

5. Аксентьев С. Л., Окунь И. М., Милотин А. А. и др. Сравнительное исследование β -адренорецепторов синаптических мембран мозга // Биофизика.— 1982.— 27, № 1.— С. 156—157.
6. Вологовский И. Д., Шейко Л. М., Финин В. С. и др. Влияние структурного состояния синаптосомальной мембраны на каталитические свойства ацетилхолинэстеразы // Изв. АН БССР.— Сер. биол. наук.— 1976.— № 5.— С. 60—70.
7. Канунго М. Биохимия старения.— М.: Мир, 1982.— 250 с.
8. Конев С. В., Аксентьев С. Л., Черницкий Е. А. Кооперативные переходы белков в клетках.— Минск: Наука и техника, 1970.— 202 с.
9. Конев С. В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы.— Минск: Наука и техника, 1987.— 239 с.
10. Лыскова Т. И., Окунь И. М., Милотин А. А. и др. Исследование мускариновых холинорецепторов синаптических мембран мозга животных разного возраста // Биофизика.— 1983.— 28, № 4.— С. 709—710.
11. Милотин А. А., Аксентьев С. Л., Окунь И. М. и др. Сравнительные исследования структурного состояния синаптосомальных мембран мозга животных с различной продолжительностью жизни при старении // Демографические, физиологические и биохимические аспекты старения.— Минск: Наука и техника.— 1976.— С. 72—79.
12. Милотин А. А., Окунь И. М., Аксентьев С. Л. и др. О возрастных изменениях аллостерических свойств ацетилхолинэстеразы мозга // Биофизика.— 1976.— 21, № 6.— С. 1120—1122.
13. Милотин А. А., Беляева Е. И., Буланова К. Я. и др. Структурно-функциональные изменения синаптических мембран мозга при старении // Там же.— 1984.— 29, № 4.— С. 640—642.
14. Фролькис В. В. Старение. Нейрогуморальные механизмы.— Киев: Наук. думка, 1981.— 320 с.
15. Armbricht H., Birnbaum L., Zenser T., Davis B. Changes in hepatic microsomal membrane fluidity with age // Exp. gerontology.— 1982.— 17, N 1.— P. 41—48.
16. Aronstam R., Abood L., Hoss W. Influence of sulfhydryl reagents and heavy metals on the functional state of the muscarinic acetylcholine receptor in rat brain // Mol. Pharmacol.— 1978.— 14, N 4.— P. 575—586.
17. De Medio G. F., Tovaralli G., Piccinin G., Porcelati G. The effect of cytidine — diphosphate choline (CDP — choline) on brain lipid change during aging // J. Neurosci. Res.— 1984.— 11, N 1.— P. 49—58.
18. Finch C. E. The regulation of physiological changes during mammalia aging // Quart. Rev. Biol.— 1976.— 51, N 1.— P. 49—83.
19. Morris D., McNeil R., Castellino F., Thomas J. Interaction of lysophosphatidylcholine with phosphatidylcholine bilayers. A photophysical and NMR study // Biochim. et biophys. acta.— 1980.— 599, N 2.— P. 380—390.
20. Shinitzky M., Henkart P. Fluidity of cell membranes-current concepts and trends // Int. Rev. Cytol.— 1979.— 60, N 2.— P. 982—999.
21. Sineriz F., Farias R., Trucco T. The convenience of the use of allosteric «probes» for the study of lipid-protein interactions in biological membranes: thermodynamic considerations // J. Theor. biol.— 1975.— 52, N 1.— P. 113—120.
22. Sun A., Sun J. Neurochemical aspects of the membrane hypothesis of aging // Interdiscipl. Topics Gerontol.— 1979.— 15, N 1.— P. 34—53.
23. Van Echteld C., De Kruijff B., Mandersloot J., De Gier J. Effects of lysophosphatidylcholines on phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol liposome systems as revealed by ^{31}P -NMR, electron microscopy and permeability studies // Biochim. et biophys. acta.— 1981.— 649, N 2.— P. 211—220.

Ин-т фотобиологии АН БССР,
Минск

Материал поступил
в редакцию 30.02.90

УДК 612.822.1/3:546.41:612.67

Д. Сатрустеги, Е. Богонез, Ж. Виторики,
П. Бланко, А. Мартинез-Серрано

Изменения кальцийтранспортных систем в синаптосомах мозга крыс и их возможное участие в патофизиологии старения

Ионы кальция играют важную роль в нейромедиации. В области плазматической мембраны кальций запускает секрецию медиатора в нервных синапсах. Вероятно, ионы кальция вступают во взаимодействие с

© Д. САТРУСТЕГИ, Е. БОГОНЕЗ, Ж. ВИТОРИКИ, П. БЛАНКО,
А. МАРТИНЕЗ-СЕРРАНО, 1990.

кальцийсвязывающими белками цитозоля. Однако выделение р-синапсов [35]. Известно также, что ключевые ферменты активации протенинфосфатазы, фосфолипидные регуляторы могут участвовать в энергетических соединениях, а также в мембране) и элемент мы принимают участие в пластичности. Позиция, играют решающую роль в системе. Раскрытие под влиянием кальциевых каналов (ПЗКК) приводит к повышению уровня. Важными механизмами, участвующими после активации нейромедиаторными органеллами (митохондриями) и выведение через плазматическую мембрану и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника [5, 7].

Кальциевые каналы. В нервных тканях, так называемых каналах, так называемых каналов на плазматической мембране, идентификация в нервных тканях.

