

7. *Averameas S.* In: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 57, 1169, 1968.
8. *Fields R.* In: *Methods in Enzymol.*, 25 (3), 451-455, Acad. Press, New-York—San-Francisco—London, 1972.
9. *Gray W. R.* In: *Methods in Enzymol.*, 11, 139-151, Acad. Press., New-York—London, 1967.
10. *Ishimaru K., Kihara H., Ohno M. J.* *Biochem.*, 89, 2, 413-451, 1980.
11. *Maraganore J. M., Heineken R. L. J.* *Biol. Chem.*, 259, 22, 13839-13843, 1984.
12. *Roberts M. F., Deems R. A., Dennis E. J.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 5, 1950-1954, 1977.
13. *Salach J. J., Turini P., Song R., Harber J., Singer T. P. J.* *Biol. Chem.*, 246, 2, 331-339, 1971.
14. *Wells M. A.* *Biochemistry*, 12, 6, 1086-1093, 1973.
15. *Wells M. A., Hanahan D. J.* In: *Methods in Enzymol.*, 11, 179-181, Acad. Press., New-York-London, 1969.

Получено 26.IV 1988 г.

Биол. ж. Армения. № 6 (42) 1989

УДК 577.352.51:577.351

МОДУЛЯЦИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЦИКЛАЗНЫХ СИСТЕМ К АЦЕТИЛХОЛИНУ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2

Д. М. МАРТИРОСЯН, С. С. ДАДАЛЯН, Н. С. БАКУНИ,
Г. С. МАНАРНИ, С. И. АЙРАПЕТАН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что фосфолипаза A_2 увеличивает внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ и модулирует влияние ацетилхолина на систему циклических нуклеотидов.

Վերջ 1 տրված, որ A_2 ֆոսֆոլիպազը զննված է ներքնային ցԱՄՖ և ցԳՄՖ բաժնիքը և վերափոխում ազնորիտիկորդ ազդեցությանը ցիկլիկ նուկլեոտիդների համակարգի վրա:

It is shown that phospholipase A_2 increases the intracellular concentration of both cAMP and cGMP and modulates the acetylcholine influence on the cyclic nucleotides system.

Фосфолипаза A_2 —циклические нуклеотиды—ацетилхолин.

Данные о влиянии ацетилхолина на внутриклеточное содержание циклических нуклеотидов противоречивы. Так, АХ увеличивал содержание цГМФ в симпатических ганглиях быка [8], но в нейрональных ганглиях интравидной улитки несколько снижал его [1]. Было показано также, что АХ ингибирует аденилатциклазу сердечной мышцы и печени [10], однако в срезах мозгового вещества надпочечника быка он стимулировал аккумуляцию цАМФ, не влияя на активность аденилатциклазы [4].

Известно, что фосфолипаза A_2 (ФЛ A_2) оказывает влияние на внутриклеточный уровень цГМФ [9], а также может модулировать ионную проницаемость и АХ-чувствительность нервных клеток [3, 7].

Сокращения: ФЛ A_2 —фосфолипаза A_2 ; ЦК—дециленовая кислота

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ФЛ-А₂ на уровень цАМФ и цГМФ в условиях действия АХ.

Материал и методика. Эксперименты проводили на изолированной центральной нервной системе виноградной улитки (XII.1988). Использовали физиологический раствор следующего состава (мМ): NaCl—84, KCl—4, CaCl₂—7, MgCl₂—15, глюкоза—10, трис-НСl—10. Реактивы применяли в следующих концентрациях: АХ—10⁻⁵ М, фосфолипаза Д—20 мкг/мл (фирма Serva), дешиленовая кислота (ДК)—1,5 мМ (TOKYO KASEI Co.ltd., JAPAN), кетамин—10⁻⁴ М (Parke Davis Company, London) ФЛ-А₂—20 мкг/мл (получена из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana* Eichwald в Институте биохимии АН УзССР). Активность фермента определяли эвлюметрическим методом [11], что составляет условных 33000 ед/мг.

Изменение текучести липидов под действием ФЛ-А₂ и кетамина определяли с помощью флуоресцентного зонда пирена [12].

Внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ измеряли следующим образом: препарированные ганглии инкубировали в соответствующих растворах (с АХ—в течение 5 минут, с фосфолипазой—10 мин, с кетамин и ДК—30 минут), затем ганглии гомогенизировали в 50 мМ трис-НСl, содержащем 10 мМ ЭДТА (рН 7.4). Белки осаждали спиртом (96%) с последующим центрифугированием при 10000 g в течение 15 минут. Осадок промывали 70%-ным спиртом и вновь центрифугировали в течение 5 минут. Полученные надосадки объединяли и подвергали высушиванию в вакууме. Концентрацию циклических нуклеотидов определяли радиоиммунным методом [12], используя стандартный набор реактивов радиохимического центра «Amersham» (Англия).

Результаты и обсуждение. Как видно на рис. 1, АХ не влияет на внутриклеточное содержание цАМФ. В условиях предварительной инкубации ганглия в растворе, содержащем ФЛ-А₂, уровень цАМФ по-

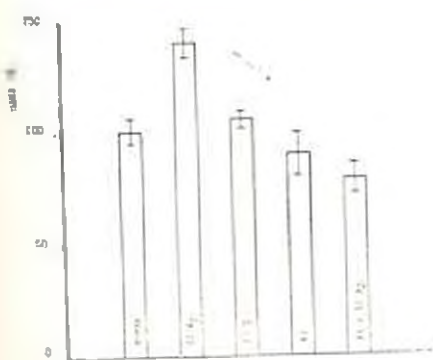


Рис. 1.

Рис. 1 Изменение внутриклеточного содержания цАМФ в различных условиях инкубации (n=10).

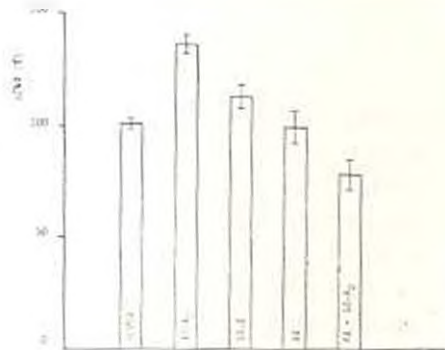


Рис. 2.

Рис. 2 Изменение количества цГМФ (%) в различных условиях инкубации (n=10).

вышается на 40%. В этих же условиях под влиянием АХ он снижается почти в два раза. Аналогичное воздействие наблюдается и при изучении влияния АХ и ФЛ-А₂ на внутриклеточное содержание цГМФ (рис. 2). При этом ФЛ-А₂ увеличивает содержание цГМФ на 35%. Из рисунка видно также, что фосфолипаза Д не влияет на содержание циклических нуклеотидов в клетке.

Представленные данные подтверждают результаты, полученные ранее другими авторами [9], показавшими, что ФЛ-А₂ стимулирует активность циклазных систем.

Известно, что активность мембранных ферментов зависит как от липидного состава, так и от текучести липидного слоя мембраны. Исследование влияния ФЛ- A_2 на текучесть липидного слоя грубых микросомальных фракций мембраны нейроны виноградной улитки выявило снижение текучести мембраны на 8%. Для выяснения роли текучести липидов в процессе стимуляции уровня цАМФ и цГМФ фосфолипазой A_2 , ганглии предварительно обрабатывались веществами модулирующими текучесть липидов (кетамин и ДК). Было показано, что как ДК (ненасыщенная жирная кислота с 10 атомами углерода в углеводородной цепи), повышающая текучесть [13], так и кетамин (2-пирро-хлорофилл-2-метиламино-циклогексана гидрохлорид, диссоциативный анестетик), уменьшающий текучесть клеточных мембран [5], не оказывают влияния на количество цАМФ (табл.). Однако предва-

Изменение уровня циклических нуклеотидов в зависимости от текучести мембраны, % $n=10$

Условия инкубации	цАМФ	цГМФ
Нормал	100 ± 5	100 ± 5
ФЛ- A_2	$140 \pm 7^*$	$131 \pm 6^*$
ДК	100 ± 9	124 ± 8
ДК+ФЛ- A_2	$133 \pm 15^*$	$137 \pm 8^*$
Кетамин	90 ± 7	$163 \pm 9^*$
Кетамин+ФЛ- A_2	118 ± 8	$230 \pm 10^*$

* — статистически достоверное отклонение ($P < 0.05$)

рительная инкубация ганглиев в среде, содержащей кетамин, резко повышает содержание цГМФ в клетках. При этом сохраняется стимулирующее влияние ФЛ- A_2 на уровень цГМФ, происходит суммация эффектов кетамина и ФЛ- A_2 .

