

54
A86



БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ТРЕТЬЯК Александр Георгиевич

О РОЛИ ФОСФОИНОЗИТИДОВ В ТРАНСПОРТЕ ИОНОВ ЧЕРЕЗ
ВОЗБУДИМЫЕ МЕМБРАНЫ

/Биофизика 03.00.02/

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Диссертационная работа выполнена на кафедре биофизики и в лаборатории "Физико-химии биологических мембран" Биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В.Ломоносова /зав. кафедрой - доктор биологических наук, профессор Б.Н.Тарусов, зав. лаб. - доктор биологических наук, профессор Ю.П.Козлов/.

Научные руководители:

кандидат биологических наук, ст. науч. сотр. И.М. Лимаренко,
доктор биологических наук, профессор Ю.П. Козлов.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук Д.А. Четвериков,
кандидат биологических наук В.Ф. Антонов.

Ведущее предприятие - Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова АН СССР, Ленинград.

Автореферат разослан " " _____ 197 г.

Защита состоится " " _____ 197 г.

на заседании Секционного Совета по зоологии физиолого-биохимического отделения Биологического факультета МГУ по адресу: Москва, Г17234, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ.

Учёный секретарь Совета

Н.С.Александрова

В настоящее время фосфоинозитиды привлекают всё большее внимание исследователей, интересующихся ролью фосфолипидов в биологических мембранах. Пристальное внимание к этим соединениям вызвано тем, что фосфоинозитиды, будучи необходимыми компонентами мембран многих растительных и животных клеток, метаболически весьма активны /Ansell и др., 1973/. Характерная черта фосфоинозитидов - высокая скорость обмена их фосфатных групп /Michell, 1975/. В нервной ткани, например, она намного превосходит скорость обмена всех остальных фосфолипидов /Прохорова, 1974/. В зависимости от числа фосфатных групп, входящих в молекулу, фосфоинозитиды делятся на моно-, ди- и трифосфоинозитиды /МЭИ, ДЭИ и ТЭИ/, последние два соединения получили название полифосфоинозитидов. Благодаря наличию диссоциированных фосфатных групп, молекулы полифосфоинозитидов имеют хорошо выраженные анионные и гидрофильные свойства. Эта особенность в значительной мере определяет способность полифосфоинозитидов образовывать прочные комплексы с белками, а также высокое их сродство к ионам двухвалентных металлов, и в первую очередь к ионам кальция /Hendrickson, Reinertsen, 1969/. Взаимопревращение фосфоинозитидов в мембранах и обусловленное ими освобождение и связывание Ca^{2+} может изменять проницаемость мембран /Buckley, 1974; Nakamura, Konishi, 1974/. В 60-х годах Хокини /Хокин Л., Хокин М., 1967/ предложили гипотезу об участии фосфатидной кислоты и монофосфоинозитидов в активном транспорте ионов натрия и, хотя в дальнейшем эта гипотеза была отклонена /Durell, Garland, 1969/, не оставляет сомнения тот факт, что цикл фосфатидная кислота - монофосфоинозитиды играет важную роль в функционировании железистой ткани /Michell, 1975/. С



другой стороны, фосфоинозитиды, наряду с другими кислыми фосфолипидами, могут восстанавливать активность $(Na^+ + K^+)$ -АТФазы после её обработки фосфолипазой А /Nokin, Nezhin, 1972/. Недавно было высказано предположение о том, что обмен фосфатных групп в полифосфоинозитидах связан с процессами переноса энергии в нервной ткани /Дворкин, Киселёв, 1973/. Высказываются также представления об участии полифосфоинозитидов в регуляции проницаемости возбудимых мембран /Hawthorne, Kai, 1970; Torda, 1974/. Однако, несмотря на то, что количество работ посвящённых фосфоинозитидам, непрерывно растёт, остаётся ещё нерешённой проблема их участия как в энергетических, так и транспортных процессах в клетке.

Поэтому, в данной работе было проведено изучение роли фосфоинозитидов в пассивном транспорте ионов через возбудимые мембраны периферических нервных волокон.

Конкретно перед нами стояли следующие вопросы:

1. Как влияет электрическое раздражение периферических нервных волокон, отличающихся друг от друга по степени миелинизации на метаболизм фосфоинозитидов?
2. Сказывается ли изменение в содержании фосфоинозитидов на скорости перемещения калия и натрия через поверхностные мембраны нервных волокон?
3. Приводит ли уменьшение в содержании полифосфоинозитидов к деполяризации нервного волокна?
4. Как вещества, повышающие скорость обмена фосфоинозитидов, влияют на реполяризацию нервных волокон?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами нашего исследования служили слабомиелинизированные нервы ходильных конечностей черноморских крабов *Carcinus maenas* и *Eriphia spinifrons* и миелинизированные седативные нервы травяной лягушки *Rana temporaria*. В экспериментах по отведению потенциала покоя использовали крабов *E. spinifrons*; нервные волокна выделяли из проксимального членика ноги и из них pripravляли препарат одиночного нервного волокна. Потенциал покоя отводили при помощи стеклянных микроэлектродов, заполненных KCl, с диаметром кончика 0,3-0,5 мк. Все остальные эксперименты с нервами крабов проводили на нервных волокнах *C. maenas*.

