



УДК 577.175.822+577.112+612.812

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА НА СИНТЕЗ БЕЛКА В
ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАХ
ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

ГРИНКЕВИЧ Л. Н., ЛИСАЧЕВ П. Д., ШТАРК М. Б.

Институт автоматки и электрометрии СО АН СССР, Новосибирск

До настоящего времени малоизученным остается вопрос о механизмах управления внутриклеточными процессами в возбудимых клетках. Наиболее продуктивной представляется гипотеза о ключевой роли хемочувствительной нейрональной мембраны, где, возможно, локализован механизм сопряжения между поверхностной мембраной и внутриклеточными процессами, меняющимися в зависимости от уровня специфической активности [1].

В настоящей работе исследовалось влияние АХ на синтез белков в нейронах пула Д (RPa D), расположенных на дорзальной поверхности подглоточного комплекса ганглиев виноградной улитки [2].

Эксперименты выполнены на половозрелых виноградных улитках *Helix pomatia*. До начала эксперимента животных содержали в активном состоянии, после чего у них извлекали подглоточный комплекс ганглиев и инкубировали в течение суток в 2 мл физиологического раствора для улиток [1] с добавлением глюкозы до 0,1% и меченого [³H]лейцина ([L-4,5-³H]лейцин) в концентрации 0,25 мКи/мл. В инкубационный раствор добавляли АХ в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. Для отведения электрической активности нейронов пула Д использовали микроэлектроды, заполненные 2,5 М раствором KCl. Клетки пула Д извлекали и помещали в капилляр диаметром 1 мм для гомогенизации и центрифугирования. Гомогенизацию проводили в 5 объемах буфера 0,06 М трис-HCl, рН 6,7, содержащего 0,002 М ЭДТА, 0,25 М сахарозу и 0,5%-ный тритон X-100. Полноту гомогенизации контролировали с помощью бинокулярного микроскопа МБС-2. Центрифугирование вели при 18000 g в течение 1 ч, после чего надосадочную жидкость подвергали микроэлектрофорезу в ПААГ (Т=7,5%, С=3,2%). Электрофорез проводили в системе Ориштейна и Дэвиса при стабилизированном напряжении 150 В на время концентрирования и 300 В на время разделения. Фронт маркировали бром-феноловым синим [3]. После того, как полоса фронта продви-

галась на расстояние 10 мм от начала разделяющего геля, электрофорез останавливали, гели выдавливали, фиксировали, окрашивали амидо-черным 10Б («Reanal», Венгрия) в 7,5%-ной уксусной кислоте и сканировали на двухлучевом микроспектрофотометре, длина волны 580 нм, луч сравнения 450 нм. Затем гели разрезали на фрагменты (1 мм), которые растворяли в 0,15 мл 30%-ной перекиси водорода при 50° в течение ночи. Счет вели на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Multi-mat-20 в толуоловом сцинтилляторе [4].

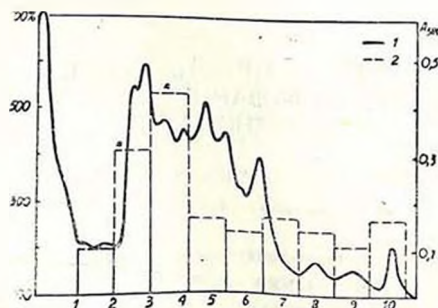


Рис. Включение $[^3\text{H}]$ лейцина в белковые фракции нейронов пула Д при инкубации ЦНС виноградной улитки с АХ: 1—оптический профиль, 2—профиль радиоактивности (относительно контроля); * $p < 0,01$ по отношению к контролю. По оси абсцисс—номер фракции, по оси ординат слева—% включения меченого предшественника на мкг белка в зоне нейронов, инкубированных с АХ, по отношению к контрольным. Контроль принят за 100% и совпадает с осью абсцисс. По оси ординат справа—относительная оптическая плотность

При сравнении оптических профилей белков контрольных животных и улиток, ганглии которых инкубировали с АХ, не обнаруживалось достоверных отличий в количестве и концентрации белков исследуемых зон. Сопоставление при этом профилей удельной радиоактивности (на 1 мг белка во фракции) показало увеличение включения метки во все исследуемые фракции в среднем более чем в 2 раза (рисунок).

Как видно из представленных на рисунке данных, выявлено 2 фракции, для которых характерно наиболее интенсивное увеличение включения метки под влиянием АХ. Так, удельная радиоактивность в 3-ей фракции возрастала на 300%, а в 4-ой—на 450% относительно контроля. Так как эти фракции находятся в непосредственной близости друг от друга, возможно, что при нарезке геля в обе смежные фракции попадает разное количество одного и того же белка.

Применяемый нами гомогенизирующий буфер экстрагирует водорастворимые и слабосвязанные мембранные белки. Поэтому отсутствие увеличения количества белка в цитоплазме нейрона при интенсификации его синтеза можно объяснить несколькими причинами: процессингом интенсивно синтезирующегося белка и секретией образующихся пептидов за

пределы клетки: переходом белка (либо пептидов) в мембраносвязанное состояние или его модификацией (или гидролизом), в результате чего продукты процессинга детектируются в других зонах, либо не фиксируются применяемой нами системой электрофореза, не предназначенной для изучения низкомолекулярных пептидов.

