

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 1, ВЫП. 1
Январь—март

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1982

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

Г. В. Априкян, А. В. Арутюнян (зам. главного редактора), Л. С. Арутюнян (отв. секретарь), Я. В. Бедик, Н. Н. Демин (зам. главного редактора), К. Г. Карагезян, П. А. Кометиани, Е. М. Кресп, А. А. Кричевская, Р. М. Налбандян, М. Ш. Промыслов, В. И. Розенгарт, Л. Я. Тяхемид, Г. С. Хачатрян

Редакционный совет

И. Г. Алексидзе, С. В. Гастева, Р. И. Глебов, Б. А. Казарян, Р. И. Кругликов, Б. К. Лишко, В. Г. Мхитарян, В. С. Оганесян, М. И. Прохорова, А. Д. Рева, Д. А. Сахаров, А. А. Симонян, Т. М. Турпаса, А. М. Утевский, Е. М. Хаатова, Л. С. Черасовас, Р. И. Этингоф

Н Е Й Р О К И М И А

Ст. редактор *В. С. Бегларян*
Редактор *И. Г. Апкарян*
Техн. редактор *Л. А. Азизбекян*

Сдано в набор 2.02. 1982. Подписано к печати 22.04. 1982. ВФ 01801.
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Плоскопечать. Печ. лист. 6,75, Усл. печ. лист. 9,45
Учет.-изд. 7,46. Тираж 400. Заказ 95. Издат. 5659.
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака, 5/1, т. 24-89-00, 24-89-54.
Издательство АН АрмССР, Ереван 19, Барскамути 24-г.
Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19, Барскамути, 24.

ГРАЦИЯ ХАЧАТУРОВИЧ БУНЯТЯН



Академик АН Армянской ССР, заслуженный деятель науки, профессор Грация Хачатурович Бунятыан родился в 1907 г. в Нор-Баязете (ныне г. Камо), где и прошло его детство.

После окончания средней школы им. Х. Абовяна в Ереване он в 1925 г. поступил на медицинский факультет Ереванского государственного университета, который окончил в 1930 г.

По окончании университета Г. Х. Бунятыан работал ассистентом, затем доцентом кафедры биохимии Ереванского медицинского института. С 1937 по 1960 гг. Грация Хачатурович заведовал кафедрой биохимии, а с 1939 по 1941 гг. был заместителем директора по научной части Ереванского медицинского института. В 1942—1946 гг. он являлся ректором Ереванского государственного университета.

В 1943 г. Г. Х. Бунятыан был избран действительным членом Академии наук Армянской ССР и в том же году назначен заведующим сектором биохимии Института физиологии АН Армянской ССР. С 1947 по 1957 гг. был академиком-секретарем отделения биологических наук, с 1958 по 1961 гг. — академиком-секретарем Академии наук

Армянской ССР, а с 1961 по 1967 гг.—ее вице-президентом. С 1961 г. до конца своей жизни (19 марта 1981 г.) Г. Х. Бунятян бессменно возглавлял Институт биохимии АН Армянской ССР, организованный на базе сектора биохимии.

В 1937 г. Г. Х. Бунятян защитил докторскую диссертацию на тему «Действие фосфатидов, холина, аскорбиновой кислоты (витамина «С») и некоторых антиоксидантов на окисление жиров, витамина «А» (каротиноидов) в присутствии железа и меди».

В 1939 г. он был утвержден в звании профессора, а в 1940 г. ему было присвоено звание заслуженного деятеля науки Армянской ССР.

Г. Х. Бунятяном было положено начало нейрохимических исследований в Советской Армении. Эти исследования при его непосредственном участии и умелом руководстве позже были значительно расширены и углублены, что послужило основанием для организации Института биохимии АН Армянской ССР, в котором в настоящее время успешно трудятся его питомцы—8 докторов и 46 кандидатов наук. Институт превратился в крупный научный центр по биохимии нервной системы в нашей стране. Многие из его учеников возглавляют научно-исследовательские лаборатории биохимического профиля, созданные за последние годы при различных научных заведениях.

Основные положения многогранного научного творчества Г. Х. Бунятяна, вытекающие из разработанных им проблем, вкратце заключаются в следующем.

В раннем периоде своей научной деятельности он занимался изучением строения и обмена витаминов, в частности витаминов «А» и «С». На основании проведенных оригинальных исследований им было высказано предположение о ендиеоловой структуре витамина «С» и впервые описана антиоксидантная роль витамина «С» в окислении фосфатидов, каротиноидов и витамина «А».

В начале пятидесятых годов коллектив, возглавляемый Г. Х. Бунятяном, развернул широкую и целенаправленную деятельность по исследованию условнорефлекторной регуляции обмена веществ и функциональной биохимии мозга. При этом особое внимание было уделено корковой регуляции обмена углеводов, белков, нейрогуморов, витаминов, минеральных веществ и системы свертывания крови.

Г. Х. Бунятяном и сотрудниками на протяжении ряда лет проводились интересные исследования по выяснению биохимической роли одного из физиологически активных соединений мозга—гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и ее производных в важнейших реакциях энергетического и азотистого обменов, а также в нейрогуморальной регуляции обмена веществ. Было показано, что ГАМК повышает проницаемость клеточных мембран не только в отношении ионов, но и глюкозы, аминокислот и ряда других веществ. Было установлено, что, помимо мозга, она образуется и в других органах, что нашло дальнейшее подтверждение в исследованиях многих зарубежных авторов. На основании обобщения полученных экспериментальных данных Г. Х.

Бунятян выдвинул положение о том, что ГАМК, являясь физиологически активным соединением, выполняет важную роль в регуляции ряда обменных процессов в нервной ткани.

Г. Х. Бунятяном и сотрудниками проведены серьезные исследования, развившие современные представления о путях образования аммиака из дикарбоновых аминокислот—аспартата и глутамата с участием пурипнуклеотидов и никотинамидных коферментов.

Г. Х. Бунятяном и его учениками вскрыты новые интересные факты и закономерности в обмене аминокислот мозга при старении, регуляции активности ключевых ферментов азотистого обмена, участвующих в цикле мочевинообразования и процессе образования свободного аммиака и его нейтрализации. Достигнутые результаты получили широкое признание в Советском Союзе, а также за рубежом.

Г. Х. Бунятяном и сотрудниками велись также разносторонние и интересные исследования по медьсодержащим белкам, протеолипидам и фосфолипидам. В мозгу обнаружены новые медь- и цинксодержащие белки, изучено строение протеолипидов в различных частях нервной системы, обмен фосфолипидов при различных функциональных состояниях мозга и ряде патологических процессов—алкогольном отравлении, диабете и т. д. Многие работы ученого посвящены вопросам общей и патологической биохимии—патологической химии почек, эволюционному развитию ферментов, гормональной регуляции активности ферментов и другим проблемам.

Г. Х. Бунятян проявлял постоянный интерес к проводимым в Институте биохимии АН АрмССР исследованиям по новым полипептидным гормонам—физиологически активным соединениям мозга, которые открывают перспективу в области развития биохимии нейрогормонов. Исследования по указанным направлениям имеют важное теоретическое значение и практическую направленность.

Исследования академика АН АрмССР Г. Х. Бунятяна получили мировое признание. В 1972 г. Г. Х. Бунятян был избран действительным членом Немецкой академии естествоиспытателей (Леопольдина), он являлся членом совета Международного общества по нейрохимии, Международной организации по изучению мозга (ИБРО), национального комитета Международного общества биохимиков, правления Общества биохимиков СССР, членом редакционных коллегий и советов журналов «Биохимия», «Вопросы медицинской химии», «Молекулярная биология», «ДАН АрмССР», «Биологический журнал Армении» и др. В течение ряда лет (1965—1970) он входил в состав редсовета международного журнала по нейрохимии (Англия), в 1978—1980 гг. он был членом издательского комитета указанного журнала, редактором четырнадцатитомного издания «Вопросы биохимии мозга» Института биохимии АН АрмССР, председателем Общества биохимиков АН АрмССР. По поручению редакции Большой Медицинской Энциклопедии Г. Х. Бунятяном написана статья «Биохимия головного мозга» и две статьи опубликованы в семитомном руководстве

по биохимии нервной системы, изданном в США. Он принимал активное участие в работах многих международных конгрессов, симпозиумов и конференций по биохимии (Австрия, Англия, Франция, Испания, Италия, Венгрия, Голландия, ФРГ, Швейцария, Швеция, Дания, Канада).

Г. Х. Бунятян неоднократно выступал с лекциями и докладами в крупных научных центрах многих зарубежных стран (США, Япония, Индия, Иран и т. д.).

Г. Х. Бунятян был выдающимся ученым, внесшим весомый вклад в развитие нейробиохимии. Он являлся автором более чем 250 научных работ. Под его руководством защищено 17 докторских и 58 кандидатских диссертаций.

По просьбе нейробиохимической общественности нашей страны и инициативе академика АН АрмССР Г. Х. Бунятяна и других видных нейробиохимиков был создан новый журнал «Нейробиохимия».

Редколлегия журнала с благодарностью отмечает, что Грачиза Хачатурович Бунятян успел много сделать для подготовки его издания.

АКТУАЛЬНЫЕ ЗАДАЧИ НЕЙРОХИМИИ

ГАЛОЯН А. А.

XX век ознаменовался выдающимися достижениями в познании химизма и функций мозга. Этому способствовали фундаментальные исследования плеяды корифеев русской физиологии И. М. Сеченова, И. П. Павлова и их учеников, создавших учение о высшей нервной деятельности и строго объективные методы ее изучения. Возникновение представлений о химической передаче нервного импульса и трофической функции нервной системы стимулировало дальнейшее изучение химизма нервной системы с учетом морфологических, функциональных и химических особенностей ее отдельных участков и ядерных образований. Исследования советской нейрохимической школы, созданной А. В. Палладиным, были посвящены, главным образом, вопросам функциональной биохимии нервной системы. Они получили дальнейшее развитие в трудах Е. М. Крепса, Г. Е. Владимирова, Г. Х. Буян-тяна, П. А. Кометиани, Н. Н. Демина и др., обогативших отечественную нейрохимию данными первостепенной важности. Эти достижения широко признаны как у нас, так и за рубежом. Однако дальнейшее развитие функциональной нейрохимии зависит от создания новых адекватных методов исследований, учитывающих новейшие достижения в области статической и динамической биохимии, нейрофизиологии и нейроэндокринологии.

Исследования нейробиологов за последние 40 лет коренным образом изменили представления о химизме и функциях мозга, о происхождении эндокринных желез, продуцирующих пептидные гормоны. Выделение из нейрогипофиза животных вазопрессина и окситоцина и расшифровка их химической структуры в 50-х годах, а также гипоталамических факторов, ингибирующих и стимулирующих высвобождение аденогипофизарных гормонов, в 70-х годах сыграли решающую роль в возникновении молекулярной нейроэндокринологии. Вслед за этим последовала расшифровка первичной структуры первого специфического белка нейрогипофиза—нейрофизина, являющегося носителем вазопрессина и окситоцина. Из гипоталамо-гипофизарной системы животных были выделены метонин и лейциненкефалины, различные эндорфины—фрагменты β -липотропина, их прогормональные формы, ферменты, ответственные за распад указанных пептидов. Аналогичные нейропептиды были обнаружены не только в мозгу, но и в поджелудочной железе, ки-

шечнике, хромоаффинной ткани надпочечников, желудке и различных нервных ганглиях.

До последнего времени оставалось загадочным образование нейропептидов в указанных железистых клетках. Однако новейшими исследованиями эмбриологов, гистологов и нейрохимиков было установлено, что все клетки нервной системы, а также эндокринных желез, образуются из специализированной нейроэктодермальной ткани. Американский ученый Пирс назвал клетки нейроэктодермального происхождения APUD-клетками. К ним же, как полагают, относятся также клетки промежуточной доли гипофиза. В них содержится АКТГ 1—39, кортикотропинподобный пептид, которым является АКТГ 18—39, α -МСГ, то есть АКТГ 1—13, β -липотропин 1—91 и β -липотропин 1—48.

Таким образом, в задачи нейробиологии и нейрохимии входит изучение особенностей молекулярных механизмов биосинтеза и выделения нейропептидов не только в специализированных нейронах мозга, но и в эндокринных железах. Поиск новых нейропептидов в этих образованиях продолжается. Успешно изучаются специфические белки нервной системы: S-100, 14-3-2, белки гликопротеиновой природы, являющиеся предшественниками обнаруженных нами кардиоактивных нейрогормонов, а также ряд новых специфических гликопротеинов в синаптических везикулах, в том числе белок В-50 и др. Наступает период бурного изучения химической структуры и биологии специфических белков и нейропептидов.

За последнее время ряд ученых показал наличие белка S-100 не только в нервных элементах, но в меланоцитах и клетках Лангерганса человеческой кожи, в эпифизе, аденогипофизе и мозговом слое надпочечников. Таким образом, этот белок является скорее своеобразным маркером нейроэктодермальных клеток, чем специфическим белком нервной системы. Выделены информационные рибонуклеиновые кислоты, ответственные за биосинтез S-100, 14-3-2 и других белков, и даже их гены. Имеются сведения о возможности клонирования генов соматостатина, инсулина, энкефалинов и других пептидных соединений. Методы генной инженерии и биотехнологии естественным путем вторгаются в нейрохимию. Именно благодаря этим методам удалось получить ряд редких нейропептидов и специфических белков нервной ткани.

Вице-президент АН СССР академик Ю. А. Овчинников пишет: «В последние годы физико-химические подходы уверенно пробивают себе дорогу и в таких направлениях, как изучение нервной системы, высшей нервной деятельности, познание природы иммунитета. В Советском Союзе работы в этой сфере развиваются в рамках общесоюзных программ «Нервный импульс» и «Ионный канал», координируемых Межведомственным научно-техническим советом по проблемам физико-химической биологии и биотехнологии при Государственном комитете СССР по науке и технике и Президиуме АН СССР. Среди важных событий в изучении мозга отметим открытие нейропепти-

дов. Они участвуют в регуляции таких проявлений высшей нервной деятельности, как память, сон, ощущение боли. Эти «химические» аспекты в функционировании мозга, вызвавшие изрядную ломку старых представлений, требуют, очевидно, большего внимания со стороны советской нейрофизиологии, порой слишком «привязанной» к традиционным направлениям»*.

Задачи нейрохимиков и нейрофизиологов заключаются в том, чтобы обнаружить функционально важные белки и нейропептиды, расшифровать их структуру и найти место этих соединений в сложных биохимических и нейрофизиологических процессах с целью их применения при лечении ряда нервных, нейроэндокринных, психических и других заболеваний.

Весьма перспективными являются глубокие исследования традиционных направлений нейрохимии с учетом новейших требований современной молекулярной нейробиологии. В числе этих проблем следует отметить изучение нейротрансмиттеров и их рецепторов, роли липидов в строении и функции нейрональных мембран, нуклеотидов и нуклеиновых кислот в функциональной деятельности мозга, включая изолирование и идентификацию генов соответствующих белков и нейропептидов. Заслуживает внимания изучение биохимии синапсов с разработкой методов выделения белков, нейропептидов и ферментов из синаптических участков для выяснения их роли в процессах передачи нервного импульса. Представляет интерес изучение особенностей азотистого, липидного, энергетического и углеводного обмена нервной ткани и нейрохимических основ генетических нарушений этих звеньев метаболизма. Особое внимание представляет исследование обмена кальция и других ионов в нервной ткани с использованием богатого опыта по изучению этих процессов на изолированных нейронах. Исключительно важное значение для функциональной биохимии нервной системы имеет изучение нейрохимических коррелятов поведенческих реакций, гормональной регуляции нейрохимических процессов и нейрохимической регуляции эндокринных и висцеральных функций.

Ознакомление с публикуемыми работами по нейрохимии показывает, что ученым нашей страны предстоит провести большую работу по раскрытию механизмов обмена и действия вновь открытых соединений нервной ткани, изучению биохимии миелиногенеза, глии и нейронов, аксонального транспорта и хромаффинных гранул.

Показателем успеха всех нейрохимических исследований является применение их результатов в практической медицине. Для этого наиболее важное значение имеют комплексные исследования первостепенных проблем нейробиологии с привлечением нейрохимиков, нейрофизиологов, нейроэндокринологов, химиков-органиков, нейрофармакологов и др.

Результаты нейрохимических исследований уже дали в руки вра-

* «Известия», 16 августа 1981 г.

чей мощные биологически активные соединения (люлиберин, тиреолиберин, соматостатин, вазопрессин, окситоцин, энкефалины, эндорфины и их синтетические аналоги), которые широко применяются для лечения ряда эндокринных, нервных и других заболеваний. Нет сомнения в том, что раскрытие тонких нейрохимических механизмов, лежащих в основе нервной деятельности, механизмов нейрогормональной регуляции функций различных органов, будет решающим фактором прогресса биологии и медицины. Повышение уровня нейрохимических исследований в СССР—задача первостепенной важности. Создание нового все-союзного журнала «Нейрохимия» является ярким проявлением заботы партии и правительства о развитии физико-химической биологии в нашей стране. Это полностью соответствует духу постановления ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О дальнейшем развитии физико-химической биологии и биотехнологии и использовании их достижений в медицине, сельском хозяйстве и промышленности».

В статье приведен далеко не полный перечень основных задач современной нейрохимии. Многим из перечисленных разделов в настоящее время уделяется недостаточное внимание, однако имеются все возможности для их успешного развития в дальнейшем.

УДК 62.278:547.915

ЛИПИДЫ МЕМБРАН КАК ИНФОРМАЦИОННЫЕ МОЛЕКУЛЫ

КРЕПС Е. М., АШМАРИН Н. П.

Нуклеиновые кислоты и белки считаются информационными макромолекулами. Липиды обычно не относятся к информационным молекулам возможно потому, что их компоненты—жирные кислоты построены из последовательностей повторяющихся единиц. Показано, что сложные мембранные липиды, прежде всего ганглиозиды, чрезвычайно многообразны и вариабельность их молекул такова, что число вариантов исчисляется сотнями. Это соответствует количеству информации приблизительно 8 бит. Учитывая новейшие данные о структуре и составе ганглиозидов, надо полагать, что информационное содержание ганглиозидов превышает 10 бит на молекулу. Оно может быть даже большим, чем информационное содержание некоторых сигнальных пептидов. Подобное рассуждение применимо и к другим мембранным липидам.

Сейчас назрела необходимость пересмотра вопроса о том, являются ли сложные липиды «информационными молекулами».

В отношении информации, которую несут ДНК и РНК, нам ясно, что она заключена в последовательности оснований (нуклеотидов), жестко соответствующих последовательности аминокислот в белках. Таким путем создаются «тексты» на языке оснований нуклеиновых кислот, информация которых точно воспроизводится в «текстах» на аминокислотном языке. Важнейшей задачей молекулярной биологии являлось раскрытие универсальных законов и механизмов того, как это происходит, выяснение структуры и свойств кодовых сочетаний оснований нуклеиновых кислот, соответствующих каждой из аминокислот.

Информационными макромолекулами признаются и белки—важнейшие характерные компоненты живой материи. В отношении белков только порядок чередования различных R-групп аминокислотных остатков содержит информацию об их структуре и свойствах. Все многообразие свойств белков определяется, то есть кодируется, первичной структурой или последовательностью аминокислот в полипептидах, образующих белок.

В биохимической литературе полисахариды и липиды обычно не считаются информационными молекулами на том основании, что их компоненты—моносахариды или жирные кислоты построены, главным образом, из повторяющихся последовательностей идентичных единиц. В отношении сложных полярных мембранных липидов это распространенное мнение вызывает законные возражения, которые тем силь-

пес, чем лучше мы узнаем строение и свойства липидов, их роль в структуре и функциях мембран.

Рассмотрим строение и информационное содержание ганглиозидов. Это самые сложные по своей структуре и, по-видимому, по своей функции мембранные липиды. Ганглиозиды—крупные молекулы, молекулярная масса их измеряется тысячами дальтон. Так, молекулярная масса моносиалоганглиозида G_{M1} , содержащего только один остаток N-ацетилгалактозаминной кислоты и 4 моносахаридных остатка, равняется 1600 дальтон. У полисиалоганглиозидов, содержащих до 5 остатков сиаловых кислот, молекулярная масса соответственно больше. Ганглиозиды, как и другие липиды, способны самопроизвольно объединяться в мицеллярные структуры с весьма большой молекулярной массой, измеряемой сотнями тысяч дальтон, и функционирующими как макромолекулярные системы.

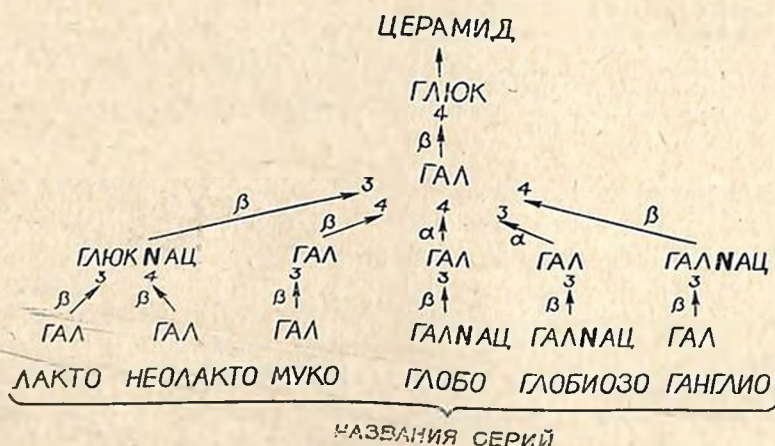


Рис. Структуры моносахаридной цепи гликосфинголипидов позвоночных

Основная клеточная локализация ганглиозидов своеобразна. Ганглиозиды по преимуществу липиды синаптических отделов плазматических мембран нервных клеток, нейронов, для которых получение самой разнообразной информации имеет особое биологическое значение. Но ганглиозиды есть в других мембранах центральной нервной системы, в клетках глии и даже в миелиновых проводниках, и в не нервных тканях, хотя содержание их во всех этих локусах на один или два порядка ниже, чем в синаптических отделах плазматических мембран. В ганглиозидах углеводные олигосахаридные компоненты, торчащие из плоскости плазматической мембраны наружу и обуславливающие (вместе с интегральными белковыми компонентами мембран) трехмерную структуру мембраны, разнообразны. Это остатки галактозы, глюкозы, N-ацетилгалактозаминна и самые значительные по объему и многообразные по строению, по месту прикрепления к субъединицам макромолекулы остатка сиаловой кислоты, обычно N-ацетил-

нейрамининовой кислоты. Спаловая кислота присоединяется к центральной или к периферической галактозе или к уже входящему в состав ганглиозида другому остатку спаловой кислоты. Спаловые кислоты обнаружены пока в составе двух из шести классов сложных глико-сфинголипидов позвоночных—в ганглио- и в неолактосериях (рисунк).

Спаловых кислот в крупной молекуле ганглиозида, как правило, бывает от одной до пяти. Места их прикрепления, то есть последовательность, могут быть различными. Разных моносахаридных остатков чаще всего бывает 4, но в мозговых и немозговых мембранах содержатся ганглиозиды с 3 или даже с 2 моносахаридными остатками. Для мозга хрящевых рыб, как показала Аврова и сотр. [1], характерны ганглиозиды с 2 моносахаридными остатками. Расположение их в большой молекуле ганглиозида может быть различным.

Гидрофобные элементы в молекуле ганглиозида—остатки жирной кислоты и сфингонда не дают такого разнообразия, хотя длина цепи и степень ненасыщенности жирной кислоты и сфингонда очень переменны и, как показали наши исследования, имеют выраженный адаптационный характер—зависимость степени ненасыщенности жирных кислот в перамиде от температуры окружающей среды [2]. В ганглиозидах мозга рыб эта зависимость выражена еще более отчетливо, чем в фосфолипидах мозга, что может быть связано с особой биологической важностью сохранения жидко-кристаллической структуры липидного бислоя в области синаптических контактов.

Все эти возможные и реально существующие вариации в липидной характеристике ганглиозидов несут, несомненно, соответствующую информацию, определяющую строение тех участков мембраны, куда эти липиды встроены. А разнообразие в строении должно быть также исключительно велико, учитывая полифункциональность и специальные функции ганглиозидов, для которых трехмерная конфигурация имеет особое значение. Это функции «клеточного узнавания» и рецепции всякого рода—рецепции гормонов, медиаторов, токсинов, вирусов, а также иммунобиологические свойства. Известно, например, о специфическом связывании ганглиозидами, т. е. связывании определенными, конкретными «индивидуальными» молекулами ганглиозидов токсинов холеры, вируса Сендай, тетанус-токсина и ряда гормонов. Вероятным считается участие ганглиозидов в синаптической передаче и в синаптогенезе. Важнейшее значение имеет функция ганглиозидов в контактом ингибировании клеточного роста и размножения [3—7].

Для выполнения всех этих многообразных функций, совершающихся в клеточной мембране при участии ганглиозидов, необходимо привнесение в мембрану разнообразной информации. Носителем этой информации можно представить сложный и многокомпонентный состав молекул ганглиозидов, с их специфической последовательностью входящих в состав макромолекулы остатков сахаров и других характерных группировок.

Произведем оценку порядка величин, характеризующих информа-

информационное содержание молекул ганглиозидов как полимеров, построенных из определенного набора разных мономеров, варьирующих по положению и числу. Трудность такой оценки определяется, во-первых, тем, что пока еще нет полных данных о частоте вхождения отдельных мономеров в олигосахаридную область молекулы ганглиозидов; во-вторых, нельзя считать выясненными все конформационные ограничения, которые возникают при варьировании положения мономеров; в-третьих, несмотря на большое число уже выделенных индивидуальных ганглиозидов, структура которых установлена, можно с уверенностью прогнозировать еще длительную работу, в результате которой будет выделено большое число новых вариантов ганглиозидов; в-четвертых, олигосахаридная часть молекулы ганглиозидов в отличие от белков и нуклеиновых кислот не является линейным полимером—в ней есть ответвления, что существенно осложняет расчеты.

Тем не менее, сейчас можно оценить порядок минимальных величин информационного содержания молекул ганглиозидов путем приблизительного вычисления количества вариантов, мыслимых с точки зрения современных представлений о закономерностях их структуры. Так, в простейших типах ганглиозидов можно допустить существование шести различных последовательностей из 2-, 3- или 4-х молекул галактозы, N-ацетилгалактозамина и глюкозы с учетом следующих закономерностей: связь с церамидом осуществляется в известных вариантах только через остаток глюкозы; остатков глюкозы в других участках нет; остатки сиаловой кислоты связаны только с остатками галактозы; если два остатка галактозы связаны каждый с сиаловой кислотой, то между ними находится остаток N-ацетилгалактозамина. Многообразие вариантов ганглиозидов, возникающих только по этим причинам, иллюстрируется на рисунке.

На базе этих последовательностей возможны многочисленные варианты размещения моно- и дисиаловых остатков. Число вариантов при условии, что общее число остатков сиаловой кислоты не превышает четырех на молекулу ганглиозида, приближается к 20. Число вариантов возрастает, если иметь в виду существование пентасиаловых ганглиозидов. Уже на этом уровне сложности число вариантов измеряется сотнями, что соответствует количеству информации приблизительно в 8 бит (двоичный логарифм числа вариантов, пока с допущением равной их вероятности).

Как расценивать эти величины? Наиболее показательно сравнение с весьма распространенными межклеточными сигнализаторами—регуляторными олигопептидами. Количество информации на один аминокислотный остаток измеряется в настоящее время величиной в 2—3 бита [8].

Тогда на такие пептиды, являющиеся межклеточными сигнализаторами, как тиреолиберин, энкефалины и тафцин, приходится 6—15 бит, т. е. величина, сопоставимая с ганглиозидами.

Однако новейшие данные о структуре и составе ганглиозидов допускают существование еще большего числа вариантов. Действитель-

но: 1) связь с церамидом как исключение может осуществляться в относительно простых ганглиозидах через галактозу; 2) между двумя остатками галактозы в ткани мозга позвоночных, как правило, находится остаток N-ацетилгалактозамина; однако в минорных фракциях может быть N-ацетилглюкозамин, а в экстранейрональных органах N-ацетилглюкозаминсодержащие ганглиозиды могут преобладать; 3) в нервной системе описаны в качестве минорных компонентов ганглиозиды, содержащие 5 моносахаридных остатков, в том числе таких сравнительно редких, как фукоза и N-гликозилнейраминная кислота; 4) в последние годы в тканях различных животных обнаружены ганглиозиды с разветвленной моносахаридной цепью из 8—10 и даже нескольких десятков остатков [9, 10]; 5) описаны минорные компоненты ганглиозидов, содержащие O-ацетильные производные [11].

Все это позволяет полагать, что информационное содержание ганглиозидов существенно превышает 10 бит на молекулу и может, следовательно, быть даже большим, чем информационное содержание некоторых из сигнальных пептидов.

Состав других гликофинголипидов—цереброзидов и сульфocereброзидов менее сложен, чем состав ганглиозидов, и величина их изолированной молекулы, не вошедшей в мицеллярную структуру, меньше, чем молекулы ганглиозидов. Все же они достаточно многообразны.

Известна преимущественная локализация цереброзидов и сульфocereброзидов в миелиновых образованиях ЦНС, то есть главным образом в белом веществе мозга. Сульфocereброзиды есть и в определенных участках серого вещества мозга, где они связаны с опиятными рецепторами мозга.

Цереброзиды и сульфocereброзиды есть не только в нервной системе, но во всех других органах и тканях. Функция этих гликолипидов не вполне выяснена. Несомненно, цереброзиды и сульфатиды играют важную роль в иммунобиологических реакциях. Гликофинголипиды также осуществляют, по-видимому, функцию клеточного узнавания. В отношении этой функции хорошо установленный пример узнавания касается группы крови. На поверхности эритроцитов факторы группы крови антигены A, B, H, Le, P₁ были идентифицированы как гликофинголипиды.

Сульфатиды, по-видимому, имеют отношение к активному транспорту натрия. Karlsson и соавт. [12—14] нашли, что сульфатиды содержатся в высокой концентрации в мозговом слое почки, в солевой железе морских птиц, в ректальной железе акул, то есть в тканях органов, где идет активный транспорт натрия. Широкое распространение цереброзидов и сульфатидов в разных тканях и у всех изученных представителей животного мира делает несомненной их полифункциональность. Уже было сказано, что эти гликолипиды связаны, по-видимому, с рецепцией некоторых нейропептидов. Loh и соавт. [15, 16] показали, что цереброзид-сульфат может быть анионным центром предполагаемого опиатного рецептора.

Этим фактам соответствует и значительная вариабельность состава цереброзидов и сульфocereброзидов. Обычно углеводным компонентом цереброзидов и сульфocereброзидов является галактоза, но в определенных редких случаях на место галактозы становится глюкоза.

Одной из особенностей молекулярного состава цереброзидов и сульфocereброзидов является то, что в отличие от других липидов жирнокислотный компонент их молекулы в цереброзидах и сульфocereброзидах содержит как нормальные незамещенные жирные кислоты, так и обладающие гидроксильной группой гидроксикислоты. С какими особенностями функций цереброзидов и сульфocereброзидов связан этот двойственный характер жирных кислот, мы пока не знаем. Интересен факт, что глюкоцереброзиды (в отличие от галактоцереброзидов) не содержат гидроксикислот.

Как и в других липидах, жирные кислоты гликолипидов бывают насыщенные или мононенасыщенные и содержат по большей части 22 или 24 углеродных атома (в гликолипидах миелина). Но нередко в зависимости от локализации жирные кислоты этих гликолипидов могут содержать 16 или 18 атомов С. Сфингоиды цереброзидов—длинноцепочечные основания чаще всего с 18-углеродной цепочкой, иногда 20-углеродной. В молекуле цереброзида чаще всего встречается мононенасыщенный сфингенин (сфингозин), реже насыщенный сфинганин (дигидросфингозин).

Все эти особенности структуры молекулы цереброзидов и сульфocereброзидов имеют специфическое функциональное значение, определяют структуру и функцию того участка мембраны, в который встроена эта молекула гликолипида. Другими словами, неоднородность и неповторимость цереброзидов и сульфocereброзидов позволяет предпологать, что и эти молекулы, хотя в меньшей мере, чем ганглиозиды, также можно считать информационными.

В липидной основе клеточных структур преобладающее количество липидов по массе принадлежит фосфолипидам. Аполярный бислой клеточных мембран, их гидрофобная матрица, построен в основном из цепей жирных кислот, а торчащие из бислоя полярные головки фосфолипидов весьма многообразны. Это—холлинсодержащие фосфорилхоллины лецитин и сфингомиелин, фосфорилэтаноламин и содержащий аминокислоту фосфорилсерин, связанный с циклическим сахаром фосфорил-инозит, который может содержать еще один или два остатка фосфорных групп (ди- и трифосфоинозитиды по старой терминологии), фосфорилглицерин в кардиолипине. Многообразие полярных головок фосфолипидов увеличивается еще тем, что фосфатидилэтаноламин, и в меньшей степени фосфатидилхоллин и фосфатидилсерин, могут быть представлены или диацильной, или плазмалогенной формой (1-алкил-2-ацил-SH-3-фосфорилэтаноламин). Соотношение этих двух форм фосфолипидов в разных тканях и у разных групп животного мира может быть самым разным. Мы до сих пор точно не знаем, какие особенности в физико-химических свойствах фосфолипидов оказывает замена диацильной на плазмалогенную форму и как эта замена влияет на свой-

ства мембраны. Плазмалогенная форма фосфатидилэтаноламина у всех классов позвоночных в несколько раз более не насыщена, чем диацильная. Жирные альдегиды плазмалогенов тоже могут быть насыщенными и ненасыщенными. Можно отметить интересную особенность в распределении диацильной и плазмалогенной форм фосфатидилэтаноламина. В мозгу рыб низкая температура обитания ведет к повышению относительного содержания диацильной формы и снижению плазмалогенной формы этого фосфолипида. Тут выступают как будто парадоксальные отношения. У обитателей холодных вод уменьшается в мозгу содержание плазмалогенов, всегда более ненасыщенных, чем диацильные формы, а, с другой стороны, увеличена ненасыщенность обеих форм фосфатидилэтаноламина при низких температурах обитания [2]. Аналогичные результаты получили Johnston и Roots [17] и Roots [18] при акклимации золотых рыбок к низкой температуре.