Для регистрации потенциала действия и стимуляции нервных волокон использовали осциллограф С1-19Б и стимулятор ЭС1-1. Нервы помещали в камеру с платиновыми электродами, насыщенную водянными парами. Частота стимуляции для нервов лягушки равнялась 100 им./сек., а для нервов краба 50 им./сек.

Скорость обмена фосфолипидов определяли по включению в них ^{32}P . О содержании фосфолипидов судили по количеству неорганического фосфора в соответствующих данным фосфолипидам участках хроматограмм.

Экстракцию фосфолипидов проводили подкисленной смесью хлороформ-метанола, полученный экстракт подвергали хроматографическому разделению на обработанной формальдегидом бумаге по методу В.Я. Дворкина и Г.В. Киселёва /1973/. При идентификации отдельных фракций фосфоинозитидов использовали в качестве "свидетелей" ТФИ, ДФИ и МФИ.

Ионный обмен изучали при помощи метода меченых атомов. В опытах с $Na_2H^{32}PO_4$, ^{42}KCl и $^{45}CaCl_2$ определяли выход данного изото-

на из нервного волокна краба. Для этого нервные волокна помещали в физиологический раствор, содержащий 5-10 мккюри/мл удельной радиоактивности двух из этих изотопов. В таком растворе нервы находились 1,5 часа. Затем после 15 минутной отмывки от внешнего радиоактивного загрязнения, объект помещали в тонкую стеклянную трубку, через которую в течение часа прокачивался физиологический раствор с ацетилхолином и без него со скоростью 0,4 мл/мин. Радиоактивность, переходящую в омывающий раствор, измеряли через каждые 5 минут. Такая постановка опыта дала нам возможность сравнивать скорости выхода сразу двух изотопов в одних и тех же нервных волокнах при идентичных условиях. В опытах с $^{22}\text{NaCl}$ определяли его вход в нервное волокно. После 1,5 часовой инкубации опытных и контрольных нервов в физиологическом растворе с удельной радиоактивностью ^{22}Na 0,7 мккюри/мл, опытные черви переносили в физиологический раствор той же удельной радиоактивности, но содержащий ацетилхолин; контрольные нервы оставляли в исходном растворе. Затем, через определенные промежутки времени, проводили измерение радиоактивности, находившейся в нервах.

Содержание ^{32}P , ^{42}K , ^{45}Ca и ^{22}Na в образцах определяли радиометрически с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра АВАС ВЛ-40 4к /фирмы "Intertechnique"/, по методике, дающей возможность регистрировать в одной пробе сразу два вида изотопа.

Для определения холинэстеразной активности был использован метод pH метрии. Нервные волокна гомогенизировали в среде состава: 0,1 М NaCl 1 мМ имидазола, pH 7,4. Для измерения скорости закисления среды инкубации в процессе гидролиза ацетилхолина или бутирилхолина была использована установка для непрерывной регистрации небольших изменений pH в среде инкубации /Голдирев и др., 1969/.

Измерения проводили в термостатируемой ячейке при температуре 37°C .

Полученные результаты обработаны статистически. Результаты считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Изучение метаболизма фосфоинозитидов при электрической стимуляции нервных волокон.

Одно из косвенных подтверждений участия фосфоинозитидов в процессах, связанных с проведением электрического импульса по нерву, можно получить при сравнении скорости обмена этих фосфолипидов в нервных волокнах в покое и при электрической стимуляции. Как правило, о скоростях обмена фосфолипидов при этом процессе судили на основании либо изменения содержания отдельных липидов, либо - по включению ^{32}P . В этом отношении наиболее значительные изменения претерпевают фосфоинозитиды /Birnbberger и др., 1971; White и др., 1974/ и фосфатидилсерин /Book и др., 1972/. Представляло интерес выяснить: как сказывается проведение возбуждения по нерву на содержание фосфолипидов и скорости включения ^{32}P в фосфоинозитидные и фосфатидилсериновую фракции нервных волокон краба и лягушки.