Первые доказательства того, что уровень кальция снижается при старении, были получены в синаптосомах 24-месячных и 3-месячных животных. Ионы с функцией ПЗКК), $^{45}\text{Ca}^{2+}$ с возрастом. Напротив, раскрытие ПЗКК, способствует входу кальция в синапсы. В проведенных работах, проведенных в старении было проанализировано участие $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника в поддержании уровня кальция в синапсах.

При определении концентрации кальция при разном возрасте обнаружено, что концентрация кальция снижается с возрастом при разном уровне концентрации K^+ . Эти данные свидетельствуют о снижении раннего потенциала, величина при старении. Более высокие напряжения у 3- и 24-месячных животных. В то время как концентрация кальция в синапсах 3- и 24-месячных крыс, в то время как концентрация (V) не изменяется.

Исследования синапсов показали, что в синаптосомах активация ПЗКК-опосредованная, который описан в литературе, в связи с тем, что структура мембраны значительно отличается в старении, определение синаптической активности, остается спорным вопросом. В исследованиях крыс, проведенных в синапсах, проведенных в синапсах.

В исследованиях крыс, проведенных в синапсах, проведенных в синапсах.

Физиол. журн., 1990, т. 36, № 5

Физиол. журн., 1990, т. 36,

кальцийсвязывающими белками на разных этапах везикулярного экзотоза. Однако выделение рецептора кальция остается безуспешным до сих пор [35]. Известно также, что внутриклеточный кальций регулирует ключевые ферменты активности нейронов, такие как протеинкиназы, протеинфосфатазы, фосфолипазы и кальцийзависимые протеазы. Эти различные регуляторы могут действовать на различные белки (в частности, участвующие в энергетическом обмене и обмене нейронспецифических соединений, а также регулирующие возбудимость плазматической мембраны) и элементы цитоскелета. Кальцийрегулируемые системы принимают участие в кратко- и долгосрочных процессах (возбудимость и пластичность). Поэтому факторы, регулирующие уровень кальция, играют решающую роль в нормальной деятельности нервной системы. Раскрытие под влиянием деполяризации потенциалзависимых кальциевых каналов (ПЗКК), по-видимому, является основным механизмом повышения уровня кальция в цитозоле нервных окончаний. Важными механизмами, участвующими в выведении кальция из цитозоля после активации нейрона, являются его депонирование клеточными органеллами (митохондриями и эндоплазматическими мембранами) и выведение через плазматическую мембрану посредством Ca^{2+} -АТФазы и Na_2/Ca_1 -обменника [5, 7].

Кальциевые каналы. Нейроны имеют различные типы потенциалзависимых каналов, так называемые Т-, L- и N-типы [29]. Однако локализация каналов на плазматической мембране неравномерна [19], а их идентификация в нервных окончаниях по-прежнему противоречива.

Первые доказательства того, что вход кальция через ПЗКК может быть снижен при старении, получены Peterson и Gibson [30]. Они установили снижение обусловленного деполяризацией захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синаптических терминалах 24-месячных крыс по сравнению с таковым в синаптических терминалах 3-месячных животных. Имеются некоторые другие факторы (не связанные с функцией ПЗКК), которые могли бы вызывать снижение захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$ с возрастом. Например, деполяризация синапсом вызывает не только раскрытие ПЗКК, но и обратимость Na/Ca -обменника, что способствует входу кальция в клетку (Na_1/Ca_0 -режим) [9, 21]. В последующих работах, проведенных в нашей лаборатории, состояние ПЗКК при старении было проанализировано в условиях сведения к минимуму вклада Na/Ca -обменника низкой концентрацией кальция (32 ммоль/л), поддерживаемой на постоянном уровне в течение периода деполяризации.

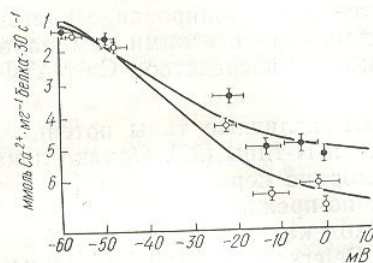
При определении мембранного потенциала синапсом ($\Delta\psi$) и захвата кальция при разных концентрациях калия у крыс различного возраста обнаружено, что количество захваченного кальция снижается с возрастом при различных условиях деполяризации [21]. Мы не установили каких-либо различий $\Delta\psi$ с возрастом при различных концентрациях K^+ . Эти данные свидетельствуют о том, что эффекты мембранного потенциала, вероятно, не вовлечены в снижение захвата кальция при старении. Более того, анализ зависимости захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$ от напряжения у 3- и 24-месячных крыс показал, что значения максимального захвата кальция были приблизительно на 22 % ниже у 24-месячных крыс, в то время как среднее значение напряжения активации (V) не изменялось при старении (рис. 1) [21].

Исследования синапсом с применением токов $^{45}\text{Ca}^{2+}$ показали, что в синаптических терминалах происходит потенциал- и кальцийзависимая инактивация ПЗКК-опосредованного захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$ [27, 36], подобного тому, который описан в электрофизиологических исследованиях. Однако в связи с тем, что шкала времени в экспериментах с токами $^{45}\text{Ca}^{2+}$ значительно отличается от таковой в электрофизиологических исследованиях, определение синапсомембранных ПЗКК, подвергающихся инактивации, остается спорным. Более того, их чувствительность к органическим блокаторам каналов кальция четко не выявляется.