Сказанным далеко не исчерпывается возможное многообразие молекулярных разновидностей фосфолипидов. Молекула фосфолипида может потерять одну ацильную группу, превратившись в лизоформу. Кроме плазмалогенной формы, существуют 1-алк-2-ацил-SH-глицерофосфолипиды. Наконец, в мембранах могут встречаться фосфодиольные липиды.

Многообразие физических и химических характеристик фосфолипидов и, следовательно, их потенциальная и фактическая информативность выступают еще отчетливее, если мы оценим фосфолипиды с точки зрения электрических зарядов, которые они несут. Фосфолипидам принадлежит доминирующее значение в мембранах не только в силу их количественного преобладания, но и по суммарному влиянию на ионное состояние липидной фазы мембран. Такие липиды, как фосфатидилхолин и сфингомиелин, составляющие около 45% общих фосфолипидов мозга, имеют сбалансированные электрические заряды. Сильно кислые фосфолипиды—фосфатидилсерин, фосфатидилинозиты, кардиолипин, фосфатидная кислота, несущие отрицательный, но не одинаковый заряд, составляют в сумме до 20% тотальных фосфолипидов. Фосфатидилэтаноламин и его плазмалогенная форма при pH 7 несут слабо отрицательный заряд. Поэтому общий заряд липидной фазы (по крайней мере в мембранах мозга и в зонах, где заряд определяется фосфолипидами) слабо отрицательный. На общий заряд бимембраны мозга существенное влияние могут оказывать ганглиозиды с их отрицательно заряженными сиаловыми кислотами.

Если к этому добавить, что жирнокислотные хвосты, образующие гидрофобную матрицу мембраны, имеют различную длину, различную степень насыщенности или ненасыщенности, то представление, что липиды мембран состоят из повторяющихся липидных единиц, очень далеко от истины.

Здесь мы подходим к вопросу об информационном содержании не отдельных молекул липидов, а их надмолекулярных комплексов в паружных мембранах клеток.

Липиды в клетках всех тканей, а в клетках ЦНС в особенности, отличаются чрезвычайным разнообразием, отвечающим сложности самих нервных клеток и гетерогенности клеточного состава ЦНС. У фосфолипидов, сфинголипидов и ганглиозидов аполярные хвосты жирных кислот, и особенно полярные головки, сильно различаются по своим размерам и химическому строению, по всей конфигурации, общей геометрии, полярности, электрическому заряду и т. п., а это создает возможность для самого разнообразного сочетания липидов в биомембранах. Клеточные мембраны, как наружные плазматические, так и внутриклеточные, невероятно многообразны, особенно в возбудимых тканях. Их отдельные участки, состоящие из неидентичных липидных молекул, отдельные домены, кластеры должны очень отличаться друг от друга, содержать разные ферменты, обладать разной специфической проницаемостью, образовывать зоны облегченной и обменной диффузии и зоны, через которые идет активный транспорт, «поры», фиксированные каналы, ионные насосы, содержат ионифоры и т. п.

Это структурное и функциональное многообразие, мозаичность в организации мембран «закодирована» отчасти в составе и строении образующих мембрану липидов, в характере, расположении и последовательности составляющих их липидных компонентов: гидрофобных аполярных жирных кислот и сфингоидов, полярных остатков фосфорной кислоты и спиртов, азотистых и безазотистых оснований, моно- и олигосахаридов и связанных с липидами протеолипидов. Гидрофильные компоненты мембран, как показали современные исследования, лежат на поверхности гидрофобного бислойа, обуславливая трехмерную конфигурацию мембраны. Такое представление о строении биологических мембран, которое Singer и Nicolson [19] называли жидко-мозаичной моделью, удовлетворительно объясняет многие свойства биологических мембран. Такая модель делает понятным наличие мембран с очень различным содержанием белков, разную толщину неоднотипных мембран, асимметрию природных мембран. Она позволяет понять электрические свойства и проницаемость мембран, подвижность белковых компонентов в плоскости мембраны и активное движение жирнокислотных хвостов липидных молекул. Пестрая липидно-белковая мозаичная структура мембран позволяет понять биологическую роль надмолекулярных комплексов липидов как информационных систем.

Комплексы липидов и белков несут разнообразнейшую информацию в деталях своей уже надмолекулярной структуры, в двухмерном и трехмерном расположении входящих в их состав молекул.

Таким образом, представляется обоснованным отнесение к категории информационных молекул некоторых сложных липидов, в первую очередь ганглиозидов, и заслуживает особого анализа и развития вопрос об информационном значении надмолекулярных комплексов липидов клеточных мембран.

MEMBRANE LIPIDS AS INFORMATIVE MOLECULES

KREPS E. M., ASHMARIN I. P.

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR
Academy of Sciences, Leningrad

Nucleic acids and proteins are considered to be informative (information bearing) macromolecules. Usually lipids are not considered to be such molecules supposedly because their components—fatty acids—are composed from consequently repeating units. It has been demonstrated that complex membrane lipids, first of all gangliosides are highly variable (hundreds of variants exist). This amount of variants corresponds to the quantity of information of about 8 bits. Taking into account modern data on structure and composition of gangliosides we suppose that they contain more than 10 bits per molecule. Gangliosides informative content may be even greater than that of signal peptides. Analogous reasoning may be extended to other membrane lipids.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аврова Н. Ф., Ли Я. Т., Обухова Е. Л. *J. Neurochem.*, 32, 1807, 1979.
2. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 338 с., 1981.
3. Mandel P., Dreyfus H., Yusufi A. N. K., Sarlieve L., Robert J., Neskovich N., Harth S., Rebel G. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 125, 515, 1980.
4. Hakomori S., Young W. W., Pott L. M., Yoshino T., Halfpap L., Lingwood C. A. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 125, 247, 1980.
5. Rebel I. G., Robert J., Mandel P. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 125, 159, 1980.
6. Kohn L. D., Consiglio E., De Wolf M. S., Grollman E., Ledley F. D., Lee G., Morris N. P. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 125, 487, 1980.
7. Svennerholm L. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 125, 533, 1980.
8. Медников Б. М.—В кн.: Строение ДНК и положение организмов в системе, М., Изд-во МГУ, 320 с., 1972.
9. Svennerholm L., Mansson J. E., Li Y. T., *J. Biol. Chem.*, 248, 740, 1973.
10. Somino S., Ghidoni R., Gialli C., Tettamanti G. *J. Neurochem.*, 31, 947, 1978.
11. Haverkamp J., Veh R. W., Sander M., Schauer R., Kamerling I. P., Vliegenhart, J. F. G. Hoppe Seyler's *Z. Phys. Chem.*, 358, 1609, 1977.
12. Karlsson K. A., Samuelsson B. E., Steen G. O. *Acta Chem. Scand.*, 22, 2723, 1968.
13. Karlsson K. A., Samuelsson B. E., Steen G. O. *Biochim. Biophys. Res. Com.*, 37, 22, 1969.
14. Karlsson K. A., Samuelsson B. E., Steen G. O. *Eur. J. Biochem.*, 46, 243, 1974.
15. Loh H. H., Law P. Y., Ostwald T., Cho T. M., Way E. L. *Fed. Proc.*, 37, 147, 1978.
16. Zals B., Chaves F. B., Monge M., Leydin L., Loh H., Baumann N., *C. R. Soc. Biol.*, 174, 457, 1980.
17. Johnston P. V., Roots B. I., *Comp. Bioch. Physiol.*, 26, 555, 1969.
18. Roots B. I. *Comp. Bioch. Physiol.*, 25, 457, 1968.
19. Singer S. J., Nicolson G. L. *Science*, 175, 720, 1972.

Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова

АН СССР, Ленинград

Поступила 4. I 1982

УДК 612.821.7:612.82:577.1

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ЛИШЕНИИ СНА (О НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ ПРИЧИНАХ НЕОБХОДИМОСТИ СНА У ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ)

ДЕМИН Н. Н.

Изложены результаты определений в различных отделах и субцеллюлярных фракциях головного мозга крыс с нарушениями сна: содержания «свободных» SH-групп, дыхания синапсом при инкубации их в средах разного ионного состава, связывания рутинетового красного синапсом, выхода кислой РНКазы и катепсина D из лизосом. На основе полученных данных сделано заключение, что одной из основных метаболических нейрохимических причин периодически возникающей необходимости сна высших позвоночных может быть постепенно развивающаяся альтерация мембранных структур нервной ткани, по-разному проявляющаяся в различных отделах головного мозга.

При сне млекопитающих в головном мозгу протекают весьма активные физиологические процессы. В настоящее время прежде всего на основе биоэлектрических явлений был выделен ряд закономерно чередующихся четко характеризуемых фаз и стадий полноценного сна. Много уже известно и об участии при этом главных медиаторов. В то же время только еще начинают развиваться исследования фундаментальных нейрохимических коррелятов динамики процессов засыпания, различных фаз и стадий сна, последующего пробуждения [1—8]. Две основные фазы сна значительно отличаются друг от друга: начальная—медленноволновая фаза сна (МФС)—характеризуется синхронизированными высокочастотными медленными биоэлектрическими колебаниями в коре больших полушарий головного мозга; развивающаяся только после МФС более глубокая парадоксальная фаза сна (ПФС) характеризуется биоэлектрическими явлениями, близкими к наблюдаемым при бодрствовании,—десинхронизированными низкочастотными быстрыми волнами. Обнаруживаются и нейрохимические различия между МФС и ПФС. Примечательно, что доля ПФС от общей суточной продолжительности эпизодов сна наиболее высока у человека; в то же время выясняется, что для репаративных биохимических процессов нейроны нуждаются именно в ПФС [8], поэтому она и привлекает большое внимание. При изучении биологической роли ПФС распространенным методическим приемом является исследование результатов ее искусственного лишения—селективной бессонни-

цы. Бессонницу вообще можно рассматривать в известной мере как модель затянувшегося бодрствования с экстраполяцией тех сдвигов, которые могут при нем постепенно накапливаться, вызывая настоятельную потребность в сне. По такому пути развивается и ряд исследований в нашей лаборатории, имеющих целью выявление нейрохимических компонентов причины необходимости сна [8, 9]. При этом вызывают интерес биохимические изменения именно в определенных субцеллюлярных мембранных структурах разных морфологических образований в головном мозгу. Некоторые итоги этих исследований изложены в данном сообщении.

Материалы и методы

Опыты всех серий были проведены на белых крысах линии Вистар обоего пола массой 170—200 г. Животных доставляли в лабораторию за сутки до опыта и размещали в отдельных клетках. Лишение ПФС вызывали по принципу метода Jouvet и соавт. [10]. Для этого крыс помещали на площадки размером 45×45 мм, расположенные на 1—2 мм над водой в соответствующем бассейне. В этих условиях у крыс могла развиваться МФС, но в результате характерного для ПФС резкого падения тонуса мышц шеи при переходе МФС в ПФС голова крысы опускалась в воду и животное немедленно просыпалось. Проведенная нами [11] специальная экспериментальная проверка подтвердила достаточную адекватность такого метода селективного лишения ПФС для нейрохимических исследований [8]. Подопытных крыс умерщвляли быстрым декапитированием через различные сроки после помещения их на маленькие площадки. Одновременно с подопытными забивали контрольных животных, находившихся в это время в обычных клетках в состоянии спокойного бодрствования.

В различных препаратах, полученных из разных отделов головного мозга, производили ряд биохимических исследований. В разных сериях опытов по методикам, детально описанным в цитируемых статьях, определяли содержание SH-групп [12], активность кислой РНК-азы [13], потребление O_2 [14] и связывание красителя [15].

Результаты и обсуждение

Такие весьма реактивные функциональные группы, как сульфгидрильные, имеют большое биологическое значение. Эти группы, входящие в состав белковых молекул, играют первостепенную роль для их конформации, а тем самым для свойств мембран, в которые входят подобные белки, для активности многих ферментов и т. д. Исходя из этого, Рашевской в серии опытов [12] при помощи амперометрического титрования $AgNO_3$ были произведены определения содержания SH-групп в различных препаратах головного мозга крыс, подвергнутых лишению ПФС до 96 ч. Было установлено, что в условиях наших опытов лишение крыс ПФС (в течение 24, 48 и 96 ч) не сопровожда-

лось какими-либо сдвигами содержания титруемых («свободных») SH-групп в гомогенатах лобной и затылочной областей коры больших полушарий, в гомогенатах варолиева моста с продолговатым мозгом и мозжечка. В гомогенатах среднего мозга и переднего отдела промежуточного мозга животных, подвергнутых 24-часовому лишению ПФС, было выявлено значительное повышение содержания SH-групп в среднем соответственно на 23 и 24% по сравнению с контрольными крысами. Спустя 48 ч после начала опыта отклонение от контроля достигало в среднем 28% в обоих отделах. Повышенное количество SH-групп приблизительно на том же уровне (26 и 24%) можно было констатировать и при 96-часовом лишении ПФС.

В то же время каких-либо изменений содержания SH-групп в течение лишения ПФС до 96 ч во фракциях растворимых белков всех исследованных отделов головного мозга найдено не было. Не наблюдалось изменения количества в них также и низкомолекулярных тиоловых соединений.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что лишение ПФС, во-первых, избирательно влияет на содержание SH-групп в различных отделах головного мозга—только в передней части его ствола (из исследованных отделов), а во-вторых, изменения проявляются лишь в случае нерастворимых, структурных белков. Далее было установлено, что содержание -S-S-групп при этом в тех же объектах не менялось. Следовательно, увеличение количества SH-групп являлось результатом не восстановления -S-S-групп, а «высвобождения» преформированных SH-групп, что свидетельствует о какой-то альтерации структурных белков части ствола головного мозга в сторону их депатурации, наступающей при нарушении сна. Как показали дальнейшие исследования [16], это повышение содержания SH-групп оказалось весьма стойким—при возвращении крыс в условия их обычного пребывания после 24-часового лишения ПФС полная нормализация количества SH-групп в гомогенатах ствола головного мозга наступала лишь спустя 36 ч. Некоторые другие, еще более выраженные сдвиги, в аналогичных условиях исчезали уже в пределах 1 ч [8].

В каких же субцеллюлярных структурах могли иметь место описанные сдвиги содержания SH-групп при лишении ПФС? В связи с этим были исследованы полученные дифференциальным центрифугированием обогащенные ядерная и синаптосомная фракции, а также относительно чистые препараты митохондрий ткани ствола головного мозга крыс, подвергнутых 24-часовому лишению ПФС [12]. Как видно на рис. 1, изменения содержания SH-групп (в пределах, установленных и в случае суммарного гомогената), сопровождавшие лишение ПФС, были найдены в ядерной и синаптосомной фракциях; в митохондриях заключить, что альтерация соответствующих нерастворимых белков при нарушении сна протекает в мембранах ядер и синаптического ап-

парата, но не в митохондриях. Следует заметить, что такое частичное развертывание пептидных цепей белков этих мембранных структур может повышать их атакуемость пептидгидролазами и способствовать разрушению мембран со снижением содержания белков [8].

Изменения биологических свойств синаптических структур в результате лишения ПФС были отчетливо продемонстрированы и в серии работ Ниловой [14, 17], в которых было изучено потребление O_2 инкубированными в средах различного ионного состава синаптосомами больших полушарий и ствола головного мозга крыс, подвергнутых 24-часовому лишению ПФС. Было показано [14] (рис. 2, а), что снижение концентрации Na^+ в среде инкубации синаптосом больших полушарий со 124 до 7,5 мМ лишь незначительно снижало их дыхание (на глутамине). При добавлении в такую среду 0,15 мМ Ca^{2+} торможение дыхания становилось достоверным. Если же синаптосомы были выделены из гомогената больших полушарий после 24-часового лишения ПФС, то уже сама пониженная концентрация Na^+ вызывала падение дыхания, но при этом без дополнительного его уменьшения при добавлении Ca^{2+} . Это явление оказалось еще более выраженным при исследовании дыхания синаптосом стволовой части головного мозга (рис. 2, б).

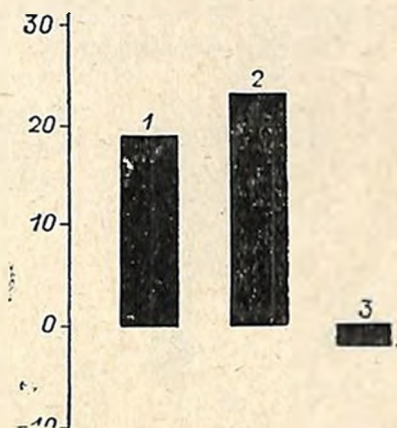


Рис. 1. Содержание SH-групп в субцеллюлярных фракциях гомогената ствола головного мозга крыс после 24-часового лишения парадоксальной фазы сна (ПФС): 1—синаптическая фракция, 2—ядерная, 3—митохондрии. По оси ординат—отклонения от величины при бодрствовании в %

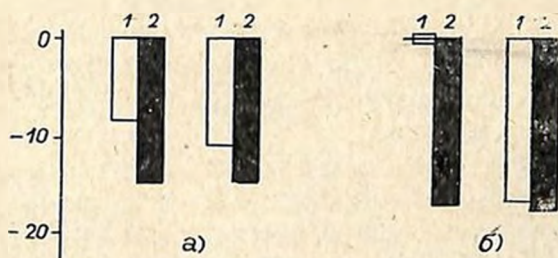


Рис. 2. Потребление O_2 синаптосомами, полученными из гомогенатов больших полушарий (а) и ствола (б) головного мозга крыс после 24-часового лишения ПФС: 1—после 30-минутной инкубации в среде с 7,5 мМ Na^+ , 2—то же с 7,5 мМ Na^+ и 0,15 мМ Ca^{2+} ; белые столбики—синаптосомы бодрствовавших животных, черные—синаптосомы животных, лишенных ПФС. По оси ординат—отклонения от величины при бодрствовании в %

Далее Ниловой [17] был выявлен эффект лишения ПФС также и на дыхание синаптосом при деполяризации мембран под влиянием вы-

сокого содержания K^+ в инкубационной среде. Так, потребление O_2 синапсосомами бодрствовавших крыс повышалось в среде с увеличенным содержанием K^+ , а добавление Ca^{2+} снимало этот эффект. В случае же синапсосом крыс, подвергнутых 24-часовому лишению ПФС, повышение содержания K^+ вызывало гораздо меньшее действие на дыхание, а добавление Ca^{2+} оказывалось неэффективным.

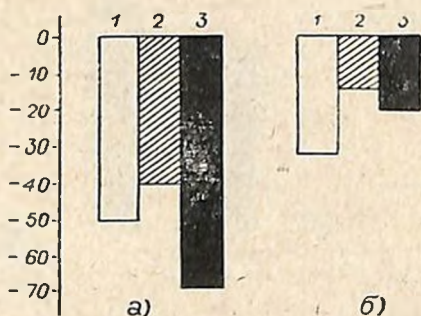


Рис. 3. Связывание рутениевого красного синапсосомами, полученными из коры больших полушарий (а) и ствола (б) головного мозга крыс после 24-часового лишения ПФС, по количеству связанного красителя в Мг белка: 1—после 1-часовой инкубации с красителем синапсосом крыс, лишенных ПФС, 2—после инкубации с красителем и 0,5 мМ Ca^{2+} синапсосом бодрствовавших животных, 3—после инкубации с красителем и 0,5 мМ Ca^{2+} синапсосом крыс, лишенных ПФС. По оси ординат отклонения от величины при бодрствовании в %

При этом эффект лишения ПФС оказался близким к действию Ca^{2+} ; возможно, что в основе влияния нарушения сна в этом отношении лежит и избыточное выделение Ca^{2+} в синапсах в таких условиях.

Наше внимание привлекали и такие клеточные мембранные структуры нервной ткани, как лизосомы. Объектом исследований Нечаевой и Шелепной [13] послужили обогащенные лизосомные фракции, которые выделяли из гомогенатов коры больших полушарий и из ствола головного мозга крыс после 6-, 24-, 48- или 96-часового лишения ПФС, а также полной бессонницы. При сравнении с препаратами, полученными у контрольных животных, был изучен спонтанный и стимулированный гистонами (фракция f_{21} из зубной железы телят) выход из лизосомной кислоты РНКазы и катепсина D при 30-минутной инкубации при 23° (в 0,25 М сахарозе с 0,01 М трис-буфером, pH 7,4). Активность кислотной РНКазы определяли на препаратах полимерной РНК, полученных из коммерческой дрожжевой РНК, с ацетатным буфером, pH 5,8. Актив-

Лишение ПФС приводило и к изменениям тинкториальных свойств синапсосомных мембран. Как было показано [15], синапсосомы больших полушарий и стволовой части головного мозга крыс, лишенных ПФС в течение 24 ч, связывали меньше основного красителя—рутениевого красного, чем синапсосомы бодрствовавших животных (рис. 3). Так, в синапсосомах больших полушарий число мест связывания красителя понижалось на 51%, а в выделенных из ствола—на 31%; в то же время это имело место на фоне увеличения сродства к красителю. Снижение связывания рутениевого красного синапсосомами вызывало также и добавление Ca^{2+} ; в случае же крыс, лишенных ПФС, эффект Ca^{2+} был ниже.

Можно заключить, что нарушение сна способно вызывать изменения синапсосомных мембран с нарушением их нормальной проницаемости.

ность катепсина D находили при pH 3,8 с денатурированным 1%-ным гемоглобином.

Полученные данные показали, что спонтанное высвобождение гидролаз из лизосом в течение 30-минутной инкубации обогащенной этими субцеллюлярными частицами фракции составляло в среднем около 5% от общей активности этих ферментов в гомогенатах как больших полушарий, так и стволовой части головного мозга крыс, находившихся в состоянии бодрствования. Не было существенных отклонений от этих контрольных данных и в случае инкубации препаратов, полученных из ствола головного мозга животных, которые были лишены ПФС до 96 ч; не было сдвигов и в размере выхода катепсина D в тех же условиях из препаратов больших полушарий и ствола.

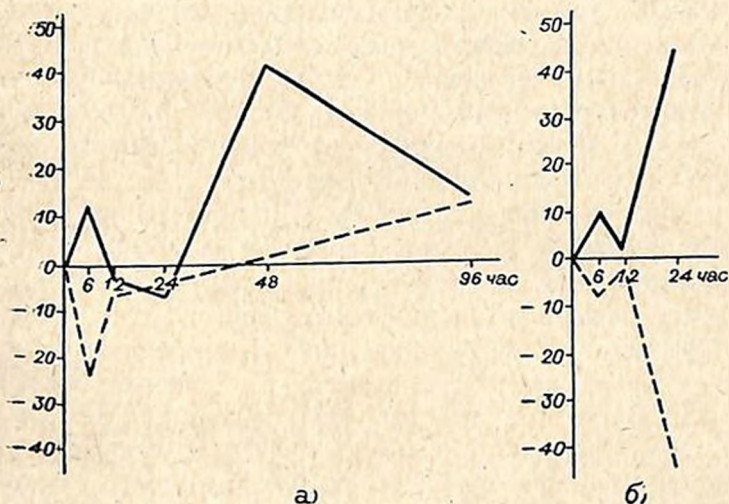


Рис. 4. Выход кислой РНКазы из лизосом проб, полученных из коры больших полушарий крыс при нарушениях сна: а—при лишении ПФС, б—при полной бессоннице; сплошная линия—спонтанный выход фермента, пунктирная—выход фермента при добавлении гистона. По оси абсцисс—время в ч; по оси ординат—отклонения от величины при бодрствовании в %

Другие данные были получены при изучении спонтанного выхода кислой РНКазы из лизосом клеток больших полушарий в те же сроки лишения ПФС. На рис. 4, а видно, что динамика высвобождения этого фермента имела фазный характер: выход его из лизосом после 6-часового лишения ПФС и весьма резко после 48-часового значительно превышал контрольные данные. В случае полного лишения сна (рис. 4, б) выраженный пик выхода кислой РНКазы был отмечен через 24 ч лишения сна.

Ранее было установлено [18], что добавление гистона i_{2a} примерно в 3 раза повышает выход кислой РНКазы из лизосом. В то же время на рис. 3, а видно, что в пробах после 6-часового лишения ПФС стимулируемый гистонами выход фермента оказался ниже, чем в про-

бах, полученных у бодрствовавших крыс. Такую реципрокность с картиной спонтанного выхода кислой РНКазы наблюдали в более выраженной степени в препаратах больших полушарий крыс, испытавших полную бессонницу (рис. 3, б): увеличение спонтанного выхода фермента на 45% по сравнению с контролем при падении стимулируемого гистонном выхода на 49%.

Можно заключить, что нарушения сна могут приводить в головном мозгу к избирательным изменениям свойств и таких мембранных структур, как лизосомы, причем лишь в определенных отделах мозга.

Итак, нарушения сна (лишение ПФС, полная бессонница) могут приводить к сдвигам денатурационного характера содержания SH-групп в нерастворимых (мембранных) ядерных и синапсомных белках, изменениям проницаемости синапсомных мембран со сдвигами их реакции на Ca^{2+} , — уменьшению сорбции красителя этими мембранами и фазным сдвигам свойств лизосомных мембран. При этом обращает на себя внимание и специфичность этих явлений лишь для определенных отделов головного мозга. В общем можно высказать рабочую гипотезу о том, что разнообразные сдвиги свойств именно мембранных структур ряда отделов головного мозга, постепенно накапливающиеся при бодрствовании, могут быть одним из важнейших компонентов того комплекса факторов, который и вызывает метаболическую необходимость периодического сна высших позвоночных животных и человека — активного состояния головного мозга на фоне выраженной деафферентации [8, 9]. Эти сдвиги и должны закономерно устраняться в течение различных фаз сна; в противном же случае развиваются более или менее тяжелые невропатологические последствия бессонницы. Определенные формы покоя (П-1 и П-2) низших позвоночных — обездвиживания, отличные от полноценного сна высших (с его МФС и ПФС), эволюционно выработались в основном, видимо, по экологическим причинам [19] и не сопровождаются определенными анаболическими процессами, характерными для настоящего сна [20].

Можно предположить, что альтерационно-денатурационные изменения белков мембран нервной ткани вместе с повышением активности пептидгидролаз (при усилении катаболизма белков) [8] приводят к появлению каких-то свободных пептидов, служащих непосредственными триггерами включения нейрохимических основ динамики поведенческий пептид Моннье, хотя сам по себе он является дельта-гипокинетическим пептидом МФС, не сопровождающийся анаболическими процессами, и препятствует развитию ПФС [21]. Поиски других гипотетических пептидов, несомненно, перспективны.

BIOCHEMICAL CHANGES IN MEMBRANE STRUCTURE OF RAT NERVOUS TISSUE UNDER SLEEP DEPRIVATION (ON NEUROCHEMICAL CAUSES OF SLEEP NECESSITY IN HIGHER VERTEBRATES)

DOEMIN N. N.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

„Free“ (exposed) SH-group content, respiration of synaptosomes upon incubation in media with various ion composition, the ruthenium red binding to synaptosomes and release of acid RNA-ase and cathepsin D from lysosomes have been studied in brain various parts and subcellular fractions of rat subjected to sleep disturbances.

Data obtained point to the conclusion, that gradually developing during waking state biochemical alteration of brain various parts membranes (in particular, changes of some membrane proteins stability against denaturation) may serve as one of the main neurochemical causes of periodically arising sleep necessity in higher vertebrates.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Jouvot M. *Physiol. Rev.*, 47, 117—177, 1967.
2. Вейн А. М. Бодрствование и сон, М., Наука, 126 с., 1970.
3. Moruzzi G. *Erg. d. Physiol.*, 64, 1—165, 1972.
4. Jouvot M. *Erg. d. Physiol.*, 64, 166—307, 1972.
5. Koella W. P. *Die Physiologie des Schlafes*, Stuttgart, 202 s, 1973.
6. Giuditta A.—In: *Biochemical correlates of brain structure and function* (ed A. N. Davison), L., 293—337, 1977.
7. Karnovsky M. L., Reich P.—In: *Adv. in Neurochemistry* (eds. B. W. Agranoff, M. H. Aprison) 2, N. Y., 213—275, 1977.
8. Демин Н. Н., Коган А. Б., Мусеева Н. Н. *Нейрофизиология и нейрохимия сна*, Л., Наука, 189 с., 1978.
9. Демин Н. Н.—В кн.: *Цитохимические корреляты торможения нейронов* (под ред. Л. З. Певзнера), Л., Наука, с. 18—39, 1978.
10. Jouvot D., Vimont P., Delorme F., Jouvot M., *C. R. Soc. Biol.*, 158, 4, 756—759, 1964.
11. Демин Н. Н.—В сб.: *Вопросы биохимии нервн. и мышечн. систем* (под ред. В. Н. Чиквандзе), Тбилиси, 3, с. 155—160, 1979.
12. Демин Н. Н., Рашевская Д. А. *Физиол. ж. СССР*, 65, 23—28, 1979.
13. Демин Н. Н., Нечаева Г. А., Шелепина Е. П. *Физиол. ж. СССР*, 63, 1073—1078, 1977.
14. Нилова Н. С. *Физиол. ж. СССР*, 65, 352—356, 1979.
15. Нилова Н. С. *Цитология*, 22, 1081—1084, 1980.
16. Рашевская Д. А. *Физиол. ж. СССР*, 66, 313—317, 1980.
17. Нилова Н. С. *Физиол. ж. СССР*, 67, 1324—1328, 1981.
18. Нечаева Г. А., Демин Н. Н., Ашмарин П. П. *ДАН СССР*, 202, 232—235, 1972.
19. Карманова Н. Г. *Эволюция сна*, Л., Наука, 174 с., 1977.
20. Демин Н. Н., Карманова Н. Г.—В кн.: *Сон как фактор регуляции функционального состояния организма*, Каунас, 1982.
21. Демин Н. Н., Карманова Н. Г., Максимук В. Ф., Рубинская Н. Л. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, 16, 257—260, 1980.

Институт физиологии
им. Павлова АН СССР, Ленинград

Поступила 16. XI 1981

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЗРИТЕЛЬНОГО ГАНГЛИЯ ТИХООКЕАНСКОГО КАЛЬМАРА С НЕКОТОРЫМИ АММОНИЕВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

БРЕСТКИН А. П., ВИНЯР Т. Н., РОЗЕНГАРТ Е. В

Субстратная специфичность холинэстеразы зрительного ганглия тихоокеанского кальмара *Todorodes pacificus* по отношению к ряду тиохолиновых эфиров характеризовалась следующими величинами скорости гидролиза ($v_{0.05}$): ацетилтихохолин и пропионилтихохолин—100, бутирилтихохолин—50, ацетил- β -метилтихохолин—170, при близких значениях константы Михаэлиса. Впервые подробно изученное взаимодействие холинэстеразы кальмара с обратимыми аммониевыми ингибиторами показало более низкую чувствительность этого фермента по сравнению с холинэстеразами млекопитающих и лягушки. В ряду амидных производных ацетилхолина (соединения VII—IX), различающихся конфигурацией основного фрагмента структуры молекулы $N-C-C-N^+$ (транс-гош-переход), наиболее активным оказался ингибитор с транс-конформацией (соединение VIII). Эффективность группы дийодметилатов кальмара в отличие от ферментов млекопитающих и лягушки практически не зависела от структуры ацильного радикала.

Холинэстераза нервной ткани играет чрезвычайно важную роль в процессе передачи нервного импульса. Предполагалось, что свойства этого фермента, часто называемого истинной холинэстеразой, должны быть одинаковыми у разных животных. В действительности же этого не наблюдается. Многочисленные исследования убедительно показали, что свойства холинэстераз нервной ткани разных животных существенно различаются [1]. Как и следовало ожидать, кальмары не составили исключения. Локализованные в зрительных ганглиях холинэстеразы нервной системы этих моллюсков различаются как по своей [2—4], так и по чувствительности к фосфорорганическим ингибиторам [3, 4]. Одной из важных особенностей холинэстераз является снижение их каталитической активности под действием аммониевых соединений, которые являются весьма эффективными обратимыми ингибиторами этих ферментов [5]. Однако действие широкого ряда аммониевых соединений на холинэстеразы кальмаров практически не исследовано. Это побудило нас изучить взаимодействие с различными по структуре аммониевыми эффекторами холинэстеразы зрительного ганглия тихоокеанского кальмара *Todorodes pacificus* (старое название *Ommatostrephes sloani-pacificus*). Для этого фермента ранее была исследована субстратная специфичность по отношению к ряду холиновых эфи-

ров и чувствительность к некоторым фосфорорганическим ингибиторам [6—10], а также изучено торможение ферментативного гидролиза ацетилхолина под действием холина и тетраалкиламмониев [11].

Материалы и методы

Ткань зрительных ганглиев 20 особей тихоокеанского кальмара *Todorodes pacificus*, выловленных в августе-сентябре 1980 г. в заливе Петра Великого, хранили в испарителе бытового холодильника. В опытах использовали центрифугат (15 мин при 5000 об/мин) водного гомогената (3 мг/мл).

Субстраты—коммерческие препараты йодидов ацетилтихолина, пропионилтихолина, бутирилтихолина и ацетил- β -метилтихолина («Chemapol», ЧССР).

Ингибиторы—коммерческие препараты йодидов тетраметиламмония и тетраэтиламмония («Chemapol», ЧССР); амидные производные ацетилхолина (соед. VII—X) синтезированы в лаборатории чл.-кор. АМН СССР Н. В. Хромова-Борисова [12]; анабазиновые производные (соед. XI—XV) синтезированы Ю. Р. Хакимовым в Институте биоорганической химии АН УзССР [13].

Активность холинэстеразы определяли методом Ellman [14]. Реакционная смесь объемом 2,0 мл содержала $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор 5,5'-дитиобис- (2-нитробензойной кислоты) («Koch-Light Lab.», Англия) в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,5, а также растворы субстрата, ингибитора и ферментного препарата. Величину экстинкции определяли в кювете фотоэлектроколориметра ФЭКН-57 в зоне 410 нм при 25°. Измерение количества подвергнутого гидролизу субстрата проводили по калибровочной кривой.