Наши исследования показали, что после инкубации нервов лягушки и краба в соответствующих физиологических растворах, содержащих ^{32}P , наибольшее абсолютное количество радиоактивного изотопа

па приходилось на фракцию трифосфоинозитидов. Было установлено, что в ответ на электрическую стимуляцию происходит статистически достоверное увеличение включения ^{32}P лишь в трифосфоинозитидную фракцию обоих типов нервов /рис.1; 2/. Полученные данные совпадают с результатами исследования влияния электрической стимуляции на метаболизм фосфолипидов в слабомиелинизированном блуждающем нерве крысы /Whate и др., 1974/. Однако из полученной нами и имеющейся в литературе информации нельзя заключить, чем обусловлено увеличение включения ^{32}P в трифосфоинозитиды: это может быть связано с повышением содержания этих липидов, или с увеличением скорости их обмена. Нами показано, что увеличение включения ^{32}P обусловлено изменениями в скорости обмена трифосфоинозитидов, так как содержание этих липидов при раздражении нервных волокон остаётся без изменения /рис.1; 2/

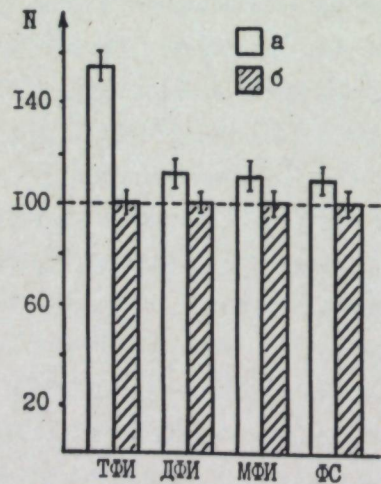


Рис.1. Влияние 120 минутного раздражения на количественный состав и включение ^{32}P в фосфоинозитидные и фосфатидилсериновую фракции нервных волокон лягушки.

N - изменение удельной радиоактивности /а/ и содержания /б/ фосфолипидов в % к контролю при электрической стимуляции нервных волокон. Показана средняя квадратичная ошибка. Зарегистрировано статистически достоверное увеличение включения метки во фракцию трифосфоинозитидов. $P < 0,01$.

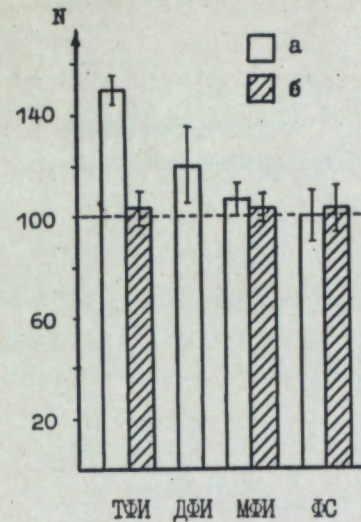


Рис. 2. Влияние 15 минутного раздражения на количественный состав и включение ^{32}P в фосфоинозитидные и фосфатидилсериновую фракции нервных волокон краба

N - изменение удельной радиоактивности /а/ и содержания /б/ фосфолипидов в % к контролю при электрической стимуляции нервных волокон. Показана средняя квадратичная ошибка. Зарегистрировано статистически достоверное увеличение включения метки во фракцию трифосфоинозитидов. $P < 0,01$.

Из полученных нами данных следует, что обмен трифосфоинозитидов в слабомиелинизированных нервах краба оказался выше скорости обмена этой фракции в миелинизированных нервах лягушки. Так 50% увеличение включения ^{32}P в трифосфоинозитиды нервов краба наступало через 15 минут после начала стимуляции. В нервах лягушки такое же увеличение отмечалось лишь после двухчасового электрического раздражения. Принимая во внимание наличие двух метаболических пулов полифосфоинозитидов /активного - в нейрилемме и менее активного - в миелине /Gonzales-Sastre и др., 1971//, можно объяснить различие в скорости включения ^{32}P в нервные волокна лягушки и краба экранирующим эффектом полифосфоинозитидного пула, связанного с миелином.

Нами не было обнаружено каких-либо значительных изменений в метаболизме фосфатидилсерина в ответ на проведение возбуждения

по нервным волокнам лягушки.

На основании установленного нами изменения в метаболизме трифосфоинозитидов в ответ на электрическую стимуляцию, можно предположить, что эти фосфолипиды участвуют в процессе проведения нервного импульса.

2. Изучение взаимосвязи метаболизма фосфоинозитидов и скорости перемещения калия и натрия через поверхностные мембраны нервных волокон.

Одним из подходов к изучению роли того или иного соединения в механизмах функционирования клеток является нахождение веществ, способных оказывать специфическое влияние на метаболизм изучаемого соединения. В 1969 году Дьюрелл и Гарланд /Durell, Garland, 1969/ предложили гипотетическую схему фосфодиэстеразного расщепления фосфоинозитидов. Они предположили, что ацетилхолин в высоких, возможно, не физиологических концентрациях, может вызывать уменьшение содержания фосфоинозитидов в мембранах нервных клеток. В 1972 году Торда /Torda, 1972/ показала, что ацетилхолин вызывает фосфомоноэстеразное расщепление трифосфоинозитидов посредством активации фермента трифосфоинозитидфосфомоноэстеразы.

