



УДК 612.825.1:577.175.822:577.122

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА НА ВКЛЮЧЕНИЕ  $[^3\text{H}]$ ЛЕЙЦИНА  
В БЕЛКИ СРЕЗОВ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ

АРУТЮНЯН Д. А., МАНУКЯН К. Г.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучено влияние разных доз АХ— $10^{-2}$ — $10^{-7}$  М на включение L-[4, 5- $^3\text{H}$ ]лейцина в суммарные белки и белки протеолипидов (ПЛ) срезов коры мозга крысы. Показано, что АХ в концентрации  $10^{-2}$  М подавляет включение лейцина в белки ПЛ на 45% и в суммарные белки—на 40%. С уменьшением концентрации АХ до  $10^{-5}$  М его ингибирующее влияние на включение лейцина в суммарные белки почти не менялось (44%), а в белки ПЛ заметно снижалось—до 18%. АХ в концентрации  $10^{-6}$ — $10^{-7}$  М не оказывал статистически достоверного эффекта. Блокирование рецепторов АХ специфическими мускариновыми (атропин— $10^{-6}$  М) и никотиновыми (синаменсин— $5 \cdot 10^{-7}$  и тубокурарин— $10^{-4}$  М) антагонистами снимало ингибирующее действие АХ ( $5 \cdot 10^{-5}$  М). Сами антагонисты не влияли на включение лейцина в белки. Высказывается предположение, что эффект АХ опосредован через холинорецептор.

В настоящее время показано, что нейромедиаторы, наряду со своей основной функцией в НС—участием в процессах синаптической передачи, могут также влиять на метаболическую активность нервной ткани, в частности на скорость синтеза белка на уровне экспрессии генов [1]. Изучение влияния различных нейрoактивных веществ на процессы синтеза белка в нервной ткани *in vivo* и *in vitro* выявило разнонаправленность оказываемых эффектов. Кислые аминокислоты—глутамат, аспартат, dl-гомоцистеат, имеющие *in vivo* возбуждающий эффект на НС, ингибировали синтез белка в срезах коры мозга пропорционально их возбуждающему эффекту [2]. Нейромедиаторы—норадреналин, дофамин, серотонин, оказывающие в основном тормозное действие, также ингибировали синтез белка в опытах как *in vivo*, так и *in vitro* [3—5]. Исключением составлял ГАМК, которая стимулировала рибосомный синтез [6, 7].

В ряде работ исследовалось влияние АХ и холинергических соединений на интенсивность синтеза РНК и белков в нервной ткани [4, 5, 8, 9]. Полученные факты свидетельствуют об определенном влиянии АХ на эти процессы, но имеется некоторое несоответствие как в отношении эффектов *in vivo* и *in vitro*, так и воздействия в сходных экспериментальных условиях, так что вопрос нуждается в дальнейшем изучении. Целью настоя-

шей работы было исследование на срезах коры мозга влияния разных доз АХ и блокаторов ацетилхолиновых рецепторов на включение [ $^3\text{H}$ ]лейцина в суммарные белки и белки ПЛ, являющихся представителями типично мембранных белков и интегральными компонентами клеточных мембран нервной ткани.

### Материалы и методы

Опыты проводили на белых беспородных крысах массой 130—150 г. Большие полушария мозга очищали от оболочек и готовили срезы толщиной 0,3—0,5 мм. Для воспроизводимости результатов срезы одного полушария каждого мозга брали в контрольную пробу, другого в опытную. В инкубационный сосуд помещали до 200 мг срезов. Инкубацию проводили в 4 мл Кребс-бикарбонатного буфера [10], рН которого был доведен до 7,4 пропусканием газовой смеси: 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ . Пробы инкубировали при 37° в токе той же газовой смеси на качалке в течение 2 ч. После 10 мин преинкубации добавляли L-[4, 5- $^3\text{H}$ ]лейцин (У. А. 250 мКи/ммоль, «Amersham», Англия) в конечной концентрации 1 мКи/мл, а к опытным пробам также  $10^{-3}$  М эсерин сульфата («Sigma», США) и ацетилхолин хлорид («Sigma», США) в требуемой концентрации. В опытах с блокированием холинорецепторов добавляли атропин сульфат— $10^{-5}$  М («Merck», Швейцария), сияменсин— $5 \cdot 10^{-7}$  М (нейротоксин, выделенный из яда тайландской кобры *Naja naja siamensis* [11]), тубокурарин— $10^{-4}$  М («Serva», ФРГ) отдельно или вместе с АХ— $5 \cdot 10^{-5}$  М. Инкубацию останавливали добавлением 10 мл холодного буфера. Срезы промывали буфером и 1 мМ раствором лейцина, гомогенизировали в 20-кратном объеме смеси хлороформ-метанол 2:1 по методу Folch и соавт. [12], оставляли 60 мин при комнатной температуре, затем фильтровали через стеклянный фильтр № 2. Осадок на фильтре промывали той же смесью и высушивали на воздухе, для определения суммарных белков часть осадка гомогенизировали в 0,6 н. NaOH и инкубировали при 37° 18 ч. Брали равные объемы раствора на определение белка и счет радиоактивности. Белок определяли по методу Hess, Lewin [13].

