



ОБЗОРЫ

УДК 577.15:024

МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОИНОЗИТИДОВ И
НЕЙРОГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

ДОЛГО-САБУРОВ В. Б.

Институт токсикологии МЗ СССР, Ленинград

В обзоре обобщены литературные данные о роли метаболизма фосфоинозитидов в функционировании трансдуцирующих механизмов, сопряженных с воздействием нейромедиаторов на хеморепрессивные структуры.

Обсужден вопрос о вкладе продуктов распада фосфоинозитидов—диацилглицерина и инозит-1,4,5-трифосфата, накапливающихся в ответ на воздействие внешнего сигнала, в процессы трансинаптической регуляции биохимических систем иннервируемых клеток. Рассмотрены некоторые стороны взаимоотношения этих сигнальных молекул с другими системами «вторых мессенджеров» при реализации регулярных эффектов нервной импульсации.

Одним из принципиально важных аспектов проблемы регуляции биохимических систем клетки является анализ влияния НС на различные стороны обмена веществ. Эта проблема самым тесным образом сопряжена с концепцией трофической функции НС, решению которой посвящены классические исследования И. П. Павлова, Л. А. Орбели и А. Д. Сперанского. Успехи развития этой концепции в наше время обусловлены привлечением биохимических, фармакологических и молекулярно-биологических подходов. Существенным вкладом в теорию адаптационно-трофической функции НС является разработка представлений о трансинаптической регуляции метаболических механизмов клетки и их нейромедиаторном контроле.

В настоящее время достаточно хорошо известны структура самых различных нейромедиаторов, особенности их взаимодействия с соответствующими рецепторами, локализация последних в органах и тканях, а также сдвиги в состоянии обмена веществ в клетках-мишенях, развивающиеся в ответ на нервный импульс. Вместе с тем, недостаточно разработаны обобщенные представления о путях передачи информации с активной поверхности рецепторов после ее взаимодействия со специфическими лигандами к исполнительным биохимическим механизмам. Речь идет о системах, осуществляющих «пе-

перевод» с языка нервной импульсации на язык биохимических реакций аналогично тому, как в клетке осуществляется «перевод» с языка нуклеотидных триплетов ДНК на язык аминокислотной последовательности синтезируемого белка. Нам представляется удачным использование термина «системы трансинаптической трансдукции» («transducing system»), подчеркивающего их вклад в усиление и преобразование сигнала на пути между рецепторами плазматической мембраны и механизмами обмена веществ.

Существенный вклад в эту проблему был сделан в 60-ые годы Е. Сазерлендом, сформулировавшим представление о роли циклических нуклеотидов как «вторых мессенджеров», накапливающихся в ответ на нейромедиаторный или гормональный стимул («первый мессенджер») и осуществляющих связь между рецепторами и исполнительными системами. Однако циклическими нуклеотидами, как это становится все более понятным, не исчерпываются возможности трансинаптической регуляции. Чрезвычайно важную роль в этих процессах играют ионные механизмы. Не вызывает, в частности, сомнений значение ионов кальция в передаче нервного сигнала.

В последние годы все возрастающее внимание привлекает участие фосфоинозитидов (ФИ) плазматических мембран иннервируемых клеток в реализации получаемой рецепторным аппаратом информации. Многие десятилетия фосфолипиды, в том числе и ФИ, рассматривались только как структурные компоненты клеток и лишь относительно недавно стало ясно, что они являются важными участниками системы «вторых мессенджеров». Присутствие в мембранах фосфолипидов этого класса в значительной мере определяет возможность выполнения мембранными структурами контроля за транспортом ионов, ориентацию векторially направленных ферментных белков, передачу внутрь клетки поступающей трансинаптической информации в виде нервных и гормональных сигналов.

Преобладающим ФИ мембран эукариотических клеток является фосфатидилинозит (монофосфоинозитид), на долю которого приходится до 12% общего содержания фосфолипидов [1, 2]. В нервной и в некоторых других тканях фосфатидилинозит может подвергаться фосфорилированию в фосфокиназной реакции с образованием фосфатидилинозит-4-фосфата и фосфатидилинозит-4,5-дифосфата. Вопросы, касающиеся структуры и метаболических превращений ФИ, достаточно подробно изложены в ряде обзоров [3—10]. Структурные формулы ФИ и их метаболитов представлены на рис. 1.