Мы обнаружили, что 20 мМ раствор ацетилхолина вызывает блокирование проведения возбуждения по слабомиелинизированному нервному волокну краба через 7 - 12 минут после начала инкубации нервов в физиологическом растворе, содержащем ацетилхолин. В то же время, ацетилхолин даже в концентрации 40 мМ не оказывал заметного действия на проведение возбуждения по миелинизированным нервам лягушки. Одновременно с блокированием проведения возбуждения, ацетилхолин вызывает значительное снижение содержания

трифосфоинозитидов и некоторое повышение содержания монофосфоинозитидов в нервных волокнах краба /табл. I/. Повышение содер-

Таблица I.

Влияние ацетилхолина на содержание трифосфоинозитидов и монофосфоинозитидов в нервных волокнах краба *Callinectes maenas* в мкг неорганического фосфора на г сырого веса ткани.

Время инкубации с АХ /мин/	0	5	10	15	20	30
ТФИ	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	15,1±1,2	14,8±0,9	16,2±1,1	16,9±1,5	17,3±1,4	18,5±1,2

хания монофосфоинозитидов может быть обусловлено переходом ТФИ → ДФИ → МФИ, но может и отразить ответную реакцию нервного волокна на уменьшение содержания в нём трифосфоинозитидов.

Встаёт вопрос, почему лишь высокие концентрации ацетилхолина вызывают изменение в проведении возбуждения и в содержании трифосфоинозитидов в нервных волокнах краба? На наш взгляд, это может быть связано с действием ацетилхолина внутри нервного волокна. Плазматические мембраны почти непроницаемы для ацетилхолина /Михельсон, Зеймаль, 1970/. Всё же, по-видимому, какая-то часть этого соединения способна проникнуть внутрь слабомиелинизированных нервных волокон краба, тогда как в миелинизированные нервы лягушки ацетилхолин проникнуть не может.

Мы показали, что целые нервные волокна краба не гидролизуют ацетилхолин, находящийся в физиологическом растворе. Однако гомотенат нервных волокон проявляет высокую холинэстеразную активность, которая в наших условиях равнялась 0,2 мкмоль ацилхолина на мг белка в мин. Проверен - ингибитор ацетилхолинэстеразы,

полностью защищает нервные волокна от действия, оказываемого на них ацетилхолином, а также на 90% ингибирует холинэстеразную активность гомогената нервных волокон. Эти эксперименты показывают, что ацетилхолин, вероятно, оказывает своё действие внутри нервного волокна.

Основываясь на этом, мы полагаем, что именно высокая наружная концентрация ацетилхолина создаёт возможность для проникновения части, возможно сравнительно небольшой, ацетилхолина внутрь нерва. При этом 15 - 20 минутное пребывание нервных волокон в физиологическом растворе, содержащем ацетилхолин, не приводит к необратимым последствиям, так как при последующей отмывке нервы восстанавливают способность генерировать потенциал действия.

Как мы уже отмечали, прозерин полностью защищает нервное волокно от действия ацетилхолина. Этот факт предполагает участие ацетилхолинэстеразы в разрушении трифосфоинозитидов. Действительно, мы обнаружили значительную холинэстеразную активность в гомогенате нервных волокон краба, из которой 90% падает на долю ацетилхолинэстеразы. Для того, чтобы более подробно разобраться в действии ацетилхолина, мы провели изучение влияния некоторых веществ, связанных с действием ацетилхолина в нервной ткани, на способность нервных волокон проводить возбуждение, а также влияние этих веществ на эффект ацетилхолина.

Кроме прозерина, нами были исследованы: бутирилхолин - аналог ацетилхолина, который не гидролизуется ацетилхолинэстеразой /Михельсон, Зеймаль, 1970/, атропин - блокатор мускариновых холинэргических рецепторов и никотин - блокатор никотиновых холинэргических рецепторов, а также холинхлорид - продукт гидролиза ацетилхолина.

Прозерин в концентрации 10^{-4} М не оказывал влияния на проведение возбуждения по нервному волокну, но как уже отмечалось, полностью предотвращал эффект ацетилхолина. Бутирилхолин, который в концентрации 20 мМ не оказывал действия на проведение возбуждения по нерву, гидролизуется гомогенатом нервных волокон в 10 раз слабее, чем ацетилхолин. Холинхлорид в концентрации 20 мМ также не оказывал влияния на величину потенциала действия нервных волокон краба.

Атропин и никотин не оказывали действия на гидролиз трифосфоинозитидов в присутствии ацетилхолина и не влияли на проведение возбуждения по нерву краба.

