

16. Winn H., Richard R. R., Berne R. M. Amer. J. Physiol., v. 241, № 2, p. 235—242, 1981.
17. Lin M. R., Henteloff H. B., Nemoto E. M. J. Neurochem., v. 40, № 2, p. 595—598, 1983.
18. Daly J.—In: Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides (eds. Baer H. P., Drummond G. I.), p. 229—241, Raven Press, New York, 1979.
19. Nimit Y., Scolnick P., Daly J. J. Neurochem., v. 36, № 3, p. 908—912, 1981.
20. Kobayashi K., Kuroda Y., Yoshioka M. J. Neurochem., v. 36, № 2, p. 651—660, 1981.
21. Foreman J., Jordan C. Agents and Actions, v. 13, № 2—3, p. 105—116, 1983.
22. Morris G., Seidler F. J., Slotkin T. A. Life Sci., v. 32, № 4, p. 1565—1571, 1983.
23. Greengard P. Chem. Neurotransm., 75 Years (Proc. Nobel. Conf.), (eds. Stjaerne L., Lagercranz H.) p. 377—384, Henquist, Per. Academic, London, 1981.
24. Goldberg N. D., Haddox M. K. Annu. Rev. Biochem., v. 46, p. 832—896, 1977.
25. Личатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, Айастан, 1981.

Поступила 14. III 1986

УДК 612.8.015:577.15/17.153.

## УЧАСТИЕ ГАМК В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

ТОВМАСЯН А. Х., \*МИНЕЕВА М. Ф., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

\*Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Установлено непосредственное взаимодействие ГАМК с тирозингидроксилазой гипоталамуса крысы, приводящее к увеличению величины  $V$  без изменения  $K_m$  для тирозина. Этот процесс представляет собой составную часть молекулярного механизма, модулирующего действия ГАМК на пресинаптическую регуляцию биосинтеза катехоламинов. Показано, что, несмотря на одинаковую физиологическую направленность эффектов взаимодействия ГАМК и антипсихотического вещества фторфеназина с тирозингидроксилазой, их молекулярные механизмы существенно отличаются.

ГАМК-ергическая и дофаминергическая нейромедиаторные системы связаны сложными функциональными отношениями. Однако молекулярные механизмы влияния ГАМК на дофаминергические процессы в мозгу изучены недостаточно [1, 2].

Ранее с использованием препаратов из синапсом стриатума крысы было экспериментально установлено, что ГАМК может оказывать непосредственное влияние на активность тирозингидроксилазы (ТГ) (КФ 1.14.16.2,  $\alpha$ -тирозин-кислород оксидоредуктаза, 3-гидроксилирующая), лимитирующего фермента биосинтеза катехоламинов. Влияние

ГАМК на ТГ выражалось в увеличении величины  $V$  и имело по отношению к тирозину неконкурентный характер [3]. Однако оставалось невыясненным, специфично ли взаимодействие с ГАМК для ТГ из стриатума, типичной дофаминергической структуры, или аналогичное взаимодействие может быть также присуще ТГ из норадренергических нейронов.

С целью выяснения возможности непосредственного взаимодействия ГАМК с ТГ из норадренергических нейронов были поставлены эксперименты с использованием ТГ из синапсом гипоталамуса, который является преимущественно норадренергической структурой мозга, хотя норадренергические терминали в гипоталамусе имеют пресинаптические дофаминовые рецепторы [4]. В гипоталамусе ГАМК содержится в более высокой концентрации, сопоставимой с ее содержанием в черной субстанции и бледном шаре, входящем в состав стриатума [5]. Для изучения возможности взаимодействия ГАМК с ТГ в условиях моделирующих физиологические, были поставлены эксперименты на синапсомах, которые широко используют в качестве модели функционирующих нервных окончаний [6]. Для сравнения был взят фторфеназин, обладающий свойствами антагониста дофаминовых рецепторов и аллостерического регулятора ТГ [7, 8], поскольку физиологически влияние этих веществ на дофаминергические процессы в мозгу имеет во многих аспектах одинаковую направленность: ГАМК оказывает тормозящее влияние на дофаминергические процессы в мозгу, пусковой же механизм действия нейролептиков, к которым относится фторфеназин, также связан с их угнетающим влиянием на эти процессы [7, 9].

