



## X МЕЖДУНАРОДНОЕ СОБРАНИЕ ПО НЕЙРОХИМИИ

(Рива-дель-Гарда, Италия, 1985 г.)

С 19 по 25 мая 1985 г. в Рива-дель-Гарда (Италия) состоялось очередное X Международное собрание по нейрохимии. Его открыл вступительным словом А. А. *Boulton* (Канада), отметивший стремительное развитие нейрохимии, главным образом, исследований по молекулярной нейробиологии в период, прошедший после IX собрания, состоявшегося в Ванкувере. Во время официальной церемонии, посвященной памяти президента Международного нейрохимического общества проф. *G. Porcellati* (Италия) были отмечены его заслуги в организации этого форума в Рива-дель-Гарда. В своих выступлениях *G. B. Ansell* (Англия) и *A. Lajtha* (США) дали высокую оценку научной и научно-организаторской деятельности проф. *G. Porcellati*.

Был избран новый состав Совета международного общества по нейрохимии. Президентом общества на новый срок избран проф. *A. Boulton*, генеральным секретарем проф. *V. P. Whittaker* (ФРГ), казначеем — проф. *B. W. Agranoff* (США).

В новый совет вошли также: *L. Austin* (Австралия), *N. Baumann* (Франция), *S. B. Blass* (США), *M. R. Cuenod* (Швейцария), *M. S. Dowdall* (Англия), *B. Drujan* (Венесуэла), *А. Галоян* (СССР), *A. Hamberger* (Швеция), *L. A. Horrocks* (США), *К. Kurijama* (Япония). Председателем следующего XI собрания Международного общества по нейрохимии был избран проф. *A. Boulton*.

В работе конгресса участвовало более 900 делегатов из 35 стран мира. Активное участие в его работе принимала делегация советских ученых (руководитель делегации *А. А. Галоян*), в состав которой входили *Н. Ф. Аврова* (Ленинград), *Д. Г. Микеладзе* (Тбилиси), *М. Б. Агаларова* (Москва). Состоялось два заседания совета общества (19 и 25 мая 1985 г.), на которых был обсужден ряд организационных вопросов — место и тематика организации сателлитных симпозиумов при XI конгрессе по нейрохимии (Венесуэла, 1987), возможность проведения XI Международного конгресса международного нейрохимического общества совместно с американским нейрохимическим обществом (ANS) и т. д. Рассматривался также вопрос о средствах организации помощи молодым нейрохимикам для более активного участия в ра-

боте конгрессов, стажировки в других научных центрах по нейрохимии.

Научная программа конгресса включила пленарную лекцию S. Numa (Япония) «Структурное и функциональное изучение никотинового ацетилхолинового рецептора методом молекулярного клонирования», 10 симпозиумов: 1—Влияние молекулярной генетики на нейрохимию; 2—Нейрональные мембраны: модулирование метаболизма липидов; 3—Функциональные изменения при посттрансляционной модификации в нервной ткани. 4—Нейрональные мембраны: роль ионных каналов. 5—Рецепторы нейротрансмиттеров: новые достижения; 6—Механизм аксонального транспорта; 7—Созревание мозга; 8—Молекулярные аспекты нейронального развития и пластичности; 9—Формирование (processing) нейропептидов; 10—Специфические макромолекулы в клеточных взаимодействиях в нервной системе, а также 6 коллоквиумов, 6 заседаний за круглым столом, 11 устных заседаний и 24 стендовые сессии, на которых было представлено 40% всех сообщений.

На различных коллоквиумах были обсуждены также следующие вопросы: молекулярные механизмы, лежащие в основе обучения и памяти, простагландины и лейкотриены в функции мозга, динамические аспекты накопления трансммиттеров в органеллах, будущее пересадки мозга, нейрональные мембраны (роль ионных каналов), последние достижения в изучении глйальных клеток, нейропептидов и белков, метаболизма мозга, нейрогистохимии и нейроиммуногистохимии, молекулярной нейрофармакологии, экспериментальной нейрохимической патологии и т. д. Сообщения по вышеуказанным разделам нейрохимии были представлены также в 24-х стендовых сессиях.