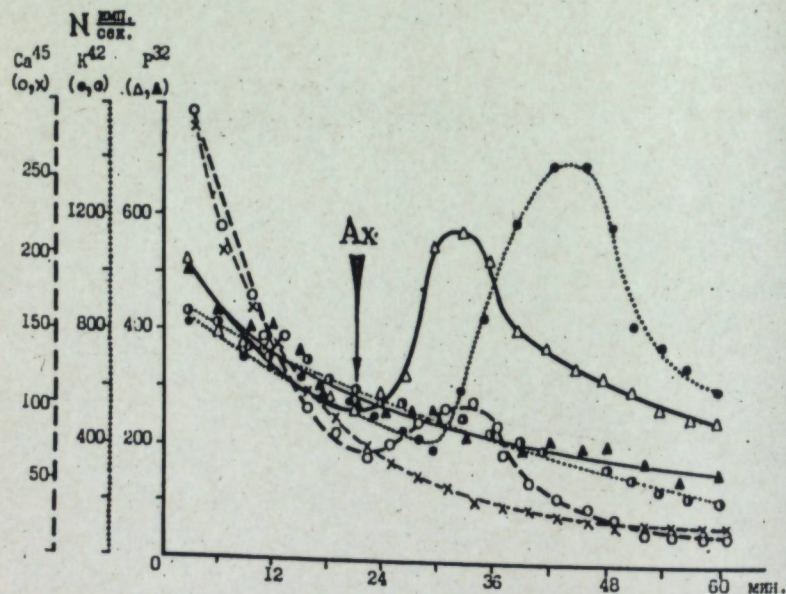
Исходя из полученных данных мы предполагаем, что ацетилхолин вызывает гидролиз трифосфоинозитидов, активируя ацетилхолинэстеразу нервных волокон краба. Возможно, активность этого фермента связана с работой трифосфоинозитидфосфомоноэстеразы и дифосфоинозитидфосфомоноэстеразы нервных волокон краба.

При гидролизе трифосфоинозитидов из мембраны может освобождаться Ca^{2+} , вследствие чего она становится более проницаемой для катионов /Hendrickson, Reinertsen, 1971/. С другой стороны показано, что вызываемая ацетилхолином деполяризация постсинаптической мембраны нейрона обусловлена гидролизом трифосфоинозитидов с освобождением мембранносвязанного кальция /Torda, 1974/.

Используя нервные волокна в качестве объекта исследования, в котором с помощью ацетилхолина оказалось возможным изменять содержание трифосфоинозитидов, мы измерили скорость выхода ^{32}P , ^{42}K и ^{45}Ca из нервов краба в норме и при уменьшении содержания в них трифосфоинозитидов. Было обнаружено, что при действии ацетилхолина, параллельно с уменьшением содержания трифосфоинозитидов,

происходит увеличение скорости выхода этих изотопов из нервного волокна /рис.3/.

Рисунок 3. Влияние ацетилхолина на скорость выхода ^{32}P , ^{45}Ca и ^{42}K из нервных волокон краба *Carcinus maenas*.



N — радиоактивность, выраженная в распадах в минуту на мг сухого веса ткани. Стрелкой показано начало прокачивания физиологического раствора, содержащего ацетилхолин.

Как видно из этого рисунка, увеличение скорости выхода радиоактивных изотопов фосфора и кальция совпадает по времени между собой и отмечается сразу же после начала действия ацетилхолина на нервные волокна. Это можно объяснить тем, что при гидролизе трифосфоэнозитидов происходит отщепление их моноэстерных фосфатов и од-

новременно освобождение Ca^{2+} , который трифосфоэнозитиды удерживали в мембране. Увеличение скорости выхода ^{42}K несколько отстаёт по времени от увеличения скорости выхода ^{45}Ca и ^{32}P . Как показано на рисунке 4, скорость вымывания ^{42}K из нервного волокна краба нарастает по мере уменьшения содержания в нём трифосфоэнозитидов. Нами, кроме того, были поставлены опыты по изучению действия ацетилхолина на вход ^{22}Na в нервные волокна краба. Статистически достоверное увеличение содержания ^{22}Na в нервах наблюдалось с 20 минуты после начала инкубации нервных волокон с ацетилхолином, то есть значительно позднее увеличения скорости выхода ^{42}K . Можно предположить, что полифосфоэнозитиды непосредственно не связаны с регулированием проницаемости натриевых каналов. Подтверждение этому можно найти в работе Вайта и сотр. /White и др., 1974/, изучивших влияние тетродотоксина — вещества избирательно блокирующего натриевые каналы, на метаболизм фосфоэнозитидов. В этой работе не было обнаружено различий во включении ^{32}P в фосфоэнозитидные фракции блуждающего нерва крысы в контроле и при действии на него тетродотоксином в концентрации, подавляющей проведение возбуждения. Кроме того, существуют многочисленные данные, свидетельствующие о том, что в формировании натриевых каналов ведущую роль играют белки. Имеются работы о том, что вещества, оказывающие действие на натриевые каналы вследствие их белковой природы, практически не изменяют калиевой проницаемости мембраны. Это может указывать на то, что калиевые каналы управляются веществами и небелковой природы. Полученные нами данные могут косвенно свидетельствовать об участии фосфоэнозитидов в регуляции калиевой проницаемости мембраны нервного волокна. Что же касается наблюдаемого нами увеличения содержания ^{22}Na в нервных волокнах кра-

ба, то это может быть обусловлено ингибирующим влиянием ацетилхолина на $(Na^+ + K^+)$ -АТФазу нервных волокон краба /Кометиани и Каландариевили, 1969/.