Кинетические параметры гидролиза субстратов (максимальную скорость реакции— V ; константу Михаэлиса— K_m) определяли графическим и аналитическим методами [15]. Эффективность обратимых ингибиторов оценивали по величине обобщенной ингибиторной константы $\bar{K}_i$ [16]. При конкурентном типе торможения $\bar{K}_i = K_i$, при смешанном— $1/\bar{K}_i = 1/K_i + 1/K'_i$, где K_i и K'_i —ингибиторные константы конкурентного и неконкурентного типов торможений.

Результаты и обсуждение

Выше отмечалось, что субстратная специфичность холинэстеразы тихоокеанского кальмара была изучена только с помощью кислородных холиновых эфиров [6—8]. Эти данные достаточно противоречивы (табл. 1). Не ясно, как менялась скорость гидролиза субстратов с удлинением ацильного радикала. По данным Т. М. Турнаева и соавт. [6] и Г. М. Григорьевой [7] скорость гидролиза ацетил- β -метилхолина (соед. IV, X=O) была несколько ниже, чем ацетилхолина (соед. I, X=O).

В табл. 1 приведены наши данные для ряда тхохолиновых субстра-

тов. Ацетилхолин (соед. I) и пропионилтихолин (соед. II) гидролизировались с одинаковой скоростью, бутирилтихолин (соед. III) — в 2 раза медленнее, а ацетил-β-метилтихолин (соед. IV) — в 1,7 раза быстрее. Величины K_m для этих субстратов различались незначительно. Своей столь необычной субстратной специфичностью (высокая скорость гидролиза ацетил-β-метилтихолина) фермент кальмара напоминал холинэстеразу пчел [1].

Таблица 1

Субстратная специфичность холинэстеразы зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара

№ соед.	Формула	X = S			X = O	
		V , моль/сек/мл	K_m , M	$V_{отн}$	$V_{отн}$	
					[7]	[8]
I	$CH_3C(O)-X-C_2H_4 \overset{+}{N}(CH_3)_3$	$2,2 \cdot 10^{-8}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	100	100	100
II	$C_2H_5C(O)-X-C_2H_4 \overset{+}{N}(CH_3)_3$	$2,1 \cdot 10^{-8}$	$6,4 \cdot 10^{-5}$	100	—	80
III	$C_3H_7C(O)-X-C_2H_4 \overset{+}{N}(CH_3)_3$	$1,1 \cdot 10^{-8}$	$8,2 \cdot 10^{-5}$	50	100	65
IV	$CH_3C(O)-X-\underset{\text{CH}_3}{\text{CHCH}_2} \overset{+}{N}(CH_3)_3$	$3,8 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	170	80	—

Примечание. V — максимальная скорость реакции, K_m — константа Михаэлиса; pH 7,5; 25°

Сравнительный анализ скоростей гидролиза холиновых и тхолиновых эфиров свидетельствует о том, что на каталитической поверхности фермента тихоокеанского кальмара нет столь строгой ограниченности эстеразного центра, как у ацетилхолинэстеразы, и, видимо, отсутствует гидрофобная область в районе эстеразного центра, как у бутирилхолинэстеразы [15].

Изученные обратимые ингибиторы в большинстве своем являются сложными эфирами или амидами карбоновых кислот и содержат в своей молекуле одну или две аммониевые группировки. Неспособность этих соединений подвергаться ферментативному гидролизу была показана в опытах с концентрацией фермента, в 10 раз превышающей ту, при которой измерялась скорость гидролиза ацетилтихолина [16]. Независимость степени торможения холинэстеразной активности от времени инкубации ингибитора свидетельствовала об обратимом характере торможения. Это дало право изучать соед. V—XV в качестве обратимых ингибиторов холинэстеразного гидролиза ацетилтихолина.

В табл. 2 приведены данные для двух классических обратимых ингибиторов холинэстераз — тетраметиламмония (соед. V) и тетраэтиламмония (соед. VI). Оба иона тормозили активность фермента кальмара

Таблица 2

Антихолинэстеразная эффективность ионов тетраалкиламмония
и амидных производных ацетилхолина

№ соед.	Формула	Холинэстераза кальмара				Ацетилхолинэсте- раза		Бутирилхолин- эстераза		Холинэстераза лягушки	
		тип тор- можения	K_i , М	K'_i , М	$p\bar{K}_i$	тип тор- можения	$p\bar{K}_i$	тип тор- можения	$p\bar{K}_i$	тип тор- можения	$p\bar{K}_i$
V	$(CH_3)_4N^+$	К	$5,8 \cdot 10^{-3}$	—	2,25	С	3,50	К	2,45	К	3,05
VI	$(C_2H_5)_4N^+$	К	$2,5 \cdot 10^{-3}$	—	2,59	С	3,40	К	2,72	К	3,00
VII	$CH_3C(O)NHCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$	К	$2,9 \cdot 10^{-3}$	—	2,54	К	2,86	К	3,08	К	2,90
VIII	$CH_3C(O)NCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$	С	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	3,05	К	3,18	К	3,23	С	3,15
IX	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3\text{C(O)N} \quad \text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array} $	С	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-2}$	1,85	К	2,53	К	2,52	К	2,48
X	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3\text{C(O)N} \quad \text{NCH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array} $	С	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	2,15	С	2,39	К	2,56	К	2,48

Примечание. Тип торможения — конкурентный (К); смешанный (С)

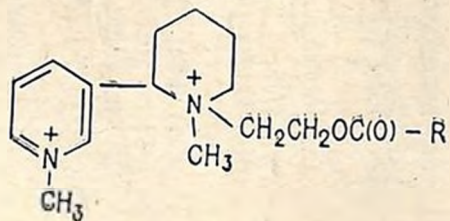
по конкурентному типу, причем соед. VI было несколько более эффективным. Сравнение с литературными данными затруднено, так как соед. V и VI были изучены как ингибиторы гидролиза ацетилхолина с использованием потенциометрического метода [11], а в нашем случае субстратом был ацетилтихолин и применен метод Ellman, т. е. реакцию проводили при более высокой ионной силе и в присутствии 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты). Чувствительность холинэстеразы кальмара к этим ингибиторам была ниже, чем у изученных нами ранее ацетилхолинэстеразы эритроцитов крови человека, бутирихолинэстеразы сыворотки крови лошади и холинэстеразы мозга лягушки [16]. Так, соед. V тормозило фермент кальмара в 20 раз слабее, чем ацетилхолинэстеразу, и в 6 раз слабее, чем холинэстеразу лягушки.

Основная группа соединений, приведенных в табл. 2, включала амидный аналог ацетилхолина (соед. VII), его N-метильное производное (соед. VIII) и пиперазиновые производные (соед. IX и X). Ранее методом теоретического конформационного анализа для основного фрагмента структуры молекул этой группы соединений N-C-C-N было показано, что значительная часть энергетически разрешенных конформеров соед. VII находится в транс-конфигурации [12]. Еще в большей степени транс-конфигурация характерна для N-метильного производного (соед. VIII), в то время как циклическое соед. IX существует исключительно в гош-конформации. Эти конфигурационные различия чрезвычайно существенны при проявлении холинотетической активности: гош-конформер (соед. IX) оказался на 2 порядка активнее своих транс-аналогов [12]. В случае холинэстераз млекопитающих и лягушки, наоборот, несколько более активным было соед. VIII с транс-конфигурацией [16, 17]. Из табл. 2 видно, что и в случае холинэстеразы кальмара более эффективным было соед. VIII, причем здесь преимущество перед гош-конформером (соед. IX) было 15-кратным. При этом и чувствительность фермента кальмара к соед. VII—X была самой низкой. Предположительно сорбцию этих соединений на активной поверхности холинэстеразы кальмара можно оценить при сопоставлении ингибиторным представлением конкурентный характер торможения обусловленный сорбцией на активном центре фермента [15]. По эффективности амидные аналоги ацетилхолина не превосходили тетраалкиламмонийные иониевой группировкой и анионным центром фермента основной составляющей процесса сорбции этих ингибиторов. Можно предположить, что преимущество более растянутой транс-конформации (соед. VII и VIII) перед компактной гош-конформацией обусловлено дополнительным гидрофобным взаимодействием с каталитической поверхностью фермента.

В табл. 3 представлен гомологический ряд дийодметилатов N-апилокситилапибазина (соед. XI—XV). Их эффективность практически не зависела от структуры ацильного радикала. Аналогичная кар-

Антихолинэстеразная эффективность анабазиновых производных

Таблица 3



№ соед.	R	Холинэстераза кальмара				Ацетилхолинэстераза		Бутирилхолинэстераза		Холинэстераза лягушки	
		тип тормо- жения	K_i , М	K'_i , М	pK_i	тип тормо- жения	pK_i	тип тормо- жения	pK_i	тип тормо- жения	pK_i
XI	CH_3	С	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-4}$	3,84	С	4,46	С	4,32	С	4,20
XII	C_2H_5	С	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	3,67	К	5,26	С	4,88	С	4,11
XIII	C_3H_7	С	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	4,02	К	4,23	К	4,28	К	4,16
XIV	C_4H_9	К	$3,3 \cdot 10^{-4}$	—	3,48	С	4,23	К	5,48	К	3,75
XV	$CH(CH_3)_2$	К	$1,4 \cdot 10^{-4}$	—	3,87	К	4,41	С	4,95	С	3,93

Примечание. Тип торможения—конкурентный (К), смешанный (С)

тина наблюдалась для холинэстеразы лягушки [16]. И в случае этой группы соединений чувствительность холинэстеразы кальмара была наименьшей. Так, пропионат (соед. XII) оказался в 40 раз более сильным ингибитором ацетилхолинэстеразы, а валерат (соед. XIV)—в 100 раз более сильным ингибитором бутирилхолинэстеразы.

Обнаруженный факт низкой чувствительности холинэстеразы тихоокеанского кальмара к аммониевым обратимым ингибиторам является в достаточной степени неожиданным. Как по способности катализировать гидролиз холинных эфиров, так и по скорости взаимодействия с катионсодержащими фосфорорганическими соединениями фермент кальмара занимал промежуточное положение между ацетилхолинэстеразой и бутирилхолинэстеразой [5—7]. Видимо, особенности структуры каталитической поверхности холинэстеразы кальмара создают стерические препятствия сорбции обратимых аммониевых ингибиторов.

INTERACTION OF OPTICAL GANGLIA CHOLINESTERASE OF PACIFIC SQUID WITH SOME AMMONIUM COMPOUNDS

BRESTKIN A. P., VINJAR T. N., ROZENGART E. V.

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The relative rates of hydrolysis of some thiocholine esters in the presence of cholinesterase of squid, *Todarodes pacificus* were as follows: acetylthiocholine and propionylthiocholine—100, butyrylthiocholine—50, acetyl- β -methylthiocholine—170.

The values of K_m were approximately the same. Studied for the first time interaction of squid cholinesterase with a large number of reversible ammonium inhibitors compounds has revealed low inhibitor compared with mammalian and frog cholinesterases, which were studied earlier.

In the series of amide derivatives of acetylcholine (compounds VII—IX) differing in conformation of the main fragment of the molecule $N-C-C-N^+$ (trans-gosh transition), the inhibitor with trans conformation (compound VIII) proved to be the most potent one. The structure of acyl radical of diiodinemethylate derivatives of N-acyloxyethyl-anabasine (compounds XI—XV) doesn't virtually affect the inhibitory power of these substances towards squid acetylcholinesterase in contrast with mammalian and frog enzymes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brestkin A. P., Brick I. L., Grigor'eva G. M. In: Intern. Encyclopedia Pharmacol. Ther., sec. 85, v. 1, Pergamon Press. Oxford—N. Y., p. 241—344, 1973.
2. Бресткин А. П., Одоева Г. А., Шевцов Г. А., Эпштейн Л. М. Тез. докл. совещ. «Биол. ресурсы морей Дальнего Востока СССР», Владивосток, 95 с., 1975.
3. Шевцова С. П., Бресткин А. П., Несис К. Н., Розенгарт Е. В. Океанология, 19, 481—486, 1979.

4. Григорьева Г. М., Конищева Н. В.—В кн.: Физиология и биохимия морских и пресноводных животных (под ред. Е. М. Крепса), Л., Наука, с. 194—204, 1979.
5. Long I. P. In: *Heifter Handbuch d. exp. Pharmacol*, Berlin, *Ergänzungwerk*, Bd. 15, 374—427, 1963.
6. Турпаев Т. М., Абашкина Л. М., Бресткин А. П., Григорьева Г. М., Розенгарт В. Н., Розенгарт Е. В., Сахаров Д. А.—В кн.: Физиология и биохимия беспозвоночных (под ред. Е. М. Крепса), Л., Наука, с. 121—130, 1968.
7. Григорьева Г. М.—В кн.: Ферменты в эволюции животных (под ред. Е. М. Крепса), Л., Наука, с. 177—183, 1969.
8. Боголюбова Г. М., Карпинская Е. В., Куликова А. И., Розенгарт В. Н. Биохимия, 37, 826—833, 1972.
9. Розенгарт Е. В.—В сб.: Реакц. способн. орг. соед, IV, 4 (14), 554—562, 1967.
10. Розенгарт Е. В.—В сб.: Реакц. способн. орг. соед. V, 1, 227—234, 1968.
11. Куприянов В. А., Куликова А. И., Розенгарт В. Н. Биохимия, 38, 6, 1261—1263, 1973.
12. Хромов-Борисов Н. В., Данилов А. Ф., Бровцына Н. Б., Александрова Л. Н., Инденбом М. Л. ДАН СССР, 230, 1250—1253, 1976.
13. Хакимов Ю. Р., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А., Садыков А. А., Асланов Х. А. ДАН УзССР, 1, 45—47, 1978.
14. Ellman G. H., Countney R. D., Anders V., Feather K. M. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 2, 88—95, 1961.
15. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Фан, Ташкент, 1976.
16. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В. Биохимия, 46, 1042—1048, 1981.
17. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Данилов А. Ф., Розенгарт Е. В., Тез. докл. III Всесоюзн. конф. «Физиология и биохимия медиаторных процессов», М., с. 32, 1980.

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

Поступила 5. X 1981

УДК 591.553

ОБ УЧАСТИИ ТРИПТИЧЕСКИХ КАРДИОАКТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ГИПОТАЛАМУСА В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФОСФОРИЛАЗЫ И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА

СРАПИОНЫАН Р. М., СААКЯН С. А., АБЕЛЯН Ж. Г., ГАЛОЯН А. А.

Изучено влияние кардиоактивных триптических фрагментов специфических белков гипоталамуса—носителей кардиотропных нейрогормонов «К», «С», «Г» на активность фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического 3', 5' — аденозинмонофосфата, фосфорилазы и на содержание гликогена в тканях белых крыс. Наибольшей ингибирующей способностью в отношении ФДЭ обладает триптический фрагмент белка-носителя нейрогормона «С» (ТФБНС).

Внутривенная инъекция этого фрагмента через 30 мин приводит также к увеличению активности фосфорилазы во всех исследуемых органах.

Однако в сердце происходит более значительное по сравнению с другими органами увеличение активности фермента. Интенсивное увеличение активности фосфорилазы сопровождается заметным уменьшением содержания гликогена. Отмеченные различия между действием триптических фрагментов на активность фосфорилазы, по-видимому, можно объяснить их структурными особенностями.

Изучение метаболических сдвигов в различных тканях под действием нейрогормона, выделенного из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса и условно названного нейрогормоном «С», позволило выяснить его участие в регуляции гликолитических процессов, особенно в сердечной мышце [1—3]. Эти сдвиги обусловлены участием нейрогормона «С» в регуляции уровня циклических нуклеотидов посредством ингибирования фосфодиэстеразы сАМР [4], что характерно для многих других сосудорасширяющих, психотропных и других соединений, таких, как папаверин, карбохромен, метилксантины и т. д. При этом он не влияет на активность аденилатциклазы (АЦ) в отличие от тиреолиберина, люлиберина, соматостатина, вазопрессина, аденогипофизарных гормонов и некоторых других биологически активных соединений, действие которых связано, главным образом, с активацией АЦ, способствующей накоплению внутриклеточного сАМР. Ингибирующее действие нейрогормона «С» на ФДЭ позволяет предположить участие системы циклических нуклеотидов в реализации органотропного эффекта нейрогормона «С» [5].

Ранее нами было обнаружено наличие в гипоталамусе крупного рогатого скота специфического белка-носителя нейрогормона «С» [6].

Наряду с коронарорасширяющим свойством белок-гормональный комплекс обладал также способностью ингибировать активность ФДЭ сАМР. Последующими исследованиями было показано, что в результате диссоциации этого комплекса белок лишается характерной биологической активности, не восстанавливающейся при воздействии различных денатурирующих агентов.

После трипсинолиза, однако, нам удалось выявить кардиоактивный фрагмент, сходный по многим физико-химическим и биохимическим свойствам, в том числе и способности ингибировать активность ФДЭ с нейрогормоном «С», выделенным из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса. Как показали результаты масс-спектрального анализа, это начало является структурно близким нейрогормону «С» соединением [7].

Это побудило нас изучить в сравнительном аспекте действие кардиоактивного ТфБНС на гликогенолиз и на ФДЭ в мозгу. В настоящей работе мы исследовали, кроме указанного фрагмента, влияние на активность фосфорилазы и фосфодиэстеразы двух других кардиоактивных фрагментов, полученных аналогичным способом из состава белка-носителя нейрогормона «К» (ТфБНК) и белка-носителя нейрогормона «Г» (ТфБНГ).

Материалы и методы

Активность ФДЭ гомогената мозга крыс определяли по количеству гидролизованного субстрата при его инкубации с ферментом по методу Pösch [8], модифицированного применением микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на пластинках «силуфол UV-254» [9].

В качестве источника ФДЭ использовали супернатант гомогената (2000 g, 20 мин) мозга крыс. Инкубацию проводили при 37° в течение 20 мин в реакционной смеси (10 мкл), содержащей трис-НСl буфер, pH 7,5—100 мМ, $MgCl_2$ —3 мМ; сАМР—50 мкМ, 3H -сАМР—0,2 мкКл, 5'АМР—1,5 мМ; исследуемые образцы ТфБНС и ТфБНГ—2 мкл или бидистиллат в контрольных пробах, супернатант мозга, содержащий 1—2 мкг белка. Дозировка была установлена эмпирически в соответствии с данными, полученными ранее [10]. После остановки реакции в кипящей водяной бане пробы центрифугировали (3000 g, 15 мин), супернатант подвергали тонкослойной хроматографии на пластинках «силуфол UV-254» в системе: n-бутанол—ацетон—водный аммиак (8:2:1). Далее производили счет радиоактивности продуктов гидролиза сАМР, идентифицированных на жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре SH-30 (Франция).

В опытах по определению активности фосфорилазы использовали самцов белых крыс линии Вистар массой 150—180 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Водные растворы препаратов кардиоактивных триптических фрагментов вводили животным в яремную вену в ко-

личестве 0,1 мл на животное, что соответствовало 36 мЕ для ТфБНС и ТфБНГ (за единицу активности принимали такое количество препарата, которое ингибировало 1мЕ ФДЭ сАМР гомогената мозга крысы за 1 мин).

Через 30 мин животных декапитировали, ткани быстро промывали дистиллированной водой на холоду и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в пятикратном объеме ТЭМ-буфера (0,04М трис—0,002М ЭДТА—0,01М меркаптоэтанол), pH 6,8. Активность фосфорилазы (КФ 2.4.1.1.) определяли по Hingworth [11]. При определении фосфорилазной активности гомогенат ткани (0,1 мл) вначале пренукубировали 2 мин при 30° с 0,1 мл 4% водного раствора гликогена и 0,1 мл ТЭМ-буфера, затем добавляли 0,1 мл 4мМ раствора 5'-АМР на 64 мМ глюкозо-1-фосфате. Через 5 мин реакцию останавливали добавлением 1,6 мл охлажденной 5% ТХУ. Количество неорганического фосфата определяли по методу Tayssky [12]. Содержание гликогена в гомогенатах тканей определяли методом Morris [13] через 30 мин после введения исследуемых веществ.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований свидетельствовали о том, что наибольшим ингибирующим эффектом в отношении ФДЭ обладал ТфБНС, степень ингибирования которого составляла 40,4%.

ТфБНГ также выявлял значительное ингибирующее действие (на 38%). Исходя из этих данных, логично было ожидать изменение активности фосфорилазы под действием этих же соединений.

Результаты изменения фосфорилазной активности под действием исследуемых препаратов ТфБНС сведены в табл. 1.

Влияние ТфБНС на фосфорилазную активность тканей
($\mu\text{кА Р}_i$ мин/г свежей ткани при 30°)

Таблица 1

Исследуемая ткань	Контроль	Опыт
Мозг	$4,85 \pm 1,7$	$7,1 \pm 1,8$ $p < 0,05$
Сердце	$4,8 \pm 2,0$	$12,9 \pm 2,4$ $0,02 < p < 0,05$
Печень	$2,6 \pm 1,2$	$3,9 \pm 1,4$ $p < 0,02$
Скелетная мышца	$5,9 \pm 3,2$	$14,2 \pm 4,3$ $p < 0,001$
Почки	$2,5 \pm 1,4$	$4,2 \pm 2,05$ $p > 0,05$

Примечание. Данные 12 опытов.

Как видно, внутривенная инъекция ТфБНС через 30 мин приводила к увеличению активности во всех исследуемых органах. Однако в сердечной и скелетной мышцах происходило значительное по сравнению с другими органами увеличение на 170 и 140% соответственно. В

этих же условиях отмечалось повышение активности фосфорилазы мозга, печени и почек лишь на 46, 50 и 68% соответственно.

Предыдущие работы показали аналогичное действие препарата нейrogормона «С», выделенного из состава низкомолекулярных соединений [2]. Полученные данные в экспериментах *in vivo* коррелируют с результатами экспериментов *in vitro* относительно влияния нейrogормона «С» на активность фосфорилазы, выделенной из скелетных мышц кроликов [14]. В этом случае было отмечено увеличение активности фермента с $6,2 \pm 0,1$ до $8,5 \pm 0,3$, т. е. на 38%. При этом авторами было отмечено активирующее действие нейrogормона «С» только в присутствии АМР.

Интенсивное увеличение активности фосфорилазы в сердечной мышце может свидетельствовать об усилении гликогенолиза в исследуемых органах. Подтверждением этого предположения наряду с ранее полученными результатами послужили данные по изменению содержания гликогена в сердце (табл. 2).

Таблица 2

Влияние ТфБНС на содержание гликогена (мг%) в тканях белых крыс

Исследуемая ткань	Контроль	Опыт
Сердце	$211 \pm 9,4$	$156 \pm 28,4$ $p < 0,01$
Скелетная мышца	$253 \pm 10,3$	$353 \pm 15,5$ $p < 0,02$
Печень	$3121 \pm 120,0$	3714 ± 135 $p = 0,5$

Примечание. - Данные 11 опытов.

Оказалось, что под действием ТфБНС содержание гликогена в сердце уменьшалось на 21%. В этих же условиях уровень гликогена в скелетной мышце, однако, увеличивается на 39%. В печени существенных изменений в содержании гликогена не отмечалось.

Поскольку распад и синтез гликогена не идут одновременно и контролируются разными системами [15], то, интерпретируя вышеуказанные данные, трудно в настоящее время сделать какие-либо однозначные выводы.

Для фосфорилазы «а» характерен путь аллостерической регуляции, который состоит в ингибировании фермента глюкозо-6-фосфатом; увеличение концентрации последнего должно приводить в этом случае к уменьшению скорости расщепления гликогена.

Необходимо отметить, что неактивная форма гликогенсинтетазы (D-форма) аллостерически активируется глюкозо-6-фосфатом. Следовательно, если имеет место быстрое повышение содержания метаболита, то это не только ингибирует фосфорилазную реакцию, но также стимулирует синтез гликогена, даже если вся гликогенсинтетаза превращается в неактивную форму. Этим можно частично объяснить повышение содержания гликогена в скелетных мышцах под действием ТфБНС, несмотря на увеличение фосфорилазной активности.

Характерные сдвиги в содержании гликогена в сердечной мышце под влиянием нейrogормона «С» наблюдались также в экспериментах *in vitro*, где выявлено значительное понижение гликогена в сердце, что вполне коррелирует с полученными данными в опытах *in vivo*. Возможность нейrogормона «С», с одной стороны, способствовать поглощению глюкозы, а с другой—ее утилизации путем усиления гликолиза, была отмечена ранее [3].

В свете изложенного коррелирующее с нейrogормоном «С» действие ТфБНС на фосфорилазную активность и содержание гликогена в различных органах наряду с полученными ранее данными [7] может свидетельствовать о сходстве между препаратами нейrogормона «С», полученными из различных источников.

Нами было изучено влияние двух других триптических кардиоактивных фрагментов специфических белков на активность фосфорилазы. При введении ТфБНГ прослеживались характерные для ТфБНС сдвиги в сторону интенсивного увеличения фосфорилазной активности во всех органах (табл. 3). Гораздо более выраженными по сравнению с

Влияние ТфБНГ на фосфорилазную активность тканей
(мкА Р_i мин/г свежей ткани при 30°)

Таблица 3

Исследуемая ткань	Контроль	Опыт
Мозг	4,85±1,7	8,3±3,6
Сердце	4,8±2,0	12,2±4,3
Печень	2,6±1,2	4,0±1,8
Мышца	5,9±3,2	15,2±2,5
Почки	2,5±1,4	4,7±2,1

Примечание. Данные 10 опытов.

ТфБНС были изменения в почках (увеличение на 88%) и мозгу (74%). В скелетной мышце происходило увеличение фосфорилазной активности на 163%, а в печени—на 54%, как и при введении препарата ТфБНС.

Наиболее четкие изменения при введении ТфБНК были обнаружены в сердечной мышце и мозгу; активность фосфорилазы повышалась в указанных органах на 100% (табл. 4).

Увеличение фосфорилазной активности, хотя и в меньшей степени (на 54%), отмечалось также в скелетной мышце. В аналогичных условиях в печени и почках существенных изменений не было обнаружено.

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что триптические кардиоактивные фрагменты, оказывая незначительное влияние на активность фосфорилазы почек и печени, весьма существенно повышают активность этого фермента в мозгу, сердце и скелетной мышце. При

этом каждый из них оказывает преимущественное влияние на активность фермента одного органа. Так, например, ТфБНС и ТфБНГ активируют фосфорилазу сердца и скелетной мышцы на 170 и 163% соответственно, в то время как ТфБНК повышает активность фосфорилазы мозга на 100%.

Таблица 4

Влияние ТфБНК на фосфорилазную активность тканей
(мкА Р_i мин/г свежей ткани при 30°)

Исследуемая ткань	Контроль	Опыт
Мозг	4,85±1,7 p<0,001	9,6±4,5
Сердце	4,8±2,0 p<0,001	9,6±2,7
Печень	2,6±1,2 p=0,5	2,8±0,6
Мышца	5,9±3,2 p<0,01	9,1±3,3
Почки	2,5±1,4 p>0,05	2,8±0,3

Примечание. Данные 12 опытов.

Сопоставляя полученные данные, свидетельствующие о сходном действии кардиоактивных фрагментов на изменение фосфорилазной активности в различных органах, нельзя не отметить и некоторые различия между ними, что можно объяснить, по-видимому, их структурными особенностями.

В настоящее время трудно судить о значении фрагментов белковых носителей в регуляции гликогенолиза в вышеперечисленных органах, так как они были получены трипсинолизом специфических белков гипоталамуса. Но нельзя исключить возможности образования аналогичных по структуре фрагментов в мозгу при протеолитическом распаде этих белков в условиях нормы и патологии. Предпосылкой к подтверждению этого предположения являются данные, свидетельствующие о выявлении кардиоактивных фрагментов при действии неочищенных кислых протеаз мозга на указанные белки.

THE EFFECT OF CARDIOACTIVE TRYPTIC FRAGMENTS OF HYPOTHALAMIC SPECIFIC PROTEINS ON THE ACTIVITY OF PHOSPHORYLASE AND cAMP PHOSPHODIESTERASE

SRAPIONIAN R. M., SAHAKIAN S. A., ABELIAN J. G., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

The effect of cardioactive tryptic fragments of hypothalamic specific proteins—the carriers of cardioactive neurohormones „K“, „C“ and „G“ on the activity of cAMP phosphodiesterase, phosphorylase and on glycogen content has been studied in rat various organs. cAMP phosphodiesterase is maximally inhibited by tryptic fragment of neurohormone „C“

carrier protein (40.4%). The intravenous injection of this fragment leads to the increase of phosphorylase activity in all organs tested (in 30 min) with maximal value in heart tissue (170%) and is accompanied by decrease of glycogen content (26%). Some differences in the mode of action of various tryptic fragments on phosphorylase activity may be due to their structural peculiarities.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Алексанян С. С. ДАН АрмССР, 58, 183—186, 1974.
2. Галоян А. А., Алексанян С. С., Абеян Ж. Г., Бархударян Н. А. ДАН АрмССР, 60, 117—120, 1975.
3. Алексанян С. С., Галоян А. А. Биол. ж. Армении, 30, 84—85, 1977.
4. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. Вопросы биохимии мозга. Изд-во АН АрмССР, 11, 89—97, 1976.
5. Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 13, 9—39, 1978.
6. Галоян А. А., Срапионян Р. М. ДАН АрмССР, 42, 210—213, 1966.
7. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Медведев Ф. М., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 70, 182—186, 1980.
8. Pösch G. and Kukovetz W. R. Life Sciences, 10, 133—141, 1971.
9. Бериташвили Д. Р., Кафиани К. А. Вопросы мед. химии, 21, 322—329, 1975.
10. Гурвиц Б. Я. Автореф. канд. дис., Ереван, 1979.
11. Illingworth B., Cori C. T. Biochem. Preparations, 3, 1—9, 1953.
12. Tayssky H. K., Shorr E. J. Biol. Chem., 202, 672—683, 1953.
13. Morris D. E. Science, 107, 254—262, 1948.
14. Парсаданян Г. К., Абеян Ж. Г., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 64, 164—167, 1978.
15. Pastan J. Sci. Amer., 227, 97—105, 1972.

Институт биохимии
АН Армянской ССР, Ереван

Поступила 5. XII 1981

УДК 599.322:001.85.612.82

К ВОПРОСУ О СПЕЦИФИЧНОСТИ БЕЛКА S-100 В ПРОЦЕССАХ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

АЛЕКСИДЗЕ Н. Г., БЕРЕЖНОЙ Г. А., НИКУРАДЗЕ В. О., БЕЛИК Я. В.

Методами иммунохимии и системного анализа изучено распределение нейроспецифического белка S-100 в коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке в экспериментах по обучению крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи. Сделано заключение, что синтез белка S-100 в процессе обучения является ответной реакцией нервных клеток специфических структур мозга, участвующих в формировании памяти и новой поведенческой реакции, и не имеет сигнального значения.

Изучение обмена нейроспецифического белка S-100 в головном мозгу представляет большой интерес в связи с его возможной ролью в механизмах обучения и памяти. Белок S-100 является главным белком, однако его находят в плазматических мембранах, ядрах нейронов и нервных окончаниях [1—4]. Региональный характер содержания белка S-100 в нервной клетке послужил основанием для экспериментального обоснования его участия в работе генетического аппарата и синаптической активности [5, 6].

Известно, что обучение крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи сопровождается повышением содержания белка S-100 в пирамидных нейронах поля CA₃ гиппокампа [7, 8]. Содержание белка S-100 измеряли в момент закрепления нового поведенческого навыка (5-й день обучения) и на 14-й день тренировки. Было установлено, что введение антисыворотки против белка S-100 обратимо ухудшает способность крыс к обучению [7]. В данной работе не проводился комплексный корреляционный анализ в динамике. Изучение содержания белка S-100 в гиппокампе и таламусе за 25 мин после начала обучения крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи на фоне внутрижелудочкового введения антисыворотки, абсорбированной белком S-100, и антисыворотки против белка S-100 также не позволило выявить закономерную корреляцию между синтезом белка S-100 и способностью крыс к обучению [8].

Таким образом выясняется, что из-за отсутствия данных системного анализа в динамике вопрос о специфичности белка S-100 в процессах обучения остается открытым. Нами была предпринята попытка биохимического обоснования возможной роли белка S-100 в процессах обучения животных новому поведенческому навыку использовать не-

предпочитаемую лапу для добычи пищи с помощью иммунохимических приемов и системного анализа в динамике.

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс массой 120—150 г. Обучение крыс проводили по описанному ранее методу [9]. Крыс обучали использованию непредпочитаемой лапы для добычи пищи из узкой пробирки на фоне внутрижелудочкового введения антисыворотки против белка S-100 и антисыворотки против белка S-100, абсорбированной антигеном S-100, и физиологического раствора. Антисыворотку к белку S-100 перед введением концентрировали с помощью сухого сефадекса G-25 в два раза. Испытуемые вещества вводили в желудочки мозга билатерально в объеме 10 мкл на 3—4-й день после начала обучения. Память оценивали количеством правильных ответов (использование непредпочитаемой лапы) из 25 испытаний. Тренировку проводили в день два раза (по 25 испытаний) в течение 11 дней. После каждой двухдневной тренировки определяли количество белка S-100 в ипси- и контралатеральной коре больших полушарий мозга, гиппокампе и мозжечке. Ткань мозга после замораживания и последующего оттаивания в жидком азоте гомогенизировали в 0,0125 М вероналовом буфере (pH 8,6) с тритоном X-100 (0,1%). Гомогенат центрифугировали при 45000 g 30 мин, и в супернатанте количественно определяли содержание белка S-100 методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле по прописи Mancini и соавт. [10]. Количество белка S-100 выражали в процентах от суммарного количества растворимых белков исследуемых структур мозга. Белок S-100 препаративно выделяли из мозга быка по методу [11] с некоторой модификацией, заменив последнюю стадию очистки препаративным диск-электрофорезом в 10% полиакриламидном геле [12]. В дальнейшем готовили моноспецифическую антисыворотку к белку S-100 путем гипериммунизации кроликов. Белок S-100 вводили подкожно с полным адъювантом Фрейнда. Полученную антисыворотку хранили в замороженном состоянии до применения в эксперименте.