В исследованиях кинетики инактивации захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у 3- и 24-месячных крыс, проведенных в условиях ограничения вхождения кальция

В серии параллельных исследований у 3-месячных крыс установлено, что пифедипин (1,0 мкмоль/л), добавленный в преинкубационную среду, восстанавливал на 20 % захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ во все периоды экспери-

В серии параллельных исследований у 3-месячных крыс установлено, что пифедипин (1,0 мкмоль/л), добавленный в преинкубационную среду, восстанавливал на 20 % захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ во все периоды экспери-

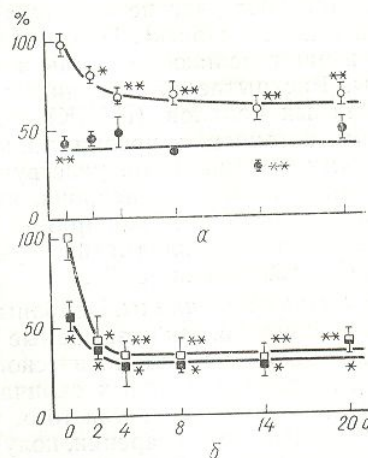


Захват кальция нормализовали по $S_{\text{макс}}$ (максимальный захват у 3-месячных крыс), а уравнение Больцмана $S_{\text{макс}} \{ [1 + \exp(\bar{V} - V)] K \}$ решали по экспериментальным данным, где $\bar{V}$ — среднее напряжение активации, K — фактор крутизны. При этом получены следующие значения: $K = (13,5 \pm 2,0)$ мВ $^{-1}$, $\bar{V} = (-36,24 \pm 2,6)$ мВ у 3-месячных крыс (светлые символы) и $K = (14,66 \pm 2,4)$ мВ $^{-1}$, $\bar{V} = (-40,50 \pm 3,2)$ мВ у 24-месячных животных (темные символы). Эти результаты нанесены относительно соответствующего МП, определяемого по TRP+ [21].

Синантосомы (2 мг белка/мл) из 3- и 24-месячных крыс были преинкубированы в течение 5 мин при температуре 30 °C в среде с низкой концентрацией K^+ (5,0 ммоль/л), после чего аликваты переносили в среды с высокой (65 ммоль/л) или низкой (5 ммоль/л) концентрацией K^+ , не содержащие Ca^{2+} (а) или содержащие (б) 0,5 ммоль/л-1 $CaCl_2$. В обозначенные периоды времени добавляли Ca^{2+} (а) и до конечной концентрации 50 ммоль/л и радиоактивную метку (0,75 мкКи $^{45}Ca^{2+}$, мл; с) или только радиоактивную метку (б). Захват кальция регистрировали через 2 с. Результаты выражали в процентах K^+ -стимулирующего (высокая концентрация минус низкая) захвата $^{45}Ca^{2+}$ в нулевое время у 3-месячных крыс — (0,089±0,006) нмоль·мл⁻¹ белка·2 с⁻¹ на позиции а и (0,747±0,039) нмоль·мг⁻¹ белка — на позиции б. В случае а среды преинкубации и деполаризации содержали 25 ммоль/л ЭГТА для исключения загрязнения эндогенным кальцием. Достоверность различий со значениями, полученными в нулевое время: * $P < 0,1$; ** $< 0,0125$ [23].

Митохондрии. Давно известно, что митохондрии относятся к внутриклеточным органеллам со сравнительно более высокой способностью к накоплению кальция. Транспорт кальция в митохондриях мозга крысы состоит из следующих двух отдельных систем: унипорта каль-

Митохондрии. Давно известно, что митохондрии относятся к внутриклеточным органеллам со сравнительно более высокой способностью к накоплению кальция. Транспорт кальция в митохондриях мозга крысы состоит из следующих двух отдельных систем: унипорта каль-



Инактивацию K^+ -стимулированного $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у з-3 (светлые символы) или символы) месячных крыс измерения чин 1,0 мкмоль/л пифедина (а или 1,0 мкмоль/л ВАУ-К-8644 (ре добавленные в начале пренклуба этих добавлений (кружочки). - I проводили в бескальцевой среде среде с 0,5 ммоль/л CaCl_2 (б). До различий между показателями без пифедином: * $P < 0,1$; * $P < 0,0125$ [2]

При старении способ энергии остается неизменным [38]. Однако вхож хондриии значительно сни предделение кальция по о няется при старении, сде предделения экстрамито (рис. 5) [39].

Физиол. журн., 1990, т. 36.

вхождения
установле-
нных крыс,
полупериод
условиях

установле-
бационную
ы экспери-

xx
—
—
—

—

xx
—
—
—

20 с

среде, содер-

се), а уравнение
де V — среднее
и значения;
и $K = (14,66 \pm$
Эти результаты

сомах 3- (свет-

з течение 5 мин
аликвоты пере-
не содержащие
добавляли CaCl_2
 Ca^{2+} , мл; а) и
заты выражали
 Ca^{2+} в нулевое
а и $(0,747 \pm$
изации содер-
стоверность раз-

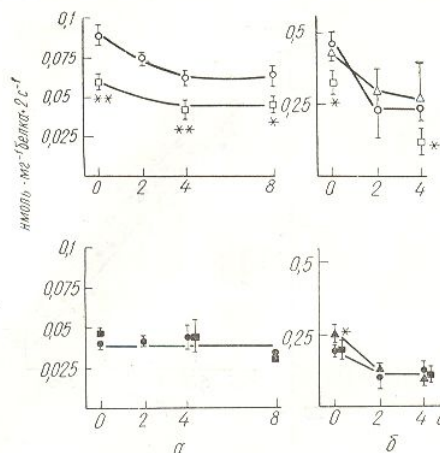
ект нифеди-
иода $^{45}\text{Ca}^{2+}$
ую-то часть
ксперимента
ивировавшие
вата $^{45}\text{Ca}^{2+}$
рис. 3). Бо-
гивации, за-
Эти резуль-
рапамила с
зга крысы
рем самым
ридинны.
ся к внутри-
способностью
дриях мозга
порта каль-

ция, запускаемого электрохимическим его градиентом через митохондриальную мембрану, и электронейтрального антипорта кальция, в результате которого один ион (Ca^{2+}) обменивается на два иона (H^+ или Na^+). При устойчивом состоянии (steady state) распределение кальция в митохондриальной мембране отражает кинетическое равновесие, когда скорость входа и скорость выхода сбалансированы [28].