Выше мы уже обсуждали вопрос, почему лишь высокие концентрации ацетилхолина оказывают действие на метаболизм фосфоинозитидов и связанные с ними изменения в физиологическом состоянии нервных волокон краба. Для выяснения, как инкубация нервных волокон с ацетилхолином сказывается на их микроструктуре, мы провели электронно-микроскопическое исследование нервов *S. maenas* в норме и при действии на них 20 мМ раствора ацетилхолина. Нам не было обнаружено изменений во внутренней структуре и в структуре плазматических мембран нервных волокон краба, обработанных ацетилхолином. Это в какой-то степени может свидетельствовать в пользу нашего предположения, что лишь незначительная часть ацетилхолина способна проникнуть из внешнего физиологического раствора внутрь нерва краба. Как отмечалось, в нервном волокне краба имеется мощная ферментативная система для гидролиза ацетилхолина. И если бы ацетилхолин свободно проникал внутрь нерва, то его гидролиз привёл бы к закислению внутренней среды нервного волокна и, как следствие этого, к нарушению его внутренней структуры.

Таким образом, наблюдаемое нами блокирование возбуждения, вызываемое ацетилхолином, может быть следствием деполяризации нервного волокна в результате уменьшения внутренней концентрации калия. Для проверки этого предположения мы провели измерение потенциала покоя нервного волокна при действии на него ацетилхолином.

3. Влияние ацетилхолина на величину потенциала покоя одиночного нервного волокна краба.

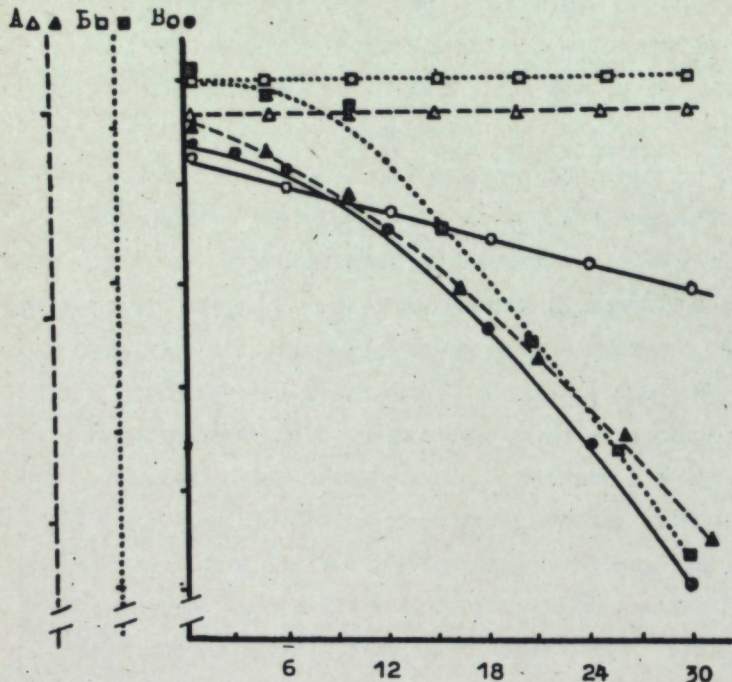
Измерение потенциала покоя мы проводили на одиночных нервных волокнах краба *E. spinifrons*, диаметр которых позволяет отводить от них потенциал при помощи микроэлектродной техники.

В опытах по влиянию ацетилхолина на потенциал покоя одиночных нервных волокон мы обнаружили, что 30 минутное действие 20 мМ раствора ацетилхолина вызывает снижение абсолютной величины потенциала покоя на 20 мВ. На рисунке 4 сопоставлены данные о действии ацетилхолина на потенциал покоя, скорость вымывания ^{42}K и количество трифосфоинозитидов в нервных волокнах крабов. Можно отметить корреляцию между изменениями всех этих параметров. Мы предполагаем, что вызываемая ацетилхолином деполяризация нервного волокна обусловлена изменением проницаемости его для калия и связанного с ним уменьшением содержания калия внутри нервного волокна. Следует отметить, что прозерин и здесь предотвращал действие ацетилхолина; это ещё раз подтверждает, что деполяризация нервного волокна и увеличение скорости вымывания из него ^{42}K , являются следствием уменьшения содержания в нём трифосфоинозитидов.