Не касаясь специально вопросов обмена ФИ и его энзимологии, следует заметить, что присутствующие в мембранах киназы, осуществляющие фосфорилирование монофосфоинозитида с образованием ди- и трифосфорилированных форм, а также специфические фосфоэстеразы (фосфатидилинозитфосфоэстераза, КФ 3. 1. 4. 10.), осуществляющие гидролиз полифосфоинозитидов с накоплением диацилглицерина (ДГ) и инозит-1, 4, 5-трифосфата (ИТ), относятся к достаточно распространенным и активным ферментам [11, 12].

Около 30 лет назад было обнаружено, что АХ увеличивает *in vitro* включение ^{32}P в фосфатидную кислоту и фосфатидилинозит срезав поджелудочной железы [13—16]. Это увеличение сопровождалось снижением содержания в ткани фосфатидилинозита и накоплением фосфатидной кислоты и ДГ. Проведенные исследования позволили позднее выдвинуть концепцию, согласно которой первичной реакцией в цепи метаболических превращений ФИ в ответ на воздействие нейромедиаторов или гормонов является ферментативный гидролиз фосфатидилинозит-4, 5-дифосфата с образованием ИТ и ДГ. Последний, как оказалось, в дальнейшем участвует в ресинтезе фосфатидной кислоты и ФИ [5, 7, 10]. Именно эти два продукта распада полифосфоинозитидов—ИТ и ДГ и следует рассматривать как сигнальные молекулы, возникающие в результате взаимодействия агонистов с соответствующими рецепторами и, наряду с циклическими нуклеотидами, выполняющие роль «вторых мессенджеров».

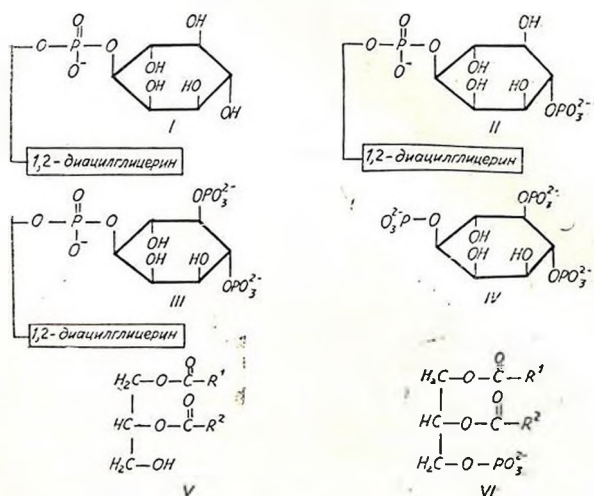


Рис. 1. Структура компонентов фосфоинозитидного цикла. I. Фосфатидилинозит; II. Фосфатидилинозит-4-фосфат; III. Фосфатидилинозит-4,5-дифосфат; IV. Инозит-1,4,5-трифосфат; V. Диацилглицерин; VI. Фосфатидная кислота

К числу агонистов, стимулирующих метаболизм мембранных ФИ, относят АХ [17, 18], норадреналин [19], гистамин [20], серотонин [21], а также ряд гормонов белковой природы (вещество Р, ангиотензин, панкреозимин, церулеин) и ростовых факторов [10]. Особенно подробно продемонстрирован вклад метаболизма ФИ в функционирование мускариночувствительных холинорецепторов, H_1 -рецепторов гистаминна и α_1 -адренорецепторов, то есть тех рецептивных структур, существенным моментом в деятельности которых является мо-

близация Ca^{2+} . В то же время следует иметь в виду, что сам по себе распад ФИ является процессом, не во всех случаях контролируемым изменениями концентрации Ca^{2+} [22, 23]. Достаточно напомнить, что Са-нонофор А23187 не стимулирует гидролиза. С другой стороны, для большинства биохимических систем показано, что в отсутствие Ca^{2+} ответ на воздействие агониста не развивается, хотя распад ФИ и имеет место. Важно подчеркнуть, что концентрационные зависимости насыщения рецептора агонистом и происходящего в результате этого распада ФИ совпадают [24]. Иными словами, приходится признать существование в клетках двух типов метаболизма ФИ: Ca^{2+} -зависимого и Ca^{2+} -независимого. К деятельности трансдуцирующих систем имеет отношение лишь Ca^{2+} -независимый распад ФИ, так как только он сопровождается накоплением информационно значимых сигнальных молекул—ИТ и ДГ.