Значительным событием нейрохимического конгресса были работы по молекулярной генетике рецепторов нейротрансмиттеров. S. Numa привел данные о раскрытии полной первичной структуры, субъединичных структур никотинового ацетилхолинового рецептора из электрического органа Torpedo-California, а также натриевого канала путем молекулярного клонирования соответствующих генов. В докладе E. A. Bernard (Англия) были приведены данные о клонировании генов N-холино и ГАМК-рецепторов, а также субъединичной структуре опиоидных рецепторов. Молекулярно-генетические методы получили отражение и в изучении ферментов обмена катехоламинов. Группой французских ученых S. Mallet и др. была расшифрована первичная структура ключевого фермента биосинтеза катехоламинов тирозингидроксилазы путем анализа клонов кДНК, причем были изучены гены этого фермента в процессе развития катехоламинергических нейронов. Обнаружение гена тирозингидроксилазы у крыс позволило изолировать также человеческий ген и изучить его локализацию и полиморфизм в хромосомах, что будет способствовать изучению фермента в различных нейронах. Методы рекомбинантной ДНК используют для изолирования генов, кодирующих предшественники пептидов в иден-

тифицированных нейронах с известной функцией. В нейрохимических исследованиях начали применять гены эмбрионов дрозофилы, являющиеся удобным и простым объектом для молекулярно-генетических исследований свойств различных нейронов (С. S. Goodman и др., США). А. Giudetta и др. (Италия) показали транспорт мРНК по аксону кальмара. Им удалось выявить гетерогенное семейство мРНК в аксонах, в большом количестве она была обнаружена в микросомной фракции. Следует заметить, что несколько лет тому назад нами ставился вопрос о возможности транспорта информационной РНК по аксону из нейронов супраоптических и паравентрикулярных ядер гипоталамуса в нейрогипофиз.

Ora Bernard и др. (Австралия) изолировали ряд клонов, один из которых, обозначенный Р<sub>3</sub>, оказался специфическим в отношении высокоосновного белка миелина мозга. Выделенная кДНК гибридизовалась с мРНК, изолированной из мозга, но не из других органов (печень, селезенка, почки, В и Т лимфоциты, тимус, фибробласты), а также с рестрикционными фрагментами, полученными из ДНК человека, мышей, быка. При гибридизации *in situ* в опытах со срезами мозга, используя эту кДНК авторы показали, что мРНК преимущественно экспрессируется во фронтальной коре, мозжечке, гипоталамусе. *In situ* гибридизация с изолированными клетками показала, что мРНК экспрессируется лишь в нейронах спинного мозга, но не в олигодендронитах и астроглии.

I. Iakahashi и др. (Япония) получили мРНК нейронспецифической синапсы, очищенной из свободных полисомов мозга крысы иммунохимическим методом с помощью хроматографии на олиго-(dT)-целлюлозе. кДНК синтезировали на матрице этой мРНК и клонировали олиго (dC-dG)-коннекторным методом. Были обнаружены кДНК из нейрональной железы, которые сравнивали с нейрональной синапсой. Оказалось, что кДНК нейрональной синапсы короче на 500 нуклеотидных остатков, а гомология аминокислотных остатков составляет лишь 82%.

D. W. Schmid (ФРГ) привел данные о библиотеке кДНК мозга *Torpedo tergogata*, из которой были изолированы клоны, специфические для холинергической функции. мРНК была изолирована из очищенных холинергических долей и использована для обратной транскрипции. Полученную кДНК включали в плазмиду рВR 322 олиго-(dC-dG)-коннекторным методом и трансформировали в клетки *E. coli* K 12. Тетрациклинрезистентные ампициллинчувствительные клоны переносились на нитроцеллюлозные мембранные фильтры и использовали для гибридизации *in situ* с различными радиоактивно мечеными пробами кДНК.

Этот метод позволяет выбирать участки, включающие холинергическую функцию перикарионной электрической доли. Было установлено, что в мозжечке имеется несколько или вовсе отсутствуют холинергические синапсы, и поэтому кДНК мозжечка не гибридизи-

ровалась с холинергическими специфическими участками. Из 3200 клонов 48 были отобраны этим методом дифференциальной гибридизации. Они соответствуют тем участкам, которые, вероятно, имеют отношение к регуляции, функции и дифференциации холинергической симпатической передачи. D. K. Batter и др. (США) изучали структуру и регуляцию гена фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы (Ф-N-МТ) терминального фермента в биосинтезе катехоламинов, катализирующего превращение норадrenalина в адреналин. ДНК, комплементарную к мРНК Ф-N-МТ из мозгового слоя надпочечников, клонировали в pBR 322. Эту кДНК (650 п. о.) использовали как зонд для поиска гена Ф-N-МТ.