Абсорбированную антисыворотку готовили следующим образом: к антисыворотке против белка S-100 добавляли антиген-белок S-100 и инкубировали при 37° в течение 1 ч. Смесь оставляли в холодильнике на 24 ч и центрифугировали при 45000 g 45 мин.

Результаты исследований

В первой серии опытов исследовали влияние внутрижелудочкового билатерального введения физиологического раствора, антисыворотки против белка S-100, абсорбированной белком S-100, и антисыворотки против белка S-100 на скорость обучения крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи. Как видно из рис. 1, результаты правильных ответов животных после введения физиологического раство-

ра или антисыворотки против белка S-100, абсорбированной белком S-100, практически не отличались. На 4—5-й день уровень обучаемости достигал максимума, и новая поведенческая реакция сохранялась в течение длительного времени. После введения антисыворотки против S-100 ход кривой обучения заметно изменялся. На второй день после введения антисыворотки против белка S-100 (третий день обучения) память крыс на новое поведение полностью стиралась, и их реакция на добывание пищи унодоблялась поведению необученных крыс. В последующие три дня обучение протекало с некоторой задержкой, в результате чего в отличие от опытов с введением абсорбированной антисыворотки против белка S-100 и физиологического раствора динамика обучения растягивалась во времени. С 7-го дня тренировки наклон кривой обучения находился в полном соответствии с наклоном кривой обучаемости контрольных животных и лишь на 11-й день тренировки достигал 80—85% критерия.

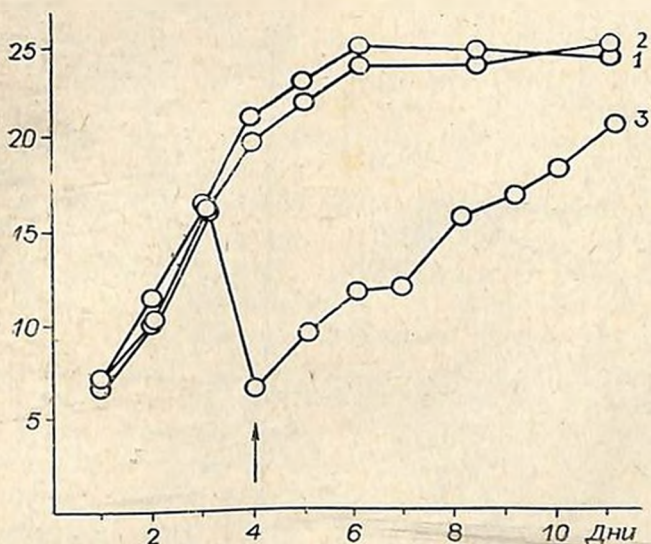


Рис. 1. Влияние внутривидочкового введения физиологического раствора (1), абсорбированной антисыворотки против белка S-100 (2) и антисыворотки против белка S-100 (3) на обучение крыс использовать непередпочитаемую лапу для добычи пищи. На ординате — количество правильных ответов; стрелки показывают момент введения испытуемых веществ

Во второй серии опытов в описанных выше условиях обучения крыс доставать пищу непередпочитаемой лапой в исп- и контрлатеральной коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке исследовали изменение количественного содержания белка S-100 методом радиальной иммунодиффузии. Как видно из рис. 2, в процессе обучения крыс использовать непередпочитаемую лапу на фоне внутривидочкового введения физиологического раствора в контрлатеральных обла-

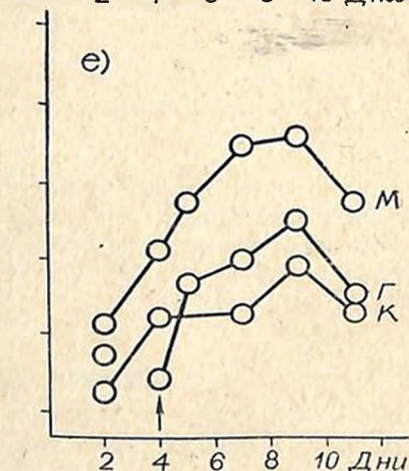
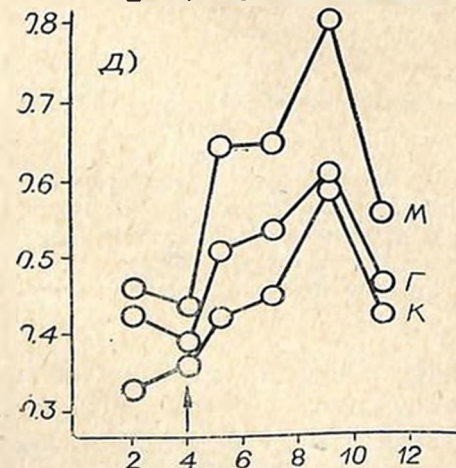
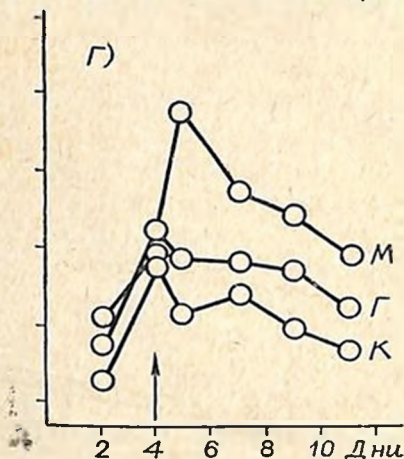
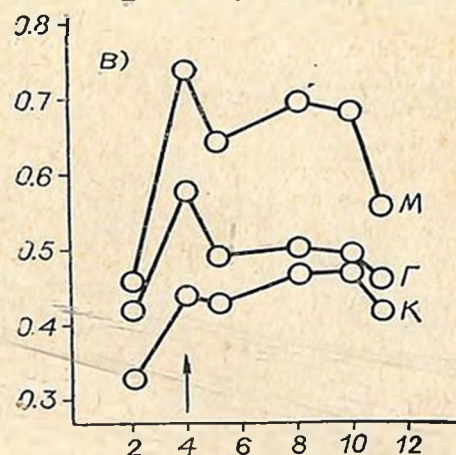
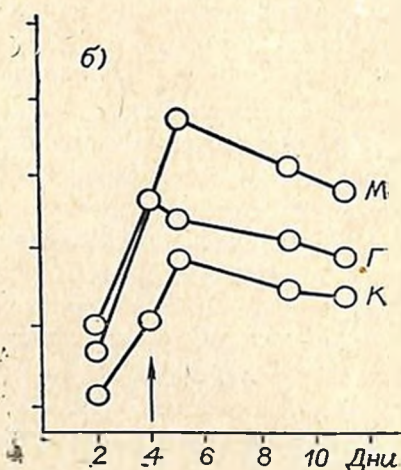
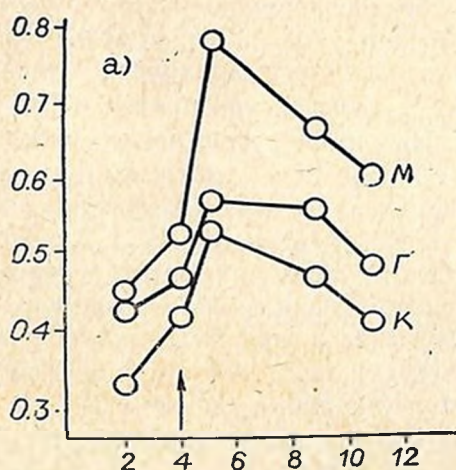


Рис. 2. Влияние внутрижелудочкового введения физиологического раствора (а, б), абсорбированной антисыворотки против белка S-100 (в, г) и антисыворотки против белка S-100 (д, е) на содержание белка S-100 в ипс- (б, г, е) и контрлатеральной (а, в, д) коре больших полушарий (К), гиппокампе (Г) и мозжечке (М). На ординате—количество белка S-100 в процентах растворимых белков коры, гиппокампа и мозжечка. стрелки показывают момент введения испытуемых веществ

стях во всех изученных нами структурах мозга содержание белка S-100 возрастало (рис. 2, а). Максимальное содержание белка обнаружилось на 4—5-й день обучения, что коррелирует с закреплением новой поведенческой реакции. В последующие дни, несмотря на продолжающееся добывание пищи непродолжительной лапой, количество белка S-100 постепенно уменьшалось и приближалось к исходному уровню. В ипсилатеральной коре, гиппокампе и мозжечке обнаруживалась аналогичная закономерность, но без четко выраженных количественных переходов.

Результаты опытов с абсорбированной антисывороткой против белка S-100 практически не отличались от результатов опытов с физиологическим раствором. В этом случае память крыс на выработанный поведенческий навык четко коррелировала с усилением синтеза белка S-100. На 4-й день после начала тренировки содержание белка S-100 в мозжечке возрастало от 0,46 до 0,74% от суммарных растворимых белков, что в среднем составило повышение на 61%. Меньшие сдвиги в изменении содержания белка S-100 были обнаружены в гиппокампе (+25—30%) и в коре больших полушарий (+20%). Однако по скорости нормализации содержания белка S-100 была выявлена тенденция в обратной последовательности. В этой связи ипсилатеральные структуры мозга отличались от контрлатеральных.

Резко отличалась динамика содержания белка S-100 в исследованных структурах мозга при внутрижелудочковом введении антисыворотки против белка S-100 на фоне обучения. После введения антисыворотки против белка S-100 в гиппокампе и мозжечке вначале происходило частичное уменьшение, а затем увеличение содержания белка S-100, максимальное накопление которого отодвигалось во времени и достигало максимума на 9-й день после начала обучения, когда уровень обучаемости составлял примерно 70% критерия. В аналогичных условиях опытов не удавалось наблюдать четких количественных переходов в содержании белка S-100 в ипсилатеральной коре больших полушарий мозга, гиппокампе и мозжечке, но закономерность динамики в содержании белка S-100 не менялась. Например, если количество белка S-100 в контрлатеральном мозжечке на 9-й день тренировки животных достигало примерно 0,8%, что превосходило контрольный уровень более чем в 1,8 раза, то в ипсилатеральном этот показатель изменялся примерно в такой же степени (1,6 раза), но с более плавным переходом. Аналогичная закономерность была обнаружена в динамике обмена белков как в ипси-, так и в контрлатеральном гиппокампе и коре больших полушарий.

Обсуждение результатов

Была предпринята попытка биохимического обоснования возможной специфической связи механизмов памяти с биосинтезом белка S-100 в ипси- и контрлатеральной коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке головного мозга в процессе обучения крыс использовать не-

предпочитаемую лапу для добычи пищи. При решении этого вопроса мы использовали моноспецифическую антисыворотку против белка S-100 с целью исключения последнего из общего белкового метаболизма. Контролем служили животные, предварительно обработанные физиологическим раствором или абсорбированной антисывороткой против белка S-100.

Было установлено, что физиологический раствор и абсорбированная антисыворотка не влияли на скорость обучения крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи. Результаты соответствовали данным опытов, проведенных ранее другими авторами [7, 9]. Введение антисыворотки против белка S-100 нарушало скорость обучения в течение 2—3 дней, а в последующие дни обучение проходило нормально.

Создается впечатление, что латентный период необходим для индукции синтеза белка S-100, т. е. для восстановления такого уровня в его содержании, который, по-видимому, обеспечивает нормальное течение нейродинамических процессов, лежащих в основе ответных реакций головного мозга на функциональную нагрузку. Результаты количественного определения содержания белка S-100 в разных структурах мозга в период обучения показали положительную корреляцию уровня обучаемости животных и содержания белка S-100 в коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке (рис. 2). Корреляция выявилась в совпадении становления новой поведенческой реакции и максимального содержания белка S-100 во всех изученных структурах мозга как в контрольных опытах, так и в условиях внутрижелудочкового введения антисыворотки против белка S-100. Например, в опытах с физиологическим раствором или абсорбированной антисывороткой на 4—5-й день заканчивалось обучение, максимальное содержание количества белка S-100 также обнаруживалось на 4—5-й день обучения. В опытах же с антисывороткой против белка S-100 пик индукции синтеза белка S-100 достигал максимума на 9-й день, когда уровень обучаемости составлял 70—80% критерия. Привлекает внимание тот факт, что после введения антисыворотки против белка S-100 незначительно уменьшалось количество этого белка. Следовательно, можно предположить, что отрицательный эффект введения антисыворотки в большей степени обусловлен взаимодействием с *de novo* синтезированным белком S-100, хотя не исключено отрицательное влияние на память конъюгата белка S-100, как это было продемонстрировано на примере пептидил-порфирина [13]. Если учесть данные литературы об участии белка S-100 в регуляции действия генетического аппарата и активности синапсов [5, 6], можно предположить наличие двух точек приложения отрицательного влияния антисыворотки против белка S-100 на память: на уровне генетического аппарата и синаптической передачи. Оба уровня играют важную роль в процессах формирования долговременной памяти [14]. Но из-за отсутствия соответствующих экспериментальных данных пока трудно сделать какие-либо выводы относительно специфиче-

ского направленного действия белка S-100 на обучение и память. Гипотеза Hyden [6], основывавшаяся на принципах конкурентного взаимодействия белка S-100 и актиноподобного белка филаментов постсинаптических мембран с Ca^{2+} , также не говорила в пользу специфической связи сдвигов в содержании белка S-100 с механизмами памяти. Исходя из данных Peterson, Devine [15] и Hyden, Lange [16], за обучение крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи преимущественно ответственными являлись двигательная область коры больших полушарий (2,7 мм латерально и 1,6 мм рострально от брегмы) и гиппокамп (пирамидные нейроны поля CA_3), индукция синтеза белка S-100 в мозжечке трудно объяснима. Однако, учитывая роль мозжечка в целенаправленных двигательных реакциях, усиление синтеза белка S-100 в мозжечке как результат неспецифического ответа на физиологическую нагрузку становится более понятным.

Таким образом, полученные результаты, а также данные литературы о роли белка S-100 в модуляции синаптической активности [6] и об усилении синтеза белка S-100 в мозгу у активных контрольных крыс [17], указывают на то, что синтез белка S-100 в процессе обучения является ответной реакцией на физиологическую нагрузку нервных клеток специфических структур мозга, участвующих в формировании нового поведенческого навыка, который не имеет сигнального значения.

ON THE SPECIFICITY OF S-100 PROTEIN IN LEARNING PROCESS AND MEMORY

ALEKSIDZE N. G., BEREZHINYI H. A., NIKURADZE V. O., BELIK Y. V.

State University, Tbilisi and Institute of Biochemistry,
Ukrainian SSR Academy of Sciences, Kiev

The time related changes in neurospecific protein S-100 content in the courses of learning process has been studied in rat cerebral hemispheres cortex, hippocampus and cerebellum by means of immunochemical methods and systematic analysis.

It is concluded that protein S-100 synthesis in the course of learning process is the response of brain specific structures involved in the formation of a new behaviour pattern and that it does not bear signal meaning.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cicero T. J., Cowan W. M., Moore B. W., Sontzeff V. Brain Res., 13, 25—34, 1970.
2. Haglid K. G., Hamberger A., Hansson H. A., Hyden H., Persson L., Rönnbäck L. Nature (London), 251, 532—534, 1974.
3. Hansson H. A., Hyden H., Rönnbäck L. Brain. Res., 93, 349—352, 1975.
4. Hyden H., Rönnbäck L. Neurobiology, 5, 291—302, 1975.
5. Michetti F., De Renzi G., Dorato R., Miani N. Brain Res., 105, 372—375, 1976.
6. Hyden H. Proc. Nat. Sci. USA, 71, 2965—2968, 1974.
7. Hyden H., Lange P. W. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 67, 1959—1966, 1970.
8. Hyden H. Biosci. Commun., 4, 185—204, 1978.

9. Алексидзе Н. Г., Балавадзе М. В. ДАН СССР, 148, 1455—1457, 1971.
10. *Manchini G., Carbonara A., Heremas J.* Immunochemistry, 2, 1, 235—254, 1965.
11. *Stewart J. A.* Biochem. Biophys. Acta, 263, 178—192, 1972.
12. Бережной Г. А. Укр. биохим. ж., 50, 1, 116—120, 1978.
13. *Flexner L. B., Flexner J. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60, 923—935, 1968.
14. Кометиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. Э. Нейрохимические аспекты памяти (под ред. Р. И. Кругликова), Тбилиси, Мешинереба, 1980.
15. *Peterson G. M., Devine J. V. J.* Comp. Biochem. Psychol., 56, 752—758, 1963.
16. *Hydén H., Lange P. W.* Science, 159, 1370—1373, 1968.
17. Алексидзе Н. Г., Мешвелишвили Д. Ф. Сообщ. АН ГССР, 59, 185—187, 1970.

Тбилисский государственный
университет, Институт биохимии
АН УССР, Киев

Поступила 14. X 1981

УДК 591.48:577.112:547.953

ЛИПИДНЫЙ КОМПОНЕНТ ПРОТЕОЛИПИДОВ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И СУБКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ МОЗГА

МАНУКЯН К. Г.

Липидный компонент протеолипидов (ПЛ) из разных отделов нервной системы и субклеточных образований мозга имеет наряду с различиями ряд общих черт. Все ПЛ характеризуются присутствием менее прочно связанного компонента, содержащего большие количества неполярных липидов и нейтральных фосфолипидов, и более прочно связанного, в состав которого входят преимущественно или только кислые липиды. Различия в липидном составе ПЛ из разных субклеточных образований в основном обусловлены разницей в содержании двух кислых фосфолипидов: фосфатидилсерина, который преобладает в фосфолипидах ПЛ, выделенных из миелина и белого вещества мозга, и дифосфатидилглицерина, преобладающего в ПЛ, выделенных из митохондрий и серого вещества мозга. На основании сопоставления данных относительно липидного и белкового компонента ПЛ из разных субклеточных структур мозга делается заключение о существовании по крайней мере двух типов ПЛ: миелинового и митохондриального. Обсуждается возможная роль ПЛ, в частности, их липидного компонента в клеточных мембранах нервной и других тканей.

Протеолипиды (ПЛ), обнаруженные впервые Folch и Lees в 1951 г. [1], представляют особую группу липопротеинов, характеризующихся специфической растворимостью в органических растворителях, которая обусловлена в основном гидрофобной природой белка ПЛ, богатого неполярными аминокислотами, и поддерживается связанными с ним липидами. С целью подчеркнуть эту особенность они и были названы протеолипидами. ПЛ являются мембранными компонентами многих животных, растительных и микробных клеток [2]. Особенно богата ПЛ нервная ткань и, главным образом, белое вещество мозга, где они локализованы в основном в миелине, составляя 30—50% общего белка миелина, выделенного из головного мозга млекопитающих [3, 4]. В небольших количествах ПЛ входят также в состав других субклеточных образований нервной ткани: митохондрий, синапсом, синапсомальных мембран, синаптических пузырьков, микросом, ядер [5, 6]. Из других органов наиболее богато ПЛ сердце, где они являются главным образом компонентами митохондрий [7]; в растениях ПЛ входят в основном в состав хлоропластов [8].

Интерес к изучению ПЛ нервной системы в настоящее время определяется, с одной стороны, их преимущественной локализацией в миелине ЦНС, где они являются главным белковым компонентом, с дру-

той—предполагаемым участием этих соединений в процессах синаптической передачи в качестве рецепторов ряда медиаторов и нейроактивных аминокислот [9—12]. ПЛ придается определенная роль также в функции митохондрий, в частности, в процессах трансформации энергии. Известно, что чувствительная к олигомицину протонпроводящая часть митохондриальной АТФазы является ПЛ [13].

Хотя роль ПЛ пока не выяснена, полагают, что они, являясь важными структурными компонентами различных клеточных мембран, могут участвовать в ряде мембраносвязанных функций, в частности в процессах протонного и ионного транспорта [14—17]. Функция ПЛ в мембранах определяется, вероятно, особыми свойствами белкового компонента (гидрофобностью, конформационной гибкостью, способностью к агрегации) и входящими в их состав липидами. Липиды играют важную роль в регуляции функций белков, с которыми они связаны, в частности, многих ферментных систем.

В настоящее время накоплен ряд данных о составе, строении, свойствах и локализации ПЛ в нервной системе [2, 18, 19]. Они относятся в основном к белковому компоненту этих комплексов.

В связи с различной локализацией и предполагаемой разной ролью ПЛ в мембранных образованиях клетки возникает вопрос о сходстве и отличиях ПЛ, входящих в состав разных субклеточных структур. Целью проводимых нами в течение ряда лет исследований являлось изучение наряду с белковым липидного компонента ПЛ, выделенных в виде растворимых, очищенных в разной степени от липидов липидно-белковых комплексов из различных отделов нервной системы некоторых млекопитающих и субклеточных образований мозга крысы. Имеющиеся в литературе в отношении липидного компонента этих комплексов данные других авторов касаются ПЛ, выделенных из белого вещества мозга, и получены главным образом Folch и сотр. [2, 19].

Материалы и методы

Выделение субклеточных частиц из мозга крысы производили по методике, описанной ранее [6]. В результате фракционирования получали достаточно чистые фракции митохондрий, синапсом, микросом, ядер и две отличающиеся по размерам миелиновых фрагментов фракции миелина. Содержащий несколько более крупные фрагменты миелин был обозначен как «тяжелый» (Мт), а содержащий несколько более мелкие—как «легкий» (Мл).

Липидные экстракты разных отделов нервной системы и субклеточных образований мозга получали и отмывали по методу Folch и др. [20]. Содержание белка ПЛ определяли методами [21, 22]. ПЛ выделяли методом эмульгирования-центрифугирования [23] с внесенными нами видоизменениями. Лиофилизированные осадки изолированных этим методом неочищенных ПЛ (НПЛ), содержащих 40—60% белка и 60—40% липидов, промывали в зависимости от задачи 2—4 раза при

—20, —12 или +23° 200-, 300-, 600-кратным объемом смеси спирт—эфир (1:1). Полученные таким образом очищенные ПЛ (ОПЛ) растворяли во влажных хлороформ-метаноловых смесях, определяли оптическую плотность при 278 нм, после чего подвергали многократному упариванию из насыщенной водой хлороформ-метаноловой смеси для расщепления связей между липидами и белками. Липиды экстрагировали из расщепленных ОПЛ сначала нейтральной, затем подкисленной HCl до 0,04 N хлороформ-метаноловой смесью [24, 25]. Фосфолипиды (ФЛ) разделяли методом восходящей хроматографии на бумаге, пропитанной кремниевой кислотой [26], а полифосфонозитиды (ПФИ)—дополнительно на бумаге, пропитанной формальдегидом [27]. Галактозу гликолипидов (цереброзиды, сульфатиды) определяли орциновым методом [28]. Для пересчета на гликолипиды полученные величины умножали на фактор 4,6. Холестерин (ХС) определяли по реакции Либермана-Бурхарда с модификации Прохоровой и Туниковой [29].

Исследованию подвергали экстракты липидов, выделенных нейтральной и подкисленной хлороформ-метаноловой смесью из ОПЛ, а также спирт-эфирные отмывы НПЛ. О липидном составе НПЛ судили по сумме: липиды спирт-эфирных отмывов+липиды ОПЛ.

Результаты и обсуждение

ПЛ являются сложными мембранными липопротеинами, в построение которых могут быть вовлечены разные типы липидно-белковых связей (вандерваальсовы силы, водородная связь, но в основном гидрофобные и ионные взаимодействия). Одни липиды связаны менее прочной связью, диссоциирующей в различной степени в зависимости от условий выделения, другие—более прочной, для расщепления которой необходимо применить подкисленные растворители [2, 19].

Для выделения менее прочно связанных липидов мы промывали НПЛ смесью спирт—эфир (1:1) при разных температурах, что способствовало, вероятно, последовательному удалению не только наименее прочно связанных липидов, но и части более прочно связанных. Известно, что спирт как полярный растворитель расщепляет некоторые липидно-белковые связи [30].

Как видно из табл. 1, содержание белка ПЛ общих липидных экстрактов, а также НПЛ и ОПЛ в белом веществе больших полушарий мозга в 8—11 раз выше, чем в сером. С другой стороны, оно снижается в белом веществе разных отделов нервной системы в кранио-каудальном направлении, достигая очень низких величин в периферическом нерве [24, 25]. Исследования показали, что в наибольших количествах и более прочно с ПЛ связаны ФЛ, в меньшей степени—гликолипиды и наименее прочно—ХС (табл. 1), что соответствует данным Folch и соотр. для ПЛ из белого вещества больших полушарий [2]. Параллельно с белком ПЛ содержание связанных с ним липидов также снижается в белом веществе нервной системы в кранио-каудальном направлении

[27], так что НПЛ и ОПЛ, выделенные из белого вещества разных отделов ЦНС собаки, почти не отличаются по содержанию ФЛ, гликолипидов и ХС, тогда как в ПЛ из седалищного нерва концентрация всех этих липидов выше (табл. 1).

Коэффициент оптической плотности при 278 мμ препаратов ПЛ из разных отделов ЦНС очень сходен и колеблется в пределах 7—10—13 в зависимости от степени очистки от липидов, у ПЛ из седалищного нерва он в 2,0—2,5 раза ниже (табл. 1).

В табл. 2 представлены данные по фосфолипидному составу общих липидных экстрактов. НПЛ и ОПЛ серого и белого вещества — мозга крупного рогатого скота. Для получения ОПЛ осадки НПЛ промывали 2 раза 600-кратным объемом смеси спирт—эфир (1:1) при 23°. С НПЛ серого и белого вещества мозга связано 5,7 и 13,5, а ОПЛ—1,0 и 4,4% всех ФЛ общего липидного экстракта этих частей мозга соответственно.

НПЛ, выделенные как из серого, так и белого вещества мозга, содержали заметные количества нейтральных ФЛ—фосфатидилхолина (ФХ), сфингомиелина (СФМ), а также фосфатидилэтанолamina (ФЭА). Однако по сравнению с общими липидными экстрактами они характеризовались более низким процентным содержанием нейтральных ФЛ—ФХ и СФМ и более высоким кислых—дифосфатидилглицерина (ДФГ) или кардиолипина, монофосфоинозотида (МФИ) и фосфатидилсерина (ФС). Промывание спирт—эфирной смесью при +23° приводило к экстракции 82% всех ФЛ, связанных с НПЛ серого вещества, и 53% — белого. При этом из НПЛ почти полностью (на 95—97%) удалялись нейтральные ФЛ. С полученными ОПЛ как серого, так и белого вещества мозга были связаны в основном кислые ФЛ. Преобладающим ФЛ ОПЛ серого вещества являлся ДФГ, составляющий 38% от суммы всех связанных ФЛ, затем ФС и МФИ. В ОПЛ из серого вещества всегда присутствовало также некоторое количество ФХ. В отличие от серого вещества преобладающими ФЛ ОПЛ из белого вещества являлся ФС, составляющий 49% всех ФЛ, затем ДФГ, ТФИ и МФИ. Процент кислых ФЛ, более прочно связанных с белком ПЛ, в белом веществе был значительно выше, чем в сером.

Наши исследования с выделением целых, неразрушенных ПФИ, а не продуктов их гидролиза, подтверждают данные Folch и соотр. [31, 32] о том, что в состав ПЛ белого вещества мозга входит ТФИ более прочно, чем другие липиды, связанные с белками этих комплексов [27]. Он отсутствовал в спирт—эфирных отмывках НПЛ и извлекался из ОПЛ только подкисленной хлороформ—метаноловой смесью. Дифосфоинозотида в ПЛ мало.

Следует отметить, что на хроматограммах нейтральных и, особенно, подкисленных липидных экстрактов ОПЛ на кремниевой бумаге всегда выявлялось отчетливое, яркое пятно, соответствующее сульфатиду.

Исследование НПЛ и ОПЛ, выделенных из белого вещества раз-

Таблица 1

Содержание и липидный состав ПЛ из серого и белого вещества больших полушарий:
мозга крупного рогатого скота и белого вещества разных отделов нервной
системы собаки

Животное, отдел нервной системы	мг г влажной ткани			Е ₁ ^{1%} см 278 нм		Липиды (мг 100 мг ПЛ)					
	Белок ПЛ об- щих ли- пидных экстрак- тов	НПЛ	ОПЛ	НПЛ	ОПЛ	Фосфолипиды		Гликолипиды		Холестерин	
						НПЛ	ОПЛ	НПЛ	ОПЛ	НПЛ	ОПЛ
Крупный рогатый скот <i>Большие полушария</i> Серое вещество (cortex)	2,1±0,1 (11)	4,9—6,4	2,3—2,9	7,0	11,2	41,3	10,8—13,7	3,2	2,1	—	—
Белое вещество (cen- trum semiovale, cor- pus callosum)	23,4±0,4 (12)	40,6±1,2 (7)	24,4±0,4 (13)	7,3	10,1— 13,3	30,0	12,2—17,6	5,5—10,0	2,1	11,6	0,1
Собака <i>Белое вещество</i> <i>Большие полушария</i>	22,4±0,5 (16)	42,8±1,9 (14)	22,0±0,8 (12)	—	11,8	35,2±0,5 (6)	17,1±0,3 (15)	6,5±0,4 (7)	3,2±0,3 (8)	12,8	0,2
Продолговатый мозг	17,4±0,5 (11)	32,7±2,0 (10)	15,9±0,7 (10)	—	12,4	35,3±0,6 (7)	18,4±0,5 (12)	10,0±0,5 (6)	3,7±0,3 (8)	15,4	0,3
Спинной мозг, отдел шейный (1—8 сегмен- ты)	15,5±0,4 (17)	27,7±1,4 (14)	14,0±0,7 (11)	—	11,6	35,2±0,6 (7)	17,8±0,5 (13)	8,9±0,6 (7)	3,7±0,3 (9)	14,2	0,4
Грудной (9—21 сегмен- ты)	14,7±0,4 (16)	29,9±1,1 (14)	13,6±0,4 (12)	—	11,7	34,6±1,3 (7)	17,4±0,5 (14)	9,5±0,8 (6)	3,5±0,4 (8)	14,4	0,4
Пояснично-крестцовый (22—31 сегменты)	15,3±0,4 (16)	30,2±2,0 (14)	14,4±0,5 (13)	—	10,6	35,8±1,2 (7)	17,3±0,6 (15)	9,5±0,4 (7)	3,6±0,2 (9)	16,5	0,8
<i>Спинальный нерв</i>	1,9±0,1 (18)	9,0±0,4 (12)	1,8±0,1 (12)	—	4,9	11,8±3,3 (9)	21,3±1,0 (10)	15,1±1,6 (6)	15,1±1,6 (7)	23,5	1,8

ных отделов нервной системы собаки, показало, что ПЛ белого вещества разных отделов ЦНС весьма сходны по своему фосфолипидному составу. Здесь, как и в белом веществе мозга крупного рогатого скота, с НПЛ связаны заметное количество ФЭА и нейтральных ФЛ, а с ОПЛ—в основном кислые ФЛ и главным образом ФС, составляющий 36—46% от суммы ФЛ, ДФГ—11—13%, ТФИ—5—8,5%, МФИ и фосфатидная кислота (ФК)—по 5—7%. Таким образом, в состав белого вещества разных отделов ЦНС входят, по-видимому, одни и те же протеолипидные комплексы. В отличие от ОПЛ центрального белого вещества в ОПЛ из седалищного нерва отсутствуют ПФИ и неидентифицированные кислые ФЛ. Основным ФЛ НПЛ и ОПЛ является СФМ, составляющий 42% всех связанных с ОПЛ ФЛ, затем уже ФС—23%. ДФГ в ОПЛ из седалищного нерва очень мало—2%. Следует отметить, что этого ФЛ в нерве вообще гораздо меньше, чем в белом веществе ЦНС [33].

Таблица 2

Фосфолипидный состав общих липидных экстрактов и НПЛ, изолированных из серого и белого вещества больших полушарий мозга крупного рогатого скота
(в % от суммы ФЛ)

Фосфолипиды	Серое вещество			Белое вещество		
	Общий липидный экстракт	НПЛ	ОПЛ	Общий липидный экстракт	НПЛ	ОПЛ
Линия старта	1,93	2,25	3,32	2,53	2,56	4,71
Неидентифицированный ФЛ, сорбированные на сульфатиде	—	0,81	4,43	—	0,58	1,78
Монофосфоинозитид	1,54	1,42	3,11	1,45	1,66	2,04
Дифосфоинозитид	3,92	4,83	1,59	2,37	3,99	7,75
Трифосфоинозитид	—	—	—	—	0,52	1,61
Сфингомиелин	10,79	8,22	4,43	21,07	3,24	10,00
Фосфатидилхолин	38,97	30,75	5,33	26,47	10,42	0,91
Неидентифицированный Фосфатидилсерин	—	0,53	2,90	—	17,45	1,31
Фосфатидилэтаноламин	15,21	16,76	21,43	20,56	0,74	3,37
Дифосфатидилглицерин	24,50	26,45	3,88	23,04	26,22	49,14
Фосфатидная кислота	3,08	7,98	37,58	2,51	27,34	2,94
	—	—	—	—	4,70	12,66
	—	—	—	—	0,58	1,78
ФЛ в % от веса ПЛ	—	40,30	13,68	—	31,30	15,60

Субклеточное распределение белка ПЛ в мозгу крысы представлено на рис. 1. Данные приводятся в процентах от содержания белка ПЛ в общем гомогенате, которое равняется 5,35 мг/г влажной ткани. Большая часть ПЛ в мозгу локализована в миелине, белок ПЛ двух фракций которого составляет 3,7 мг/г влажной ткани. Содержание белка ПЛ в липидных экстрактах митохондрий и синапсом почти одинаково и равняется 0,44—0,45 мг/г. В микросомах оно ниже—0,26 мг/г и особенно низкое в растворимой фракции и ядрах—0,1 мг/г [6].