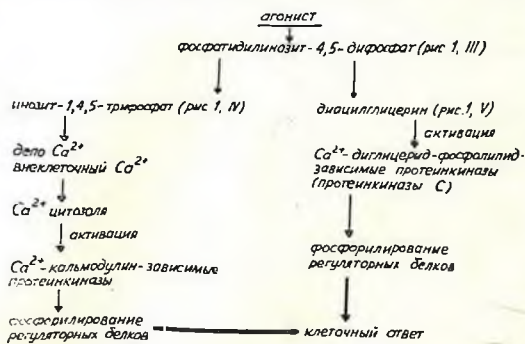


Рис. 2. Участие метаболитов фосфоинозитидов в регуляции биохимических систем клеток

Таким образом, следует считать достаточно обоснованным представление о том, что в результате взаимодействия группы рецепторов с соответствующими агонистами происходит распад фосфатидилинозит-4, 5-дифосфата с образованием ДГ и ИТ (рис. 2). Эти метаболиты удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к «вторым мессенджерам» — они быстро накапливаются в ответ на нейромедиаторный сигнал, активны в весьма малых концентрациях и быстро исчезают по мере прекращения действия стимула.

Michell, Kirk [5, 25] выдвинули гипотезу, в соответствии с которой ИТ играет принципиально важную роль в мобилизации Ca^{2+} то есть освобождения его из внутриклеточных депо и транспорте внутрь клетки. Уместно еще раз напомнить, что стимулируемый агонистами распад ФИ («фосфоинозитидный ответ» по Michell) сопряжен только с теми рецепторами, возбуждение которых сопровождается мобилизацией пониженого Ca^{2+} , то есть его накоплением в цитозоле. Это сопряжение достаточно специфично, например, из 4-х известных основных типов адренорецепторов (α_1 , α_2 , β_1 и β_2) оно характер-

но только для α_1 -типа, а из 2-х типов холинорецептора—только для мускариночувствительного, но не для никотиночувствительного.

Механизмы, обеспечивающие накопление Ca^{2+} в цитозоле под действием ИТ, во многом остаются не ясными. Вместе с тем, многочисленными экспериментами *in vitro* показано, что добавление к суспензии клеток ИТ вызывает освобождение Ca^{2+} из его депо в эндоплазматическом ретикулуме [26, 27]. Замена ИТ на инозит-1, 4-дифосфат, инозит-1-фосфат или инозит-1, 2-циклофосфат не сопровождалась мобилизацией Ca^{2+} [26].

Не исключено, что ИТ тормозит обратный захват Ca^{2+} и его секвестрацию в клетке или, напротив, стимулирует перемещение в цитозоль из депо с участием механизмов активного транспорта. Что же касается возможного вклада ИТ в повышение содержания Ca^{2+} в цитозоле клеток за счет поступления ионы через плазматическую мембрану, то этот вопрос остается открытым. Высказываемые ранее предположения о том, что накопление внутриклеточного Ca^{2+} происходит в результате реализации ионофорного эффекта фосфатидной кислоты, образующейся, наряду с ИТ и ДГ, в процессе метаболизма ФИ при возбуждении рецепторов [28—30], более поздними экспериментами не подтвердились [31, 32]. Так или иначе, существование корреляции между накоплением в клетке ИТ в ответ на возбуждение хеморецептивных структур и мобилизацией Ca^{2+} является установленным фактом и подтверждением функционирования ИТ как участника сигнального каскада.

Как уже упоминалось, вторым продуктом стимулированного агонистами распада ФИ является ДГ (рис. 2). По-видимому, его основной функцией как «второго мессенджера» является активация протеинкиназы С, стимулирующей фосфорилирование ряда белков [33—35]. Обращает на себя внимание достаточно широкое распространение этого фермента у организмов, находящихся на различных ступенях эволюционной лестницы. В нервных клетках его активность наиболее высока. Активация протеинкиназы С представляется весьма сложным процессом, требующим для своего осуществления ионов кальция и фосфатидилсерина. Существенным этапом активации является отщепление от молекулы неактивного фермента пептида с M_r 26 кД под действием Ca^{2+} -зависимой тирозиновой протеазы с образованием конечного продукта с M_r 51 кД. Роль же ДГ сводится, по-видимому, к формированию активного комплекса протеинкиназы С с фосфолипидом и Ca^{2+} .