В докладе A. Maggi и I. Zucchi (Италия) были приведены факты о механизме влияния эстрогенов на ЦНС млекопитающих. Было установлено, что введение овариэктомированным крысам эстрогенов вызывает увеличение полисомной активности и аккумуляирование поли-А(+) мРНК в мозгу *in toto*. В течение 24 ч эстрадиол бензоат (50 мкг/крыса) преимущественно увеличивал содержание поли А (-/-) мРНК в коре (+40%) и в гиппокампе (+60%) и поли А(-) мРНК в гипоталамусе (+35%). Была сконструирована библиотека кДНК гипоталамуса крыс, обработанных эстрогенами с целью изолирования методом дифференциальной гибридизации ДНК соответствующих генов, специфически индуцируемых половым гормоном.

A. Roses и др. (США) попытались выработать стратегию идентификации локуса генов и участков повреждения у больных со старческим слабоумием.

Ряд докладов был посвящен молекулярным аспектам *нейронального развития и пластичности*. Исключительно интересным в плане эволюции и функции симпатической и холинергической систем было сообщение S. C. Landis, G. Lebbong и L. Storens (США). Они обнаружили эволюционные изменения в нейротрансмиттерном фенотипе симпатических нейронов *in vivo*. Многие симпатические нейроны являются адренергическими, но некоторые, включая те, которые иннервируют потовые железы, являются холинергическими. Были изучены эволюционные механизмы такого выбора *in vivo*.

Потовые железы и их иннервация развиваются постнатально. Иннервация первоначально по фенотипу является адренергической. Тирозин и дофамин β-гидроксилазная иммунореактивности и катехоламинная флуоресценция были выявлены в этих железах. С дальнейшим развитием выявляются холин-ацетилтрансферазная и ацетилхолинэстеразные активности и иммунореактивность в отношении двух пептидов (вазоактивный интестинальный и кальцитонинподобный пептиды), а проявление адренергических свойств ослабевает. Установлено, что эти изменения соответствуют фенотипному превращению (трансформации) в единственной популяции волокон потовых желез. Фенотипические изменения, наблюдаемые в волокнах потовых желез, соответствуют изменениям, ранее описанным для симпатических ней-

ронов в культуре. Под влиянием специфического растворимого фактора, выделенного из нейрональных клеток, пораднергические нейроны могут превращаться в холинергические.

Данные о нейритстимулирующих факторах в эмбриогенезе спинного мозга эмбрионов кур были приведены в докладе *Ch. E. Henderson* и соавт. (Франция). Было установлено, что развивающиеся мотонейроны спинного мозга зависят от факторов роста, образуемых мышцами для их дифференциации. Эти факторы похожи на фактор роста нервов в отношении их влияния на чувствительные и симпатические нейроны-мишени. Экстракты эмбриональных мотонейронов *in vitro* стимулируют рост нейронов. Описанные факторы имеют  $M_r$  40 кД и более, чувствительны к трипсину и продуцируются лишь клетками мышц и печени в культуре. Исследованиями *P. H. Patterson* (США) было обнаружено, что ненейрональные клетки секретируют комплекс высокомолекулярных протеогликанов, стимулирующий рост нейронов как периферической, так и ЦНС.

Ряд докладов на нейрохимическом собрании был посвящен функциональному значению посттрансляционных модификаций в НС.

*M. V. Kennedy* (США) продемонстрировала большой фактический материал о  $Ca^{2+}$ -зависимом фосфорилировании белков в НС, имеющем важное значение в нейрональных ответах при изменении концентрации кальция. В нервной ткани идентифицирован ряд различных  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ и охарактеризованы особенности некоторых из них, в частности  $Ca^{2+}$  и липидзависимой С-киназы,  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимой протеинкиназы и т. д. Для изучения функционального значения этих киназ в ответ на изменение концентрации ионов кальция важно знать их распределение в нейронах в различных отделах мозга и их субклеточных структурах. Новый класс протеинкиназ, названный  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимые протеинкиназы II типа, особенно обильно представлен в мозгу. Радиоиммунохимия и иммуногистохимические исследования показывают, что кальмодулинзависимые протеинкиназы II типа расположены в большей мере в телэнцефалических нейронах, чем в нейронах из низших отделов мозга. Это свидетельствует о важном значении  $Ca^{2+}$  в ответных реакциях телэнцефалических нейронов. Приблизительно половина этой киназы находится в растворимой форме, другая часть—в постсинаптических образованиях. Часть из них легко связана со структурой цитоскелетона. Эти киназы имеют  $M_r$  500—700 кД и находятся не только в НС, но и в самых различных органах.