Несмотря на высокую способность митохондрий к накоплению кальция, полагают, что их реальное значение как буфера кальция цитозоля незначительно, так как аффинность к кальцию в системе уни-

Рис. 3. Эффект нифедипина и ВАУ-К-8644 на потенциалзависимую (а) и на потенциал- и кальцийзависимую (б) инактивацию захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$, стимулированного K^+ .

Инактивацию K^+ -стимулированного захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у 3- (светлые символы) или 24- (темные символы) месячных крыс измеряли при наличии 1,0 мкмоль/л нифедипина (квадратики) или 1,0 мкмоль/л ВАУ-К-8644 (треугольники), добавленные в начале преекспозиции, или без этих добавлений (кругочки). Инактивацию проводили в бескальциевой среде (а) или в среде с 0,5 ммоль/л CaCl_2 (б). Достоверность различий между показателями без или с нифедипином: * $P < 0,1$; ** $P < 0,0125$ [23].



порта относительно низка (около 1 мкмоль [28]). Так ли это? Этот вопрос возник в связи с полученными недавно данными о том, что полиамины способствуют значительному повышению аффинности к кальцию в системе унипорта [14].

При старении способность митохондрий мозга к преобразованию энергии остается неизменной, даже если использование определенных дыхательных субстратов (например, глутамата) может быть сниженным [38]. Однако вхождение кальция посредством унипорта в митохондрии значительно снижено (рис. 4) [18, 39]. Вследствие этого распределение кальция по обе стороны митохондриальной мембраны изменяется при старении, сдвигаясь в сторону более высоких значений распределения экстрамитохондриального кальция у старых крыс (рис. 5) [39].

Результаты, полученные Peterson и соавт. [31], свидетельствуют о том, что установленный в изолированных митохондриях дефект транспорта кальция, вероятно, имеется и в синаптосомальных митохондриях. Эти авторы изучали распределение синаптосомального $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в митохондриях и экстрамитохондриальных фракциях, полученных с помощью метода разрыва дигитонином, и установили, что доля митохондриального $^{45}\text{Ca}^{2+}$ уменьшается при старении. Мы пришли к аналогичным выводам, используя другой подход, основанный на применении КЦФМГ (карбонилцианид-4,3-флюорометоксифенилгидразона) в опытах на деполаризованных калием синаптосомах. Этот разобщитель способствует быстрому выделению кальция, представляющего собой, как предполагают, митохондриальный кальциевый пул. В условиях данного определения соотношение КЦФМГ-выделяемый $^{45}\text{Ca}^{2+}$: (общий $^{45}\text{Ca}^{2+}$ — КЦФМГ-выделяемый $^{45}\text{Ca}^{2+}$), которое может быть представлено как митохондриально-экстрамитохондриальный коэффициент, у 3- и 12-месячных животных составляет 0,62 и 0,59 соответственно, тогда как у старых, 24-месячных, животных — лишь 0,39. Поскольку это изменение распределения кальция в синаптосомах аналогично тому, которое наблюдается в изолированных митохондриях (см. рис. 5), наши результаты явно свидетельствуют о том, что дефект транспорта каль-

ция имеется как в свободных, так и в интрасинаптических митохондриях [39].

Становится ясным, что кальций, накопленный в митохондриях, выступает в качестве регулятора митохондриальных дегидрогеназ [13, 20]. Эта роль вполне может выполняться, независимо от того, что значительная доля митохондриального кальция находится в связанной форме и поэтому является метаболически инертной, поскольку ответственной за регуляцию дегидрогеназ может быть очень небольшая доля ионизированного кальция. В результате исследования выхода кальция

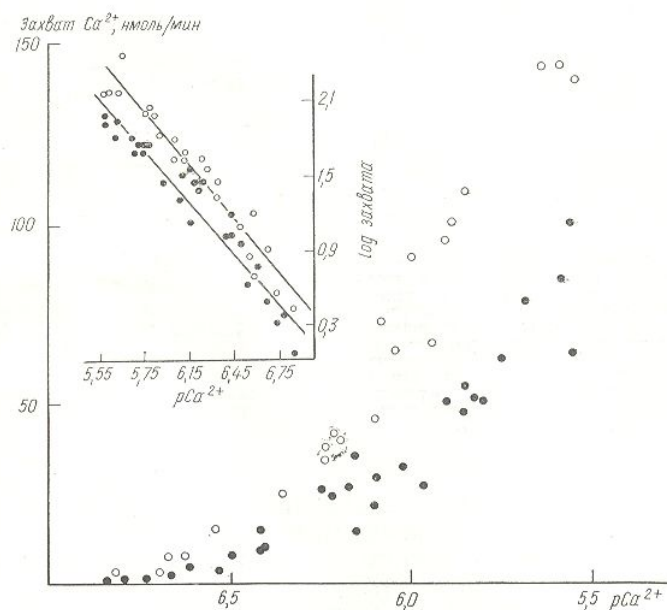


Рис. 4. Возрастные колебания захвата Ca^{2+} митохондриями мозга крыс.