Как видно из таблицы, ДК также увеличивает содержание цГМФ, хотя и в меньшей степени по сравнению с кетамином.

Таким образом, и при увеличении, и при уменьшении текучести мембраны не меняется уровень цАМФ и увеличивается уровень цГМФ, а ФЛ- A_2 в обоих случаях сохраняет стимулирующее влияние на содержание циклических нуклеотидов. Это позволяет предположить, что модуляция чувствительности циклазных систем ФЛ- A_2 не зависит от изменения текучести липидов.

Известно, что под действием ФЛ- A_2 происходит образование свободных жирных кислот. Наряду с этим показано, что свободные жирные кислоты могут оказывать влияние на уровень цАМФ и цГМФ в клетке [6]. Полученные нами экспериментальные данные можно интерпретировать следующим образом: под действием ФЛ- A_2 происходит образование свободных жирных кислот, которые путем прямого взаимодействия с циклазными системами активируют их, что в свою очередь приводит к повышению внутриклеточного уровня цАМФ и цГМФ. Тот факт, что изменение текучести мембраны не влияет на эффекты ФЛ- A_2 , также свидетельствует в пользу нашего предположения.

На основании вышесказанного можно полагать, что чувствительность циклических систем нейрональных мембран к АК может зависеть от степени активности фосфолипаз. Противоречивость результатов исследований, полученных при изучении влияния АХ на уровни циклических нуклеотидов, может объясняться тем, что сезонные изменения (особенно выраженные у пойкилотермных животных) могут приводить к изменению фосфолипазной активности, что, в свою очередь, может влиять на чувствительность цАМФ и цГМФ к АХ.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаб. биофизики Института фотобиологии АН БССР за предоставленную возможность и помощь при измерении текучести мембранных фракций. Авторы благодарят также сотрудника Института биохимии АН АрмССР Айяна А. за помощь при определении активности ФЛ-А₂.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дабаян С. С., Азатян К. В., Айрапетян С. Н. Нейрохимия, 7, 1, 18—25, 1988.
2. Охунь И. М., Казар Г. Н., Волковец Т. М., Мережинская Н. В., Кочев С. В. Биохимия, 51, 7, 1132—1140, 1986.
3. Andreassen T. J., Doerge D. M., McNamee M. G. Arch. Biochem. Biophys., 194, 468—480, 1979.
4. Boonyavetroj P., Cuytman J. Pharmacol., 297, 241—247, 1977.
5. Familiari M. Minerva Anesthesiol., 43, 435—448, 1977.
6. Golberg N. D., Haddox M. K. Ann. Rev. Biochem., 46, 823—886, 1977.
7. Kimura M., Kimura I., Shikada A., Takahashi K. Int. J. Dev. Neuroscience, 5, 2, 127—133, 1987.
8. Lee T. P., Kuo J. F., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3287—3289, 1972.
9. Letzicki J. A., Waldman S. A., Cheng D., Marad F. Fed. Proc., 42, 902, 1983.
10. Murad F., Chl J. M., Rall T. W., Sutherland E. W. J. Biol. Chem., 237, 1233—1239, 1962.
11. Salach J. L., Turtai C., Song R., Hauber J., Singer T. P. J. Biol. Chem., 246, 331—339, 1971.
12. Seiner A. L., Parson L. S., Chase L. R., Kiput D. M. J. Biol. Chem., 247, 1114—1120, 1972.
13. Takenaka T., Horii H. J. Neurobiology, 14, 47—60, 1983.

Поступило 15.11.1989 г.