*P. De Camilli* (Италия) показал иммуногистохимическими методами локализацию фосфорилирующихся субстратов и протеинкиназы в различных частях мозга. Имеется гетерогенность нейронов по содержанию протеинкиназ и фосфопроteinфосфатаз и фосфопроteinов. Фосфопроteinны находятся лишь в определенных классах нейронов и включаются, по-видимому, в процессы биосинтеза нейротрансмиттеров и модуляции сигналов (регуляторные белки протеинкиназ и фосфа-

таз). Была обсуждена также роль двух важных фосфопротеинов, широко распространенных в нервных популяциях—синапсин 1 и MAP 2. Синапсин 1—нейроспецифический фосфопротеин, включающийся в секреторный путь специфических нейронов. MAP 2, связанный с микротрубулами, избирательно концентрируется в перикарионе и дендритах, что может реализовать влияние нейротрансмиттеров на «дендритическом» цитоскелетоне.

*N. Hutter* и др. (ФРГ) привели данные о сульфировании тирозина белков в нейрональных и не нейрональных клетках. Сульфирование по тирозину белков было обнаружено во многих тканях у всех позвоночных и беспозвоночных животных. Они относятся к единому классу секреторных белков. Первичная функция сульфирования тирозина в белках может контролироваться такими пресекреторными процессами, как внутриклеточное накопление определенных секреторных белков. В ретине сульфирования по тирозину белки распределяются в везикулах мембран и достигают нервных окончаний. Они, в основном, локализованы аксональным током в аппарате Гольджи и пост-Гольджи. Сульфирование тирозина секреторных белков дает возможность «узнавать» их специфическими рецепторами.

Были представлены данные *H. L. Ploegh* (Нидерланды) о возможности биосинтеза N-гликанов. Многие из этих препаратов не токсичны и могут быть использованы в исследованиях с культурами нервной ткани. Важным событием можно считать обнаружение эктокиназ, осуществляющих фосфорилирование специфических субстратов на внешней поверхности нервных клеток (*J. H. Ehrlich* и др., США). Авторы показали, что внеклеточный АТФ оказывает сильное влияние на активность мембран возбудимых клеток. Известно также, что АТФ выделяется нервными окончаниями пуринергических нейронов. Нервные клетки, содержащие эктокиназы, утилизирующие внеклеточный АТФ для фосфорилирования специфических белков, локализованы на внешней поверхности мембран. Используя клетки нейробластом, гибридизированных с глиальными клетками, авторы показали, что происходит фосфорилирование как эндогенных, так и внеклеточных (поверхностных) белков. Основные белки, фосфорилируемые эктокиназами, имеют  $M_r$  190, 120, 97 и 33 кД. Это фосфорилирование чувствительно к  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и блокатору кальциевых каналов—верапамину. Считают, эктокиназы играют важную роль в захвате кальция интактными нервными клетками.

Посттрансляционным модификациям гликопротеинов Шванновских клеток было посвящено сообщение *S. F. Poduslo* (США). Он показал значение двух  $\alpha$ -1, 2-маннозидаз в превращении  $Man_5, GlcNAc_2$  в  $Man_3, GlcNAc_2$ . Предварительно предшественник этих тромбопластических соединений олигосахарида, связанный с аспарагином белка N-связью, распадается под влиянием эндо- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы H.

Посттрансляционным изменениям подвергаются также хромосомные белки, что играет важную роль в транскрипции хроматина.

Как показано *M. Sngoglia* и др. (США), посттрансляционной модификации могут подвергаться под влиянием ряда аминокислот (аргинин, лизин, лейцин, тирозин и аспарат) белки интактных и регенерирующих аксонов седалищного нерва. По данным *P. Mandel* (Франция), с изменением структуры хроматина связано АДР-рибозилирование белков в культуре астроцитов быстро растущей  $C_6$ -глиомы крыс и кур. Важное значение имеет также их ацетилирование, метилирование и фосфорилирование (*I. Serra* и др., Италия). Посттрансляционная модификация путем ацетилирования и деацетилирования наблюдается и в синапсомных белках (*S. Berl* и др., США).

Значительное место в работе нейрохимического собрания заняло обсуждение вопросов, связанных с формированием (процессингом) нейропептидов.