Митохондрии мозга (0,6 мг белка) от 3- (светлые символы) или 24- (темные символы) месячных крыс инкубировали в среде с 0,32 моль/л маннитола, 10 нмоль/л tris-HCl , 20 ммоль/л KCl , 0,1 % бычьего сывороточного альбумина, свободного от жирных кислот (pH 7,4), 2,5 ммоль/л сукцината (калиевая соль), 0,4 мкмоль/л ротенона, 0,8 ммоль/л P_i , 0,2 ммоль/л АДФ, 0,4 ммоль/л олигомицина-мг $^{-1}$ белка, приготовленной на нитрилоацетатном Ca^{2+} -буфере и при различных кальциевых нагрузках. Изменение содержания Ca^{2+} определяли с помощью кальцийчувствительного электрода. Захват кальция определяли после добавления калибровочной дозы кальция, рассчитывая разницу концентраций, наблюдаемых после каждой добавки кальция. Вставка показывает логарифм изменения захвата Ca^{2+} относительно $p\text{Ca}$ в митохондриях мозга старых и взрослых крыс. Наклоны и пересечения этих линий были достоверно различимыми ($P < 0,0001$) [39].

из митохондрий установлено, что при эквивалентных дозах «нагрузки» кальцием выход кальция, наблюдающийся в условиях достатка или нехватки Na^+ , был меньше у 24-месячных крыс, чем у 3-месячных [40]. Этот дефект, вероятно, вызван уменьшением в матриксе митохондрий достаточного для выделения количества свободного кальция, так как этот дефект наблюдался также при стимуляции выхода кальция ионофором для кальция А 23187, т. е. в ситуации, когда опосредованные носителем эффекты исключаются [40].

Поскольку фосфат (P_i) является одним из основных компонентов кальцийбуферной системы в митохондриальной матрице [37] и его количество значительно увеличено в митохондриях старых животных [40], возможно, что увеличение количества P_i может быть ответственно за повышение буферной емкости кальциевого митохондриального матрикса у старых животных.

Если митохондрии мозга старых животных захватывают меньше кальция, чем митохондрии взрослых животных, и свободная фракция кальция в матриксе митохондрий старых животных меньше, чем у взрослых, то вследствие этого может быть существенное ухудшение активации кальцием митохондриальных ферментов у старых живот-

ных. Действительно, мы полагаем, что это может касаться пи-

Кальций цитозоля. Притом, что гомеостаз кальция при старении [12]. Кроме $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник [18, 21], мы, участвующие в выведении рану, также модифицируют свободного кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

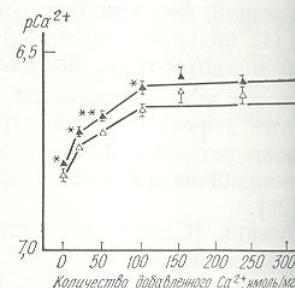


Рис. 5. Устойчивое распределение с 0,2 ммоль/л АДФ и 0,8 ммоль/л Митохондрии мозга (0,6 мг белка) в 0,8 ммоль/л P_i , 0,2 ммоль/л АДФ, 0,4 ацетатном Ca^{2+} -буфере при наличии определяли после добавления различия Достоверность различий устойчивого крыс оценивали с помощью критерия t

Рис. 6. Концентрация кальция в старых крыс.

Средние значения $\pm$ стандартная ошибка (б, в), инкубировали метил)-этилендиамин (ТНЭД, 5 мин) по разности: * $P < 0,01$; ** $P < 0,005$; ***

регулирующей внутриклеточного важно выяснить, как эти ф

На рис. 6 приведены данные синапсом 3- и 24-месячных использованием флуоресцентных значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и в покое, резко повышены у старых нала зонда Квин-2 воздействия мы преинкубировали в течение (2 пиридилметил)-этилендиамин желых металлов, перед оп влияла на различие значений рых животных (рис. 6).

Ввиду выраженного пов животных с возрастом, [Ca] собами, чтобы избежать ограниченной емкостью зонда Квин-2 модифицированного метода и соавт. [41]. Использование значений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с возра

Показано, что количество бластов кожи человека уменьшили также, что рост культуры более медленный, чем взятых с собственный для культуры клеток клеток кальциевым ионо

митохонд-
риях, вы-
геназ [13,
о, что зна-
связанной
ку ответст-
вляющая доля
ка кальция

ных. Действительно, мы получили данные, свидетельствующие о том, что это может касаться пируватдегидрогеназы [6, 33].

Кальций цитозоля. Представленные результаты свидетельствуют о том, что гомеостаз кальция в синапсосах мозга крыс нарушается при старении [12]. Кроме дефектов вхождения $^{45}\text{Ca}^{2+}$ через ПЗКК и Na_i/Ca_o -обменник [18, 21], имеется также сообщение о том, что системы, участвующие в выведении кальция через синапсосальную мембрану, также модифицируются при старении [25]. Концентрация свободного кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в цитозоле является основной переменной,

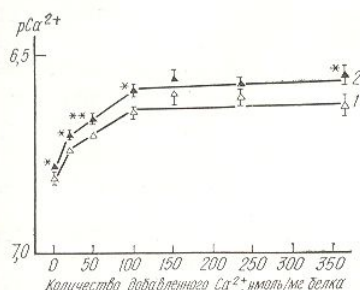


Рис. 5. Устойчивое распределение Ca^{2+} в митохондриях мозга, инкубированных в среде с 0,2 ммоль/л АДФ и 0,8 ммоль/л P_i .