На рис. 2—5 приведен фосфолипидный состав НПЛ, выделенных из различных субклеточных частиц, и ОПЛ, полученных после промывания НПЛ спирт-эфирной смесью при различных температурах. ФЛ

составляют 30—39% от веса НПЛ из разных субклеточных образований и 8—25% от веса ОПЛ в зависимости от условий очистки. Преобладающими ФЛ НПЛ всех изученных субклеточных частиц являются ФХ и ФЭА, составляющие каждый 25—30% от суммы всех связанных ФЛ. В ПЛ, отмывых при -12° , процентное содержание этих и остальных нейтральных ФЛ снижается и повышается содержание кислых. ПЛ разных субклеточных образований, так же как и ПЛ из исследованных отделов нервной системы, отмывые при $+23^{\circ}$, содержат только или преимущественно кислые ФЛ и в основном ФС,ДФГ и МФИ.

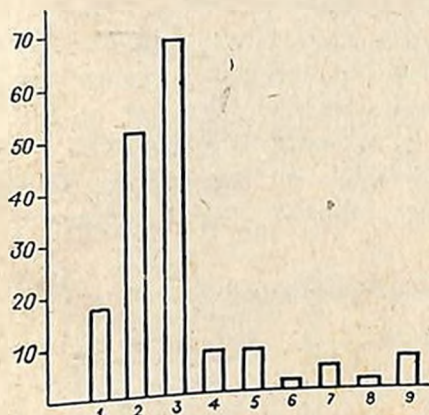


Рис. 1. Белок ПЛ субклеточных фракций мозга крысы в % от белка ПЛ общего гомогената: 1—Мт, 2—Мл, 3—Мт+Мл, 4—синапсомы, 5—митохондрии, 6—ядра, 7—микросомы, 8—растворимая фракция, 9—прочие отмывы

В ПЛ общего гомогената, очищенных при $+23^{\circ}$ (рис. 2), основными ФЛ являются ФС и ДФГ, содержащиеся примерно в равных количествах и составляющие 36 и 34% от суммы ФЛ, связанных с ОПЛ; 10,5% составляет МФИ и 7% ФХ.

НПЛ и ОПЛ из двух фракций миеллина—Мт и Мл очень сходны по своему фосфолипидному составу [34]. Для ОПЛ миеллина, как и белого вещества мозга, характерно преобладание ФС, содержание которого достигает 62% в ФЛ ПЛ, очищенных при $+23^{\circ}$, затем следуют МФИ—12—14% и ДФГ—9—11% (рис. 3).

В ОПЛ из митохондрий основным ФЛ является ДФГ, составляющий 34% в ФЛ ПЛ, очищенных при -12° , и 46% в ФЛ ПЛ, очищенных при $+23^{\circ}$, меньший процент составляют ФС и ФХ—15—16% и МФИ—10% (рис. 4). Таким образом, ПЛ митохондрий по своему фосфолипидному составу ближе к ПЛ серого вещества мозга. Преобладание ДФГ еще более выражено в ПЛ, выделенных из сердца, где он составляет 60—70% всех ФЛ, связанных с ОПЛ [35].

ПЛ синапсом занимают промежуточное положение между ПЛ миеллина и митохондрий и характеризуются, как и ПЛ общего гомогената, примерно одинаковым содержанием ФС и ДФГ, которые являются преобладающими ФЛ (рис. 5). В очищенных при $+23^{\circ}$ ПЛ из синапсом

наптосомальных мембран основным ФЛ является ФС, составляющий 49% от суммы всех связанных ФЛ, затем ДФГ—25, 4%, ФХ—7,8% и МФИ—6%.

Результаты проведенных исследований подтверждают, что в формировании протеолипидных комплексов могут участвовать разные липидно-белковые связи. Менее прочно связаны с белком ПЛ непонные липиды: ХС, часть гликолипидов (цереброзиды) и нейтральные ФЛ. Они почти полностью удаляются из ПЛ спирт-эфирной смесью при $+23^{\circ}$. Более прочно связаны с белком ПЛ сульфатиды и кислые ФЛ: ФС, ДФГ и МФИ, которые частично экстрагируются из НПЛ спирт-эфирной смесью, но в основном остаются в составе ОПЛ. В связывании этих липидов, по-видимому, принимают участие как ионные, так и гидрофобные связи. Наиболее прочно с ПЛ серого вещества связаны два неидентифицированных кислых ФЛ, которые вообще не экстрагируются спирт-эфирной смесью, а белого—также ПФИ и особенно ТФИ. Последний извлекается из ОПЛ подкисленной хлороформ-метаноловой смесью. Эти ФЛ связаны, вероятно, только ионными связями.

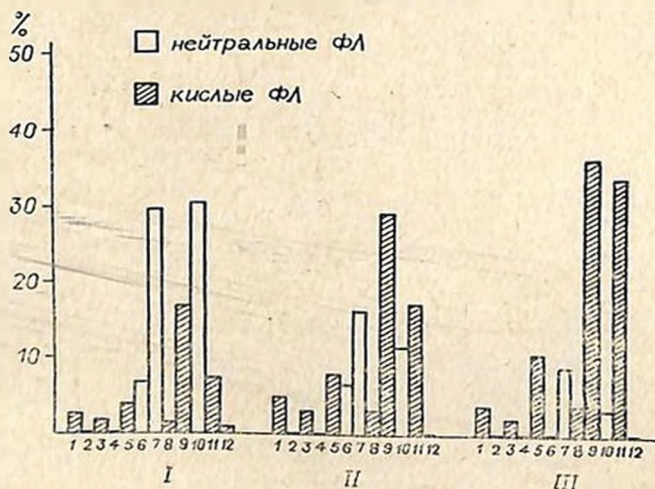


Рис. 2. Фосфолипидный состав (в % от суммы ФЛ)—НПЛ (I) и полученных после отмывания НПЛ смесью спирт-эфир (1:1) при -12° (II) и $+23^{\circ}$ (III) ОПЛ общего гомогената мозга крысы: 1—линия старта; 2—неидентифицированный; 3—ФЛ, сорбированные на сульфатиде; 4—лизолецитин; 5—МФИ; 6—СФМ; 7—ФХ; 8—неидентифицированный; 9—ФС; 10—ФЭА; 11—ДФГ; 12—ФК

Трудно утверждать, что все описанные связи имеют место *in vivo*, возможно, присоединение каких-то липидов происходит *in vitro* в процессе выделения препарата. Однако растворимость освобожденного от липидов апопротенина в воде [2, 19, 36] при полной нерастворимости в ней тканевых ПЛ свидетельствует о том, что в тканях апопротенин должен быть обязательно скомбинирован с липидами, которые стабилизируют белок ПЛ в его липофильной, водонерастворимой конформации.

В модельных опытах *in vitro* разными авторами получен ряд дока-

зательств о предпочтительном связывании апопротенна ПЛ из миелина с отрицательно заряженными липидами [37—39], что подтверждается и данными об изоэлектрической точке этого белка, равной 9,2 [40]. Браун, Радин, изучив взаимодействие водорастворимого апопротенна из миелина с диспергированными липидами, пришли к заключению, что кислые и нейтральные липиды могут независимо и одновременно связываться с катионными и неполярными областями белка, причем аннионные липиды связываются прочно с остатками основных аминокислот белка, тогда как нейтральные липиды менее прочно с гидрофобными участками [37].

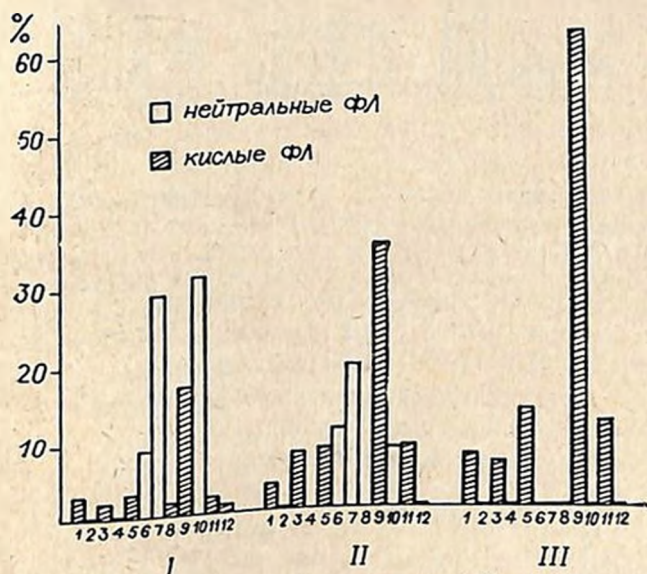


Рис. 3. Фосфолипидный состав (в % от суммы ФЛ)—НПЛ (I) и полученных после отмывания НПЛ смесью спирт—эфир (1:1) при -12° (II) и $+23^{\circ}$ (III) ОПЛ Мл из мозга крысы: 1—линия старта; 2—неидентифицированный; 3—ФЛ, сорбированные на сульфатиде, 4—лизолецитин; 5—МФИ; 6—СФМ; 7—ФХ; 8—неидентифицированный; 9—ФС; 10—ФЭА; 11—ДФГ; 12—ФК. ФЛ в мг/100 мг ПЛ: I—30,50; II—24,91; III—8,25

Проведенные нами исследования показали, что липидный компонент ПЛ, выделенных из разных отделов нервной системы и различных субклеточных образований мозга, имеет наряду с отличиями ряд общих черт.

Для всех изученных ПЛ характерно присутствие, с одной стороны, менее прочно связанного компонента, содержащего большие количества неполярных липидов и нейтральных ФЛ (в основном ФХ, а также ФЭА); с другой—более прочно связанного, в состав которого входят преимущественно или только кислые липиды (главным образом ФС, ДФГ и МФИ). Последние три кислых ФЛ являются обязательными компонентами ПЛ, выделенных из нервной ткани. Различия в липидном составе ПЛ разных субклеточных образований нервной ткани обусловлены в основном разницей в содержании двух из этих ФЛ: ФС и



Рис. 4. Фосфолипидный состав (в % от суммы ФЛ)—НПЛ (I) и полученных после отмывания НПЛ смесью спирт—эфир (1:1) при -12° (II) и $+23^{\circ}$ (III) ОПЛ митохондрий из коры мозга крысы: 1—линия старта; 2—неидентифицированный; 3—ФЛ, сорбированные на сульфатиде; 4—лизолецитин; 5—МФИ; 6—СФМ; 7—ФХ; 8—неидентифицированный; 9—ФС; 10—ФЭА; 11—ДФГ; 12—ФК. ФЛ в мг/100 мг ПЛ: I—34,53; II—16,61; III—10,84

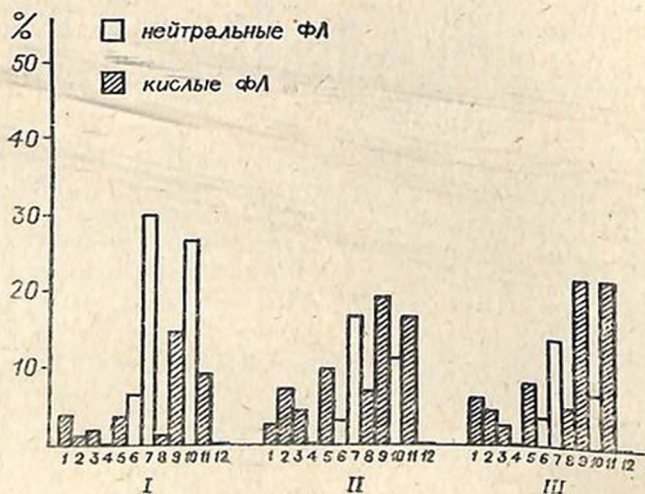


Рис. 5. Фосфолипидный состав (в % от суммы ФЛ)—НПЛ (I) и полученных после отмывания НПЛ смесью спирт—эфир (1:1) при -19° (II) и -12° (III) ОПЛ синапсом из мозга крысы: 1—линия старта; 2—неидентифицированный; 3—ФЛ, сорбированные на сульфатиде; 4—лизолецитин; 5—МФН; 6—СФМ; 7—ФХ; 8—неидентифицированный; 9—ФС; 10—ФЭА; 11—ДФГ; 12—ФК. ФЛ в мг/100 мг ПЛ: I—39,32; II—17,90; III—11,74

ДФГ. Следует отметить, что липидный состав ПЛ определяется в значительной степени общим липидным составом тех структур, где они локализованы. Для миелина и белого вещества мозга, основным кислотным ФЛ которых является ФС, характерно преобладание в ПЛ именно этого ФЛ, а также присутствие в ПЛ двух других преимущественно миелиновых липидов—ТФИ и сульфатида. В ПЛ из митохондрий и серого вещества мозга, а также сердца, преобладающим ФЛ является ДФГ-характерный митохондриальный липид, которому придается важная роль в структуре и функциях митохондриальных мембран.

ПЛ миелина и митохондрий, а также белого и серого вещества мозга, несколько отличаются и по своему белковому компоненту. Для ПЛ из миелина характерно присутствие в белковом составе, кроме белка, соответствующего ПЛ, также белка ДМ-20, тогда как в ПЛ митохондрий присутствует в основном один белок, соответствующий ПЛ, но с несколько более высоким молекулярным весом [25]. N-концевой аминокислотой ПЛ из белого вещества мозга и миелина является глицин, а митохондрий — аспарагиновая кислота [41, 42]. Исследование аминокислотного состава показало, что по сравнению с ПЛ миелина и белого вещества мозга ПЛ митохондрий несколько богаче аспарагиновой кислотой, метионином, пролином, лейцином, изолейцином и беднее глутамином, треонином и тирозином [25, 41, 43].

Сопоставляя данные относительно белкового и липидного компонентов ПЛ из разных субклеточных образований мозга, можно прийти к заключению о существовании по крайней мере двух типов ПЛ: миелинового, присущего белому веществу ЦНС, и митохондриального, более характерного для серого вещества и других органов. ПЛ остальных субклеточных структур являются, возможно, комбинацией в какой-то степени этих двух типов, как, например, ПЛ синапсом. Не исключено, конечно, присутствие в нервной ткани и других ПЛ с иным липидным и белковым составом. Как было показано выше, ПЛ периферической и центральной нервной системы отличаются по липидному составу. Lunt и др. [44] нашли, что с холинорецепторным ПЛ из коры мозга связан в основном МФИ, составляющий 30—33% всех связанных с ПЛ ФЛ. Известное стимулирующее влияние ацетилхолина на обмен МФИ связано именно с этим его пулом.

Таким образом, ПЛ разных субклеточных структур нервной ткани отличаются по своему белковому и особенно липидному компоненту, чем, возможно, определяются в значительной степени различия их функции в зависимости от локализации.

Определенная роль ПЛ в сохранении стабильности мембран, а также в некоторых их функциях, в частности в процессах транспорта ионов, зависит, с одной стороны, от комплексных взаимодействий белка с индивидуальными липидными компонентами, с другой—от влияния самого белка на липидный бислой.

Для изучения некоторых из этих вопросов нами были реконструир-

рованы искусственные мембраны двух типов. С одной стороны, непосредственно из очищенных в разной степени от липидов ПЛ из белого вещества мозга, что оказалось возможным благодаря гидрофобной природе белка ПЛ [45, 46]. С другой — получены устойчивые плоские мембраны из смесей ПЛ с липидами белого вещества мозга [47]. Исследования показали, что сопротивление как протеолипидных, так и липидно-протеолипидных мембран на 2—3 порядка ниже, чем обычных липидных бислоев [45—47]. ПЛ резко снижают сопротивление, т. е. повышают проводимость, при нанесении их на бислойную мембрану из общих ФЛ мозга или добавлении в виде липосом в раствор КСl, окружающий лецитиновую мембрану [45, 46].

Искусственные мембраны, реконструированные из очищенных в разной степени ПЛ из белого вещества мозга, содержащих от 70 до 8—15% липидов, обладают катионной проводимостью, причем во всех случаях проводимость ОПЛ выше, чем НПЛ. Однако, несмотря на большие различия в липидном составе, коэффициенты катионной специфичности всех исследованных ПЛ в отношении одновалентных катионов почти одинаковы и располагаются в следующем порядке: $N_a^+ > K^+ > C_s^+ > L_i^+$ [45, 46]. Пока трудно судить, насколько эти эффекты обусловлены белковой частью ПЛ, насколько липидной и, особенно, связанными с ПЛ кислыми липидами. Гидрофобный белок ПЛ может, с одной стороны, сам создать катионпроводящие пути через мембрану, с другой — вызвать реорганизацию липидов с образованием отрицательно заряженных участков. Показано, что введение этого белка в липосомы приводит к иммобилизации части липидов с образованием так называемого «пограничного» слоя и повышению упорядоченности оставшихся свободными липидов [48]. Поскольку более прочно с белком ПЛ связаны кислые ФЛ, можно предположить, что присутствие этих отрицательно заряженных липидов, сконцентрированных вокруг гидрофобного белка, должно играть важную роль в индуцировании локальной ионной избирательности. О специфической катионной проводимости ПЛ из миелина [49] и некоторых холинорецепторных тканей [50] свидетельствуют и данные других авторов.

В настоящее время в модельных опытах на липосомах и плоских мембранах, реконструированных из смесей ПЛ (в основном апопротенина из миелина) и липидов, с помощью различных физических методов исследования изучено влияние апопротенина на липидный бислой. Показано, что белок ПЛ в основном глубоко погружен в аполярную область липидного бислоя, но часть его выступает в водную фазу [48]. Об этом свидетельствуют и наши исследования, где было обнаружено, что искусственная липиднопротеолипидная мембрана представляет собой мозаику из бислойных липидных участков и протеолипидных утолщений, занимающих около 30% площади поверхности и непосредственно граничащих с водной средой [47].

Каждая молекула апопротенина может повлиять в результате связывания на фазовый переход примерно 142 липидных молекул, что для

глобулярного белка соответствует пограничному слою из 3—4 концентрических слоев ФЛ, окружающих каждую белковую молекулу в мембране [48, 49]. Найдено также, что чрезвычайно малое количество белка ПЛ оказывает, подобно холестерину, выраженное влияние на поверхностную упаковку ФХ головок в мембране [51] и т. д.

Хотя роль ПЛ и связанных с ними липидов пока окончательно не выяснена, можно думать, что белок ПЛ наряду с другими присущими ему функциями должен через изменение физического состояния, фазовых переходов и упорядоченности окружающих липидов играть определенную роль в регуляции метаболизма и функций различных клеточных мембран нервной и других тканей.

LIPID MOIETY OF PROTEOLIPIDS FROM VARIOUS PARTS OF NERVOUS SYSTEM AND BRAIN SUBCELLULAR PARTICLES

MANUKIAN K. H.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

In addition to certain differences lipid moieties to proteolipids (PL) from various parts of nervous system and brain subcellular particles are much alike. All these PL are characterized by the presence of a loosely bound component containing great amount of non-polar lipids and neutral phospholipids, and a tightly bound component, which contains mainly or only acidic lipids.

Differences in lipid composition of PL from various subcellular particles are due mostly to variation in acidic phospholipids content: phosphatidylserine and cardiolipin. The former predominates in PL isolated from myelin and brain white matter and the latter—in PL from mitochondria and brain grey matter. Data on lipid and protein moiety of PL from brain various subcellular particles point to the existence of at least two types of PL: one in myelin and another in mitochondria. Possible function of cell membrane PL and especially their lipid component is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Folch J., Lees M. J. *Biol. Chem.*, 191, 807—817, 1951.
2. Folch-Pi J., Stoffyn P. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 195, 86—107, 1972.
3. Eng L. F., Chao F. C., Gersli B., Pratt D., Tavaststjerna M. G. *Biochemistry*, 7, 1455—1465, 1968.
4. Mehl E., Halaris A. J. *Neurochem.*, 17, 659—668, 1970.
5. Lapetina E. G., Soto B. F., De Robertis E. J. *Neurochem.*, 15, 437—445, 1968.
6. Манукян К. Г., Левонян К. Л., Степанян А. А., Кирикосян Л. Г., Казарян Т. Н. *Вопросы биохимии мозга*, 12, 68—80, Изд-во АН АрмССР, 1977.
7. Murakami M., Ozawa Y., Funahashi S. J. *Biochemistry (Japan)*, 54, 166—172, 1963.
8. Zill L. P., Harmon E. A. *Biochim. Biophys. Acta*, 53, 579—581, 1961.
9. De Robertis E. *Science*, 171, 3975, 963—971, 1971.
10. Fiszer de Plazas S., De Robertis E. J. *Neurochem.*, 23, 1115—1120, 1974.
11. Fiszer de Plazas S., De Robertis E. J. *Neurochem.*, 25, 547—552, 1975.

12. Де Робертис Э. Ж. эвол. биох. и физиол., 12, 213—226, 1976.
13. Beechey R. B., Hubbard S. A., Linnett P. E., Mitchell A. D., Munn E. A. Biochem. J., 148, 533—537, 1975.
14. Cattel K. J., Knight J. G., Lindop C. R., Beechey R. B. Biochem. J., 117, 1011—1013, 1970.
15. Guerin M., Napias C. Biochemistry, 17, 2510—2516, 1978.
16. Racker E., Eytan E. J. Biol. Chem., 250, 7533—7541, 1975.
17. Racker E. J. Cell Physiol., 89, 697—700, 1976.
18. Lees M. B., Sakura D. J., Supristein V. S., Curatolo W. Biochim. Biophys. Acta, 559, 209—230, 1979.
19. Folch-Pi J. In: Proteins of Nervous System (ed. by D. J. Schneider), p. 45—66, N. Y., Raven Press, 1973.
20. Folch J., Lees M., Sloane-Stauley G. H. J. Biol. Chem., 225, 497—509, 1957.
21. Less H. H., Lewin E. J. Neurochem., 12, 205—211, 1965.
22. Lees M. B., Paxman S. Analyt. Biochem., 47, 184—192, 1972.
23. Folch J., Webster G. R., Lees M. Federat. Proc. 18, part 1, 223, 1959.
24. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л. Вопросы биохимии мозга, 7, 140—149, Изд-во АН АрмССР, 1972.
25. Манукян К. Г. Вопросы биохимии мозга, 13, 86—106, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1979.
26. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. Биохимия, 26, 1027—1033, 1961.
27. Манукян К. Г., Бунятыан Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 9, 87—108, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1974.
28. Svennerholm L. J. Neurochem., 1, 42, 1956.
29. Прохорова М. И., Тушикова З. Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену, Л., Изд-во ЛГУ, 1965.
30. Lovern J. A. The Chemistry of Lipids of Biochemical Significance L., Methuen and CO Ltd; N. J., J. Wiley and Sons, 1957.
31. Pritchard E. G., Folch-Pi J. Biochim. Biophys. Acta, 70, 481—483, 1963.
32. Folch-Pi J. Federat. Proc., 23, part 1, 630—633, 1964.
33. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г. Вопросы биохимии мозга, 6, 183—202, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
34. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л., Степанян А. А. Вопросы биохимии мозга, 11, 116—128, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1976.
35. Левонян К. Л., Манукян К. Г. Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека, III Всесоюзн. симп., с. 123—124 Л., Наука, 1978.
36. Tenenbaum D., Folch-Pi J. Biochim. Biophys. Acta, 115, 141—147, 1966.
37. Brazeal P. E., Radin N. S. Biochemistry, 8, 4310—4318, 1969.
38. Londin Y., Demel R. A., Geurts van Kessel W. S. M., Zahler P., Van Deenen L. L. M. Biochim. Biophys. Acta, 332, 69—81, 1974.
39. Boggs J. M., Wood D. D., Moscarello M. A., Parahadjopoulos D., Biochemistry, 15, 2325—2329, 1977.
40. Draper M., Lees M. B., Chan D. S. J. Neurochem., 31, 1095—1099, 1978.
41. Whiteheart D. R., Lees M. B. J. Neurochem., 20, 1303—1315, 1973.
42. Казарян Т. Н., Манукян К. Г. Биол. ж. Армении, 34, 502—505, 1981.
43. Манукян К. Г., Степанян А. А., Арутюнян Д. Л., Киракосян Л. Г. Биол. ж. Армении, 34, 878—880, 1981.
44. Lunt G. G., Canessa O. M., De Robertis E. Nature, New Biol., 239, 14, 187—190, 1971.
45. Бабожиян С. А., Манукян К. Г. ДАН СССР, 250, 1262—1265, 1980.
46. Бабожиян С. А., Манукян К. Г. Биофизика, в печати.
47. Гюльханджян М. З., Манукян К. Г. Биофизика, 27, 258—262, 1982.

48. *Curatolo W., Sakura J. D., Small D. M., Shipley G. G.* Biochemistry, 16, 2313—2319, 1977.
49. *Papahadjopoulos D., Vatt W. J., Moscarello M. A. J.* Membr. Biol., 22, 143—164, 1975.
50. *Adragna N. C., Salas P. J. I., Parisi M., De Robertis E.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 110—117, 1975.
51. *Sears B., Curatolo W., Janiak M. J., Tall A., Sakura J. D., Shipley G. G., Small D. M., Neuringer L.* J. Biophys. J., 21, 213a, 1978.

Институт биохимии
АН Армянской ССР, Ереван

Поступила 15.XII 1981

УДК 612.82.015.348.017.1—08

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИСЫВОРОТОК К ОПИОИДНЫМ ПЕПТИДАМ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИХ СОЕДИНЕНИЙ

ДМИТРИЕВ А. Д., ГОЛИКОВА Ю. И., КОБЫЛЯНСКИЙ А. Г.,
САМОВИЛОВА Н. Н., ТРУШИНА Е. Д., ЯРЫГИН К. Н.,
БЕСПАЛОВА Ж. Д., АЗЬМУКО А. А., САКС Т. Р.

Антисыворотки к синтетическим лейцин- и метионин-энкефалинам, а также α -, β - и γ -эндорфинам получены путем многократной иммунизации кроликов олигопептидами, которые были ковалентно связаны с бычьим сывороточным альбумином с помощью бис-диазотированного бензида. Лучшие антисыворотки использовались для радиоиммунологического определения пептидов в конечном разведении от 1:4000 до 1:48000. Чувствительность методов—менее 10 пг в пробе. Все антисыворотки характеризовались высокой специфичностью и давали минимальную перекрестную реакцию с энкефалинами, эндорфинами и β -липотропином. Показано, что экстракты мозга и соответствующий опиоидный пептид одинаковым образом вытесняют ^{125}I -пептид из его комплекса со специфической антисывороткой.

Энкефалины и эндорфины—группа пептидов с опиоидными свойствами, которые были выделены из экстрактов мозга [1—4]. Эндорфины по своей первичной структуре соответствуют фрагментам 61—76 [2], 61—91 [3, 4], 61—77 [5] и 61—87 [4] β -липотропина и обозначаются α -, β -, γ - и σ -эндорфины соответственно. Met-энкефалин также является фрагментом 61—65 β -липотропина [3, 4]. Кроме того, описаны высокомолекулярные предшественники Leu- и Met-энкефалинов, отличные от β -липотропина [6—9]. Для определения опиоидных пептидов были предложены конкурентные методы, основанные на способности этих соединений связываться с опиатными рецепторами мозга [10, 11]. Однако в экстрактах тканей эти методы позволяют определять лишь сумму опиоидных пептидов. В настоящее время разработаны радиоиммунологические методы определения энкефалинов и эндорфинов [12—17], но в некоторых случаях используемые антисыворотки характеризовались низкой специфичностью [15, 18]. Антисыворотки к Leu- и Met-энкефалинам, а также α -, β - и γ -эндорфинам, описанные в настоящей работе, при их использовании для радиоиммунологического определения сочетают высокую чувствительность и специфичность в отношении β -липотропина и его фрагментов.

Материалы и методы

Синтез пептидов и тестирование их биологической активности. Опиоидные пептиды (Leu-энкефалин, Met-энкефалин, α -эндорфин и γ -эндорфин) были получены классическими методами пептидной химии [19]. Гомогенность пептидов проверялась с помощью тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрофореза на бумаге [19]. Биологическую активность пептидов определяли, используя классические тесты с семьявыводящим протоком мыши и подвздошной кишкой морской свинки. Определялась также анальгезирующая активность пептидов [20, 21]. Кроме того, тестировалась способность всех пептидов конкурировать с ^3H -налоксоном за связывание с рецепторами опиатов мозга крысы [22].

Получение иммуногенных конъюгатов. Конъюгацию эндорфинов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) проводили с помощью бисдиазотированного бензидина (БДБ) [23]. Молярное отношение пептид: БСА: БДБ в инкубационной смеси равнялось 20:1:40. Опиоидные пептиды, БСА и БДБ смешивали в 5—10 мл 0,16 М боратного буфера pH 9 с 0,15 М NaCl. К инкубационной смеси добавляли 10^6 имп/мин соответствующего ^{125}I -пептида. Реакцию проводили в ледяной бане 1 ч; связывание пептида с БСА оценивали по убыли радиоактивности [^{125}I], связывающейся с углем; аликвоту инкубационной смеси объемом 5 мкл смешивали с 200 мкл суспензии угля (10 мг/мл) в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,5 с 0,2% БСА; после центрифугирования (1000 g, 10 мин) оценивали радиоактивность в супернатанте и осадке. Реакционную смесь анализировали при $+4^\circ$ против дистиллированной воды до исчезновения в ней радиоактивности и еще 1 сутки против 0,15 М NaCl. Конъюгаты хранили при -40° в пластиковых пробирках.

Иммунизация кроликов. Для первой иммунизации 1 мг конъюгата доводили до 1 мл 0,15 М NaCl, добавляли равный объем полного адьюванта Фрейнда и эмульгировали смесь путем обработки ультразвуком. По 0,2 мл эмульгата вкалывали в подушечку каждой из лап кролика. Оставшуюся часть инъецировали подкожно в 10—12 точек спины. Последующие иммунизации проводили с месячным интервалом подкожно в 8—10 точек спины, используя 0,2—0,5 мг конъюгата в 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда.

Радиоиммунологическое определение опиоидных пептидов. Все компоненты инкубационной смеси растворяли в буфере: 0,05 М фосфат pH 7,5 с 0,15 М NaCl, 0,2% БСА и 0,02% азида натрия (РИО-буфер). Инкубационная смесь объемом 0,4 мл содержала: ^{125}I -пептид— 10^5 имп/мин в 0,1 мл, антисыворотку в соответствующем разведении—0,1 мл, стандартное количество эндорфина или неизвестный образец—0,1 мл, РИО-буфер—до 0,4 мл. Пробы инкубировали 18—24 ч при $+4^\circ$. Для отделения связавшихся с антителами энкефалинов, а также α - и γ -эндорфинов от «свободных», к инкубационной смеси добавляли 0,1 мл нейтральной сыворотки, разведенной РИО-буфером в 5 раз и 0,5 мл насыщенного при $+4^\circ$ раствора сульфата аммония. Через 30 мин про-

бы центрифугировали (2000 g, 0°, 15 мин) и регистрировали радиоактивность в осадках. Для осаждения связавшегося с антисывороткой ^{125}I - β -эндорфина в пробы добавляли 0,05 мл нейтральной сыворотки, разведенной в 100 раз, и 0,05 мл антисыворотки барана к γ -глобулину кролика. После инкубации в течение 18—24 ч при +4° пробы центрифугировали (2000 g, 0°, 20 мин) и определяли радиоактивность в осадках, используя γ -счетчик ЛКВ.

Получение экстрактов мозга. В опытах использовали беспородных крыс массой 120—150 г без учета пола. Немедленно после декапитации животных вскрывали черепную коробку, извлекали мозг, промывали его холодным 0,15 М NaCl, взвешивали и помещали в 0,2 М HCl (5—6 объемов по отношению к весу). Пробы прогревали в кипящей водяной бане 10 мин и размельчали на холоду в гомогенизаторе стекло-стекло. Экстракты центрифугировали (2000 g, 0°, 20 мин), осадок отбрасывали, а супернатант замораживали в жидком азоте. После оттаивания пробы нейтрализовали до pH 7 1 М NaOH с 0,2 М Na_2HPO_4 , образовавшийся осадок удаляли центрифугированием, а супернатант использовали для радиоиммунологического определения опиоидных пептидов.

Получение йодированных пептидов. Опиоидные пептиды йодировали хлораминовым методом [14]. Йодированные пептиды отделяли от свободного [^{125}I] гель-фильтрацией на Био-геле Р-2 [14].

Результаты и обсуждение

При конъюгации Leu-энкефалина с БСА с помощью бис-диазотированного бензидаина около 60% олигопептида ковалентно связывалось с белком в течение часа (рис. 1), и дальнейшая инкубация не приводила к увеличению связывания. Для других опиоидных пептидов связывание также было близко к 60%. Учитывая молярное отношение компонентов реакции в инкубационной смеси, следует заключить, что 12 молекул пептида ковалентно связывалось с одной молекулой БСА, что составляло около 10 мкг Leu- и Met-энкефалинов, 30 мкг α - и γ -эндорфинов и 60 мкг β -эндорфина на 100 мкг БСА. При использовании в качестве конъюгирующего агента карбодимид с БСА связывается около 6 молекул пептида [23]. БДБ связывает пептид с белком через остатки тирозина или гистидина; в молекулах энкефалинов, α - и γ -эндорфинов один остаток тирозина—Tyr¹, в молекуле β -эндорфина верблюда, который использовался для приготовления иммуогенных конъюгатов, таких остатков два—Tyr¹ и His²⁷. В то же время молекулы эндорфинов насчитывают несколько свободных карбоксил- и аминогрупп, через которые пептид связывается с белком при использовании карбодимидов. Таким образом, конъюгация карбодимидом в сравнении с бис-диазотированным бензидином приводит к большему разнообразию мест связывания эндорфинов с белком, что, по-видимому, уменьшает специфичность антисывороток, особенно в случае β -эндорфина.

Для получения антисывороток иммунизировали 12 кроликов:

двух—конъюгатами γ -эндорфина, по два животных конъюгатами энкефалинов и по три животных конъюгатами α - и β -эндорфинов. У всех кроликов после пятой—седьмой иммунизации обнаруживались антитела к соответствующему олигопептиду. Лучшие сыворотки связывали 40—50% ^{125}I -пептида в следующих конечных разведениях: антисыворотка (АС) № 80 к α -эндорфину—1:40000, АС № 50 к β -эндорфину—1:6000, АС № 17 к Leu-энкефалину—1:8000, АС № 19 к Met-энкефалину—1:3200 и АС № 49 к γ -эндорфину—1:40000.

