного фермента получен в условиях очень ограниченного гидролиза фосфолипидов (менее 0,1%) при расчете на их суммарное содержание.

Фосфолипазы из различных источников, несмотря на одинаковую специфичность, могут сильно различаться не только по величине M_r , но и по своим свойствам. Поэтому представлялось целесообразным изучить влияние на Ca^{2+} -транспорт фермента не микробного происхождения, а фосфолипазы С из нейрональной ткани. По данным Irvine и соавт. [13], цитозольная фракция гомогената мозга крыс обладает фосфолипазной активностью, специфичной к ФИ. В данной работе исследовали действие цитозольной фракции гомогената мозга крыс на накопление Ca^{2+} синапсомы. Действие этой фракции гомогената мозга оказалось идентичным действию специфичной фосфолипазы С из *Bacillus cereus*: в среде покоя накопление Ca^{2+} синапсомы увеличивалось почти вдвое, а в деполяризующей среде несколько снижалось по отношению к контролю (таблица). Методом ТСХ на примере липосом различного фосфолипидного состава было установлено, что цитозольная фракция головного мозга крыс гидролизует только ФИ, причем процент гидролиза этих липидов не превышает 10%. При проведении этих экспериментов использовали ФИ, также выделенные из мозга крыс. Таким образом, вне зави-

симости от источника выделения и активности фосфолипазы С, специфичные к ФИ, способны активировать Ca^{2+} -транспорт в нервные окончания в условиях весьма небольшого гидролиза фосфолипидов.

Тем не менее нельзя исключить, что даже ограниченный липолиз синаптических мембран может сопровождаться их деструкцией, в результате чего мембраны могут стать проницаемыми для Ca^{2+} . Такие данные есть для фосфолипазы A_2 [14]. Поэтому представлялось необходимым выяснить, носит ли стимулирующий эффект фосфолипазы специфичный характер по отношению к ФИ или проницаемость для Ca^{2+} возникает при гидролизе и других липидов. Для этого изучали действие на Ca^{2+} -транспорт фосфолипазы С также из *Bacillus cereus*, но обладающей иной специфичностью: этот фермент способен гидролизовать фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА), но не ФИ (в дальнейшем этот фермент называем неспецифичной фосфолипазой С). Для того, чтобы можно было сопоставлять действие фосфолипаз С различной специфичности, были подобраны такие концентрации неспецифичной фосфолипазы С, при которых процент гидролиза меченого ФХ в составе липосом не превышал 5%. В этих условиях (концентрация неспецифичной фосфолипазы С составляла 0.1 мкг/мл) не наблюдали изменений в накоплении Ca^{2+} как в среде деполяризации, так и в среде покоя. При повышении концентрации данного фермента в среде, когда гидролизовался достаточно высокий процент липидов (20%) в среде деполяризации, наблюдалось снижение накопления Ca^{2+} синапсосомами (таблица).

Итак, при исследовании возможности сопряжения между ФИ-циклом и транспортом Ca^{2+} в синапсосомы, который активируется при деполяризации мембран большими концентрациями K^+ , установили различное по направленности действие специфичной к ФИ и неспецифичной фосфолипазы С. Отсюда следует, что накопление в мембране гидрофобного продукта гидролиза только ФИ-1,2-диацилглицерола (ДАГ) ответственно за этот эффект. Следует еще раз отметить, что активация метаболизма ФИ в клетке в физиологических условиях (при появлении сигнала на внешней поверхности плазматической мембраны) осуществляется эндогенной фосфолипазой С, расположенной с цитозольной стороны мембраны. В данной работе постановка эксперимента такова, что дает возможность изучать функциональную активность образующихся в ходе гидролиза гидрофобных продуктов, так как водорастворимые продукты гидролиза переходят во внешнюю среду.

Основные пути дальнейших превращений гидрофобного продукта гидролиза ФИ-1,2-ДАГ и возможные механизмы регуляции внутриклеточной концентрации K^+ продуктами его превращений разобраны в обзорной статье Berridge, Irvine [1]: а) активация 1,2-ДАГ протеникиназы С и возможное влияние на проницаемость мембран из-за изменений в уровне фосфорилирования белков; б) увеличение внутриклеточной концентрации свободной арахидоновой кислоты, которая может образовываться при содействии 1,2-ДАГ несколькими путями; в) превращение 1,2-ДАГ в

фосфатидную кислоту (ФК), которая, как показано на модельных системах, стимулирует вход Ca^{2+} в липосомы.