### Материалы и методы

Крыс деканитировали, мозг извлекали на холоду, отделяли гипоталамус и выделяли из него мембраносвязанную и растворимую ТГ по методу Kuczenski, Mandell [10].

Из гипоталамуса также выделяли синапсомы по методу Hajos [11], которые в дальнейшем использовали как для проведения экспериментов по изучению регуляции ТГ опосредовано через пресинаптическую мембрану по методике, описанной ранее [12], так и для очистки фермента путем биоспецифической хроматографии на дийод-тирозил-сефарозе 4В [15]. Скорость реакции определяли спектрофотометрически [13], теплоту реакции — по термодинамическому методу [14], белок — по методу Lowry и соавт. [16],  $K_m$  и  $V$  рассчитывали по методу Коринши-Бойдена [17].

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты экспериментов по изучению непосредственного влияния ГАМК на мембраносвязанную ТГ из гипоталамуса крысы. Показано, что ГАМК в концентрации  $10^{-5}$  М увеличивает скорость ТГазной реакции в широком диапазоне концентраций тирозина ( $p < 0.01$ ), не вызывая качественных изменений в характере кривой зависимости скорости от концентрации субстрата и не влияя на субстратное торможение фермента. Таким образом, эффект ГАМК на

ТГ гипоталамуса оказался сходным с влиянием ГАМК на ТГ стриатума [3]. Однако изучение действия ГАМК на растворимую фракцию ТГ гипоталамуса показало, что, в отличие от стриатума, активность фермента остается неизменной, в связи с чем мы нашли целесообразным эти данные не приводить в статье.

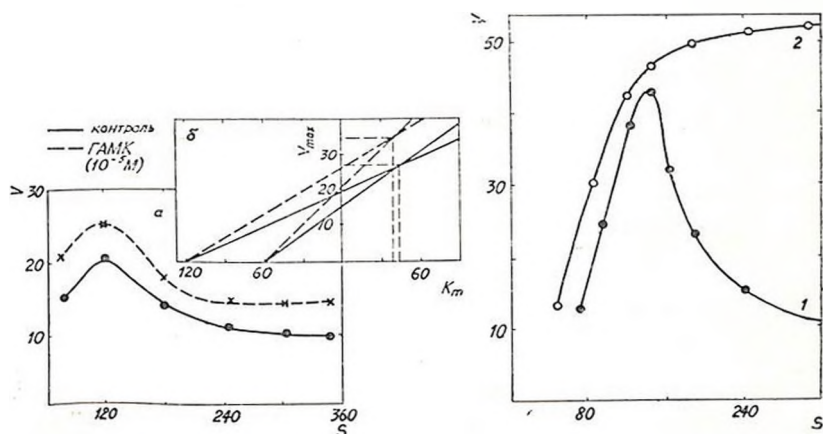


Рис. 1. Влияние ГАМК на активность тирозингидроксилазы гипоталамуса крысы при различных концентрациях тирозина (а) и зависимость скорости тирозингидроксилазной реакции от концентрации тирозина в присутствии ГАМК в координатах Корниш-Боудена (б)

Рис. 2. Влияние фторфеназина на активность тирозингидроксилазы (V, нМ/мин/мг белка) гипоталамуса крысы в присутствии различных концентраций тирозина (S, мкМ; n=5); 1—контроль; 2—фторфеназин 10<sup>-5</sup> M

Из рис. 2 видно, что фторфеназин в концентрации 10<sup>-5</sup> M, в отличие от ГАМК, изменяет характер зависимости скорости ТГ-реакции от концентрации тирозина в гипоталамусе. Фторфеназин элиминирует субстратное торможение ТГ: зависимость скорости реакции от концентрации тирозина в присутствии фторфеназина характеризуется гиперболической кривой вместо колоколообразной, описывающей зависимость скорости реакции от концентрации тирозина для ТГ в контрольных опытах. Сравнивая рис. 1 и 2, можно заметить, что в присутствии ГАМК и особенно фторфеназина наблюдается высокая скорость ТГ-реакции при ингибирующих концентрациях тирозина. Однако в молекулярном механизме влияния ГАМК и фторфеназина на ТГ имеются существенные различия, которые находят отражение в том, что ГАМК не влияет на субстратное торможение фермента, а фторфеназин устраняет его, иными словами, при взаимодействии с фторфеназином фермент утрачивает свойство ингибироваться избытком субстрата.