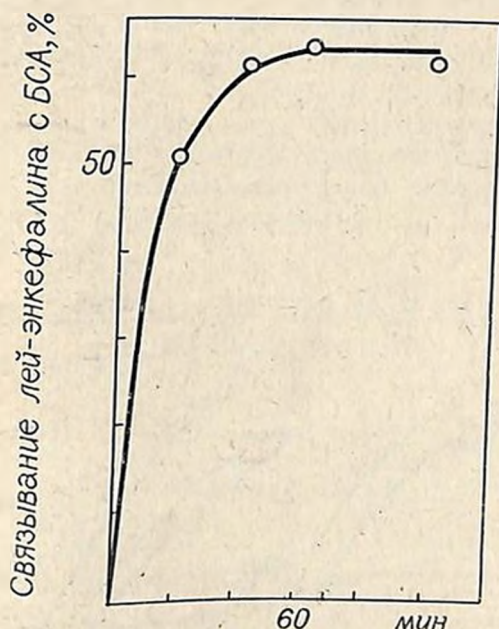


Рис. 1. Конъюгация Leu-энкефалина с бычьим сывороточным альбумином с помощью бис-диазотированного бензидаина.

К 20 мкл инкубационной смеси, отобранной в указанный момент времени, добавляли 380 мкл 1% суспензии (вес/объем) смеси активированного угля с декстраном Т70 в отношении 9:1 в РИО-буфере. После центрифугирования регистрировали радиоактивность [^{125}I] в осадке и супернатанте

Специфичность антисывороток определяли радиоиммунологическим методом. Рис. 2 иллюстрирует определение специфичности АС № 50 к β -эндорфину. Доза β -эндорфина, которая на 50% ингибирует связывание [^{125}I] β -эндорфина с антисывороткой, составляла 200 пг. В той же системе γ -эндорфин подавлял связывание наполовину при концентрации 30 пг. Отношение дозы β -эндорфина, подавлявшей связывание наполовину, к соответствующей концентрации γ -эндорфина равнялось 0,8%. Эта величина и характеризует перекрестную реакцию АС № 50 к β -эндорфину в отношении γ -эндорфина. Сходным образом определялась специфичность всех исследованных антисывороток к эндорфинам в отношении α -, β -, γ - и Des-Tyr¹- γ -эндорфинов, Leu- и Met-энке-

фаллинов и β -липотропина*. Эти данные представлены в табл. 1. Можно видеть, что АС № 50 к β -эндорфину давал минимальную перекрестную реакцию с другими эндорфинами и практически нулевую с энкефалинами; ее перекрестная реакция с β -липотропином составляла 6,6%. Описанная система для радиоиммунологического определения β -эндорфина человека является гетерологичной: иммуногенные конъюгаты получали, используя β -эндорфин верблюда (фирма «Serva»), а для йодирования и приготовления стандартов применяли β -эндорфин человека (фирма «Вексман»). β -Эндорфин верблюда в сравнении с β -эндорфином человека имеет две аминокислотных замены: гистидин в 27 положении заменен на тирозин и С-концевой глутамин—на глутаминовую кислоту. Несмотря на гетерологичность системы радиоиммунного тестирования, она характеризовалась высокой чувствительностью и специфичностью. Большинство описанных сывороток к β -эндорфину обладает гораздо худшей специфичностью, особенно в отношении β -липотропина [18].

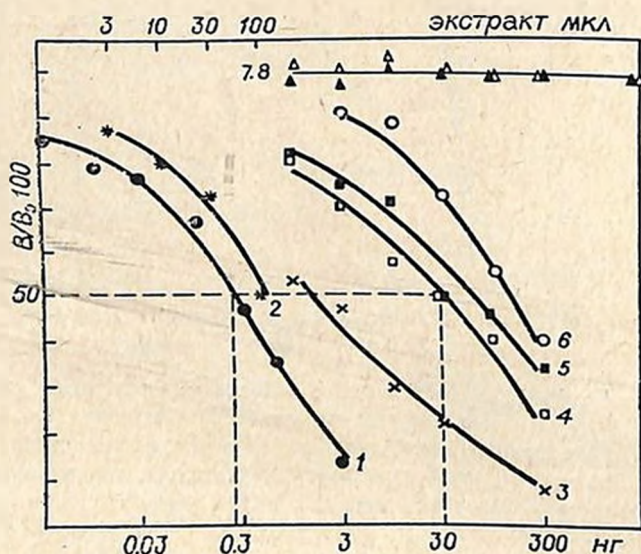


Рис. 2. Специфичность антисыворотки № 50 к β -эндорфину: 1— β -эндорфин, 2—экстракт, 3— β -липотропин, 4— γ -эндорфин, 5—Des-Tyr¹- γ -эндорфин, 6— α -эндорфин, 7—Leu-энкефалин, 8—Met-энкефалин; V_0 —связывание ^{125}I - β -эндорфина с антисывороткой в отсутствие конкурирующего агента; V —то же при определенной концентрации пептида или экстракта

Хорошей специфичностью характеризовалась АС № 80 к α -эндорфину. Ее перекрестная реакция с γ -эндорфином равнялась 14% (табл. 1), хотя оба олигопептида отличаются лишь одним аминокислотным остатком на С-конце—Leu⁷⁷ β -липотропина. Des-Tyr¹- γ -эндорфин обладал той же перекрестной реакцией, что и γ -эндорфин, а для β -эндорфина

* β -липотропин быка был любезно предоставлен проф. Ю. А. Паиковым (Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов, Москва)

эта величина была значительно ниже и составляла 2,6%. Перекрестная реакция с энкефалинами и β -липотропином практически равнялась нулю.

Антисыворотка № 49 к γ -эндорфину также обладала высокой специфичностью и давала минимальную перекрестную реакцию с α - и β -эндорфинами, энкефалинами и β -липотропином (табл. 1). Однако ее перекрестная реакция в отношении Des-Tyr¹- γ -эндорфина была очень высока и составляла 50%, что позволило определить сумму γ - и Des-Tyr¹- γ -эндорфинов.

Таблица 1

Характеристика антисывороток к эндорфинам			
Пептид	Перекрестная реакция, %		
	Антисыворотка № 80 к α -эндорфину	Антисыворотка № 50 к β -эндорфину	Антисыворотка № 49 к γ -эндорфину
α -эндорфин	100	0,15	0,25
β -эндорфин	2,6	100	4,4
γ -эндорфин	14	0,8	100
Des-Tyr ¹ - γ -эндорфин	14,2	0,66	60
Leu-энкефалин	<0,02	<0,02	<0,02
Met-энкефалин	<0,02	<0,02	<0,02
β -липотропин	0,34	6,6	0,5
Чувствительность 50% вытеснения*	2—5 пкг 30—50 пкг	5—10 пкг 150—200 пкг	2—5 пкг 30—50 пкг

Примечание. Специфичность рассчитывали, исходя из концентрации конкурирующих агентов, выраженной в единицах веса.

* концентрация эндорфина, при которой на 50% ингибируется связывание [25I]-эндорфина с соответствующей антисывороткой.

Таблица 2

Характеристики антисывороток к Leu- и Met-энкефалинам		
Пептид	Перекрестная реакция, %	
	Антисыворотка № 17 к Leu-энкефалину	Антисыворотка № 19 к Met-энкефалину
Leu-энкефалин	100	5,8
Met-энкефалин	0,93	100
β -эндорфин	<0,01	<0,1
β -липотропин	<0,01	<0,1
Брадикинин	<0,01	<0,1
Чувствительность 50% вытеснения	3—5 пкг 30—50 пкг	100—200 пкг 1—3 пг

См. пояснения к табл. 1.

Специфичность антисывороток к Leu- и Met-энкефалинам определяли в отношении следующих пептидов: энкефалинов, β -эндорфина, β -липотропина и брадикинина (табл. 2). Можно видеть, что АС № 17 к Leu-энкефалину давала перекрестную реакцию с Met-энкефалином (5,8%); перекрестная реакция в отношении β -эндорфина, β -липотропина и брадикинина была менее 0,03%. Антисыворотка № 19 к Met-эн-

кефалину характеризовалась более высокой специфичностью: ее перекрестная реакция в отношении Leu-энкефалина составляла 1%, а с другими пептидами — менее 0,1% (табл. 2).

Все антисыворотки помимо высокой специфичности характеризовались высокой чувствительностью и позволяли уверенно определять менее 10 пг пептида в пробе. Исключение составляла АС № 19 к Met-энкефалину: чувствительность метода при использовании этой антисыворотки не превышала 100 пг пептида в пробе; вероятно, при использовании двухстадийной инкубации [18] чувствительность метода несколько возрастет.

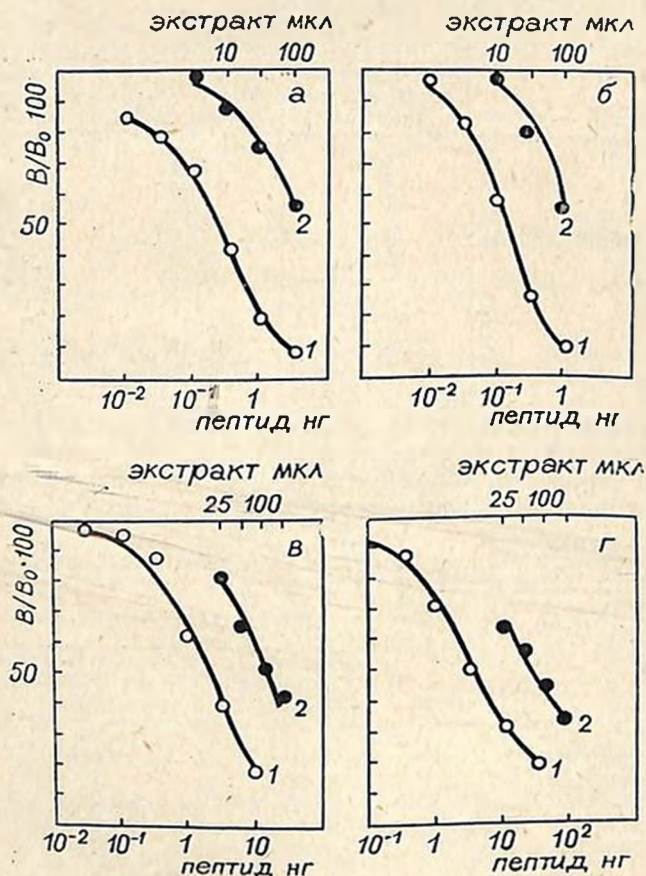


Рис. 3. Конкуренция экстрактов мозга крысы с ^{125}I -опиатными пептидами за связывание со специфической антисывороткой: B_0 — связывание ^{125}I -пептида со специфической антисывороткой в отсутствие конкурирующего агента; B — то же при определенной концентрации синтетического пептида (1) или экстракта (2). а — α -эндорфин, б — γ -эндорфин, в — Leu-энкефалин, г — Met-энкефалин

Пригодность сывороток для радиоиммунологического определения эндорфинов и энкефалинов в экстрактах мозга крысы оценивалась по их способности конкурировать с соответствующим ^{125}I -пептидом за связывание со специфической антисывороткой. Рис. 2 и 3 иллюстри-

руют конкуренцию экстрактов с соответствующими ^{125}I -пептидами. Можно видеть, что характер конкуренции синтетического пептида и экстрактов за связывание со специфической антисывороткой идентичен в случае α - (рис. 3, а), β - (рис. 2) и γ -эндорфинов (рис. 3, б), а также Leu- и Met-энкефалинов (рис. 3, в и г соответственно). Подобный ход кривых конкуренции свидетельствовал о родственности или полной идентичности конкурирующей субстанции мозговых экстрактов с соответствующим синтетическим пептидом. Таким образом, полученные нами антисыворотки позволяют весьма специфично определять содержание энкефалинов и эндорфинов в нефракционированных экстрактах мозга.

SPECIFIC ANTISERA TO OPIOID PEPTIDES: PREPARATION AND USING FOR RADIOIMMUNOASSAY OF THESE PEPTIDES

DMITRIEV A. D., GOLIKOVA U. I., KOPYLYANSKY A. G., SAMOVILOVA N. N., TRUSHINA E. D., YARYGIN K. N., BESPALOVA J. D., AZMUKO A. A., SAKS T. P.

Institute of Psychiatry of the USSR Academy of Medical Sciences, Research Laboratory of the USSR Ministry of Public Health, All-Union Cardiological Center of the USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The preparation of highly specific antisera to synthetic Leu- and Met-enkephalins and α -, β - and γ -endorphins is described. Antisera were raised in rabbits by prolonged immunization using peptides conjugated to bovine serum albumine by bis-diazotized benzidine. The best antisera have been used for radioimmunoassay of peptides in final dilution from 1:4000 to 1:48000. The sensitivity of the assay was higher than 10 pg/tube for leu-enkephalin, α -, β - and γ -endorphin and 100 pg/tube for met-enkephalin. All antisera are characterized by high specificity and exhibit minimal cross-reactivity to enkephalins, endorphins and β -lipotropin. The inhibition of binding of ^{125}I -peptides in the RIA by rat brain extract was parallel to the inhibition curve produced by the addition of unlabeled peptides.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hughes J. T., Smith T. V., Kosterlitz H. W., Fothergill Y. A., Morgan B. A., Morris H. R. *Nature*, 258, 577—579, 1975.
2. Guillemin R., Ling N., Burgus R. C. R. *Acad. Sci.*, 232, 783—785, 1976.
3. Li C. H., Ching D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1145—1148, 1976.
4. Bradbury A. F. D., Smyth D. G., Snell C. R., Birdsall N. J. M., Hulme E. C. *Nature*, 250, 793—795, 1976.
5. Bradbury A. F. D., Feldberg W. F., Smyth D. G., Snell C. R.—in: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides* (Kosterlitz H. W. ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 9—17, 1976.
6. Lewis R. V., Stern A. S., Kimura S., Rossier J., Stein S., Udenfriend S. *Science*, 203, 4451, 1459—1461, 1980.
7. Kimura S., Lewis R. V., Stern A., Rossier J., Stein S., Udenfriend S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1681—1685, 1980.
8. Brownstein M. J. *Nature*, 287, 678—679, 1980.

9. Goldstein A., Chazarossian V. E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6207—6210, 1980.
10. Hazum E., Chang K. J., Cuatrecasas P. J. Biol. Chem., 254, 1765—1767, 1979.
11. Simantov R., Childers S. R., Snyder S. H. Brain Res., 135, 358—367, 1977.
12. Weissman B. A., Gershon H. FEBS Lett., 70, 245—248, 1976.
13. Yang H. Y., Hong G. S., Costa E. Neuropharmacology, 16, 303—307, 1977.
14. Miller R. G., Chang K., Cooper B., Cuatrecasas P. J. Biol. Chem. 253, 531—538, 1978.
15. Rossier J., Bayon A., Vargo T. M., Ling N., Guillemin R., Bloom F. Life Sci., 21, 847—852, 1977.
16. Jégou S., Tonon M. Ch., Leboulenger F., Delarue C., Vaudry H., Ling N. Biochem. Biophys. Res. Com., 83, 201—208, 1978.
17. Guillemin R., Ling N., Vargo T. Biochem. Biophys. Res. Com., 77, 361—366, 1977.
18. Rossier J., Vargo T. M., Minick S., Ling N., Bloom F. E., Guillemin R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5162—5165, 1977.
19. Methoden der organischen chemie synthese von peptiden (ed. Wuensch E.). Georg Thieme verlag, Stuttgart, 1974.
20. Alder M. W. Life Sci., 26, 497—510, 1980.
21. Opmeer F. A., Vanree J. M. Eur. J. Pharmacol., 53, 395—397, 1979.
22. Pert C. B., Snyder H. S. Mol. Pharmacol., 10, 868—879, 1974.
23. Bassiri R. M., Utiger R. D. Endocrinology, 90, 722—727, 1972.

Институт психиатрии АМН СССР,
 Центральная научно-исследовательская
 лаборатория Четвертого главного
 управления при МЗ СССР,
 Всесоюзный кардиологический центр
 АМН СССР, Москва

Поступила 24. XI 1981

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.8.015

ЦИТОФОТОМЕТРИЯ СОДЕРЖАНИЯ СУММАРНЫХ БЕЛКОВ
В СИСТЕМАХ НЕЙРОН — НЕЙРОГЛИЯ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ХОДЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО
ОНТОГЕНЕЗА

ГЛУЩЕНКО Т. С., ВОЛЬФ Г.

Исследования постнатального онтогенеза головного мозга позволили выявить региональные отличия в динамике его морфологического и биохимического созревания. Некоторые отделы ствола головного мозга, например гипоталамо-гипофизарная система, функционально активны уже к моменту рождения [1—3]. Развитие серого и белого веществ больших полушарий [4—6] и гиппокамповой формации [7] идет в основном в ходе постнатального развития, характеризующегося качественными и количественными изменениями в формировании морфологических структур, химического состава, становления физиологических и биохимических функций этих структур.

Морфологические данные, свидетельствующие о постепенном созревании различных отделов головного мозга, могут быть удобным параметром при их исследовании во время функциональной активности. В частности показано, что формирование нейронов сопровождается закономерными изменениями количества белка в их ядрах, цитоплазме и отростках.

Учитывая различия в динамике не только морфологического, но и биохимического созревания нейронов и глиальных клеток, нам представлялось интересным сопоставить возрастные изменения содержания суммарных белков в системах нейрон—нейроглия функционально различных полей гиппокампа и двигательной зоны коры больших полушарий.

Работа была выполнена на 10-, 15-, 20-, 25- и 90-дневных крысах линии Вистар. Исследуемые группы составляли из животных одного помета. Головной мозг фиксировали в смеси Карнуа в течение 1 ч с последующей общепринятой гистологической обработкой и заливкой в парафин. В срезах толщиной 5 мкм в пирамидных нейронах и клетках глиии полей СА₂, СА_{3а}, СА_{3б} и СА_{3с} гиппокампа и V слое двигательной зоны коры больших полушарий определяли содержание суммарных белков после окраски срезов амидочерным 10Б при pH 5,32 [8, 9]. Оптическую плотность клеток измеряли на микроспектрофотометре

МЦФУ-1 одноволновым методом на краю полосы поглощения при 685 нм [10].

Весь цифровой материал (по 100—120 клеток от 6 животных в каждой серии) обрабатывали статистически по Стьюденту—Фишеру.

Таблица

Содержание суммарных белков в системах нейрон—нейроглия разных полей гиппокампа и двигательной зоны коры больших полушарий в ходе постнатального развития

Отдел головного мозга	Возраст	Тело нейрона	Ядро нейрона	Глия
<i>Гиппокамп</i> поле СА ₂	10 дней	0.094±0.001	0.075±0.001	0.073±0.002
	15	0.101±0.001	0.083±0.002	0.089±0.002
	20	0.140±0.002	0.126±0.004	0.134±0.003
	25	0.176±0.001	0.140±0.002	0.135±0.003
	90	0.131±0.002	0.117±0.003	0.119±0.003
поле СА _{3а}	10 дней	0.104±0.002	0.084±0.001	0.089±0.002
	15	0.114±0.003	0.088±0.004	0.099±0.003
	20	0.157±0.003	0.140±0.004	0.145±0.002
	25	0.180±0.001	0.154±0.002	0.155±0.002
	90	0.147±0.002	0.120±0.002	0.126±0.003
поле СА _{3б}	10 дней	0.109±0.002	0.073±0.001	0.080±0.002
	15	0.125±0.003	0.102±0.003	0.111±0.003
	20	0.159±0.003	0.143±0.004	0.147±0.003
	25	0.196±0.002	0.150±0.003	0.169±0.004
	90	0.154±0.002	0.141±0.002	0.121±0.002
поле СА _{3с}	10 дней	0.100±0.001	0.074±0.001	0.079±0.002
	15	0.125±0.003	0.098±0.003	0.097±0.003
	20	0.186±0.004	0.142±0.001	0.137±0.004
	25	0.189±0.002	0.152±0.004	0.163±0.004
	90	0.145±0.002	0.110±0.003	0.118±0.003
V слой двигательной зоны коры больших полушарий	10 дней	0.116±0.001	0.086±0.001	0.093±0.002
	15	0.098±0.001	0.092±0.003	0.084±0.002
	20	0.139±0.003	0.114±0.003	0.128±0.003
	25	0.158±0.002	0.145±0.003	0.141±0.002
	90	0.125±0.001	0.121±0.002	0.110±0.002

Как видно из таблицы, у 10- и 15-дневных крысят содержание суммарных белков в телах нейронов, отдельно в их ядрах и клетках глии во всех исследованных полях гиппокампа было приблизительно одинаковым. К 20-му дню постнатального развития содержание суммарных белков оказалось наиболее высоким в телах нейронов (более выражено в полях СА₂, СА_{3а} и СА_{3с}); оно было увеличено также в ядрах нейронов и в глиоцитах, причем наибольшее повышение имело место в поле СА_{3а}. Примерно такой же уровень содержания суммарных белков во всех исследованных структурах гиппокампа сохранялся и у 25-дневных крысят. У 90-дневных же животных, мозг которых по морфологическим и биохимическим параметрам был уже полностью сформирован, содержание белков в телах, ядрах нейронов и глиоцитах всех полей гиппокампа, за исключением СА_{3б}, несколько снижалось.

Следовательно, содержание суммарных белков претерпевает дальнейшие изменения в ходе постнатального развития животных после завершения стадии нейрогенеза.

Динамика содержания суммарных белков в нейронах, их ядрах и глиальных клетках двигательной зоны коры больших полушарий в

процессе постнатального развития в общем была такой же, как и в гиппокампе, с наибольшей величиной у 20- и 25-дневных животных.

Таким образом, в ходе постнатального развития отмечена односторонненность сдвигов содержания суммарных белков в системах нейрон—нейроглия во всех исследованных полях гиппокампа и в двигательной зоне коры больших полушарий.

В телах пирамидных нейронов гиппокампа, их ядрах и глиальных клетках повышенное содержание белков было отмечено на том этапе постнатального развития, когда в этой структуре головного мозга период формирования нейронов практически завершен [5]. Данные же ряда авторов [11, 12] показывают, что внутреннее развитие и усложнение синаптических контактов гиппокампа продолжают значительно дольше, превышая 20 дней постнатального онтогенеза. При этом имеются также доказательства [13] и определенного участия глиальных клеток в формировании синаптических контактов. По-видимому, содержание суммарных белков в системе нейрон—нейроглия различных структур нервной системы отчетливо коррелирует не с нейрогенезом, а с развивающимся синаптогенезом.

ON CYTOPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TOTAL PROTEIN CONTENT IN NEURON-NEUROGLIA SYSTEM FROM DIFFERENT RAT BRAIN AREAS IN THE COURSE OF POSTNATAL ONTOGENESIS

GLUSCHENKO T. S., VOLF G.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Institute of Biology and Anatomy of DDR Medical Academy, Magdeburg

In the course of postnatal development (10-, 15-, 20-, 25- and 90 days) a universal trend in the shift of total protein content has been detected in neuron-neuroglia system from all areas of hippocampus tested (CA₂, CA₃₁, CA₃₃, CA₃₂) and from motor zone of cerebral hemispheres cortex with maximal value in 20- and 25-days' animals apparently total protein content in neuron-neuroglia system distinctly correlates with developing synaptogenesis and not neurogenesis.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Swaab D. F., Boer G. J., Boer K., Dogterom J., van Leeuwen F. W., Visser M. —In: Maturation of the nervous system (Eds. H. B. M. Uylings), Amsterdam, N. Y.: Elsevier North-Holland Biomedical Press, 277—289, 1978.
2. Wolf G., Trautmann B. *Endokrinologie*, 69, 222—226, 1977.
3. Khachaturian H., Sladek J. B. *Peptides*, 1, 77—95, 1980.
4. Corner M. A., Baker R. E., Poll N. E., van de, Swaab D. F., Uylings H. B. M., Maturation of the nervous system (Eds. Uylings H. B. M.), Amsterdam, N. Y.: Elsevier North-Holland Press, 1978.
5. Angevine J. B. —In: R. L. Isaacson and K. H. Pribram (eds.): *The hippocampus* 1. N. Y., London: Plenum Press, 61—94, 1975.
6. Altman J. J. *Comp. Neurol.*, 45, 399—464, 1972.

7. Виноградова О. С. Гиппокамп и память, М., Наука, 1975.
8. Geyer G. Acta Histochem., 10, 5/8, 286—292, 1960.
9. Брумберг В. А., Певзнер Л. З. Цитология, 14, 674—676, 1972.
10. Агроскин Л. С., Папаян Г. В. Цитофотометрия, Л., Наука, 1977.
11. Altman J., Bayer S.—In: R. L. Isaacson and K. H. Pribram (Eds.) The hippocampus, 1, N. Y., London, Plenum Press, 95—122, 1975.
12. Stirling V., Bliss T. V. P.—In: Maturation of the nervous system (Eds. H. B. M. Uylings), Amsterdam, N. Y. Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1978.
13. Watson W. E. Brit. Med. Bull., 30, 112—115, 1974.
14. Campbell B. A., Spear N. E. Psychol. Rev., 79, 215, 1972.
15. Glushchenko T. S., Pevzner L. Z., Klenikova V. A. Pharmacol. Biochem. Behavior, 11, 593—594, 1979.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
АН СССР, Ленинград
Институт биологии и анатомии
Медицинской академии, Магдебург (ГДР)

Поступила 16. XI 1981

АТРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОТРУБОЧЕК МОЗГА

ГЛЕБОВ Р. Н., КРЫЖАНОВСКИЙ Г. Н.

Существуют две различные сократительные системы: система актин—миозин, состоящая из актиновых микрофиламентов (d 6—8 нм) и миозиновых фибрилл (d 14 нм), и система тубулин—динени, состоящая из микротрубочек (d 25 нм). В микротрубочках мозга, по-видимому, может содержаться динениновая АТРаза. Как известно, динени ресничек и жгутиков отличается от миозина скелетных мышц по значению молекулярной массы (M), составу субъединиц, чувствительности к ионам K^+ и является Mg^{2+} -АТРазой.

Satir [2] впервые обратил внимание на то, что системы актин—миозин и тубулин—динени в некоторых клетках могут действовать антагонистично, так что повышение концентрации Ca^{2+} в клетке включает первую и выключает вторую. Может быть, этот антагонизм открывает в эволюции дополнительную возможность регуляции различных форм движения. Примером антагонизма может служить факт, что миозин скелетных мышц, добавленный к микротрубочкам мозга, разрушает их, по-видимому, за счет истощения запасов GTP, приводя таким образом к деполимеризации микротрубочек [3]. Обнаружено [4], что миозин скелетных мышц кролика связывается с тубулином мозга, это связывание было АТР-зависимым. Тубулин мозга препятствует образова-

нию комплекса актомиозина при взаимодействии миозина с актином. 6S-тубулин снижает Mg^{2+} -АТФазную активность актомиозина. В последующей работе было показано [5], что коллагин и Ca^{2+} не влияют на связывание миозина скелетных миоцитов кролика с тубулином мозга свиньи. Одно из двух мест связывания у миозина оказалось общим с тубулином и актином. В этих опытах отмечается, что тубулин не влияет на Mg^{2+} -АТФазную активность миозина.

Микротрубочки способны связываться с актином, образуя стабильную сеть, при этом происходит поперечное сшивание фибрилл [6]. В дальнейшем выяснено [7], что актиновые микрофиламенты связываются с высокомолекулярными белками, ассоциированными с микротрубочками, но не связываются с тубулином. Природа этого белок-белкового взаимодействия пока не ясна. Интересно отметить, что в этих условиях актин не стимулирует АТФазную активность указанных высокомолекулярных белков.

Дать окончательную оценку вышенприведенным данным пока трудно, однако они указывают на определенную взаимосвязь двух сократительных систем.

Рассмотрим экспериментальные данные об АТФазной активности микротрубочек мозга. Впервые динениподобный белок из мозга выделен в 1974 г. [8]. Он был сходен с классическим диненином по значениям M и R_f . Одновременно появилась работа по выделению динениподобной АТФазы из препаратов микротрубочек мозга [9], хотя и с меньшей активностью, чем диненин. Возможно, что динениподобный белок мозга активен тогда, когда он связан функционально с интактными микротрубочками. Если диненин состоит из двух изоформ с константами седиментации 14 и 30 S, то динениподобный белок состоит из двух изоформ, но с другими значениями констант седиментации—18 и 23 S. Это различие могло быть связано с процедурой выделения.

В недостаточно очищенном препарате тубулина обнаруживается АТФазная активность [10], однако в очищенном тубулине эта активность отсутствует [11]. В составе препарата тубулина мозга находятся связанные с тубулином высокомолекулярные белки, которые регулируют самосборку тубулина в микротрубочки. Эти белки получили название—белки, ассоциированные с микротрубочками (БАМ). Показано [12], что один из белков БАМ обладает АТФазной активностью. По-видимому, он входит в состав филаментозных ответвлений от осевого цилиндра микротрубочек—«ручек» (или «мостиков») диаметром 5—10 нм и подобен диненину—белку «ручек» наружных дублетов ресничек или жгутиков. «Ручки» микротрубочек мозга состоят из трех белков фракции БАМ с M 271, 286 и 345 кД, именно последний из этих трех белков подобен диненину по значению R_f .

«Ручки» микротрубочек мозга наблюдаются как *in situ*, так и у реконструированных микротрубочек *in vitro*. При помощи этих «ручек» микротрубочки мозга прикрепляются к клеточным мембранам. Из-за трудностей подбора фиксирующих средств электронномикроскопически

не всегда удается выявить «ручки» в микротрубочках мозга. В двигательных функциях микротрубочек важную роль играют, помимо АТРаза «ручек», также процессы фосфорилирования белков. В частности, в препаратах микротрубочек выявлена сАМР-зависимая протеникиназа, фосфорилирующая тубулин и белки фракции БАМ [13]. Фосфорилирование и дефосфорилирование высокомолекулярных белков БАМ может иметь триггерный механизм в двигательных функциях микротрубочек. Во фракции БАМ также выявлен белок — ингибитор протеникиназы.

Banks [14] исследовал АТРадную активность в препаратах микротрубочек селезеночного нерва быка. В этих препаратах обнаружены два пептида с M 300 кД, сходные по значению M с динейном. Активность Mg^{2+} -АТРаза препарата микротрубочек оказалась довольно низкой (0,024 мкмоль P_i /мг белка/ч). Оптимум для субстрата (АТР) — 1 мМ, оптимум pH — 7,0—7,2. Активность Ca^{2+} -АТРаза была еще меньше, чем Mg^{2+} -АТРаза. Субстратная специфичность снижалась в ряду: АТР $\gg$ ITP $>$ GTP $\gg$ ADP.

В этой же работе указывается, что в препарате микротрубочек содержатся фосфолипиды и выявляется Na^+ , K^+ -АТРазная активность, что указывает на невысокую степень очистки микротрубочек. В этом же препарате микротрубочек не обнаруживалась миозинподобная K^+ -ЭДТА-АТРазная активность. Активность Mg^{2+} -АТРаза очищенного тубулина в данной работе составляла 0,008 ед. Следует сразу же оговориться, что данные о присутствии Na^+ , K^+ -АТРадной активности в микротрубочках мозга не подтвердились [15, 16].

Из микротрубочек аксонов кальмара выделена фракция БАМ, соосажающаяся вместе с тубулином и способная регулировать полимеризацию тубулина в микротрубочки [17]. В составе фракции БАМ электрофоретически обнаружен пептид с M 200 кД, сходный, по мнению авторов, с тяжелой субъединицей мышечного миозина.

В препаратах микротрубочек мозга быка присутствует некая АТРаза, которая способна к коседиментации с микротрубочками. Присутствие в препаратах примесей актина и миозина не сказывается на активности этой новой, по-видимому, динейновой АТРаза, которая может участвовать в механохимическом сопряжении микротрубочек [15].

Webb [16] показал, что в препаратах микротрубочек мозга быка активность Mg^{2+} -ГТРаза выше, чем активность Mg^{2+} -АТРаза. В ходе очистки АТРаза выделяется вместе с микротрубочками: и удельная активность связанного фермента остается постоянной в циклах полимеризации — деполимеризации в ходе очистки микротрубочек. Данная АТРаза менее активна в связанном виде, чем в состоянии, когда микротрубочки деполимеризованы. Значение K_m для АТР равно 0,9 мМ. Активность Mg^{2+} -АТРаза в данных опытах увеличивалась в присутствии 5 мМ Ca^{2+} , снижалась в присутствии GDP (200—600 мкМ) и NaCl (67—111 мМ). Убаин, колхицин и винбластин не влияли на активность Mg^{2+} -АТРаза препаратов микротрубочек. Считается, что дан-

ная АТРаза необходима для АТР-индуцируемой и GDP-зависимой полимеризации тубулина, но не для GTP-индуцируемой полимеризации. Чистый тубулин полимеризуется в присутствии GTP, но не в присутствии АТР + GDP. Фракция тубулина, содержащая АТРазную активность, полимеризуется в присутствии АТР или GTP. Очищенный тубулин АТРазной активностью не обладает.