Митохондрии мозга (0,6 мг белка) взрослых (1) и 27-месячных (2) крыс инкубировали в среде с 0,8 ммоль/л P_i , 0,2 ммоль/л АДФ, 0,4 ммоль/л олигомицина-мг $^{-1}$ белка, приготовленной на нитрило-ацетатном Ca^{2+} -буфере при наличии сукцината (кальевая соль). $p\text{Ca}$ устойчивого состояния определяли после добавления различных доз кальция с помощью кальцийчувствительного электрода. Достоверность различий устойчивого распределения Ca между митохондриями взрослых и старых крыс оценивали с помощью критерия t Стьюдента: * $P < 0,05$; ** $P < 0,025$ [39].

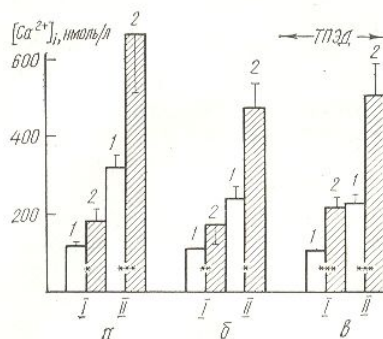


Рис. 6. Концентрация кальция в цитозоле синапсосом ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 3- (1) и 24- (2) месячных крыс.

Средние значения $\pm$ стандартная ошибка для $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в синапсосах (а) или грубых синапсосомальных фракциях (б, в), инкубированных без или с 20 мкмоль/л $\text{N}_2\text{N}_2\text{N}_2$ -тетракис (2 пиридил-метил)-этилендиамина (ТПЭД, 5 мин преинкубации). I—5 ммоль/л K^+ ; II—65 ммоль/л K^+ . Достоверность различий: * $P < 0,01$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,025$ [22].

регулирующей внутриклеточные эффекты кальция. В связи с этим было важно выяснить, как эти факторы могли бы сами влиять на $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

На рис. 6 приведены данные о концентрации кальция в цитозоле синапсосом 3- и 24-месячных крыс, полученные в экспериментах с использованием флуоресцентного зонда Квин-2 [22]. Установлено, что значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покое, и после K^+ -индуцированной деполяризации резко повышены у старых животных. Чтобы избежать угнетения сигнала зонда Квин-2 воздействием тяжелыми металлами [2], синапсосомы преинкубировали в течение 5 мин с 20 мкмоль/л $\text{N}_2\text{N}_2\text{N}_2$ -тетракис (2 пиридилметил)-этилендиамина (ТПЭД), проникаемого хелатора тяжелых металлов, перед определением $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Эта процедура не повлияла на различие значений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ между группами взрослых и старых животных (рис. 6).

Ввиду выраженного повышения концентрации кальция в цитозоле животных с возрастом, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ определялась двумя различными способами, чтобы избежать ограничений, обусловленных высокой буферной емкостью зонда Квин-2, а именно: с помощью фура-2-метода и модифицированного метода пулевой точки, разработанного Williamson и соавт. [41]. Использование обоих этих методов подтвердило увеличение значений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с возрастом [22].

Показано, что количество свободного кальция в цитозоле фибробластов кожи человека уменьшается с возрастом [32]. Авторы показали также, что рост культуры клеток, взятых от старых доноров, более медленный, чем взятых от молодых доноров, и этот феномен, свойственный для культуры клеток старых доноров, устраняется обработкой клеток кальциевым ионофором А 23187. Если возрастные изменения

30-мн) месячных
оль/л KCl , 0,1 %
оль/л сукцината
ль/л олигомици-
ных кальциевых
ного электрода,
читывая разницу
логарифм изме-
крыс. Наклоны и

«нагрузки»
остатка или
ячных [40].
митохондрий
ния, так как
кальция ионо-
средованные

компонентов
[37] и его
х животных
ответствен-
ндриального

ают меньше
ная фракция
ныше, чем у
е ухудшение
арых живот-

кальциевого равновесия общие для человека и крысы, то результаты культивирования клеток свидетельствуют о том, что изменения концентрации кальция в цитозоле являются тканеспецифическими, поскольку, во-первых, инкубация с А 23187 (от 0,5 до 5,0 мкмоль/л), значительно усиливающим захват кальция и выделение ацетилхолина в синапсосамах, не исключает возрастного снижения выделения ацетилхолина, наблюдаемого у 24-месячных крыс [24]; во-вторых, данные, полученные Landfield и Pitler [16] на нейронах гиппокампа, а также результаты наших собственных исследований, полученные на синапсосамах мозга, свидетельствуют о том, что $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах более высокая в старости.

Молекулярные механизмы, ответственные за повышение $[Ca^{2+}]_i$ с возрастом, пока не известны. Дефект митохондрий, который был описан выше, возможно, частично ответствен за большое увеличение $[Ca^{2+}]_i$, наблюдаемое в K^+ -деполяризованных синапсосамах, полученных от старых крыс, но из-за низкой аффинности этой органеллы к кальцию [28] до сих пор не ясно, влияет ли этот дефект на концентрацию кальция в интактных синапсосамах. Однако ретикулярные насосы и насосы плазматической мембраны [25] или кальцийсвязывающие протеины могут быть вовлечены в этот процесс [26].