Протеинкиназа С характеризуется широкой субстратной специфичностью. Объектом ее воздействия являются как мембранные белки, так и белки цитозоля, в особенности в ткани мозга. В ряде случаев удастся продемонстрировать существование общих субстратов для протеинкиназы С и сАМР-зависимых протеинкиназ, хотя участки фосфорилирования неидентичны [36].

Мы намеренно оставляем в стороне вопрос о не имеющих отно-

шения к метаболизму ФИ мембраносвязанной и растворимой форм. Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протениназ, играющих важную роль в деятельности трансдуцирующих систем клетки — их значение для реализации эффектов нейромедиаторов и иных «первых мессенджеров» достаточно подробно изложенный в ряде обзоров [36—38].

Рассматривая роль ДГ в регуляции метаболизма клетки в ответ на стимулирующее воздействие агониста, не следует забывать еще об одной возможности, заложенной непосредственно в самой структуре этого соединения. Известно, что один из ацильных радикалов, этерифицирующий второй гидроксил глицерина (рис. 1, I) в структуре ФИ, представлен арахидоновой кислотой, освобождающейся при повышении концентрации Ca^{2+} в цитозоле [39, 40]. Накопление в клетке этой жирной кислоты вызывает активацию гуанилатциклазы с последующим увеличением содержания cGMP. Этот путь регуляции имеет особое значение для реализации эффектов холинергической импульсации и функции мускариночувствительных холинорецепторов, а также H_2 -рецепторов гистамина, для которых роль cGMP как «второго мессенджера» общепризнана. Таким образом, эти хеморецептивные системы достаточно своеобразны в том отношении, что, в отличие от других рецепторов нейромедиаторов, активация циклаз и последующий синтез cAMP или cGMP осуществляются как непосредственно в процессе взаимодействия агониста с рецептором, так и через стадию образования арахидоната, сопряженного с метаболизмом ФИ.

Следовательно, в системе «вторых мессенджеров» существует определенная функциональная взаимосвязь, обеспечивающая полноту транссинаптической регуляции биохимических процессов в клетке.

Не в полной мере является изученным вопрос о взаимном влиянии рецепторов различных классов на стимулируемый их агонистами распад ФИ. В частности, в опытах на сегментах экзоринового отдела поджелудочной железы мыши [41] было показано, что при совместном воздействии карбамилхолина и холецистокинин-октапептида, для возбуждения рецепторов которых характерен «фосфоинозитидный ответ», распад ФИ стимулировался в меньшей степени, чем при изолированном добавлении их к инкубационной среде. Очевидно, что активация рецепторов одного класса существенно влияет на интенсивность распада ФИ при возбуждении рецепторов другого класса. По-видимому, метаболизм мембранных ФИ можно рассматривать как один из этапов в транссинаптической регуляции функций, на котором реализуются рецепторные взаимоотношения.

Несмотря на логичность и экспериментальную обоснованность современных представлений о вкладе структурных компонентов фосфоинозитидов, накапливающихся в клетке в ответ на нейромедиаторный стимул, в регуляцию принципиально важных биохимических систем, многое в этом аспекте все еще остается не вполне ясным. В частности, совершенно не разработан вопрос о состоянии обмена фосфоинозитидов в условиях прекращения нервной импульсации в ре-

зультате хирургической денервации или при блокаде постсинаптических рецепторов фармакологическими препаратами. Вместе с тем, накапливаются экспериментальные материалы, свидетельствующие о том, что процесс взаимодействия блокатора с рецептором не есть акт простого экранирования его активной поверхности с последующим предотвращением взаимодействия с соответствующим нейромедиатором или фармакологическим агонистом. Нам, в частности, удалось показать [42—47], что введение крысам холинблокаторов в специально подобранных дозах стимулировало транскрипцию в гепатоцитах аналогично тому, как это происходило при введении холиномиметиков АХ или карбамилхолина. При этом оказалось, что по некоторым параметрам спектр продуктов стимуляции генома холинолитиками и холиномиметиками не идентичен. Состояние системы циклических нуклеотидов под влиянием холинолитиков и холиномиметиков также менялось неоднозначно. Следовательно, блокада рецепторов (по крайней мере, мускариночувствительных рецепторов гепатоцитов) является функционально значимым процессом, реализующимся в активации определенных локусов генома. Совершенно очевидно, что анализ состояния метаболизма фосфоинозитидов в условиях блокады рецепторов и его связи в этой ситуации с другими компонентами трансдуцирующих систем (циклические нуклеотиды, Ca^{2+}) представил бы значительный интерес для понимания вклада нервной импульсации в регуляцию обмена веществ.