Wallin и соавт. [18] подробно изучили АТРазную активность в препаратах микротрубочек мозга быка. При pH 6,8 активность Mg^{2+} и Ca^{2+} -АТРазы равна 2,9 и 3,1 ед., а при pH 8,0—2,5 и 3,5 ед. соответственно. Во фракции БАМ также измерялась АТРазная активность. Показано, что р-хлормеркуробензолсульфокислота при pH 6,8 активирует (на 16%) Mg^{2+} -АТразу препарата микротрубочек при низких концентрациях (10^{-6} — 10^{-7} М) и значительно ингибирует Mg^{2+} -АТразу при высоких концентрациях ($\geq 10^{-4}$ М), в то время как Ca^{2+} -АТРаза только ингибируется при высоких концентрациях тиолового реагента. Другой тиоловый агент — N-этилмаленимид действует на АТразу препарата микротрубочек аналогичным способом. При pH 8,0 первый реагент только ингибирует, а второй только активирует АТразу. Пренкубация обоих тиоловых агентов в присутствии АТР (pH 6,8) приводит к стимуляции Mg^{2+} -АТРазы микротрубочек. При использовании фракции БАМ при pH 6,8 оба реагента действовали также на АТРазную активность, но менее эффективно. Согласно авторам, АТРаза препаратов микротрубочек мозга по своему отношению к тиоловым реагентам подобна как диненну, так и миозину. В последующей работе этой группы исследователей [19] показано, что АТРаза микротрубочек мозга активируется ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} (1—2 мМ) практически одинаково (0,18—0,27 ед) и имеет оптимум pH 8,0. При pH 6,8 во фракции очищенного тубулина выявляется лишь Ca^{2+} -АТРазная активность. При разделении микротрубочек (на фосфоцеллюлозе) на тубулин и БАМ АТРазная активность главным образом определяется в последней фракции. В этом случае АТРазная активность тормозилась NaF (10 мМ), ЭДТА и в среде с высокой ионной силой (0,6 М KCl), но не изменялась в присутствии ванадата (0,1 мМ), ЭГТА и уабанина. Значение K_m для АТР как для Mg^{2+} , так и для Ca^{2+} -АТРазы равно 25 мкМ, $M \geq 200$ кД, активность АТРазы сосредоточена в препаратах микротрубочек с $K_s = 30$ —36 (тип «кольцо — спираль»). На основании полученных данных делается вывод о сходстве исследований АТРазы микротрубочек мозга с диненином и миозином (см. таблицу), хотя и имеются некоторые отличия этой АТРазы от миозиновой, например, по ионной регуляции.

По данным Shelanski, Liem [20], тубулин мозга не обладает Mg^{2+} -АТРазной активностью, однако добавка субъединиц нейрофиламентов при самосборке микротрубочек придает структуре Mg^{2+} -АТРазную активность.

Японские исследователи обнаружили в препаратах микротрубочек мозга крыс АТРазную активность [21]. Хроматографический анализ

микротрубочек указывал на то, что АТРаза прочно связана с белками фракции БАМ. Интересно, что очищенный тубулин резко стимулирует АТРазную активность микротрубочек. Этот факт нам кажется очень важным. Известно, что тубулин мозга свиней также стимулирует АТразу диненна ресничек [22]. По-видимому, в обоих случаях образуется комплекс типа тубулин—диненн аналогично комплексу актомиозина. Обнаружено [21], что Ca^{2+} (8—10 мМ) тормозит Mg^{2+} -АТразу микротрубочек мозга, но активирует фермент микротрубочек в присутствии тубулина. Ионы магния таким действием не обладают. Активность частично очищенной АТРазы при 37° составляет 0,5—0,8 ед, значение K_m для АТР равно $3 \cdot 10^{-5}$ М. Mg^{2+} -АТРаза микротрубочек тормозится в среде с 0,2 М КСl или NH_4Cl , но не ингибируется ванадатом, колхицином и убаином.

Таблица

Сходство и отличия АТРазы микротрубочек мозга по сравнению с АТРазой миозина и диненна [19]

Параметр	Микротрубочки	Диненн	Миозин
М	> 200 кД (?)	520 кД	470—540 кД
Оптимум рН	8,0	6,5—10,5	6,0 и 9,5
Стимуляция ионами	Mg^{2+} , Ca^{2+} (1—2 мМ)	Mg^{2+} , Ca^{2+} (10—20 мМ)	Ca^{2+} ; 0,6 М КСl + ЭДТА
Ингибиторы	NaF, ЭДТА	Ванадат, ЭДТА	Mg^{2+}
Субстратная специфичность	Низкая	Высокая	Низкая
K_m для АТР, мМ	25	11—50	< 30

Польские исследователи [23] показали, что в препаратах микротрубочек мозга, полученных методом сборки-разборки, обнаруживается АТРазная активность. Гистохимически обнаружена АТРазная активность в микротрубочках коры мозга крыс [24, 25], при этом активность значительно тормозилась высокими концентрациями фиксатора глутаральдегида [24]. Гистохимически в ткани нервов краба, улитки и мозга крыс обнаруживается в микротрубочках Mg^{2+} -АТРазная активность [26]. Для выявления этой активности необходимы Pb^{2+} ; 1% глутарат (но не 2—3%), рН 7,6; АТР. В присутствии GTP (вместо АТР) активность также выявляется, хотя и в меньшей степени. На Mg^{2+} -АТРазную активность не влияют цистеин и NaF.

Во фракции БАМ, выделенной из микротрубочек мозга быка, обнаружена АТРазная активность [27]. Субстратами этой АТРады являются АТР и GTP. Электрофоретический анализ показал, что данная АТРаза микротрубочек отличается от АТРады саркоплазматического ретикулула, F_1 -АТРады митохондрий, Na^+ , K^+ -АТРады, и от АТРады миозина и диненна.

Недавно обнаружено [28], что микротрубочки мозга быка содержат диненн, который по своим свойствам (K_s , радиус Стокса, пептидные карты) сходен с диненном аксоном жгутиков и ресничек, однако отличается по ферментативным свойствам. Нуклеотидтрифосфатаза ди-

нина мозга по сравнению с диненим сперматозондов млекопитающих была менее чувствительна к ингибирующему действию ванадата и гидролизovala GTP и ITP с большей скоростью, чем АТР. В работе Murphy и сотр. [29] отмечается, что динениновая АТРаза (активность 0,6 ед) при очистке выделяется вместе с микротрубочками. При отсутствии детергентов фермент агрегирует и может быть отделен от микротрубочек. Выделенный динени (М 150 кД) состоит из двух субъединиц. Эти же авторы [30] идентифицировали и сравнили АТР-связывающие пептиды диненина жгутиков сперматозондов морского ежа и очищенного препарата Mg^{2+} -АТРАЗы микротрубочек мозга быка при помощи фотоаффинного аналога АТР — 8- N_3 АТР. Анализ меченых продуктов методом электрофореза и радиоавтографии показал, что фотолиз индуцировал значительное избирательное мечение компонента Mg^{2+} -АТРАЗы с М = 55 кД и компонента диненина с М = 45 кД. В результате фотолиза АТРАЗная активность препаратов обоих белков тормозилась на 30%. Очищенный актин и тубулин мозга лишь слабо метились 8- N_3 АТР. Предполагается, что АТР-связывающий центр обоих белков является каталитическим и ответственным за гидролиз АТР.

В препаратах тубулина мозга содержится также ГТРАЗная активность, эта АТРаза ассоциирована с тубулином и необходима для полимеризации тубулина в микротрубочки [31, 32]. Недавно показано, что эта ГТРаза модулируется сАМР, Ca^{2+} и АТР [33]. В данной работе обнаружено, что препарат тубулина мозга, содержащий связанный GDP, гидролизует субстрат GTP со скоростью в 1,5 раза больше, чем препарат, содержащий связанный АТР. В присутствии сАМР скорость гидролиза GTP возрастает в 1,5—3 раза. Для стимуляции ГТРАЗы, вызванной сАМР, не требуется присутствия АТР в среде инкубации. Это указывает на то, что такая стимуляция не связана с действием сАМР-зависимой протеникиназы, ассоциированной с микротрубочками. Хотя использовавшийся препарат тубулина содержал мало или совсем не содержал кальмодулина, ионы Ca^{2+} в концентрации 10 мкМ значительно (на 50%) тормозили ГТРАЗную активность препарата. Процесс полимеризации тубулина в препарате не тормозился Ca^{2+} в такой же концентрации. Ингибирование ГТРАЗы ионами Ca^{2+} наблюдалось как в присутствии, так и в отсутствие АТР, что указывает на то, что данный эффект не связан с действием Ca^{2+} кальмодулин-зависимой протеникиназы. Присутствие АТР по-разному влияло на вызываемую сАМР активацию ГТРАЗы в препаратах, содержащих связанный GTP и GDP. Как стимулирующее действие сАМР, так и ингибирующее действие Ca^{2+} наблюдалось лишь в первые 2 мин после начала полимеризации тубулина, т. е. лишь во время фазы нуклеации микротрубочек. В период элонгации, а также после достижения равновесия реакции полимеризации тубулина, ни сАМР, ни Ca^{2+} не влияли на ГТРАЗную активность препарата тубулина. Таким образом, АТРаза в

нативных микротрубочках мозга, вероятно, локализована в «ручках» (во фракции БАМ), а ГТРаза—в тубулине.

Несмотря на некоторую противоречивость изложенных фактов, можно сделать следующие предварительные выводы:

— в высокомолекулярных белках, ассоциированных с микротрубочками мозга, содержится АТРаза, напоминающая по своим свойствам динени;

— данная АТРаза, по-видимому, принимает участие в механическом сопряжении при функционировании микротрубочек мозга.

ATPase ACTIVITY OF BRAIN MICROTUBULES

GLEBOV R. N., KRYZHANOVSKY G. N.

Institute of General Pathology and Pathological Physiology, USSR
Academy of Medical Sciences, Moscow

The review is devoted to the interaction of actine microfilaments with microtubules that is of great importance for functioning of brain cells, cytoskeleton net. On summarizing the existent literature it may be suggested that the dynein-like ATPase is localized in the "handles" of brain microtubules. The motor function of the microtubules may be due to an ATPase of this kind.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
2. Satir P. In: Cell motility, Cold Spring Harbor conferences on cell proliferation. Cold Spring Harbor Lab., 3, 841—846, 1976.
3. Hayashi M. J. Biochem., 85, 3, 691—698, 1979.
4. Fujii T., Tanaka R. Life Sci., 24, 1683—1690, 1979.
5. Shimo-Oka T., Hayashi M., Watanabe Y. Biochemistry, 19, 4921—4926, 1980.
6. Griffith L. M., Pollard T. D. J. Cell Biol., 78, 958—965, 1978.
7. Griffith L. M. Eur. J. Biochem., 22, 270—296, 1980.
8. Burns R., Pollard T. FEBS Lett., 40, 274—280, 1974.
9. Gaskin F., Kramer S., Cantor C., Adelstein R., Shelanski M. FEBS Lett., 40, 281—286, 1974.
10. Nagayama A., Dales S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 65, 464—471, 1970.
11. Azai T., Kaziro Y. Biochem. Biophys. Res. Comm., 69, 369—376, 1976.
12. Murphy D., Borisy G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 2696—2701, 1975.
13. Глебов Р. Н. Успехи совр. биол., 91, 3, 433—450, 1981.
14. Banks P. J. Neurochem., 27, 1465—1471, 1976.
15. Gelfand V. J., Gyoeva F. K., Rosenblat V. A., Shanina N. A. FEBS Lett., 88, 197—200, 1978.
16. Webb B. C. Arch. Biochem. Biophys., 198, 296—303, 1979.
17. Sakai H., Matsumoto G. J. Biochem., 83, 1413—1422, 1978.
18. Wallin M., Larsson H., Edström A. J. Neurochem., 33, 1095—1099, 1979.
19. Larsson H., Wallin M., Edström A. J. Neurochem., 33, 1249—1258, 1979.
20. Shelanski M. L., Liem R. K. H. J. Neurochem., 33, 5—13, 1979.
21. Jhara Y., Fujii T., Arai T., Tanaka R., Kaziro Y. J. Biochem., 86, 587—590, 1979.

22. *Hoshino M.* Biochim. Biophys. Acta, 462, 49—62, 1977.
23. *Turyna B., Pozniczek M.* Lesz. nauk. UJ, 549, 39—44, 1979.
24. *Fitzsimon J. T. R., Kerkut G. A., Sharp G. A.* J. Physiol., 278, 96—97, 1978.
25. *Sharp G. A.* Comp. Biochem. and Physiol., A66, 3, 415—429, 1980.
26. *Kerkut G. A., Sharp G. A., Fitzsimons J. T. R.* Comp. Biochem. and Physiol., B67, 3, 485—492, 1980.
27. *White H. D., Coughlin B. A., Purich D. L.* J. Biol. Chem. 255, 486—491, 1980.
28. *Baccetti B., Burrini A. G., Dallai R., Pallini V.* Eur. J. Cell Biol., 22, 292, 1980.
29. *Murphy D. B., Hlebsch R. R.* Eur. J. Cell Biol., 22, 1, 291, 1980.
30. *Hlebsch R. R., Murphy D. B., Haley B. E.* J. Cell Biol., 87, part. 2, 37, 1980.
31. *Jacobs M., Smith H., Taylor E. W.* J. Molec. Biol., 89, 455—468, 1974.
32. *Maccioni R., Seeds N. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 462—466, 1977.
33. *Helmberg K.-W., Burg J., Doenges K. H.* Eur. J. Cell Biol., 22, 296, 1980.

Институт общей патологии
и патологической физиологии
АМН СССР, Москва

Поступила 2.X 1981

УДК 577.151+577.153

ПРИРОДА ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ СЕТЧАТКИ И СОПРЯЖЕНИЕ ФЕРМЕНТА С РЕЦЕПТОРОМ

ЭТИНГОФ Р. Н., ДУМЛЕР И. Л.

Обобщены данные о ключевой роли фосфодиэстеразы в регуляции содержания циклических нуклеотидов в фоторецепторном нейроне сетчатки при получении рецептором адекватного стимула. Проанализированы материалы о механизме сопряжения рецептора (родопсина) с фосфодиэстеразой и черты сходства этой системы с аденилат-циклазным комплексом фермента с рецепторным компонентом. Выдвинуто предположение, что решающее значение для процесса сопряжения рецептора с тем или иным ферментом метаболизма циклических нуклеотидов имеет локализация рецептора в клетке (наружная мембрана или цитозоль).

Приведены собственные материалы о полной очистке фосфодиэстеразы наружных сегментов сетчатки быка. Определена субъединичная структура фермента и показана возможность переходов форм с различным молекулярным весом. Проведено сравнение фосфодиэстеразы сетчатки и ткани мозга.

Особый интерес к фосфодиэстеразе (ФДЭ) циклических нуклеотидов (КФ 3. 1. 4. 17) в ткани сетчатки и, в частности, к ферментной системе, локализованной в фоторецепторном нейроне, объясняется тем, что этот фермент является пока единственным примером функционального сопряжения ФДЭ с рецепторным компонентом клетки. Соответственно ФДЭ в данном случае играет ключевую роль в регуляции внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов при получении клеткой стимула из внешней среды. Показано, что при освещении, т. е. восприятии рецептором (родопсином) фотонов, резко увеличивается активность ФДЭ, что сопровождается уменьшением содержания cGMP в фоторецепторной клетке и ткани сетчатки в целом. Установлено, что активность ФДЭ определяется функциональным состоянием родопсина (темновой или обесвеченный) [1, 2]. Таким образом, на фоторецепторе сетчатки ткани, являющейся дериватом мозга, впервые обнаружено, что в дополнение к многократно описанному и хорошо изученному процессу сопряжения гормональных рецепторов с аденилатциклазой в наружной мембране клеток [3, 4] в тканях животных может иметь место и другая ситуация—функциональная связь рецепторного компонента с другим ферментом метаболизма циклических нуклеотидов—ФДЭ.

Ряд данных по ФДЭ сетчатки и ее фоторецепторных клеток был обобщен [1, 2, 5]. Однако после появления этих обзоров получены но-

вые принципиальные факты. Рассмотрение последних, сравнение путей сопряжения аденилатциклазы и ФДЭ с рецепторами, обобщение материалов о природе ФДЭ сетчатки в сравнении с этой системой в ткани мозга, а также анализ возможных причин сопряжения рецепторных белков с разными ферментами системы циклических нуклеотидов составляет задачу настоящего обзора.

Краткие общие сведения о фосфодиэстеразе сетчатки: локализация в клетке, свойства, природа

ФДЭ сетчатки, так же, как и в отдельных отделах мозга, характеризуется наиболее высокой активностью по сравнению с другими тканями [6]. Основная доля фермента сетчатки локализована в ее фоторецепторных клетках, причем непосредственно в первичных акцепторах световых квантов—наружных сегментах палочек (НСП), т. е. там же, где сосредоточен родопсин [1, 2]. Последний, являясь трансмембранным белком, пронизывает мембрану так называемых дисков—основной структуры НСП. ФДЭ расположена на поверхности дисков, обращенных в междисковое пространство. Недавно показано, что ферментативная активность одинакова при использовании обычных и инвертированных дисков-препаратов, в которых их внутренние мембраны, недоступные обычно для субстрата реакции, становятся доступными для последнего [7]. Ассоциация фермента с мембраной определяется ионом Mg ; при малой ионной силе фермент переходит в раствор. При увеличении концентрации Mg^{2+} ФДЭ вновь присоединяется к мембране. Возможно, что такие обратимые взаимодействия фермента с мембраной имеют и определенную функциональную значимость, но пока этот вопрос не ясен. Неизвестен и конкретный компонент мембраны, связывающей фермент; имеющиеся ранее сведения, что ФДЭ присоединена непосредственно к родопсину [1], не получили пока подтверждений.

Для проявления активности фермента в опытах *in vitro* необходим ион Mg , его можно заменить ионом Mn . В этом отношении ФДЭ сетчатки подобна ферменту других тканей. Однако в отличие от ряда последних и, в частности мозга, активность ФДЭ первичных акцепторов световых квантов не изменяется в присутствии иона Ca и кальмодулина [1, 2]. Но полностью исключить роль этого иона в процессе функционирования фермента нельзя, недавно показаны изменения его чувствительности к освещению в зависимости от концентрации Ca^{2+} [8]. Можно также предположить, что помимо ФДЭ, локализованной в НСП и резистентной к кальмодулину, в других клетках сетчатки имеется форма, чувствительная к этому белку и иону Ca . Отмечено, что в ранний постнатальный период, когда НСП еще не полностью сформированы, ФДЭ активность сетчатки подавлялась в присутствии ЭГТА и увеличивалась при наличии кальмодулина [9]. Имеются указания и о наличии белка, подобного кальмодулину, в нефоторецепторных слоях сетчатки [2]. Возможно, что в сетчатке взрослых животных не удастся выявить Ca^{2+} -зависимой формы ФДЭ из-за резкого преоб-

ладания той формы, которая резистентна к этому иону. Если это предположение справедливо, то ткань сетчатки по набору форм ФДЭ подобна ткани мозга и некоторым другим.

Особенностью ФДЭ НСП является резко выраженное сродство к сGMP по сравнению с сAMP [1, 2]. Этот факт представляет интерес в связи с особой ролью сGMP в ткани мозга [6], и особенно в сетчатке [2]. Помимо субстратной функции сGMP является одним из возможных регуляторов ФДЭ реакции. Показано, что в препаратах ФДЭ, полученных из НСП, имеются помимо каталитического центра еще два участка связывания нуклеотида. Эти участки, обладающие высоким сродством к сGMP, отличаются по ряду свойств от каталитического центра. Полагают, что они имеют прямое отношение к регуляции активности фермента [10].

Помимо сGMP в регуляции ферментативной активности могут принимать участие и другие нуклеотиды, в частности АТР и ГТР. Нами показано тормозящее действие этих нуклеотидов на ФДЭ НСП [11], что соответствует данным, полученным на ферментной системе мозга [12].

Особый интерес представляет вопрос о белковых регуляторах ФДЭ системы в нервной системе. Следует отметить, что кальмодулин был впервые обнаружен в ткани мозга, и его там значительно больше, чем в других тканях [13]. В ткани мозга показано и наличие ряда белков, препятствующих действию кальмодулина [13].

При попытке выделения нами белкового модулятора ФДЭ из ткани сетчатки по схеме, предложенной для изолирования кальмодулина из ткани мозга, был обнаружен своеобразный белковый ингибитор фермента, подобный по ряду свойств кальмодулину [14]. Особенностью этого ингибитора в отличие от многих других, описанных впоследствии [13, 15—17], является его тормозящий эффект на Ca^{2+} -зависимые и нечувствительные к Ca^{2+} формы фермента. Было также установлено, что ингибитор локализован непосредственно в НСП и относительно прочно связан с ферментом [2]. По-видимому, этот белок имеет прямое отношение к функции ФДЭ в НСП (см. ниже).

Проблема участия белковых модуляторов в регуляции активности ФДЭ непосредственно связана с вопросом о природе фермента. В случае тканей нервной системы это особенно актуально, так как на ФДЭ мозга показано, что одна из ее субъединиц имеет регуляторное значение и даже одинаковую с каталитической субъединицей антигенную природу [18]. Разделение регуляторной и каталитической субъединицы возможно лишь после специальной обработки исследуемых препаратов [15]. Относительно прочно связан с каталитической субъединицей ФДЭ и белковый ингибитор фермента сетчатки [19].

Ферментные системы мозга и НСП были подвергнуты очистке рядом авторов [20—26]. По поводу ФДЭ мозга полученные данные более или менее однозначны (табл. I). Молекулярная масса каталитической субъединицы составляет около 60 000 дальтон; иногда фермент представлен димером [21, 22]. Каждая субъединица может образовы-

вать комплекс с кальмодулином, что приводит к активации фермента. Регуляторная субъединица, присоединяя кальмодулин, препятствует его контакту с каталитической субъединицей, что приводит к торможению активности. Недавно установлено, что сродство кальмодулина к каталитической субъединице в отличие от регуляторной увеличивается при повышении содержания сАМР [27]. Таким образом может обеспечиваться саморегуляция системы—увеличение количества субстрата способствует его распаду.

Таблица 1

Молекулярная масса и активность очищенных ФДЭ ткани мозга и НСП сетчатки

Объект исследования	Молекулярная масса ФДЭ в дальтонах	Число субъединиц	Масса субъединиц в дальтонах	Удельная активность в мкмоль/мг белка/мин	Ссылка
Мозг быка	135 000	3	59 000 61 000 15 000	80—100	[20]
-	126 000	2	63 000 63 000	167	[21]
-	120 000	2	60 000 120 000	300 185*	[22] [23]
НСП лягушки	240 000	2	110 000 88 000		[24]
НСП быка	340 000	4	84 000 88 000	15	[25]
-	170 000	2	84 000 88 000		[26]
-	170 000	2	84 000		
-	45 000	1**		328	наши данные

* активность определена в присутствии протаммина, активирующего фермент примерно в 10 раз.

** в концентрированных растворах фермента—2, молекулярная масса—80 000 (см. текст)

Данные по поводу молекулярной массы ФДЭ НСП неоднозначны; приведенные величины колеблются от 170 000 до 340 000 дальтон (табл. 1), причем, так же, как в случае ФДЭ мозга, показано наличие в структуре фермента ряда субъединиц, выявляемых при электрофорезе в присутствии додецилсульфата Na. Большинство авторов считает, что ФДЭ НСП представлена двумя основными субъединицами 88 000 и 84 000 дальтон. Кроме того, иногда отмечают и наличие третьей—порядка 13 000 дальтон, выполняющей функцию ингибитора фермента [26, 28]. Следовательно, и в данном случае, так же, как и для Ca^{2+} -зависимой ФДЭ мозга, показана относительно прочная сопряженность каталитической субъединицы фермента со своим регуляторным компонентом. Представляет интерес выяснение вопроса, в какой мере эта особенность характерна для ФДЭ именно нервной ткани.

Для выяснения причин неоднозначности данных по молекулярной массе ФДЭ НСП мы попытались выделить максимально очищенные препараты фермента. В результате были получены образцы, обладаю-

щие значительно большей удельной активностью, чем описано в литературе (табл. 1). Результаты электрофореза полученного белка в геле, содержащем додецилсульфат Na, свидетельствовали о его гомогенности [40]. Молекулярная масса фермента, оцененная при помощи маркерных белков, составила всего 40 000 дальтон, что значительно меньше значений, приводимых другими авторами (табл. 1).

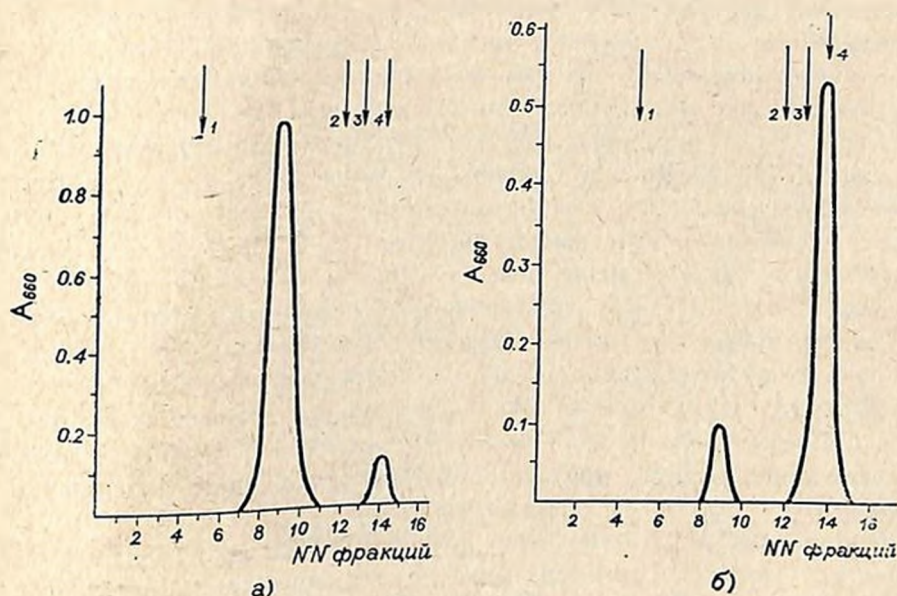


Рис. 1. Ультрацентрифугирование препаратов ФДЭ в непрерывном градиенте плотности сахарозы: а—концентрация ферментного белка в наносимом на градиент образце—200 мкг/мл, б—концентрация ферментного белка в наносимом на градиент образце—1 мкг/мл. Ось ординат—активность ФДЭ в ед. опт. плотности при 660 нм. Стрелками обозначены фракции, соответствующие маркерным белкам: 1—алкогольдегидрогеназа, 2—бывший сывороточный альбумин, 3—гемоглобин, 4—яичный альбумин

Одной из возможных причин этого расхождения могла быть степень чистоты препарата, которая в наших экспериментах была существенно выше, чем в других работах. Другой причиной этого несоответствия являлось, по-видимому, то обстоятельство, что исследуемый препарат фермента в работах других исследователей мог находиться в ассоциированной форме, т. е. состоял из нескольких олигомеров, как это, например, показано для ФДЭ других объектов исследования [29]. В пользу такого предположения в случае ФДЭ НСП свидетельствовали данные об отсутствии в обычных условиях линейной зависимости активности фермента от концентрации его белка в пробе. Только при сильных разведениях фермента такая зависимость становилась очевидной.

Пытаясь выявить различные состояния агрегированности фермента и полагая, что изменение диссоциации его молекул может происхо-

доть при изменениях концентрации ферментного белка [29], была проверена молекулярная масса очищенного фермента (метод ультрацентрифугирования в изокинетическом градиенте плотности сахарозы с маркерными белками) при разных его разведениях, соответствующих линейному и нелинейному участкам графика зависимости активности от концентрации белка. Из приведенных на рис. 1 графиков следует, что молекулярная масса ФДЭ в первом случае составила 45 000 дальтон, что соответствует данным, полученным методом электрофореза. Во втором варианте опыта—молекулярная масса ФДЭ равнялась 80 000 дальтон. Эти результаты являются прямым доказательством наличия в структуре ФДЭ-мономера (40—45 000 дальтон) и димера (80 000 дальтон). Не исключено, что процесс ассоциации может быть многоступенчатым и приводить к образованию и больших по своей массе агрегатов. Полученные факты объясняют неоднозначность результатов, полученных другими исследователями, свидетельствуя, что ФДЭ НСП представлена агрегатами разной величины.

Следует отметить, что сдвиг равновесия мономер $\rightleftharpoons$ полимер может быть эффективным средством регуляции ферментативной активности. В данном случае это особенно важно, так как специфической особенностью фермента этих структур являются периодические изменения его активности при изменениях функционального состояния. При этом отмечены аномалия кинетического поведения фермента темновых препаратов и исправление графика на освещенных [30].

Как уже было отмечено ранее [2], ФДЭ НСП является ключевым ферментом, регулирующим внутриклеточное содержание циклических нуклеотидов при освещении фоторецептора. Поскольку изменения активности ФДЭ обусловлены изменениями рецепторного компонента—родопсина, то принципиальный интерес представляет вопрос о механизме сопряжения этих белков.

Сопряжение рецептора с фосфодиэстеразой в наружных сегментах палочек

Проблема сопряжения гормональных рецепторов с аденилатциклазой в наружной мембране клеток является предметом многочисленных исследований и обобщена в ряде обзоров [3, 4]. Основные факты, установленные на аденилатциклазной системе, сводятся к следующему: действие гормонов на аденилатциклазу регулируется, как правило, гуаниловыми нуклеотидами; выделены и очищены специальные GTP-связывающие белки (G-белки) [31, 32], которые обеспечивают контакт рецептора с ферментом и гидролиз GTP, что необходимо для функционирования аденилатциклазного комплекса. Последний состоит не менее чем из трех белков: рецептора, G-белка и каталитической субъединицы фермента.

В какой же мере эти положения соответствуют материалам, полученным при изучении сопряжения рецептора с ФДЭ в НСП? Ряд подобных черт в сопряжении аденилатциклазы и ФДЭ с рецепторными ком-

нонентами был отмечен ранее [1, 2, 33]. Наиболее существенным фактом является участие ГТРазной системы в процессе сопряжения; так же, как и в случае аденилатциклазы, для активации ФДЭ необходим ГТР; показано, что происходит GDP-GTP обмен, для завершения процесса и обеспечения его обратимости осуществляется ГТРазная реакция [1, 33]. Рядом авторов из НСП выделены и идентифицированы G-белки [34—39]. Представляет интерес, что, несмотря на некоторые расхождения в полученных результатах, G-белки, полученные из НСП, по своему молекулярному весу и ряду свойств подобны G-белкам аденилатциклазного комплекса (табл. 2). Недавно установлено, что G-

Таблица 2

Сопрягающие белки аденилатциклазного и фосфодиэстеразного комплекса

Комплекс	Объект исследования	Молекулярная масса в дальтонах	Ссылка
Аденилатциклаза	Эритроциты	42 000	[31]
		23 000	
ФДЭ	Плазматические мембраны печени НСП	45 000	[32]
		35 000	
		41 000	[34]
		37 000	
		54 000	[35]
		37 000	
		35 000	[36]
		55 000	
		53 000	[37]
		37 000	
		41 000	[38]
		39 000	
		36 000	[39]
		10 000	

белки связаны с ФДЭ и могут быть отделены от каталитической субъединицы фермента только при его тщательной очистке [39]. Кроме G-белка, избирательно связывающего ГТР, по данным некоторых авторов, в НСП имеется еще один белок. Последний необходимо добавлять к обесвеченным фоторецепторным мембранам и G-белку для осуществления ГТРазной реакции. Этот белок получил название—«помощник» («helper»); его молекулярная масса составляет 53 000 дальтон; он не обладает ни ГТРазной, ни ФДЭ активностями, но необходим для проявления ГТРазной реакции и, кроме того, увеличивает степень связывания ГТР G-белком [37]. Таким образом, сопрягающая система ФДЭ представляет собой (так же, как и аденилатциклаза) мультикомплекс белков. Уже сейчас, помимо рецептора и фермента, в сопрягающем звене различают ряд белков. Один из них функционирует непосредственно как G-белок, т. е. связывает ГТР, чем обеспечивается активация ФДЭ, другой выполняет подсобную роль, способствуя связыванию нуклеотида и проявлению ГТРазной активности.

Какое же место в системе сопряжения ФДЭ с рецептором занимает ингибитор фермента, относительно прочно связанный с последним? Нам было показано, что после отделения от ФДЭ фракции, содержащей

ингибиторный компонент, не удастся активировать фермент, несмотря на наличие в пробах фоторецепторных мембран и GTP [40]. Более подробно этот феномен был изучен в другой работе [26]. Автору удалось выделить отдельно ФДЭ, GTPазный комплекс и ингибитор фермента, а также везикулы фосфолипидов, содержащие обесцвеченный родопсин. В опытах с рекомбинацией этих компонентов было установлено, что для активации ФДЭ необходимы все четыре компонента, а также свободный нуклеотид.

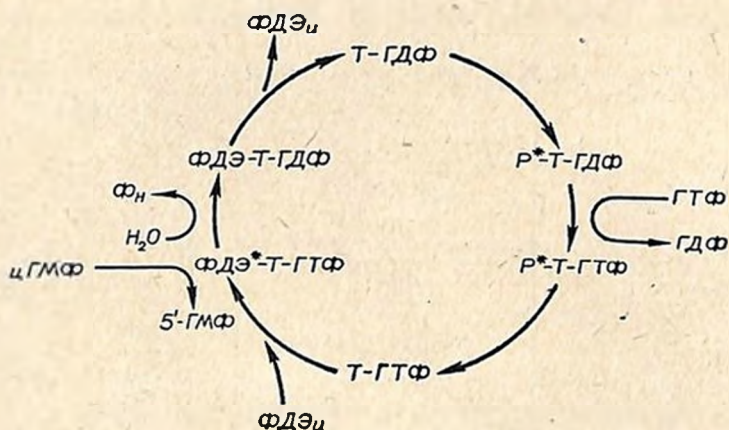


Рис. 2. Схема активации ФДЭ в НСП при освещении (по Fung и др., 1981): Т—трансдуцин, Р*—обесцвеченный родопсин, ФДЭ_и—неактивная ФДЭ, ФДЭ*—активная ФДЭ

На основании этих данных можно полагать, что помимо G-белков, связывающих гуаниловые нуклеотиды и осуществляющих их гидролиз, белка—«помощника» этого процесса, в состав регуляторно-сопрягающего комплекса ФДЭ в НСП входит и белок-ингибитор ФДЭ. Функция последнего может заключаться в сохранении низкого уровня активности ФДЭ в ее «базальном» (т. е. в фазу темновой адаптации) состоянии. Фотоактивация фермента в присутствии GTP приводит к снятию блокады фермента. В одной из работ отмечено, что скорость активации ФДЭ соответствовала скорости исчезновения ингибитора при протеолизе последнего [28].

Однако вряд ли справедливо мнение некоторых исследователей [14], полагающих, что эффект активации ФДЭ при освещении сводится лишь к устранению ингибиторного влияния. Тщательно проведенный кинетический анализ показывает, что помимо устранения действия ингибитора при освещении НСП в присутствии GTP имеет место и дополнительная активация фермента [30].