Липидные экстракты, содержащие ПЛ, отмывали на ледяной бане 0,2 объемами дистиллированной воды, затем смесью хлороформ-метанол-вода (3:48:47). Промытую хлороформную фазу выпаривали под вакуумом после добавления половины от имеющегося объема хлороформа. Осадок растворяли в смеси хлороформ-метанол-вода (86:14:1) и осаждали ПЛ 8-кратным объемом смеси спирт-эфир (3:2). Осаждение проводили при —30° в течение 4 ч. Осадок после центрифугирования промывали таким же объемом смеси спирт-эфир (1:1) при 23° для удаления липидов.

Полученные очищенные ПЛ (ОПЛ) растворяли в смеси хлороформ-метанол-вода (86:14:1) и брали пробы на определение белка и счет радиоактивности. ПЛ солиubilизировали 0,5 М протозолом («New England Nuclear», США), добавляли сцинтилляционную жидкость Брея [14] и измеряли распады в минуту на жидкостном сцинтилляционном счетчике

SL-30 «Intertechnique» (Франция) с внешним стандартом. Белок ПЛ определяли по методу. Lees, Rahman [15]. Рассчитывали величину У. А. в расп/мин/мг белка.

### Результаты исследования

АХ почти во всем исследованном диапазоне концентраций подавляла включение  $[^3\text{H}]$ лейцина в белки коры мозга (табл. 1). Высокие концентрации АХ— $10^{-2}$  М вызывали значительное угнетение включения  $[^3\text{H}]$ лейцина в суммарные белки (на 40%), и в белки ПЛ (на 45%). При снижении концентрации АХ до  $10^{-5}$  М его ингибирующее влияние на

Таблица 1

Влияние разных концентраций АХ на включение  $[^3\text{H}]$ лейцина в суммарные белки и белки протеолизидов (ПЛ) срезов коры мозга (У. А. белков в % от уровня в контроле)

| Белки           | Концентрация АХ (М) |                   |                   |                    |            |           |
|-----------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------|-----------|
|                 | $10^{-2}$           | $10^{-3}$         | $10^{-4}$         | $10^{-5}$          | $10^{-6}$  | $10^{-7}$ |
| Суммарные белки | $60 \pm 5$<br>(10)  | $63 \pm 5$<br>(3) | $59 \pm 6$<br>(3) | $56 \pm 12$<br>(4) | 120<br>(2) | 89<br>(2) |
| Белки ПЛ        | $55 \pm 5$<br>(11)  | $77 \pm 6$<br>(3) | $74 \pm 3$<br>(3) | $82 \pm 8$<br>(4)  | 116<br>(2) | 80<br>(2) |

включение лейцина в белки ПЛ заметно снижалось (до 18%), а в суммарные белки почти не менялось, оставаясь на том же уровне (44%). Добавление к срезам  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  М АХ не оказывало статистически достоверного эффекта.

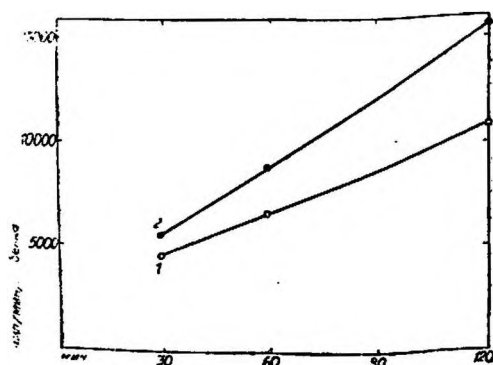


Рис. Влияние АХ на включение  $[^3\text{H}]$ лейцина в суммарные белки срезов коры мозга крыс в зависимости от времени. 1 — пробы, содержащие  $10^{-5}$  М АХ,  $10^{-3}$  М эзерин сульфата и 1 мкКи/мл  $[^3\text{H}]$ лейцина. 2 — контрольные пробы; инкубационной среде отсутствуют АХ и эзерин сульфат

В дальнейшем использовали  $10^{-5}$  М концентрацию АХ, которая наиболее близка к физиологическим концентрациям этого медиатора в ткани мозга. Ингибитор АХЭ — эзеринсульфат в примененной концентрации ( $10^{-3}$  М) не влиял на включение лейцина в белки.