Независимо от возможных причин увеличения $[Ca^{2+}]_i$ при старении, вероятно, это увеличение имеет важные физио-патологические последствия для функции нейрона. В нейронах улитки и клетках GH3 дигидропиридинчувствительные ПЗКК могут инактивироваться в результате необратимой кальцийзависимой деградации или вследствие дефосфорилирования эндогенных кальцийзависимых фосфатаз [1, 10]. Представляется убедительным то, что повышенные значения $[Ca^{2+}]_i$ при старении, вероятно, вызваны прекращением функционирования дигидропиридинчувствительных ПЗКК в синапсосамах старых крыс.

В настоящее время общепризнано, что «сверхнагрузка» клеток кальцием может вызывать определенные типы гибели клеток. Так, избыточный вход Ca^{2+} , по-видимому, приводит к нескольким категориям повреждений лимфоцитов, гепатоцитов и мышечных клеток посредством мембраноактивных токсинов или нейромедиаторов [11, 15, 17, 34]. Кроме того, имеются данные, указывающие на то, что «сверхнагрузка» клеток кальцием может являться патогенетическим механизмом при возникновении гипоксически-ишемического повреждения нейрона [8]. Существует много возможных причин, почему сохраняющееся увеличение $[Ca^{2+}]_i$ является токсичным. Среди специфических событий, вызванных избытком $[Ca^{2+}]_i$, можно назвать активацию внутриклеточных протеаз и липаз, которая может привести к необратимому повреждению клетки. Даже если цепь событий, начинающаяся патологическим увеличением $[Ca^{2+}]_i$ и ведущая к гибели клетки, останется до конца неизвестной, вероятно, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ при старении может быть возрастспецифическим фактором риска для повреждения нейрона.

J. Satrustegui, E. Bogóñez, J. Vitórica, P. Blanco,
A. Martínez-Serrano

ALTERATIONS IN THE CALCIUM-TRANSPORT SYSTEMS OF THE RAT BRAIN SYNAPTOSOMES AND THEIR POSSIBLE INVOLVEMENT IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF AGEING

Studies were undertaken on the age-associated peculiarities of the Ca^{2+} transport systems of the rat brain synaptosomes. It has been found that $^{45}Ca^{2+}$ uptake reduced with ageing. The above reduction was not linked with the changes in the permeability of potential-dependent synaptosomal membrane Ca^{2+} depending upon the membrane potential. The distribution of calcium across the mitochondrial membrane changed with ageing, shifting towards higher extramitochondrial calcium levels in old rats, both in isolated and in synaptosomal mitochondria. While studying calcium efflux from mitochondria, it was

found that, at equivalent calcium levels in rats as compared to adult animals, after K^+ -depolarization drastically in mechanisms in neuronal injury, conditions

Center of Molecular Biology,
University of Madrid (Spain)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Armstrong D., Eckert R. Voltage related to respond to membrane potential. — P. 2518—2522.
2. Arslan P., Virgilio F. D., Bell and Yoshida carcinomas. A new model that these ascites tumor cell lines. — P. 2719—2727.
3. Ashley R. H. Buffer capacity of calcium. — P. 310—311.
4. Battaini F., Govoni S., Rius J. $[^3H]$ verapamil binding to rat brain. — P. 67—71.
5. Blaustein M. P. Calcium transport in rat brain. — P. 438—443.
6. Bogóñez E., Martínez A., Blanco P. dependent dephosphorylation of calcium. — P. S92.
7. Carafoli E. Intracellular calcium. — P. 395—433.
8. Choi D. W. Calcium-mediated role in ischemic damage. // Trends Neurosci. — 1987. — 8. — P. 329—34.
9. Coutinho O. P., Carvalho C. A. polarization and Na^+/Ca^{2+} exchange. — P. 261—271.
10. Eckert R., Chad J. E. Inactivation of calcium transport. — P. 215—267.
11. Farber J. L. The role of calcium in cell death. — P. 329—34.
12. Gibson G. E., Peterson C. C. Aging. — 1987. — 8. — P. 329—34.
13. Hansford R. G. Relation between calcium metabolism. // Rev. Physiol. — 1987. — 8. — P. 329—34.
14. Jensen J. R., Lynch G., Baudry J. sport in rat brain. // J. Neurochem. — 1987. — 8. — P. 329—34.
15. Kaiser N., Edelman I. S. Calcium transport. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — 8. — P. 329—34.
16. Landfield P. W., Pitler T. A. hippocampal neurons of aged rats. — P. 177—183.
17. Leonard J. P., Salpeter M. M. cation is mediated by calcium. // J. Neurochem. — 1987. — 8. — P. 329—34.
18. Leslie S. W., Chandler L. J., Baudry J. in mitochondria and synaptosomes. — P. 177—183.
19. Lipscombe D., Madison D. V., nels and cytosolic calcium transport. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — 8. — P. 329—34.
20. MacCormack J. G., Denton R. Trends Biochem. Sci. — 1986. — 8. — P. 329—34.
21. Martínez A., Vitórica J., Bogóñez E. pathways of calcium influx in synaptosomes. — P. 257.
22. Martínez A., Vitórica J., Satrustegui J. in rat brain synaptosomes. // J. Neurochem. — 1986. — 8. — P. 329—34.
23. Martínez-Serrano A., Bogóñez E. $^{45}Ca^{2+}$ influx in synaptosomes. — P. 257.
24. Meyers E. M., Crews F. T., O'Connell J. rat cortical synaptosomes to calcium. — 1986. — 47. — P. 1244.
25. Michaelis M. L., Johe K., Kito J. systems for Ca^{2+} regulation. — P. 225.
26. Michaelis M. L. Molecular mechanisms of calcium transport.