Сегодня уже стало привычным считать реальной возможностью фармакологического воздействия на состояние трансинаптической регуляции биохимических систем клетки введением агонистов или антагонистов ряда хеморецептивных структур. Адрено- и холиномиметики и соответствующие им блокаторы, агонисты и антагонисты рецепторов гистамина и другие препараты, механизм действия которых заключается во взаимодействии с активной поверхностью рецепторов, прочно вошли в арсенал клинической фармакологии. Накоплен достаточный опыт изменения с помощью лекарств содержания циклических нуклеотидов, главным образом сАМР, как молекул, участвующих в сопряжении рецепторов нейромедиаторов и исполнительных биохимических механизмов. Однако до сих пор не предпринимались попытки использовать возможность воздействия на содержание в иннервируемых тканях структурных компонентов фосфоинозитидов— ИТ и ДГ, по праву считающихся, наряду с сАМР и сGMP, «вторыми мессенджерами». Между тем этот подход вполне заслуживает того, чтобы стать объектом самого пристального рассмотрения в рамках проблемы, касающейся влияния нервной импульсации на биохимические механизмы. Это явилось бы не только существенным вкладом в понимание путей влияния ИС на регуляцию функциональной активности иннервируемых клеток, но и позволило бы с новых позиций подойти к лекарственной терапии нейротрофических расстройств.

METABOLISM OF PHOSPHOINOSITIDES AND NEUROHUMORAL REGULATION

DOLGO-SABUROV V. B.

Institute of Toxicology, USSR Ministry of Health, Leningrad

The review covers literature data about the role of phosphoinositides in the functioning of chemoreceptors. Involvement of diacylglycerine and inositol-1,4,5-triphosphate in the transsynaptic regulation of target cells is discussed. Interaction of these compounds that are the products of phosphoinositides catabolism with other substances belonging to the group of "second messengers" is considered.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. White D. A.—In: Form and function of phospholipides (eds. G. B. Ansell, J. N. Hawthorne, R. M. C. Dawson) Amsterdam, p. 441—482, 1973.
2. Holub B. J. Adv. Nutr. Res., v. 4, p. 107—141, 1982.
3. Hawthorne J. N. Vitam. Hormon., v. 22, p. 57—79, 1964.
4. Hawthorne J. N., White D. A. Vitam. Hormon., v. 33, p. 529—573, 1975.
5. Michell R. H. Biochim. et biophys. acta, v. 415, p. 81—147, 1975.
6. Berridge M. J. Trends Pharmacol. Sci., v. 1, p. 419—424, 1980.
7. Berridge M. J. Mol. Cell Endocrinol., v. 24, p. 115—140, 1981.
8. Abdel-Latif A.—In: Handbook of Neurochemistry, v. 3, p. 91—131, N.-Y., 1983.
9. Berridge M. J. Biochem. J., v. 220, № 2, p. 345—360, 1984.
10. Farese R. V. Metabolism, v. 32, № 6, p. 628—641, 1983.
11. Hawthorne J. N., Pickard M. R. J. Neurochem., v. 32, p. 5—14, 1979.
12. Kikkawa U., Takai Y., Mtnakuchi R. J. Biol. Chem., v. 257, p. 13341—13348, 1982.
13. Hokin M., Hokin L. J. Biol. Chem., v. 203, p. 967—977, 1953.
14. Hokin L. E., Hokin M. R. J. Physiol., v. 132, p. 442—453, 1956.
15. Hokin L., Hokin M. J. Biol. Chem., v. 233, p. 805—810, 1958.
16. Hokin M. R., Hokin L. R. J. Biol. Chem., v. 233, p. 967—977, 1958.
17. Weiss S. J., Putney J. W. Biochem. J., v. 194, p. 463—468, 1981.
18. Brown S. L., Brown J. H. Mol. Pharmacol., v. 24, p. 351—356, 1983.
19. Uchida T., Ito H., Baum B. J., Roth G. S., Filburn C. R., Sacktor B. Mol. Pharmacol., v. 21, p. 128—138, 1982.
20. Jones L. M., Cockcroft S., Michell R. H. Biochem. J., v. 182, p. 669—676, 1979.
21. Fain J. N., Berridge M. J. Biochem. J., v. 180, p. 655—661, 1979.
22. Aub Debra L., Putney J. W. Biochem. J., v. 225, № 1, p. 263—266, 1985.
23. Yano K., Higashida H., Nozawa Y. FEBS Lett., v. 183, № 2, p. 235—239, 1985.
24. Jones L. M., Kirk Ch., Michell R. H. Scand. J. Gastroenterol., v. 17, Suppl. 72, p. 33, 1982.
25. Michell R. H., Kirk C. Y. Trends Pharmacol. Sci., v. 2, № 4, p. 86—89, 1981.
26. Streib H., Schultz I. Am. J. Physiol., v. 245, p. 347—357, 1983.
27. Joseph S. K., Thomas A. F., Williams R. J., Irwin R., Williamson J. R. J. Biol. Chem., v. 259, p. 3077—3081, 1984.
28. Michell R. H., Jafferji S. S., Jones L. M. Adv. Exp. Med., v. 83, p. 447—465, 1977.
29. Lapetina E. G. Trends Pharmacol. Sci., v. 3, p. 115—118, 1982.
30. Lapetina E. G. Life Sci., v. 32, p. 2069—2082, 1983.
31. Holmes R. P., Yoss N. L. Nature, v. 305, p. 637—638, 1983.