Для оценки первой возможности изучали действие на Ca^{2+} -транспорт активатора протеникиназы С β -форболового эфира, который имитирует действие 1,2-ДАГ на этот фермент. Показано, что инкубация синапсом с β -форболовым эфиром ($5 \cdot 10^{-8}$ М) достоверно не изменяла уровень накопления Ca^{2+} в обоих средах. Таким образом, изменение активности протеникиназы С и связанного с этим уровня фосфорилирования белков существенно не влияют на проницаемость мембран для Ca^{2+} в нервных окончаниях.

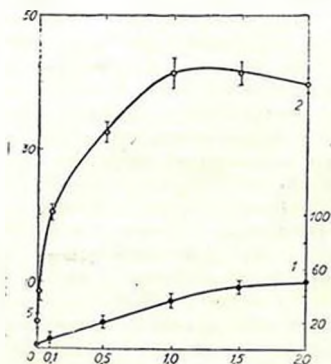


Рис. Влияние фосфолипазы Д на транспорт Ca^{2+} в синапсомы. Концентрационные зависимости степени гидролиза мембранных фосфолипидов (1) и накопления ^{45}Ca синапсомы (2). Время гидролиза синапсомных мембран фосфолипазой Д — 30 мин. По оси абсцисс — концентрация фосфолипазы Д в мкг/мг белка, по оси ординат слева — концентрация Ca^{2+} , пмоль/мг белка, справа — гидролиз фосфолипидов (%)

Для выявления возможной роли ФК, в которую может превращаться 1,2-ДАГ под действием соответствующей киназы, в данной работе было изучено действие ФК и фосфолипазы Д на поступление Ca^{2+} в синапсомы, так как этот фермент гидролизует фосфолипиды с образованием ФК. Добавление в среду инкубации, содержащей синапсомы, 100 мкМ ФК вызывает 50% стимуляцию входа Ca^{2+} в среде покоя. В меньших концентрациях ФК была неэффективна. Эти данные хорошо согласуются с ранее полученными результатами [15]. Активация входа Ca^{2+} с помощью ФК блокируется верапамилом ($5 \cdot 10^{-4}$ М). При деполяризации мембран синапсом ФК не влияла на величину накопления Ca^{2+} синапсомы (таблица).

Изучение действия фосфолипазы Д на поступление Ca^{2+} в синапсомы в среде покоя показало, что происходит значительное увеличение входа Ca^{2+} , величина которого зависит от концентрации фермента. Эта зависимость описывается кривой, которая выходит на плато в области концентраций фермента 1—2 мкг/мл (рис. 1). Методом ТСХ определили, что в этих условиях содержание ФК в мембране достигает 30—40%, что значительно превышает ее содержание в плазматических мембранах различных животных клеток даже при активации метаболизма ФН раз-

личными агентами [16]. Однако 2-кратное увеличение поступления Ca^{2+} наблюдается уже при добавлении малых концентраций фосфолипазы Д (0,01 мкг/мл), при которых в мембране образуются сравнительно небольшие количества ФК—до 5%. Следует отметить, что как и в случае со специфичной фосфолипазой С, активация транспорта Ca^{2+} в синапсосомы низкими концентрациями фосфолипазы Д снимается верапамилом ($5 \cdot 10^{-4}$ М). При больших процентах гидролиза фосфолипидов этим ферментом верапамил несколько снижает действие фосфолипазы Д, но не блокирует его полностью.

При деполяризации синаптической мембраны низкие концентрации фосфолипазы Д (0,02 мкг/мл) не оказывали достоверного стимулирующего эффекта на поступление Ca^{2+} , как и эндогенная ФК в условиях деполяризации. Однако в области концентраций от 0,5 до 1,5 мкг/мл этот фермент существенно повышал накопление Ca^{2+} синапсосомами, которое практически не уменьшалось при добавлении верапамила (таблица).

ФК, образующаяся под действием фосфолипазы Д, значительно более эффективна, чем экзогенная ФК, что может быть обусловлено рядом причин. Одна из них—это плохая встраиваемость экзогенной ФК в мембрану синапсосом. Другая—это различия в жирнокислотном составе экзогенной ФК из яиц и ФК, образующейся в мембране синапсосом под действием фосфолипазы Д. Известно, что уровень ненасыщенности жирнокислотных остатков в составе ФК существенным образом влияет на ее способность модифицировать структуру бислоя в модельных мембранах липосом [17].