Принимая во внимание тот факт, что белки 3-ей и 4-ой фракций являются высокомолекулярными, а клетки пула Д нейросекреторными, наиболее вероятным представляется предположение о наличии в этих фракциях белка-предшественника нейросекрета клеток пула Д. Подвергаясь процессингу, белок расщепляется на пептиды, которые и секретируются клетками пула Д. Эта гипотеза хорошо объясняет как интенсификацию синтеза белка-предшественника, так и отсутствие его накопления в цитоплазме нервных клеток. В этой связи необходимо отметить, что в последнее время как у моллюсков, так и у высших позвоночных животных обнаружены белки-предшественники для нескольких классов нейропептидов, например, гормона откладывания яиц, механизмы процессинга которых в настоящее время интенсивно изучаются [5].

В условиях электрофизиологического эксперимента внесение АХ в омывающий раствор вызывало гиперполяризацию клеток пула Д, что соответствует литературным данным [2]. Восстановление исходной активности длилось до 40 мин. Следовательно, интенсификация биосинтеза в клетках группы Д не вызвана увеличением импульсной активности нейронов. Возможно, усиление биосинтеза связано с модулирующим действием АХ на белоксинтезирующие системы.

В частности, влияние АХ на биосинтез белка может быть реализовано через изменение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме нервной клетки [6]. Таким образом, клетки пула Д являются хорошей моделью для исследования активной роли гиперполяризации, в настоящее время плохо изученной, в регуляции биосинтеза белка.

ACETYLCHOLINE—INDUCED PROTEIN BIOSYNTHESIS IN THE NEURONS OF *HELIX POMATIA*

GRINKEVITCH L. N., LISACHOV P. D., SHTARK M. B.

Institute of Automatics and Electrometry, Siberian Branch of USSR
Acad. Sci., Novosibirsk

The influence of acetylcholine on protein synthesis in identified „pool D“ neurons of *Helix pomatia* has been studied. With the help of disc-electrophoresis in polyacrylamide gel fractions have been identified, in which the intensity of labelling increased up to 400–500% of the control level. The label incorporation into other fractions studied increased up to 80–100% of the control level. Taking into consideration that acetylcholine application causes hyperpolarization of the cells in „pool D“, it may be supposed, that acetylcholine modulates the protein synthesizing systems.

ЛИТЕРАТУРА

1. Косыук П. Г., Крышаль О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки, М., Наука, 1981.
2. Сахаров Д. А. Генеалогия нейронов, М., Наука, 1974.
3. Гринкевич Л. Н. Докл. АН СССР, т. 252, с. 248—250, 1980.
4. Остерман Л. А. Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот (под ред. Д. Г. Кнорре), с. 55—77, М., Наука, 1973.
5. Шеллер Р. Х., Аксель Р. В мире науки, № 5, с. 28—37, 1984.
6. Пивоваров А. С., Сатемлидзе Г. Н. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 36, с. 947—956, 1986.

Поступила 14. II. 1988

Нейромодуляция и функция мозга, 460 с., 1984.

Neuromodulation and Brain Function. Proc. of the Biannual Capo Boi Conference, Villasimius, Italy, June 1983. Published as „Advances in Biosciences“ (ed. G. Biggio, P. F. Spano, G. L. Gessa, G. Toffano), Pergamon Press, Oxford, v. 48, 460p., 1984.

Сборник посвящен нейромодуляторам и нейротрансмиттерам и их роли в функции мозга. В нем суммированы материалы проводимой раз в два года конференции под эгидой Итальянского общества нейронаук. В числе опубликованных статей: V. Chan-Palay «Множественные химические мессенджеры в нейронах Пуркинье»; F. Benfenati et al. «Новые механизмы, участвующие в модуляции синаптической передачи»; M. Marconi et al. «Доказательства преимущественной роли норадренергических нейронов в синтезе допамина во фронтальной коре»; J. Vetulani «Модуляция популяций рецепторов хронической обработкой антидепрессантами»; M. O. Carruba et al. «Поведенческие доказательства существования множественных систем допаминовых рецепторов в мозгу»; A. Bruni, G. Tottano «Фосфолипидзависимая регуляция мембранных рецепторов»; M. Memo et al. «Допаминовая модуляция различных внутриклеточных изменений, индуцируемых пролактин-высвобождающими агентами»; P. Onali et al. «Молекулярные механизмы, включающиеся в ингибиторное сопряжение мускариновых рецепторов полосатого тела с аденилатциклазой»; C. Levi et al. «Возможная роль АКТГ—МСГ-пептидов в медиации вызванной апоморфином зевоты и эрекции пениса»; M. Motta et al. «Пептидергическая модуляция секреции гонадотропина и пролактина».

Книга предназначена для специалистов по нейронаукам.