Изучали временную зависимость эффекта АХ на включение  $[^3\text{H}]$ лейцина в суммарные белки коры мозга. Установили, что ингибирующее влия-

ние АХ линейно возрастает в исследованном промежутке времени (рисунок). Так, после 30 мин инкубации с АХ он подавлял включение лейцина в суммарные белки на 19% по сравнению с контролем, после 60 мин на 35%, а через 120 мин уровень ингибиции достигал 51%.

Для исследования механизмов ингибирующего влияния АХ на включение аминокислот в белки, изучали его эффект на фоне блокирования мускариновых и никотиновых холинорецепторов.

Таблица 2

Влияние антагонистов АХ на включение [ $^3\text{H}$ ]лейцина в суммарные белки и белки протеолипидов (ПЛ) срезов коры мозга  
и на эффект АХ

| Антагонист                           | Концентрация, М   | У. А. в % от контроля |                     |
|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|
|                                      |                   | Суммарные белки       | Белки ПЛ            |
| Атропин                              | $10^{-6}$         | $110 \pm 11$<br>(4)   | $110 \pm 17$<br>(3) |
| Атропин + $5 \cdot 10^{-5}$ М АХ     | $10^{-6}$         | $102 \pm 9$<br>(5)    | $94 \pm 11$<br>(6)  |
| Сианесин                             | $5 \cdot 10^{-7}$ | $115 \pm 3$<br>(3)    | $106 \pm 9$<br>(3)  |
| Сианесин + $5 \cdot 10^{-5}$ М АХ    | $5 \cdot 10^{-7}$ | $97 \pm 7$<br>(2)     | $106 \pm 10$<br>(3) |
| Тубокурарин                          | $10^{-4}$         | $92 \pm 2$<br>(3)     | $105 \pm 3$<br>(3)  |
| Тубокурарин + $5 \cdot 10^{-5}$ М АХ | $10^{-4}$         | —                     | $119 \pm 2$<br>(3)  |

Антагонист мускариновых рецепторов—атропин в концентрации  $10^{-6}$  М не влиял на включение [ $^3\text{H}$ ]лейцина в суммарные белки и белки ПЛ, а при одновременном добавлении с АХ ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) полностью снимал его ингибирующий эффект (табл. 2). Хотя в коре мозга преобладают холинорецепторы мускаринового типа, специфические никотиновые антагонисты: сианесин ( $5 \cdot 10^{-7}$  М [16]) и d-тубокурарин ( $10^{-4}$  М) оказывали сходный с атропином эффект. Сами по себе они не влияли на включение лейцина в белки, а при одновременном добавлении с АХ снимали его подавляющее действие (табл. 2).

### Обсуждение результатов

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют об ингибирующем влиянии АХ на синтез белка в нервной ткани при концентрациях  $10^{-2}$ — $10^{-5}$  М в условиях *in vitro*. Подобный эффект, но выраженный слабее, наблюдали на срезах мозга Тихонов и соавт. [5] при концентрациях АХ порядка  $10^{-3}$  М. Демин, Рубинская [8] в опытах *in vivo* при повышении уровня эндогенного АХ под влиянием ингибитора АХЭ армина обнаружили кратковременное преходящее снижение РНК в мотонейронах спинного мозга и стойкое уменьшение концентрации РНК в глияльных клетках сателлитов. Другие авторы, наоборот, отмечают опре-

деленное усиление синтеза белка в мозговой ткани *in vivo* при введении ингибиторов АХЭ или холиномиметика ареколина [4]. Такие же противоположные эффекты в отношении влияния АХ в опытах *in vivo* и *in vitro* были получены и при исследовании активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы [9, 17, 18]. По-видимому, эффект АХ на синтез белка зависит от многих неизвестных пока факторов.

Примененная в наших опытах концентрация АХ— $10^{-5}$  М равна приблизительно вычисленной концентрации медиатора в цитоплазме нервных клеток мозга крысы [19]. При этой физиологической концентрации АХ тормозил в большей степени включение аминокислот в суммарные белки коры мозга, тогда как эффект на включение в белки ПЛ был значительно слабее. В связи с тем, что белки ПЛ характеризуются сравнительно низкой скоростью обновления, не исключено, что эффект АХ сильнее выражен в отношении какой-то метаболически более активной фракции суммарных белков. С другой стороны, поскольку срезы коры мозга не подвергались дальнейшему субфракционированию, определенную долю исследованных ПЛ составляли более инертные в метаболическом отношении ПЛ миелина. Возможно, что при раздельном изучении субклеточных фракций выявятся различия в эффекте АХ на синтез белка ПЛ в разных субклеточных образованиях.