Хорошо известно наличие генов-предшественников многих нейропептидов, содержащих более чем один биоактивный пептид. Примером таких полипептидов являются предшественники опиоидных пептидов. Опиоидные пептиды образуются из трех предшественников: проопиомеланокортина, проэнкефалина А (проэнкефалина) и проэнкефалина В (продинарфина). Были изолированы гены этих предшественников и определена их нуклеотидная последовательность. Экспрессия генов была изучена введением генов в овоциты лягушки и АГТ-20 клетки (клетки опухоли гипофиза мышей, которые синтезируют проопиомеланокортин, но не проэнкефалин). Была изолирована мРНК человеческого проопиомеланокортина и изучена роль кортикотропин-рилизингфактора, сАМР и гликокортикоидов в регуляции ее экспрессии. В АГТ-20 клетках, принимающих участие в процессинге проопиомеланокортина, были обнаружены калликренн, тиоловая протеаза и карбоксипептидаза. Аминокислотный состав этого калликренина отличается от калликренина, ранее открытого у мышей. мРНК калликренина находится в промежуточной доле (наиболее активный участок синтеза РОМС) гипофиза и гипоталамуса мышей.

Были идентифицированы также гипоталамические предшественники окситоцина, вазопрессина и соматостатина как крысы, так и крупного рогатого скота. Недавно были выделены предшественники человеческого соматостатина (45 кД) и вазопрессина (19 кД). Выделенный вазопрессиновый предшественник имеет С-концевой гликопептид с неизвестной пока функцией (*R. Ivell, D. Richter, ФРГ*).

Как известно, холецистокинин широко распространен в мозгу млекопитающих. Он является мощным нейротрансмиттером. Наряду с тем, что холецистокинин находится в коре мозга в высоких концентрациях, происходит быстрая трансляция и процессинг препро-холецистокинина. Структура этого нейропептида у человека, свиньи и крысы уже известна. Холецистокинин находится в мультимолекулярных формах. Посттрансляционный процессинг препро-холецистокинина происходит, по крайней мере, тремя различными путями в коре мозга, отсюда — несколько типов ССК нейронов в мозгу (*S. F. Rehfeld, Дания*).

А. А. Галоян представил данные о процессинге гликопептидов в гипоталамусе и их участии в регуляции метаболизма циклических нуклеотидов и катехоламинов, а также о катепсине В, генерирующем ангиотензин II в мозгу млекопитающих.

Значительное место в работе конгресса заняли доклады по нейрональным мембранам. Обсуждались роль GM-ганглиозидов в холинэргической системе (R. S. Soper, H. S. Baker, США), значение метаболизма фосфонозотида в мембранных процессах (B. Agronoff, США), механизм сопряжения между ГАМК-рецепторами и Cl<sup>-</sup>-каналами (R. Harris и A. Allan, США).

Ряд докладов был посвящен роли фосфолипидов в биосинтезе нейротрансмиттеров, структуре и механизму вольтачувствительных ионных каналов (M. Zardunsku, Франция), Ca<sup>2+</sup>-каналам нейронов позвоночных (H. Zux, E. Carbone, ФРГ), Ca<sup>2+</sup>-инактивируемым мембранным каналам (D. Alkon, США) и т. д.

На симпозиальных заседаниях, коллоквиумах и особенно в стендовых сообщениях было приведено множество сообщений о нейротрансмиттерах и их рецепторах. Гликопротеиновая природа мускариновых рецепторов мозга и функциональное значение их различных «субтипов», никотиновые рецепторы в стриатуме крыс, свойства допамины D<sub>2</sub>-рецептора, характеристика ГАМК-рецепторов верхнего шейного симпатического ганглия, онтогенез рецепторов α-глутамила и аспартата, опиоидные рецепторы (множественные формы, принимающие участие в регуляции нейроэндокринного контроля секреции лютеинизирующего гормона и пролактина у крыс—вот далеко не полный перечень исследований по рецепторам). Ряд работ был посвящен метаболизму нейротрансмиттеров, а также аксональному транспорту в развивающемся мозгу, пластичности нейронов *in vivo* и *in vitro*, глиальным клеткам и т. д.

Были представлены также первые сообщения, касающиеся нейрохимии пересадки нервной ткани и новые данные по нейрохимии памяти, обучения и поведения.

Подытоживая приведенные данные, следует отметить, что состоявшееся в Рива-дель-Гарда собрание по нейрохимии продемонстрировало заметное развитие молекулярной нейрогенетики, использование достижений генной инженерии в раскрытии химической структуры рецепторов, ферментов и белков. Большое внимание было уделено посттрансляционным модификациям, особенно фосфорилированию белков, играющим важную роль в функциональной деятельности синапсов. Широко были представлены также механизмы процессинга различных нейропептидов. Высокий методический уровень, стремление выяснить молекулярные механизмы нейрохимических патологий (болезнь Паркинсона, старческое слабоумие, шизофрения и т. д.), глубокий анализ нейрохимических процессов—характерные черты нынешнего собрания нейрохимиков.

ГАЛОЯН А. А.