Тот факт, что стимуляцию Ca^{2+} -транспорта вызывают и экзогенная ФК, и фосфолипаза Д, противоречит предположению Holmes, Yoss [18] о том, что способность ФК активировать перенос Ca^{2+} через мембрану обусловлена наличием продуктов ПОЛ в препарате ФК. Согласно нашим результатам исследований, в которых изучалось слияние липосом и их проницаемость для Ca^{2+} , ФК способна в низких концентрациях (1—2%) ускорять перенос Ca^{2+} через мембрану липосом, но при этом в мембранах должны присутствовать такие типы липидов, которые сами по себе могут образовывать небислойные структуры [19]. В состав синаптических мембран входит около 30% одного из таких «небислойных» липидов—фосфатидилэтаноламина, поэтому в синаптической мембране ионофорные свойства ФК в принципе могут реализоваться. Из данных, приведенных в таблице, следует, что эта ситуация наблюдается при достаточно больших процентах содержания ФК в мембране, когда она способна активировать перенос Ca^{2+} в синапсосомы и в среде покоя, и при деполяризации. В этих условиях блокирующее воздействие верапамила на этот процесс весьма незначительно. При добавлении же экзогенной ФК или низких концентраций фосфолипазы Д накопление Ca^{2+} синапсосомами активируется только в среде покоя.

Для клеток различных тканей известно, что ФИ-цикл сопряжен с каскадом арахидоновой кислоты и при активации метаболизма ФИ уровень арахидоновой кислоты в клетке повышается. Кроме того, для

нейрональной ткани показана активация фосфолипазы A_2 в процессе синаптической передачи, в результате чего высвобождается свободная арахидоновая кислота [20]. Как уже говорилось, 1,2-ДАГ способен активировать этот процесс. Для выявления такого действия 1,2-ДАГ было изучено влияние арахидоновой кислоты на поступление Ca^{2+} в синапсосомы. Показано, что добавление арахидоновой кислоты ($1 \cdot 10^{-4} M$) в суспензии синапсосом оказывало тот же эффект, что и специфичная фосфолипаза C: накопление Ca^{2+} в среде покоя увеличивалось, а в среде деполяризации практически не изменялось. В меньших концентрациях арахидоновая кислота была неэффективна.

Известно, что жирные кислоты, обладающие поверхностно-активными свойствами, в больших концентрациях способны индуцировать проницаемость мембран для Ca^{2+} . Именно поэтому фосфолипаза A_2 вызывает вход Ca^{2+} в липосомы [14]. Чтобы выяснить, насколько специфично действие арахидоновой кислоты, в качестве контроля изучали действие двух других жирных кислот (линолевой и олеиновой) и фосфолипазы A_2 . Обе кислоты в концентрации $10^{-4} M$ не оказывали какого-либо эффекта на поступление Ca^{2+} в синапсосомы в обеих средах. Фосфолипаза A_2 в концентрации 10 мкг/мл не уменьшала накопление Ca^{2+} при деполяризации и в среде покоя. Методом ТСХ установили, что при использовании этого фермента в таких концентрациях гидролизуетс $\bar{a}$ до 30% фосфолипидов. На основании этих данных можно высказать предположение о том, что эффект арахидоновой кислоты не связан с хаотрическим действием жирных кислот. Активация транспорта Ca^{2+} в первые окончания при деполяризации мембраны является начальной стадией синаптической передачи; в отсутствие Ca^{2+} во внешней среде не происходит секретиции медиатора [21]. Механизм потенциалзависимого поступления Ca^{2+} в синапсосомы в настоящее время детально не изучен. По-видимому, накопление Ca^{2+} внутри синапсосом, определяемое с помощью ^{45}Ca , является суммарным результатом транспорта Ca^{2+} по потенциалзависимым каналам различных типов (быстрых и медленных) и по механизму Ca^{2+}/Na^{+} обмена. Отсутствие блокирующего действия дигидропиридинов на этот процесс в синапсосомах свидетельствует о том, что эти каналы по своей природе отличаются от таковых в нейроне и в сердечной мышце [22].

Для установления возможности участия метаболитов ФИ (1,2-ДАГ и ФК) в потенциалзависимом поступлении Ca^{2+} в синапсосомы использован фосфолипазу C, специфичную к ФИ, и фосфолипазу D. Обнаруженное усиление транспорта Ca^{2+} под действием этих ферментов и блокирование их действия верапамилом свидетельствует в пользу того, что увеличение содержания метаболитов ФИ в мембране в концентрациях, которые сопоставимы с физиологическими изменениями, действительно может активировать потенциалзависимое поступление Ca^{2+} . Доказательством этого служит и тот факт, что фосфолипаза C, не обладающая специфичностью, не оказывает какого-либо эффекта на транспорт Ca^{2+} .

Механизм влияния исследуемых соединений (1,2-ДАГ и ФК) на

транспорт Ca^{2+} в синапсомы может быть обусловлен способностью этих соединений модифицировать структурную организацию фосфолипидов в мембране. Выше приводились такие данные для ФК, полученные на модельных системах [17]. Аналогичные результаты были получены нами при исследовании структуры липосомальных мембран, содержащих низкие (1—2%) концентрации 1,2-ДАГ [23]. По-видимому, в биологических мембранах, где проницаемость для Ca^{2+} определяется функциональней активностью каналов, имеющих белковую природу, кратковременное повышение концентрации метаболитов ФИ индуцирует изменение структурной организации липидного окружения канала, тем самым влияя на его функциональную активность.