результаты
нения кон-
и, посколь-
л), значи-
лина в си-
а ацетилхо-
данные, по-
а также ре-
синапосо-
более высо-

не $[Ca^{2+}]_i$
ий был опи-
увеличение
х, получен-
ганеллы к
концентра-
ные насосы
ающие про-

при старе-
ические по-
терках ГНЗ
ться в ре-
следствие
газ [1, 10].
ния $[Ca^{2+}]_i$
ования ди-
к крыс.
а» клеток
ж. Так, из-
категориям
к посредст-
15, 17, 34].
хнагрузка»
измом при
йрона [8].
ся увеличе-
ний, вызван-
очных про-
вреждению
жим увели-
онца неиз-
быть воз-
рона.

INVOLVEMENT

port systems
with ageing.
of potential-
potential. The
ageing, shif-
isolated and
ndria, it was

т. 36, № 5

found that, at equivalent calcium loads, the calcium efflux rates were slower in old rats as compared to adult animals. As observed, both resting $[Ca^{2+}]_i$ and that obtained after K-depolarization drastically increased in old animals. The possible pathogenic mechanisms in neuronal injury, conditioned by this increase, are discussed.

Center of Molecular Biology,
University of Madrid (Spain)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Armstrong D., Eckert R. Voltage activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84.—P. 2518—2522.
2. Arslan P., Virgilio F. D., Beltrame M. et al. Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in ehrlich and yoshida carcinomas. A new membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+} // J. Biol. Chem.—1985.—260.—P. 2719—2727.
3. Ashley R. H. Buffer capacity of intracellular Ca^{2+} indicators // Biochem. J.—1986.—240.—P. 310—311.
4. Battaini F., Govoni S., Rius R. A., Trabucchi M. Age-dependent increase in $[^3H]$ verapamil binding to rat cortical membranes // Neurosci. Lett.—1985.—61.—P. 67—71.
5. Blaustein M. P. Calcium transport and buffering in neurons // Trends Neurosci.—1988.—11.—P. 438—443.
6. Bogónez E., Martínez A., Blanco P., Satrustegui J. Effects of ageing on depolarization dependent dephosphorylation of synaptosomal proteins // Neurochem. Int.—1988.—13.—P. S92.
7. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis // Ann. Rev. Biochem.—1987.—56.—P. 395—433.
8. Choi D. W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage // Trends Neurosci.—1988.—11.—P. 465—469.
9. Coutinho O. P., Carvalho C. A. M., Carvalho A. P. Calcium uptake related to K^+ -depolarization and Na^+/Ca^{2+} exchange in sheep brain synaptosomes // Brain Res.—1984.—290.—P. 261—271.
10. Eckert R., Chad J. E. Inactivation of Ca^{2+} channels // Progr. Biophys. Mol. Biol.—1984.—44.—P. 215—267.
11. Farber J. L. The role of calcium in cell death // Life Sci.—1981.—29.—P. 1289—1295.
12. Gibson G. E., Peterson C. Calcium and the aging nervous system // Neurobiol. Aging.—1987.—8.—P. 329—343.
13. Hansford R. G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.—1985.—102.—P. 1—72.
14. Jensen J. R., Lynch G., Baudry M. Polyamines stimulate mitochondrial calcium transport in rat brain // J. Neurochem.—1987.—48.—P. 765—772.
15. Kaiser N., Edelman I. S. Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74.—P. 638—642.
16. Landfield P. W., Pittler T. A. Prolonged Ca^{2+} -dependent after hyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats // Science.—1984.—226.—P. 1089—1092.
17. Leonard J. P., Salpeter M. M. Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium // J. Cell. Biol.—1979.—82.—P. 811—819.
18. Leslie S. W., Chandler L. J., Barr C., Farrar R. P. Reduced calcium uptake by rat brain mitochondria and synaptosomes in response to aging // Brain Res.—1985.—329.—P. 177—183.
19. Lipscombe D., Madison D. V., Poenie M. et al. Spatial distribution of calcium channels and cytosolic calcium transients in growth cones and cell bodies of sympathetic neurons // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.—P. 2398—2402.
20. McCormack J. G., Denton R. M. Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria // Trends Biochem. Sci.—1986.—11.—P. 258—262.
21. Martínez A., Vitórica J., Bogónez E., Satrustegui J. Differential effects of age on the pathways of calcium influx into nerve terminals // Brain Res.—1987.—435.—P. 249—257.
22. Martínez A., Vitórica J., Satrustegui J. Cytosolic free calcium levels increase with age in rat brain synaptosomes // Neurosci. Lett.—1988.—88.—P. 336—342.
23. Martínez-Serrano A., Bogónez E., Vitórica J., Satrustegui J. Reduction of K^+ -stimulated $^{45}Ca^{2+}$ influx in synaptosomes with age involves inactivating and noninactivating calcium channels and is correlated with temporal modifications in protein dephosphorylation // J. Neurochem.—1989.—52.—P. 576—584.
24. Meyers E. M., Crews F. T., Otero D. H., Laren K. Aging decreases the sensitivity of rat cortical synaptosomes to calcium ionophore-induced acetylcholine release // J. Neurochem.—1986.—47.—P. 1244—1246.
25. Michaelis M. L., Johe K., Kitos T. E. Age-dependent alterations in synaptic membrane systems for Ca^{2+} regulation // Mech. Ageing and Develop.—1984.—25.—P. 215—225.
26. Michaelis M. L. Molecular mechanisms underlying age-dependent alterations in calcium