Как было отмечено, получасовая инкубация нервного волокна краба в физиологическом растворе, содержащем ацетилхолин, приводит к деполяризации нервного волокна на 20 мВ. При последующей отмывке происходит некоторое восстановление величины потенциала покоя нервного волокна краба, но она остаётся всё же примерно на 10 мВ ниже его исходного абсолютного значения. Если же отмывку производить в присутствии ц-АМФ в концентрации 10^{-4} - 10^{-5} М,

потенциал покоя восстанавливается почти до исходной величины.

Рисунок 4. Влияние 20 мМ раствора ацетилхолина на потенциал покоя, скорость вымывания ^{42}K и содержание трифосфоинозитидов в нервных волокнах крабов.



A — величина потенциала покоя в мВ; B — содержание трифосфоинозитидов в мкг на мг сырого веса ткани; B — натуральный логарифм удельной радиоактивности ^{42}K в нервных волокнах.
 ••□•••□•• содержание трифосфоинозитидов в нервах *S. maenas* в норме и ••■•••■•• при действии на них ацетилхолином;
 —△—△— величина потенциала покоя нервного волокна *E. spinifrons* в норме и —▲—▲— при действии на него ацетилхолином;
 —○—○— натуральный логарифм удельной радиоактивности ^{42}K в нервных волокнах *S. maenas* в норме и —●—●— при действии на них ацетилхолином.

Обнаруженный нами факт влияния ц-АМФ на реполяризацию нервного волокна краба *E. spinifrons*, после его деполаризации, вызванной ацетилхолином, а также известного из работ Торда /Torda, 1974/ факта участия ц-АМФ в активации фермента, осуществляющего синтез трифосфоинозитидов, побудил нас провести исследование влияния этого соединения на метаболизм фосфоинозитидов.

4. Влияние ц-АМФ на метаболизм фосфоинозитидов в нервных волокнах краба.

Для выяснения влияния ц-АМФ, мы сравнили скорость включения ^{32}P в фосфоинозитидные фракции фосфолипидов нервных волокон краба *S. maenas*, преинкубированных в растворах ц-АМФ в концентрациях 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} М в состоянии покоя и при электрическом раздражении.

Полученные данные /табл.2/ свидетельствуют о том, что в присутствии ц-АМФ возрастает включение ^{32}P во фракцию трифосфоинозитидов, выделенную из нервов, подвергнутых электрической стимуляции. В тоже время включение ^{32}P в нервы, находившиеся в состоянии покоя, при действии на них ц-АМФ практически не изменялось. Наиболее ярко эффект ц-АМФ был выражен при концентрации 10^{-5} М.

Анализируя полученные данные, следует учесть то обстоятельство, что плазматические мембраны в покое очень мало проницаемы для нуклеотидов. Активный же центр фермента, осуществляющего синтез трифосфоинозитидов, находится на внутренней стороне плазматической мембраны нервных клеток /Torda, 1974/. Возможно, что мембрана нервного волокна, находясь в состоянии возбуждения, ста-



новится более проницаема для ц-АМФ, в результате чего происходит увеличение включения ^{32}P в трифосфоинозитиды. Если же предположить, что ц-АМФ в одинаковой степени проникает как в покоящиеся, так и в раздражаемые нервы, например через повреждённые во время препаровки участки нервных волокон краба, то очевидно при раздражении нервного волокна в нём могут происходить изменения в доступности активного центра рецепторной субъединицы дифосфоинозитидфосфокиназы для молекулы ц-АМФ, в то время как в покое доступность этого соединения к активному центру ограничена.

Таблица 2.

Влияние ц-АМФ на скорость включения ^{32}P в фосфоинозитидные фракции нервных волокон *S. maenas* в покое и при электрическом раздражении.

Время раздражения	Концентрация ц-АМФ	Удельная радиоактивность /расп. в мин. на мг сырого веса/			
		0 м	10^{-4} м	10^{-5} м	10^{-6} м
0 мин	ТФИ	$12,7 \pm 1,3$	$13,7 \pm 1,5$	$13,3 \pm 1,6$	$13,2 \pm 1,2$
	ДФИ	$3,2 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3$
	МФИ	$3,5 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,4$
15 мин	ТФИ	$18,0 \pm 1,6$	$24,6 \pm 2,1$	$26,1 \pm 2,5$	$22,3 \pm 2,3$
	ДФИ	$3,9 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,6$
	МФИ	$4,0 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,5$

Число опытов в каждом случае равнялось пяти. Статистически достоверное увеличение включения ^{32}P наблюдалось лишь в трифосфоинозитидной фракции нервов, подвергнутых раздражению и преинкубированных с ц-АМФ в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} м. $P < 0,05$.