Можно предположить, что эффект АХ на включение лейцина в белки коры мозга является медиаторным по своей природе и проявляется на уровне рецепторов как мускаринового, так и никотинового типа. Вероятно, он реализуется через взаимодействие АХ с рецепторами на клеточной мембране, что, по-видимому, приводит к изменению синтеза циклических нуклеотидов или ионного состава клетки. Этим, вероятно, и объясняется неспецифичность выявленного эффекта к одному типу холинорецепторов. Об опосредованном через рецепторы влиянии нейромедиаторов на процессы синтеза белка в нервной ткани свидетельствуют и данные других авторов [3, 4].

Приносим свою благодарность доктору Э. Карлссону (Институт биохимии Уппсальского университета) за любезное предоставление препарата синаменсина.

## THE EFFECT OF ACETYLCHOLINE ON THE INCORPORATION OF $^3\text{H}$ -LEUCINE INTO PROTEINS OF RAT CEREBRAL CORTEX SLICES

ARUTYUNYAN D. L., MANUKYAN K. H.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

We studied the effect of various doses of acetylcholine (ACh) ( $10^{-2}$ — $10^{-7}$  M) on the incorporation of L-[4,5- $^3\text{H}$ ]-leucine in total protein and proteolipids of rat brain cortex slices. ACh in concentration of  $10^{-2}$  M inhibits the incorporation of leucine into proteins of proteolipids by 45% and into total proteins by 40%. As ACh concentration

was decreased down to  $10^{-5}$  its inhibitory effect on the incorporation of leucine into total proteins showed almost no changes, whereas the effect of incorporation into proteins of proteolipids markedly decreased down to 18%. ACh in concentrations of  $10^{-6}$ — $10^{-7}$  M showed no statistically significant effect. The inhibition of the ACh receptor using specific antagonists of muscarinic (atropine  $10^{-6}$  M) and nicotinic (siamensin  $5 \cdot 10^{-7}$  M and d-tubocurarine  $10^{-4}$  M) antagonists abolished the inhibitory effect of ACh ( $5 \times 10^{-5}$  M). The antagonists alone showed no effect on leucine incorporation into proteins. It is proposed that the observed effect of ACh is mediated through the cholinergic receptor.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Schmitt F. O., Dev P., Smith B. H. Science, v. 193, p. 114—120, 1976.
2. Orrego F., Lipman F. J. Biol. Chem., v. 242, p. 665—671, 1967.
3. Weiss B. F., Liebschutz J. L., Wurtman R. J., Munro H. N. J. Neurochem., v. 24, p. 1191—1195, 1975.
4. Еласв Н. Р. Докл. АН СССР, т. 216, с. 452—454, 1974.
5. Тихонов В. Х., Валсв Р. М., Мяснцев А. Н. Укр. біохім журн., т. 45, с. 271—275, 1973.
6. Goertz B. Exp. Brain Res., v. 34, p. 365—372, 1979.
7. Lipton P., Heimbach C. J. J. Neurochem., v. 31, p. 1299—1307, 1978.
8. Демин Н. Н., Рубинская Н. Л. Изв. АН СССР, Сер. биол., 3, с. 426—434, 1972.
9. Еласв Н. Р. Биохимия, т. 45, с. 1749—1754, 1980.
10. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф.—В кн.: Манометрические методы изучения тканевого обмена, с. 49, М., ИЛ, 1951.
11. Karlson E., Arnberg H., Eaker D. Eur. J. Biochem., v. 21, p. 1—17, 1971.
12. Folch J., Lees M. B., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 226, p. 497—509, 1957.
13. Hess H. H., Lewin E. J. J. Neurochem., v. 12, p. 205—211, 1965.
14. Bray G. A. Anal. Chem., v. 1, p. 279—285, 1960.
15. Lees M. B., Paxman S. Anal. Biochem., v. 47, p. 184—192, 1972.
16. Eaker D., Harris J. B., Thesleff S. Eur. J. of Pharmacology, v. 15, p. 254—256 1971.
17. Еласв Н. Р., Семснв Е. В. Биохимия, т. 39, с. 639—640, 1974.
18. Болдырев А. А., Твсрдислав В. А. Итоги науки и техники, Биофизика, т. 10, ВИНТИ, М., 1978.
19. Hanin J., Massarelli R., Costa E.—In: Drugs and cholinergic mechanisms in the CNS, p. 145—264, Stokholm, 1970.

Поступила 4. VI 1988