Различие в механизмах эффектов ГАМК и фторфеназина на ТГ позволяет предположить, что эти вещества взаимодействуют с разными

участками молекулы фермента. Для выяснения этого вопроса были поставлены эксперименты по измерению теплового эффекта взаимодействия очищенной ТГ с тирозином и фторфеназином (таблица). Проведенные исследования показали, что растворение фермента в концентрации  $10^{-7}$  М в 0,05 М  $K^+$ -фосфатном буфере, pH 6,0 сопровождается выделением тепла, составляющим 13,3 мДж. При добавлении тиро-

Таблица

Влияние фторфеназина и ГАМК на тепловой эффект взаимодействия очищенной ТГ и тирозина

| Условия опыта       | Тепловой эффект взаимодействия |
|---------------------|--------------------------------|
| Тирозин             | +32,5 мДж                      |
| ГАМК                | -39,5 мДж                      |
| Тирозин+ГАМК        | -7,57 мДж                      |
| Фторфеназин         | +15,1 мДж                      |
| Тирозин+фторфеназин | +15,8 мДж                      |

*Примечание.* Тепловые эффекты указаны с поправкой на тепловой эффект растворения фермента. Поглощение тепла обозначено знаком (+), выделение тепла—знаком (-),  $n=10$ .

зина в пробу концентрации  $10^{-4}$  М происходит поглощение 20,2 мДж тепла. Взаимодействие ТГ с тирозином в концентрации  $10^{-4}$  М сопровождается поглощением 32,5 мДж тепла. Введение в среду с ферментом фторфеназина ( $10^{-5}$  М) вызывает эндотермический эффект, составляющий 2,8 мДж, что соответствует тепловому эффекту взаимодействия фторфеназина с ТГ, равному +15,1 мДж. При добавлении фторфеназина в той же концентрации к ферменту после внесения в пробу тирозина в ингибирующей концентрации  $10^{-4}$  М общий эффект взаимодействия равен +16,8 мДж, что близко к величине взаимодействия фторфеназина с ферментом в отсутствие тирозина. Как видно из этих данных, тепловые эффекты взаимодействия тирозина и фторфеназина не суммируются. В совокупности с данными об устранении субстратного торможения полученные данные о теплоте взаимодействия фторфеназина с комплексом фермент—тирозин показывают, что взаимодействие ТГ с фторфеназином может происходить в присутствии тирозина в ингибирующей концентрации, создавая препятствия для взаимодействия тирозина с ТГ в регуляторном участке молекулы фермента, как это предполагалось ранее [7].

В то же время взаимодействие ГАМК с ТГ в отличие от фторфеназина сопровождается выделением тепла, равного 39,5 мДж. Общий тепловой эффект взаимодействия тирозина ( $10^{-4}$  М) и ГАМК ( $10^{-5}$  М) с ТГ равен 7,57 мДж. Тепловой же эффект взаимодействия тирозина с ферментом, равный разности величин тепловых эффектов взаимодействия ТГ с тирозином в присутствии и в отсутствие ГАМК, составляет +31,9 мДж, что хорошо согласуется с величиной +32,5 мДж, полученной нами в другой пробе для эффекта взаимодействия тирозина с ТГ в отсутствие других добавок. Тепловые эффекты взаимодействия ГАМК и тирозина аддитивны, в отличие от эффекта совместного кон-



такта фторфеназина и тирозина с ТГ. Эти результаты подтверждают предположение, что ГАМК и фторфеназин взаимодействуют с разными участками молекулы ТГ.