COUPLING OF PHOSPHATYDILINOSITOL CYCLE TO Ca^{2+} TRANSPORT THROUGH RAT BRAIN SYNAPTOSOMAL MEMBRANES

SELISHCHEVA A. A., BRUSOVANIK V. I., KRAVTSOV G. M.,
SCHKAGIN A. S., KOZLOV Yu. P.

M. V. Lomonosov State University, Moscow, USSR

The effects of phosphatidylinositol cycle on potential-dependent Ca^{2+} -influx into rat brain synaptosomes were studied. Treatment of synaptosomes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C resulted to an increase in synaptosomal Ca^{2+} content in the medium maintaining the transmembrane potential of synaptosomes. If synaptosomes were treated with specific phospholipase C in the depolarizing medium, no increase in Ca^{2+} transport was observed. Phosphatidic acid, phospholipase D at low concentrations and arachidonic acid produced the same effects as phospholipase C. Verapamil (a blocator of potential-dependent Ca^{2+} -channels) decreased or even completely abolished activating effects of all the compounds used. Phospholipase A at high concentrations stimulated Ca^{2+} influx into synaptosomes both in absence and in presence of transmembrane potential. Treatment with non-specific phospholipases A_2 and C, as well, as with α -phorbol or oleic and linolic acids did not lead to any changes in Ca^{2+} -transport into synaptosomes.

The results presented allow us to conclude that synaptosomal membrane permeability to Ca^{2+} ions is in some way coupled to phosphatidylinositol metabolism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berridge M. J., Irvine R. F. *Nature*, v. 312, p. 315—321, 1984.
2. Cooper R. H., Cell K. E., Williamson J. R. *J. Biol. Chem.*, v. 260, № 6, p. 3281—3288, 1985.
3. Lapetina E. J. *Life Sci.*, v. 3, № 11, p. 1011—1018, 1984.
4. Brown E., Kendall D. A., Nahorski S. I. *J. Neurochem.*, v. 42, p. 1379—1387; 1984.

5. Hawthorne J. N. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 8, p. 83—86, 1975.
6. Rickard M. R., Hawthorne J. N. *J. Neurochem.*, v. 30, p. 145—152, 1978.
7. Atlas N.—lu: Hight light in the reception. Amsterdam, Pergamon Press, 1983.
8. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, p. 485—489, 1975.
9. Fleming L. H., Hodach A. E., Reynolds N. S. *Brain Res.*, v. 202, № 2, p. 469—473, 1980.
10. Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, v. 72, № 2, p. 243—254, 1976.
11. Vaskovsky V., Kostetsky E. J., Vasendin I. V. *J. Chromatogr.*, v. 114, № 1, p. 129—141, 1975.
12. Blaustein M. P., Ector A. C. *Biochim. et biophys. acta*, v. 419, № 2, p. 295—308, 1976.
13. Irvine R. F., Hemington N., Dawson R. M. C. *Eur. J. Biochem.*, v. 99, № 3, p. 525—530, 1979.
14. Okimasu E., Shitruishi N., Kobayashi S. *FEBS Lett.*, v. 145, p. 82—86, 1982.
15. Harris R. A., Schmidt J., Hitzemann B. A., Hitzemann R. *J. Science*, v. 212, № 4500, p. 1290—1291, 1981.
16. Bogg J. M. *Can. J. Biochem.*, v. 58, № 10, p. 756—770, 1980.
17. Kouyouct R., Silvius J. R., Graham I., Pezolet M. *Biochemistry*, v. 24, p. 7132—7140, 1985.
18. Holmes R. P., Yoss N. L. *Nature*, v. 305, p. 223—224, 1983.
19. Шрагин А. С., Василенко Н. А., Селищев А. А., Шаси В. И. Докл. АН СССР, т. 281, вып. 1, с. 223—226, 1986.
20. Moskowitz N., Puzskln S., Schook W. *J. Neurochem.*, v. 41, p. 1576—1586, 1983.
21. Katz B., Miledt R. *J. Physiol (London)*, v. 195, p. 481—491, 1968.
22. Crebn J. A., Karobath M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 134, № 3, p. 1038—1047, 1981.
23. Шрагин А. С., Василенко Н. А., Селищев А. А., Шаси В. И. Биол. мембраны, т. 2, вып. 8, с. 789—794, 1985.

Поступила 15. V 1988