Независимо от этих фактов очевидно, что в сложный сопрягающий комплекс, обеспечивающий контакт рецептора с ФДЭ, помимо G-белков следует включить еще один белковый компонент—ингибитор фермента. Предложено назвать этот набор регуляторных белков трансдуцином (Т) [39]. Полагают, что Т состоит из трех полипептидных цепей

с молекулярными массами 39 000, 36 000 и 10 000 дальтон. Последний полипептид, вероятнее всего, соответствует ингибитору, а два других белка осуществляют связывание GTP и его гидролиз.

Активация ФДЭ при освещении происходит, по мнению авторов, предложивших назвать всю систему трансдукционным, в две стадии: вначале в обменной реакции, катализируемой обесцвеченным родопсином, образуется комплекс T-GTP, на втором этапе этот комплекс «запускает» процесс активации ФДЭ (рис. 2). Вероятно, на этом этапе имеет место и снятие действия ингибитора на фермент.

Существенно, что эта схема позволяет объяснить возможность активации ФДЭ при обесцвечивании родопсина, несмотря на количественные несоответствия молекул рецептора и фермента [1, 2]. Уже в первой части цикла при переходе от T-GDP к T-GTP достигается существенное усиление процесса. Как показали специальные опыты, при обесцвечивании одной молекулы родопсина образуется несколько сотен молекул T-GTP [39]. На последующем этапе процесса (активация ФДЭ) степень усиления может быть увеличена. GTРазная активность трансдукцина является частью механизма дезактивации ФДЭ, возвращающей всю систему в исходное «темновое» состояние.

Изложенные представления о системе активации ФДЭ свидетельствуют о подобии ее системе проведения и трансформации гормонального сигнала с участием аденилатциклазы [1, 33]. По-видимому, структура и функция ферментных комплексов, ответственных за регуляцию уровня циклических нуклеотидов в клетке в ответ на сигнал извне, сходны независимо от того, является ли ключевым ферментом мембранная аденилатциклаза или цитозольная ФДЭ.

Чем же определяется сопряженность рецепторов различных стимулов с ферментами метаболизма циклических нуклеотидов? Почему в отличие от всех изученных до сих пор клеток, в которых рецептор функционально связан с аденилатциклазой, в фоторецепторе родопсин сопряжен с ФДЭ? Следует отметить, что эта клетка своеобразна по своей структуре, необычна и природа поступающего в нее стимула (физическая, а не химическая). Особенностью этой клетки является и расположение в ней рецепторного компонента: родопсин сосредоточен преимущественно в дисках, окруженных наружной мембраной, т. е. локализован внутриклеточно. В связи с этими фактами до последнего времени оставалось не ясным, характерно ли сопряжение рецептора с ФДЭ только для глубоко специализированной фоторецепторной клетки или такая ситуация может иметь место и в других, более или менее обычных клетках, являющихся мишенью действия какого-либо гормона.

Изучение этого вопроса было проведено нами на клетках матки, в которых содержание циклических нуклеотидов меняется после введения животным эстрадиола [42]. Существенно, что рецепторы этого гормона, так же, как и в случае фоторецепторной клетки, локализованы не в наружной мембране, а внутриклеточно. Оказалось, что и в этом случае ФДЭ являлась ключевым ферментом, регулирующим содержание

циклических нуклеотидов в ответ на гормональный сигнал. Активность водорастворимой ФДЭ клеток матки в опытах *in vitro* тормозилась под влиянием эстрадиола, активность аденилатциклазы оставалась неизменной. Изменение активности ФДЭ под влиянием эстрадиола было специфично для клеток матки, на активность ФДЭ других тканей эстрадиол не влиял. Прямым доказательством сопряжения рецепторов эстрадиола с ФДЭ в клетках матки явился факт отсутствия изменений в активности фермента под влиянием гормона при блокаде его связывания рецептором с помощью антагониста эстрадиола (кломифен).

Эти данные дают основание полагать, что решающее значение в процессе сопряжения рецептора с тем или иным ферментом метаболизма циклических нуклеотидов имеет локализация рецепторного компонента в клетке. При внутриклеточном расположении рецептора ключевое значение должна иметь, по-видимому, ФДЭ. Число примеров сопряжения рецепторов с ФДЭ, вероятно, будет увеличиваться по мере изучения этой проблемы. Так, например, можно предположить, что такая же ситуация наблюдается и с нейrogормоном «С». Уже показано, что этот гормон оказывает ингибирующий эффект на ФДЭ ткани сердца и не влияет на активность аденилатциклазы [43]. Пока не ясны природа и место локализации рецепторов этого гормона, но ряд данных свидетельствует, что эти рецепторы относятся к растворимым белкам [44], т. е. тем белкам, которые вполне могут иметь внутриклеточное происхождение.

Совокупность приведенных данных свидетельствует, что функция ФДЭ в клетках может быть значительно более многогранна, чем это обычно принято считать. Изучение взаимоотношений различных внутриклеточных рецепторов с ферментами метаболизма циклических нуклеотидов имеет важное значение для целенаправленного поиска различных биоактивных соединений, регулирующих процесс функционирования разных рецепторных компонентов. Следует также отметить, что, учитывая трудности получения из мембран очищенной аденилатциклазы, возможность исследования механизмов сопряжения на примере водорастворимой ФДЭ открывает широкие перспективы для изучения молекулярных основ важнейшего процесса—включения циклических нуклеотидов клетки в систему трансформации сигнала, полученного ею извне.

CYCLIC NUCLEOTIDES PHOSPHODIESTERASE FROM RETINA AND ITS COUPLING WITH THE RECEPTOR

ETINGOF R. N., DUMLER I. L.

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR
Academy of Sciences, Leningrad

The data on the key role of cyclic nucleotides phosphodiesterase in the regulation of cyclic nucleotides content in retina photoreceptor neuron receiving light stimulus are reviewed.

The mechanism of coupling of phosphodiesterase with the receptor (rhodopsin) is analysed and compared with adenylate cyclase-cell receptor component system. In the process of coupling of the receptor with different enzymes of cyclic nucleotides metabolism the receptor cell localization (in the outer membrane or inside the cell) is suggested to be of primary importance.

A phosphodiesterase has been purified to homogeneity from bovine rod retina outer segment. The subunit structure of this enzyme is determined and a possibility of interconversion of the enzyme forms with different molecular weights is demonstrated. The enzyme is compared with brain phosphodiesterase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bilensky M. W., Wheeler G. L., Aloni B., Vetury S., Matuo J.—In: Adv. in Cyclic Nucl. Res., 9, 553—572, 1978.
2. Этингоф Р. Н. Успехи совр. биол., 92, 2 (5), 198—213, 1981.
3. Rodbell M. Nature, 284, 3751, 17—22, 1980.
4. Ткачук В. А. Укр. биохим. ж., 53, 2, 5—27, 1981.
5. Этингоф Р. Н., Думлер Н. Л. Укр. биохим. ж., 53, 2, 28—43, 1981.
6. Ferrelli J. A. In: Adv. in Cyclic. Nucl. Res., 9, 453—464, 1978.
7. Shichi H., Somers R. Photochem. and Photobiol., 32, 491—495, 1980.
8. Robinson P., Kawamura S., Abramson B., Bownds D. J. Gen. Physiology, 76, 631—644, 1980.
9. Liu J. P., Krishna G., Aquirre G., Chader G. J. Nature, 280, 5717, 62—64, 1979.
10. Jamazaki A., Sen I., Bilensky M. W., Casnellie J. E., Greengard P. J. Biol. Chem., 255, 11619—11624, 1980.
11. Гарновская М. Н., Думлер Н. Л., Этингоф Р. Н. Тезисы докл. VI симп. биох. об-ва СССР и ГДР, М., Наука, с. 19—20, 1981.
12. Cheung W. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 23, 214—219, 1956.
13. Grand R. J., Perry S. V. Biochem. Soc. Transactions, 8, 487—493, 1980.
14. Dumlér I. L., Ettingof R. N. Biochim. et Biophys. acta, 429, 474—484, 1976.
15. Klee C. B., Krinks M. H. Biochemistry, 17, 120—127, 1978.
16. Wallace R. W., Lynch T. J., Tallant A., Cheung W. J. J. Biol. Chem., 254, 377—382, 1979.
17. Sharma R. K., Wirch E., Wang J. H. J. Biol. Chem., 253, 3575—3580, 1978.
18. Wallace R. W., Lynch T. J., Macleod R. M., Cheung W. J. Fed. Proceed., 37, 6, 187, 1978.
19. Фураев В. В., Думлер Н. Л., Казимирский А. Н., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 243, 247—250, 1978.
20. Klee C. B., Crutch T. H., Krinks M. H. Biochemistry, 18, 722—729, 1979.
21. Merrill M. E., Thompson S. T., Stellwagen T. E. J. Biol. Chem., 254, 4371—4374, 1979.
22. Sharma R. K., Wang T. H., Wirch E., Wang J. H. J. Biol. Chem., 255, 5916—5927, 1980.
23. Miki N., Biraban J. M., Kelms J. J. J. Biol. Chem., 259, 6320—6327, 1975.
24. Hurley J. B., Ebrey T. G. Biophys. J. 25, 2, 314a, 1970.
25. Baehr W., Devlin M. J., Applebury M. L. J. Biol. Chem., 254, 11633—11677, 1979.
26. Hurley J. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 92, 505—510, 1980.
27. Cheung W. J., Lynch T. J., Wallace R. W., Tallant A. J. Biol. Chem., 255, 4439—4443, 1981.

28. Harley J. B., Stryer L. *Biophys. J.*, 33, 203a, 1981.
29. Pichard A. L., Cheung W. J. *J. Biol. Chem.*, 251, 5726—5737, 1976.
30. Yee R., Liebman P. A. *J. Biol. Chem.*, 253, 8902—8909, 1978.
31. Pfeuffer T. *J. Biol. Chem.* 252, 7224—7234, 1977.
32. Northup J. K., Sterweis P. C., Smigel M. D., Schleifer R. C., Gilman A. G. *Fed- Proceed.*, 39, 3, 516, 1980.
33. Shinozawa T., Sen I., Wheeler G., Bitensky M. W. *J. Supramolec. Struct.*, 10, 2, 185—190, 1979.
34. Godchaux W., Zimmerman W. F. *J. Biol. Chem.*, 254, 7874—7884, 1979.
35. Somers R. L., Shichi H. *Biochem. et Biophys. Res. Commun.*, 89, 479—485, 1979.
36. Kühn H. *Nature*, 283, 5747, 587—589, 1980.
37. Shinosawa T. S., Ushida E., Martin D., Cafisco D., Hubbell W., Bitensky M. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1408—1411, 1980.
38. Kohnken R. E., Eadie D. M., McConnell D. G. *Biophys. J.*, 33, 289a, 1981.
39. Fung B. R., Nurley J. B., Stryer L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 152—156, 1981.
40. Думлер И. Л., Фураев В. В., Этингер Р. Н. *ДАН СССР*, 253, 1504—1508, 1980.
41. Sitarumayya A., Virmaux N., Mandel P. *Exp. Eye Res.*, 25, 163—169, 1977.
42. Chew C. S., Rinard G. A. *Biochem. et Biophys. acta*, 362, 493—500, 1974.
43. Galojan A., Gurvitz B., Saribekian G., Kirakosova A. In *Cyclic nucleotides and therapeutic perspectives* (eds. Cedovic G., Robison G.), Oxford—N. Y., Pergamon Press, 1979.
44. Срапионян Р. М., Мисирян С. С., Галоян А. А. *Вопросы биохимии мозга*, Изд-во АН АрмССР, 10, 122—128, 1975.

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

Поступила 16. XI 1981

РЕЦЕНЗИИ

УДК 612.397.8:612.822.1 «71»

Е. М. КРЕПС. *ЛИПИДЫ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов*, Л., Наука, 339 с., 1981.

Биохимия липидов клеточных мембран развивается в настоящее время особенно интенсивно. Рецензируемая книга Е. М. Крeпса не имеет аналогов ни в отечественной, ни в зарубежной литературе. В предисловии автор упоминает несколько книг, в которых рассматриваются те или иные из вопросов, включенных в монографию. Однако только Е. М. Крепс сочетал в одной книге краткий систематический обзор современного состояния биохимии липидов клеточных мембран с обобщением материалов по адаптационной функции и эволюции липидов. Последнее в значительной мере является плодом исследований автора и его учеников, фундаментально проводившихся в течение четверти века. Столь целенаправленных и систематических работ за рубежом не велось, но следует отметить тщательный анализ всей литературы по проблеме, осуществленный в монографии.

Особенностью книги является преимущественное внимание к липидам клеточных мембран мозга. Это обусловлено не только особым интересом к биохимическим основам деятельности нервной системы, но и тем, что именно липиды мозга наименее подвержены колебаниям состава и содержания, зависящим от характера питания. Поэтому эволюционные и онтогенетические изменения, а также проявления адаптации, связанные со средой обитания, выступают в липидах мозга в наиболее четкой форме. Рассматриваются не только липиды мозга в целом, но и по всех главных отделах этого сложнейшего органа.

Наиболее интересными представляются следующие результаты и обобщения.

Во-первых, обоснована гипотеза о прогрессивном направлении эволюционного развития не всех, а лишь определенных липидов мозга, в особенности возрастания роли ганглиозидов. Открытием Е. М. Крeпса и его школы является выявление прогрессивных характеристик липидов мозга не костистых, а пластинжаберных рыб. Несмотря на широкое распространение, костистые рыбы в свете этих данных представляются эволюционным тупиком, в то время как пластинжаберные (вероятно, какие-то предки современных пластинжаберных) находятся «в стволе» филогенетического древа.

Во-вторых, убедительно представлено по критериям химии липидов особое таксономическое положение осетровых рыб (по соотношениям цереброзидов с нормальными и оксикислотами, а также с сульфocereброзидами). Примечательно, что к аналогичному выводу, исходя из других биохимических показателей — гибридируемости ДНК, пришли А. С. Антонов, Б. М. Медников и др. В этом вопросе биохимическая таксономия внесла существенные коррективы в установившиеся общebiологические положения.

В-третьих, Е. М. Крепс подводит читателя к необходимости пересмотра вопроса о том, являются ли липиды «информационными» молекулами. Отнесение нуклеиновых кислот и белков к последней категории основано на том, что они построены из разнообразных (хотя и однотипных) компонентов, образующих потенциально и фактически огромное число различных последовательностей. Однако в ганглиозидах, например, возможны сочетания неодинаковых углеводных компонентов молекулы и формирование разных по пространственной конфигурации «ветвей», образуемых сialовыми кислотами. Есть основания полагать, что они участвуют в образовании двух- и

трехмерных структур поверхностей клеток, необходимых для таких важных процессов, как их узнавание друг другом и взаимодействие.

В-четвертых, велик вклад представленных в книге исследований и обобщений автора в проблему адаптационных функций липидов. Рыбы—эктотермные организмы, обитающие в чрезвычайно широком диапазоне значений температуры и давления, оказались особенно благодатным объектом таких исследований. Автор развивает и конкретизирует положения о роли в термо- и барорегуляции соотношений насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Выявлены группы липидов, у которых соответствующие корреляции выражены особенно четко—фосфолипиды и ганглиозиды, и на большом фактическом материале показано адаптационное значение плазмалогенных форм жирных кислот.

Помимо иллюстрированных выше крупных обобщений, Е. М. Крепе представил обширнейший материал и оригинальные трактовки по очень большому числу других аспектов эволюции и адаптации липидов мембран. Книга станет постоянным источником для размышлений и формирования новых направлений работ в биохимии липидов и послужит импульсом к дальнейшим исследованиям.

Восприятие всех представленных данных и закономерностей значительно облегчается наличием в книге разделов, где общие сведения по химии, функциям и методам исследования липидов представлены в виде компактных сводок.

Книга, несомненно, станет предметом переводов и переизданий. При этом, по моему мнению, целесообразно сформировать заключительный обобщающий раздел, в котором были бы объединены итоговые разделы отдельных глав книги. Заслуживают большего внимания соображения об «информационности» некоторых липидов (с. 21) или их двухмерных распределений в мембранах. Более четко воспринималась бы классификация липидов, если бы автор не выделил в особый подраздел—1.1.4 вопрос о стереоспецифической нумерации (тогда номера подразделов соответствовали бы только группам липидов).

Суммируя изложенное, можно выразить уверенность, что монография Е. М. Крепе принесет пользу не только биохимикам вообще и биохимикам, специализирующимся в области липидов и их эволюции, но и широкому кругу биологов.

АШИМАРИН И. П.

E. M. KREPS. THE LIPIDES OF CELL MEMBRANES. The evolution of brain lipides. The adapting function of lipides, Leningrad. Nauka, 339 p. 1981.

Reviewed by ASHIMARIN I. P.

УДК 016:577.1:612.8

Нейрохимия. Библиографический указатель. Книга первая: 1953—1962 гг. Киев, Наукова думка, 1979, 403 с.; книга вторая: 1963—1967 гг., Киев, Наукова думка, 1981, 523 с. Автор-составитель Я. В. Белик.

Нейрохимия весьма интенсивно развивается в течение последних лет, что знаменуется резким ростом числа публикаций. С каждым годом в разных странах появляются новые периодические издания по нейрохимии, однако значительная часть работ этой области биохимии публикуется в общих биохимических и биологических журналах, в журналах, выпускаемых университетами, а также в тематических сборниках и материалах разного рода конференций.

Поиск информации требует большой затраты времени и непрерывно затрудняется. В нейрохимию ежегодно вливается большое число молодых исследователей, для которых ретроспективный поиск информации представляется особенно важным.

Неоценимую помощь в этой работе окажут рецензируемые библиографические указатели по нейрохимии за 1953—1962 и 1963—1967 гг., составленные профессором

Я. В. Беликом. Они содержат библиографические описания более чем 12300 работ, расположенных в хронологическом порядке. Пользование книгами значительно облегчают подробные и логично составленные предметные указатели, включающие около 14000 предметных записей, и авторские указатели (свыше 15000 фамилий). Наличие этого ценного вспомогательного справочного аппарата позволяет буквально в течение нескольких минут найти необходимые ссылки из мировой литературы по нейрохимии за пятнадцатилетний период. Особой похвалы заслуживает то, что составитель в каждом библиографическом описании привел ссылку на реферативный журнал, где опубликован реферат описанной работы. Это позволяет читателю получить дополнительную, нередко весьма ценную информацию. Легкость и удобство в пользовании, которые дают возможность осуществить высокоинформативный поиск с помощью указателей, являются результатом большой и чрезвычайно трудной работы автора-составителя.

Практическое отсутствие ошибок (все источники, которые мы наугад взяли для проверки по оригиналу, показали полное соответствие библиографическому описанию) свидетельствует о тщательности и аккуратности работы Я. В. Белика над составлением указателей.

В предисловии к первой книге автор указал основные принципы, которые он положил в основу составления указателей, и описал их структуру. Нет никакого сомнения в том, что со временем эти книги не только не устареют, но ценность их с годами будет возрастать.

Необходимо поблагодарить профессора Я. В. Белика за его нелегкий труд, который будет высоко оценен всеми специалистами, работающими в области нейрохимии,—биохимиками, физиологами, фармакологами, морфологами, биологами, медиками, а также библиотечными работниками. Следует пожелать автору продолжить его ценную и нужную работу по выпуску в свет новых библиографических указателей по нейрохимии, охватывающих последующие периоды времени.

РОЗЕНГАРТ В. И., СЫТИНСКИЙ И. А.

Y. V. BELIK. *Neurochemistry, Bibliography, Book I: 1953—1962*. Kiev, Naukova Dumka, 1979, 403 p., Book II: 1963—1967, Kiev, Naukova Dumka, 1981, 523 p.

Reviewed by ROZENGART V. I.,
SITINSKI I. A.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются оригинальные статьи, содержащие ранее не опубликованные результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной нейрохимии, рецензии на новые издания и актуальная научная хроника.

Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не должен превышать 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроники—4 с., а писем в редакцию—2 с.

Рукопись статьи должна подписываться всеми авторами (2 экз.) и сопровождаться актом экспертизы (2 экз.) и направлением от учреждения.

2. Ко всем статьям и сообщениям прилагаются на отдельных листах резюме на русском и английском языках объемом не более 0,5 с. Английское резюме должно быть озаглавлено, в нем указываются авторы и название учреждения, в котором выполнена работа.

Статья должна иметь титульный лист, на котором пишется ее заглавие прописными буквами, а под ним фамилии и инициалы авторов, а также полное название учреждения, в котором выполнена работа. Вверху справа титульного листа приводится индекс универсальной десятичной классификации (УДК), а внизу листа указывается адрес и номер телефона автора, которому следует посылать запросы.

Экспериментальные статьи, являющиеся основным публикуемым материалом в журнале, должны быть построены по следующему плану: резюме на русском языке, краткое введение с указанием цели работы, материалы и методы, результаты и обсуждение, резюме на английском языке, литература.

3. Таблицы должны иметь заголовки, нумерацию и не превышать размера печатной страницы. Каждая таблица печатается на отдельном листе. Сокращение слов за исключением общепринятых в таблицах не разрешается. Необходимо указать достоверность данных.

4. Рисунки, отчетливо выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на глянцевой бумаге) следует указать ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе. Замена фотоиллюстраций электрофоретических исследований рисованными схемами не допускается. Количество иллюстративного материала (таблицы и рисунки) не должно превышать в статьях 8, в кратких сообщениях—2.

5. Формулы и индексы должны быть вписаны четко черными чернилами или пастой, обязательно выделяя курсив (подчеркнуть волнистой линией) и различая прописные и строчные буквы, мало отличающиеся по своему написанию, двумя черточками снизу или сверху, буквы греческого алфавита подчеркиваются красным карандашом.

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

6. Названия ферментов и коферментов, символы кинетики ферментов и единиц активности, написание соединений, меченых изотопами, и т. п. должны соответствовать требованиям Международного биохимического союза. Разрешаются лишь общепринятые современные сокращения слов, различных единиц измерения, физических и химических величин, терминов и т. п. В приложении к правилам для авторов, которое бу-

лет публиковаться в каждом первом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, разрешаемых применять без специальной расшифровки.

Используемые авторами другие сокращенные слова при первом упоминании даются полностью и в скобках в сокращенном виде.

7. Список литературы составляется в порядке цитирования. Все ссылки печатаются на машинке на языке оригинала через 1,5 интервала. В тексте ссылки даются в квадратных скобках. Цитируемая литература в списке приводится в следующем порядке: порядковый номер, фамилия и инициалы авторов на языке оригинала, название журнала, том, номер или выпуск, страницы, год издания. В случае сплошной нумерации страниц тома номер выпуска не указывать. При цитировании книги указывается также, под чьей редакцией она издана, название издательства и место издания. Например:

1. Силакова А. Н., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 7, 538—544, 1962.

2. Георгиев Г. П. — В кн.: Цитология ферментов (под ред. А. А. Покровского), с. 32—83, М., Мир, 1971.

8. Редакция имеет право сокращать и исправлять текст статьи, не изменяя ее основного содержания.

9. В случае возврата статьи для исправления датой поступления ее в редакцию считается день получения исправленного текста.

10. Редакция высылает авторам бесплатно 25 оттисков опубликованной статьи.

11. При отсылке рукописи в редакцию рекомендуется прилагать к заказному письму или бандероли уведомление о вручении, редакция в свою очередь сообщает автору о получении статьи.

12. В случае, если статья будет отклонена редакцией, автору возвращается второй экземпляр рукописи и акт экспертизы.

13. Корректуру авторам редакция не высылает.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

Ala*—аланин
 AMP, ADP, ATP**—аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 cAMP—циклический аденозинмонофосфат
 Ara*—арабиноза
 Arg—аргинин
 Asn—аспарагин
 Asp—аспарагиновая кислота
 Asx—аспарагиновая кислота или аспарагин
 CMP, CDP, CTP—цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 CoA—коэнзим A
 CoASAc—ацетилкоэнзим A
 Cys—цистеин
 FAD, FADH₂ —флавинадениндинуклеотид и его восстановительная форма
 FMN, FMNH₂ —флавиномононуклеотид и его восстановительная форма
 Fuc—фукоза
 Fru—фруктоза
 Gal—галактоза
 Glc—глюкоза
 GlcA—глюкуроновая кислота (аналогично другим уроновым кислотам)
 GlcN—глюкозамин
 GlcNAc —ацетилглюкозамин (аналогично другим дезоксисахарам и их ацетилпроизводным)
 Gln—глутамин
 Glu—глутаминовая кислота
 Glx—глутамин или глутаминовое соединение
 Gly—глицин
 GMP, GDP, GTP—гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 GSH, GSSG—глутатион и его окисленная форма
 His—гистидин
 Hyl—оксализин

Hyr—оксипролин
 Ile—изолейцин
 IMP, IDP, ITP — инозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 Leu—лейцин
 Lys—лизин
 Man—манноза
 Met—метионин
 NAD, NADH —никотинамидениндинуклеотид и его восстановительная форма
 NADP, NADPH —никотинамидениндинуклеотидфосфат и его восстановительная форма
 NMN—никотинамидмононуклеотид
 Orn—орнитин
 Phe—фенилаланин
 P_i —неорганический фосфат
 PP_i —неорганический пирофосфат
 Pro—пролин
 Q, QH₂—убихинон, убихинол
 Rib, dRib—рибоза, 2-дезоксирибоза
 Ser—серин
 Thr—треонин
 TMP, TDP, TTP—рибозилтимин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 Trp—триптофан
 Tyr—тирозин
 UMP, UDP, UTP—уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 Val—валин
 GAMK—гамма-аминомасляная кислота
 ДНК—дезоксирибонуклеиновая кислота
 РНК—рибонуклеиновая кислота
 рРНК—рибосомная РНК
 мРНК—матричная (информационная, ядерная РНК)
 тРНК—транспортная РНК
 Glu-тРНК и т. п.—аминоацилпроизводные РНК

* стандартные обозначения аминокислот и моносахаридов допустимо употреблять в сокращенном виде при написании структур, а также в таблицах и на рисунках

** соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются путем добавления латинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом

Список сокращений часто употребляемых слов, терминов, символов физических и химических величин и единиц измерения

БХ—бумажная хроматография	ЭСР—электронный спиновый резонанс
ГЖХ—газожидкостная хроматография	ЯМР—ядерный магнитный резонанс
ГЭБ—гемато-энцефалический барьер	А—абсорбция (поглощение)
ДЭАЭ—целлюлоза — диэтилamine этилцеллюлоза	г—константа скорости реакции
ИКС—инфракрасная спектроскопия	K_d —константа диссоциации
ИОХ—ионообменная хроматография	K_i —константа ингибирования
КД—круговой дихроизм	K_m —константа Михаэлиса
КХ—колоночная хроматография	K_s —субстратная константа
КМ—целлюлоза — О-карбоксиметил-целлюлоза	n_d —коэффициент Хилла
МАО—моноаминоксидаза	V—максимальная скорость реакции
М. Е.—международная единица	K_u —кюри
М—молекулярная масса (вес)	мК _u —милликюри
м-, о-, п—мета-, орто-, пара-	Р—рентген
н.—нормальный (раствор)	мР—миллирентген
НС—нервная система	имп/мин—импульсы за минуту
ПААГ—полиакриламидный гель	ч—час
СМЖ—спинномозговая жидкость	мин—минута
т. кип.—температура кипения	с—секунда
т. пл.—температура плавления	мкм—микромметр
трис—трис (оксиметил)-аминометан	мкл—микролитр
ТСХ—тонкослойная хроматография	мкг—микрограмм
У. А.—удельная активность	нг—нанограмм
УФ-спектр—ультрафиолетовый спектр	нм—нанометр
ЦНС—центральная нервная система	нг—пикограмм
ЭГТА—этиленгликольтетраацетат	мкатом—микроатом
ЭДТА—этилендиаминтетраацетат	ммоль—миллимоль
ЭПР—электронный парамагнитный резонанс	мкмоль—микромоль
	нмоль—наномоль
	пмоль—пикомоль

Примечание. Сокращения для названий ферментов, как, например, ГДГ, ГДК, ГФБДГ и т. д., не допускаются. Однако нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например: АТРаза, РНКаза, NADHдегидрогеназа и т. п. Химические элементы следует обозначать символами, а простые неорганические соединения—формулами, например: $MgCl_2$. Символы ионов следует писать так: Mg^{2+} , Cl^- , PO_3^- .

СОДЕРЖАНИЕ

Грация Хачатурович Бунятян	3
Галоян А. А. Актуальные задачи нейрохимии	7
Крепс Е. М., Ашмарин И. П. Липиды мембран как информационные молекулы	11
Демин Н. Н. Биохимические изменения мембранных структур нервной ткани крыс при лишении сна (о нейрохимических причинах необходимости сна у высших позвоночных)	20
Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В. Взаимодействие холинэстеразы зрительного ганглия тихоокеанского кальмара с некоторыми аммониевыми соединениями	28
Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Об участии триптических кардиоактивных фрагментов специфических белков гипоталамуса в регуляции активности фосфорилазы и фосфодиэстеразы циклического аденозинмонофосфата	36
Алексидзе Н. Г., Бережной Г. А., Никурадзе В. О., Белик Я. В. К вопросу о специфичности белка S-100 в процессах обучения и памяти	43
Манукян К. Г. Липидный компонент протеолипидов разных отделов нервной системы и субклеточных образований мозга	51
Дмитриев А. Д., Голикowa Ю. И., Кобылянский А. Г., Самовилова Н. Н., Трушина Е. Д., Ярыгин К. Н., Беспалова Ж. Д., Азьмуко А. А., Сакс Т. Р. Получение специфических антисывороток к опиоидным пептидам и их использование для радиоиммунологического определения этих соединений	66

Краткие сообщения

Глущенко Т. С., Вольф Г. Цитофотометрия содержания суммарных белков в системах нейрон—нейрогангия разных отделов головного мозга крыс в ходе постнатального онтогенеза	75
--	----

Обзоры

Глебов Р. Н., Крыжановский Г. И. АТРазная активность микротрубочек мозга	79
Этингоф Р. Н., Думлер Н. Л. Природа фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов сетчатки и сопряжение фермента с рецептором	87

Рецензии

Ашмарин И. П. Е. М. Крепс. ЛИПИДЫ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов	99
Розенгарт В. И., Сытинский Н. А. Я. В. Белик. Нейрохимия. Библиографический указатель. Книга первая (1953—1962); книга вторая (1963—1967)	100

CONTENTS

<i>Hrachia Buniatian</i>	3
<i>Galoyan A. A.</i> The actual problems of neurochemistry	7
<i>Kreps E. M., Ashmarin I. P.</i> Membrane lipids as informative molecules	11
<i>Doemin N. N.</i> Biochemical changes in membrane structure of rat nervous tissue under sleep deprivation (on neurochemical causes of sleep necessity in higher vertebrates)	20
<i>Brestkin A. P., Vinjar T. N., Rozengart E. V.</i> Interaction of optical ganglia cholinesterase of pacific squid with some ammonium compounds	28
<i>Srapionian R. M., Sahakian S. A., Abelian J. G., Galoyan A. A.</i> The effect of cardioactive tryptic fragments of hypothalamic specific proteins on the activity of phosphorylase and cAMP phosphodiesterase	36
<i>Aleksidze N. G., Berezhnyj H. A., Nikuradze V. O., Belik Y. V.</i> On the specificity of S-100 protein in learning processis and memory	43
<i>Manukian K. H.</i> Ltpid moiety of proteolipids from varions parts of nervous system and brain subcellular particles	51
<i>Dmitrlev A. D., Golikova U. I., Kobylansky A. G., Samovilova N. N., Trushina E. D., Yarygin K. N., Bepalova J. D., Azmuko A. A., Saks T. R.</i> Specific antisera to opioid peptides: preparation and using for radioimmunoassay of these peptides	66

Short communications

<i>Gluschenko T. S., Volf G.</i> On cytophotometric determination of total protein content in neuron-neuroglia system from different rat brain areas in the course of postnatal ontogenesis	75
---	----

Reviews

<i>Glebov R. W., Kryzhanovsky G. N.</i> ATPase activity of brain microtubules	79
<i>Ettingof R. N., Dumler I. L.</i> Cyclic nucleotides phosphodiesterase from retina and its coupling with the receptor	87

Book reviews

<i>Ashmarin I. P.</i> E. M. Kreps. THE LIPIDES OF CELL MEMBRANES. The evolution of brain lipides. The adapting function of lipides	99
<i>Rozengart V. I., Stitsnki I. A.</i> Y. V. Belik. Neurochemistry, Bibliography, Books 1-II	100

К ЧИТАТЕЛЯМ

Постановлением Президиума Академии наук СССР от 16 января 1981 г. был создан новый всесоюзный журнал «Нейрохимия». В журнале публикуются статьи по всем разделам биохимии нервной системы.

В 1982—1983 гг. запланирован выпуск четырех номеров журнала, в дальнейшем число номеров будет увеличено до шести. В журнале замечено публиковать наряду с оригинальными статьями также обзоры по актуальным вопросам нейрохимии и экспресс-информацию в виде кратких сообщений и писем в редакцию. Намечена публикация сообщений об итогах состоявшихся нейрохимических форумов и календаря предстоящих научных событий, имеющих отношение к нейрохимии; будут помещены рецензии на книги по нейрохимии, а также другая информация.

Редколлегия приложит все силы к максимальному сокращению сроков публикации статей. Каждая рукопись будет рецензироваться высококвалифицированными специалистами.

Редколлегия оставляет за собой право отклонять работы, не относящиеся непосредственно к профилю журнала, а также выполненные на недостаточно высоком научно-методическом уровне.

Редколлегия будет благодарна читателям за советы и критические замечания по улучшению журнала, все они будут внимательно рассмотрены.

Редколлегия обращается к авторам с просьбой подробно ознакомиться с публикуемыми в этом номере журнала «Правилами для авторов» и строго следовать им.

Мы надеемся, что наш журнал, способствуя установлению более тесных контактов и обмену научной информацией между учеными, работающими в области нейрохимии, выполнит поставленные перед ним задачи.

РЕДКОЛЛЕГИЯ