Для оценки роли эффекта непосредственного взаимодействия ГАМК с ТГ в механизме влияния ГАМК на катехоламинергические процессы в мозгу были поставлены эксперименты на синапсосомах. Суспензию синапсосом из гипоталамуса крысы делили на четыре части и инкубировали одновременно в термостате Варбурга при постоянном встряхивании в течение 15 мин пробы следующего состава: контроль (без добавок), в присутствии  $10^{-5}$  М ГАМК или  $10^{-5}$  М дофамина, с добавлением одновременно ГАМК и дофамина. Результаты экспериментов представлены на рис. 3, где показана зависимость скорости ТГазной реакции от концентрации тирозина мембраносвязанной ТГ (ввиду того, что активность растворимой ТГ не изменялась под действием ГАМК, данные не приводятся). Проба, инкубированная с дофамином, характеризуется уменьшением  $K_m$  (6 мкМ) и увеличением  $V$  (40 ммоль/мин/мг белка), рассчитанных для восходящей ветви кривой по сравнению с аналогичной кривой для контрольной пробы и сохранением субстратного торможения ТГ. Эти результаты совпадают с ранее полученными данными об уменьшении  $K_m$  для тирозина при взаимодействии дофамина с синапсосомной мембраной. Для мембраносвязанного фермента, выделенного из синапсосом, при инкубации с ГАМК, в отличие от фермента из контрольной пробы, наблюдается увеличение  $V$  (93 ммоль/мин/мг белка) с небольшим уменьшением  $K_m$  (27 мкМ) для тирозина (рис. 3). Сравнение данных, приведенных на рис. 1 и 3, дает основание полагать, что влияние ГАМК на ТГ синапсосом обусловлено непосредственным действием на фермент и может иметь место в физиологических условиях. Вместе с тем, следует отметить хотя и небольшое, но заметное уменьшение  $K_m$  при контакте ГАМК с синапсосомной мембраной в отсутствие дофамина, которое может быть отражением слабого деполаризующего действия ГАМК, описанного для срезов стриатума [18] и клеток периферических ганглиев и их аксонов [19]. Однако на синапсосомах из прилежащего ядра деполаризующее действие ГАМК не выявлялось, о чем судили по отсутствию влияния ГАМК на спонтанное высвобождение дофамина в этой структуре мозга [20]. Предположение о возможности непосредственного взаимодействия ГАМК с ТГ при добавлении ГАМК в среду инкубации синапсосом правомерно, так как ГАМК может транспортироваться внутрь синапсосом [21]. При совместном добавлении в среду инкубации синапсосом дофамина и ГАМК (рис. 3) обнаруживается эффект ГАМК, сходный с таковым в отсутствие дофамина. Вместе с тем, характер кривой 4 указывает на суммирование кривых 1 и 2, что позволяет предположить, что ГАМК не полностью препятствует изменениям кинетических свойств ТГ, которые происходят при воздействии дофамина на наружную мембрану синапсосом. Однако благодаря повышению величины  $V$  при этом сохраняется вы-

сокая скорость реакции в условиях, при которых ТГ из пробы синап-  
тосом, контактировавших с дофамином, ингибирована.

Эксперименты с фторфеназином на синаптосомах были поставле-  
ны аналогично исследованиям, проведенным с ГАМК. Из данных,  
представленных на рис. 4, видно, что при совместном добавлении в  
среду инкубации дофамина и фторфеназина не наблюдается измене-  
ний кинетики ТГазной реакции, которые четко проявляются при воз-  
действии дофамина на синаптосомную мембрану. Таким образом, до-  
бавление фторфеназина к синаптосомам препятствует регуляторному

|                                | контроль | дофамин | ГАМК | ГАМК<br>+ дофамин |
|--------------------------------|----------|---------|------|-------------------|
| $K_m$ , мкМ                    | 30       | 6       | 27   | 9                 |
| $V_{max}$ , нмоль/мин/мг белка | 30       | 40      | 93   | 58                |