возрастание включения ^{32}P в трифосфоинозитиды нервных волокон краба подтверждает данные Торды /Torda, 1974/ об активации ц-АМФ синтеза трифосфоинозитидов, полученные ею на мозговой ткани. Возможно, что наблюдаемый нами эффект восстановления потенциала покоя одиночного нервного волокна *E. spinifrons* в присутствии ц-АМФ после обработки волокна ацетилхолином, обусловлен увеличением содержания трифосфоинозитидов в мембране и возвращением её проницаемости для калия к исходному уровню.

Проведённое исследование позволяет сделать заключение о том, что роль фосфолипидов не ограничивается поддержанием только определённой структуры возбудимой мембраны. В частности, фосфоинозитиды способны в силу своих физико-химических свойств выполнять роль функциональноактивных компонентов в возбудимой мембране. Полученные нами данные даёт возможность высказать предположение о том, что фосфоинозитиды могут принимать участие в проведении возбуждения по нерву, регулируя калиевую проницаемость возбудимой мембраны.

ВЫВОДЫ.

1. При электрической стимуляции нервных волокон лягушки *Rana temporaria* и краба *Carcinus maenas* происходит увеличение включения ^{32}P в трифосфоинозитидную фракцию фосфолипидов этих нервов. При этом не происходит изменений в содержании фосфоинозитидных фракций нервов лягушки и краба, что указывает на увеличение скорости обмена трифосфоинозитидов при электрической стимуляции нервов, а не на повышение их содержания в нервных волокнах.

2. Ацетилхолин вызывает снижение содержания трифосфоинозитидов в нервных волокнах краба *C. maenas*, блокирует проведение возбуждения и вызывает увеличение скорости выхода из них ^{45}Ca . Параллельно со снижением содержания трифосфоинозитидов происходит увеличение скорости вымывания из нервных волокон ^{42}K .

3. Ацетилхолин вызывает деполаризацию одиночного нервного волокна краба *Egria spinifrons*.

4. Ацетилхолин вызывает гидролиз трифосфоинозитидов посредством активации ацетилхолинэстеразы. Прозерин — ингибитор ацетилхолинэстеразы, предотвращает изменения вызываемые ацетилхолином в нервных волокнах крабов *C. maenas* и *E. spinifrons*.

5. ц-АМФ способствует гиперполяризации одиночного нервного волокна краба *E. spinifrons* после обработки его ацетилхолином.

6. ц-АМФ вызывает увеличение скорости включения ^{32}P в трифосфоинозитидную фракцию нервных волокон краба *C. maenas* при их электрической стимуляции, тогда как в покое это соединение не оказывает действия на скорость включения ^{32}P в эту фракцию фосфолипидов.

7. На основании полученных экспериментально и литературных данных выдвинуто предположение о том, что фосфоинозитиды могут участвовать в изменении ионно-проницаемости воздушных мембран.

Список опубликованных работ по теме
диссертации

1. А.Г. Третьяк, И.М. Лимаренко, Г.В. Коссова, 1975. Обмен фосфоинозитидов и проведение нервного импульса. Докл. АН СССР, 221, №1, стр. 223-225.
2. А.Г. Третьяк, П.В. Гулак, Г.В. Коссова, И.М. Лимаренко, 1975. К вопросу о роли фосфоинозитидов в регуляции ионной проницаемости в нервных волокнах. Докл. АН СССР, 222, №4, стр. 964-966
3. I.M. Limarenco, P.V. Gulak, G.V. Kossova, Yu.P. Kozlov, A.G. Tretijak, 1975. Control of nerve fibre ionic permeability by polyphosphoinositides. 5th International Biophysics Congress, Copenhagen, Abstracts P-483, p. 134.
4. А.Г. Третьяк, И.М. Лимаренко. Фосфоинозитиды и их функциональная роль в мембранах нервных волокон. Всесоюзный симпозиум: "Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека", сборник материалов симпозиума 17-19 декабря 1975 года, стр 191.
5. А.Г. Третьяк, И.М. Лимаренко, И.И. Марихова, Ю.П. Козлов, 1976. Влияние ц-АМФ и ацетилхолина на метаболизм фосфоинозитидов и потенциал покоя нервных волокон краба. Докл. АН СССР, 226, №2,

Материалы диссертации доложены на

- У Международном биофизическом конгрессе. /Копенгаген, 1975/,
Секции биофизики МОИП. /Москва, 1974, 1975/
Всесоюзном симпозиуме "Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека". /Ленинград, 1975/.

Подп. к печати 3/кн - 75г
Физ. п. л. 1,5 Уч.-изд. л. 1,0 Ф. 60×90/16
Тираж 200 экз. Заказ 2207

Изд-во Московского университета, Москва, К-9,
ул. Герцена, 5/7.
Типография Изд-ва МГУ. Москва, Ленинград