32. Ichida S., Moriyama M., Hirooka Y., Otazaki Y., Yoshitaka K. *Europ. J. Pharmacol.*, v. 106, p. 657—660, 1985.
33. Kishimoto A., Takai Y., Mori T., Kikkawa U., Nishizuka Y. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 2273—2276, 1980.
34. Takai Y., Minakuchi R., Kikkawa U., Sano K., Kaibuchi K., Yu B., Matsubara T., Nishizuka Y. *Progr. Brain Res.*, v. 56, p. 283—301, 1982.
35. Nishizuka Y. *Trends Biochem. Sci.*, v. 8, p. 13—16, 1983.
36. Schulman H. *TIPS Rev.*, v. 5, p. 188—192, 1984.
37. Cheung W. Y. *J. Cycl. Nucl. Res.*, v. 7, p. 71—84, 1981.
38. Эттингер Р. Н., Нейрохимия, № 3, с. 405—418, 1984.
39. Dawson R. M. C., Hemington N. L., Irvine R. F. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 117, p. 196—201, 1984.
40. Snider R. M., McKinney M., Forray C., Richelson E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biol. Sci.*, v. 81, p. 3905—3909, 1984.
41. Roberts M. L., Tennes K. A. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 109, № 2, p. 293—296, 1985.
42. Долго-Сабуров В. Б., Подосиновикова Н. П., Матвеев В. И., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 9, с. 294—297, 1979.
43. Долго-Сабуров В. Б., Матвеев В. И., Подосиновикова Н. П. *Докл. АН СССР*, т. 264, № 4, с. 994—996, 1982.
44. Долго-Сабуров В. Б., Матвеев В. И., Подосиновикова Н. П., *Вопр. мед. химии*, № 5, с. 83—87, 1984.
45. Долго-Сабуров В. Б., Подосиновикова Н. П., Матвеев В. И., *Тез. докл. XVI конф. ФЕБО*, Москва, с. 313, 1984.
46. Голиков С. Н., Долго-Сабуров В. Б., Елаев Н. Р., Кулешов В. И., —В кн.: *Холинэргическая регуляция биохимических систем клетки*, с. 124—140, Медицина, М., 1985.

Поступила 7. I 1986

УДК 577.112.083.42.398—088.1/543.545

УЛЬТРАМИКРОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПОЛИПЕПТИДОВ НЕЙРОННЫХ СТРУКТУР

ШТАРК М. Б., МИКИЧУР Н. И., БЕРЕТЕННИКОВ Н. А.

Институт автоматики и электрометрии СО АН СССР
Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

В обзоре анализируются различные варианты ультрамикроелектрофоретических исследований применительно к изучению белков и пептидов различных структур мозга, нервных клеток и их органелл. Рассматриваются последовательные процедуры выделения структур и их обработка; обсуждаются особенности фракционирования материала в гелях с однородным диаметром пор и градиентных гелях, бескапиллярные варианты ультрамикроелектрофореза, комбинированные методы анализа, встречная иммунодиффузия, импергнационные методы, их возможности и перспективы использования.