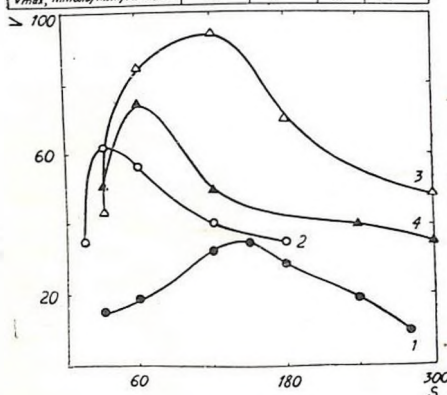


Рис. 3. Влияние ГАМК и дофамина на активность тирозингидроксилазы ( $V$ , нМ/мин/мг белка) из синапсом гипоталамуса крысы при различных концентрациях тирозина ( $S$ , мкМ;  $n=6$ ); 1—контроль; 2—дофамин; 3—ГАМК; 4—ГАМК + дофамин

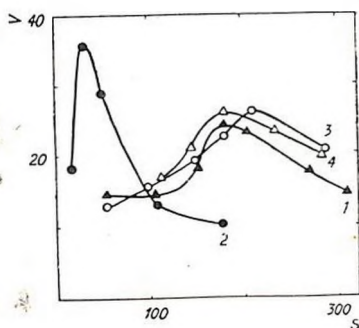


Рис. 4. Влияние фторфеназина и дофамина на активность тирозингидроксилазы ( $V$ , нМ/мин/мг белка) из синапсом гипоталамуса крысы при различных концентрациях тирозина ( $S$ , мкМ;  $n=5$ ); 1—контроль; 2—дофамин; 3—фторфеназин + дофамин; 4—фторфеназин

воздействию пресинаптической мембраны (пресинаптических рецепто-  
ров), активированной природным агонистом дофамином на скорость  
ТГазной реакции. Однако антагонизм с дофамином проявляется, по  
всей вероятности, не только на уровне пресинаптической мембраны,  
но и на уровне ТГ, так, при сравнении характера кривых 4 (рис. 4) и  
2 (рис. 2) можно заметить собственный эффект фторфеназина. Таким  
образом, полученные результаты показывают, что представитель фар-  
макологического класса нейролептиков фторфеназин блокирует пре-  
синаптическое действие дофамина на ТГ двумя путями: опосредован-  
но через пресинаптическую мембрану и путем непосредственного вза-  
имодействия с ТГ. Сравнение результатов, представленных на рис. 3 и  
4, показывает, что хотя функционально эффекты взаимодействия

ГАМК и фторфеназин с синаптической мембраной однонаправлены, они существенно различаются по молекулярным механизмам.

Приведенный экспериментальный материал позволяет предположить, что ГАМК, оказывая непосредственное влияние на ТГ, может нарушать осуществляемую дофамином пресинаптическую регуляцию активности этого фермента, выполняющего лимитирующую функцию в биосинтезе катехоламинов.

## INVOLVEMENT OF GABA IN THE REGULATION OF TYROSINE HYDROXYLASE ACTIVITY IN RAT HYPOTHALAMUS

TOVMASYAN H. Kh., \*MINEEVA M. F., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

\*Institute of Pharmacology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A direct interaction of GABA with tyrosine hydroxylase (TH) in rat hypothalamus has been established, that results in elevation of maximal reaction rate without a change in  $K_m$  for tyrosine. Studies on hypothalamic synaptosomes showed that direct interaction between GABA and TH is the part of molecular mechanism, which modulates action of GABA on presynaptic regulation of catecholamine biosynthesis. Comparative studies indicate that an antipsychotropic drug, fluorophenazine, and GABA interact with TH by different molecular mechanisms.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Scheel-Krüger J., Mageland G., Ollanos M.—In: Amino Acid Neurotransmitters, Adv. Biochem. Psychopharmacol. (eds. T. V. D. Feudis, P. Mandel), v. 29, p. 23—26, Raven Press, New York, 1981.
2. Hutchins D. A., Rayevskiy K. S., Sharman D. F. Brit. J. Pharmacol., v. 46, p. 409—415, 1972.
3. Касабян А. Х., Минеева М. Ф., Раевский К. С., Казарян Б. А. Биол. журн. Армении, т. 34, с. 1251—1253, 1981.
4. Dibokovich M. L., Langer S. L. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 251, p. 737—762, 1975.
5. Fahn S.—In: GABA in Nervous System Function (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 170—186, Raven Press, New York, 1976.
6. De Belleruche J. S., Bradford H. F., Jones D. A. J. Neurochem., v. 26, p. 561—571, 1976.
7. Минеева М. Ф.—В сб.: Нейрохимические основы психотропного эффекта (под ред. А. А. Вальдмана), с. 53—66, М., Изд. ВНИИТИ, 1982.
8. Минеева М. Ф., Раевский К. С.—Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 98, № 10, с. 453—455, 1981.
9. Pycock G. J., Horton R. W. J. Neural. Transm., v. 45, p. 17—33, 1979.
10. Kuczenski R. T., Mandell A. J. J. Biol. Chem., v. 247, p. 3114—3121, 1972.
11. Hajos T. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
12. Минеева М. Ф., Тюмлер Д., Кузнецова Е. А., Васильев А. Е., Раевский К. С. Докл. АН СССР, т. 258, с. 501—504, 1981.
13. Минеева-Вялых М. Ф. Вopr. мед. химии, т. 22, с. 274—279, 1976.
14. Кальве Э., Прат А. Микрокалориметрия. М., Изд. Ин. лит., 1963.

15. *Shlman R., Akino N., Kaufman S.* J. Biol. Chem., v. 246, p. 1330—1334, 1971.
16. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
17. *Корниш-Бовден Э.* Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
18. *Krnjevic K.*—In: GABA in Nervous System Function (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 269—281, Raven Press, New York, 1976.
19. *Obata K.*—In: GABA in Nervous System Function (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 283—286, Raven Press, New York, 1976.
20. *Ковалев Г. Н., Хетев Л.* Нейрохимия, т. 2, с. 315—318, 1983.
21. *Pastuszko A., Willson D. F., Eresinsca M.* J. Biol. Chem., v. 257, p. 7514—7520, 1982.

Поступила 28. XII 1985

УДК 577.159

## СУБСТРАТНО-ИНГИБИТОРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ КОМАНДОРСКОГО КАЛЬМАРА

БРЕСТКИН А. П., КОВАЛЕВ И. Н., РОЗЕНГАРТ Е. В.,  
ХОВАНСКИХ А. Е., ФЕДОРЕЦ Ю. А., ЭПШТЕЙН Л. М.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
АН СССР, Ленинград

Изучена субстратная и ингибиторная специфичность холинэстеразы (ХЭ) зрительных ганглиев командорского кальмара (*Berytheutis magister*). С помощью набора специфических тioxолиновых субстратов и фосфорорганических ингибиторов (ФОИ) показано, что холинэстеразная активность обусловлена действием одного фермента. Отмечено, что ХЭ командорского кальмара по чувствительности к некоторым гидрофобным ФОИ отличается от ХЭ тихоокеанского (*Todarodes pacificus*), что подтверждает представления о видоспецифичности ХЭ кальмаров. Впервые изучено действие на ХЭ командорского кальмара ФОИ, содержащих ацетиленовую группировку. Величина «ацетиленового эффекта» существенно зависела от структуры ФОИ.

Как отмечалось ранее [1, 2], у кальмаров свойства ХЭ существенно зависят от их видовой принадлежности и условий обитания. В этой связи свойства ХЭ командорского кальмара, которые до сих пор практически не изучены, представляют особый интерес. В отличие от других видов дальневосточных кальмаров командорский кальмар имеет наиболее высокоширотный ареал обитания. Весь его жизненный цикл проходит при средней температуре воды 2—4°. Он ведет придонный образ жизни и значительно менее подвижен, чем пелагические виды, такие как тихоокеанский кальмар или кальмар Бартрама. Можно предположить, что эти особенности биологии вида должны сказаться на функционировании ЦС, а значит и на свойствах ХЭ нервной ткани.

В настоящей работе приведены свидетельства в пользу того, что холинэстеразная активность в зрительных ганглиях командорского