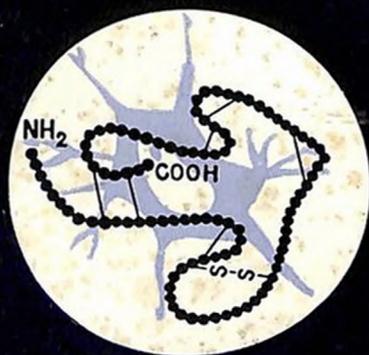


НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ. 1. № 4. 1982

ISSN 0203-493X



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 1, ВЫП. 4
Октябрь—декабрь

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1982

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

Сдано в набор 27.10. 1982 г. Подписано к печати 13.01. 1983 г. ВФ 04216
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист. 7,5. Усл. печ. лист. 10,5.
Учет.-изд. 8,15. Тираж 615. Заказ 1157. Издат. 5816.
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака, 5/1, т. 24-89-00, 24-89-54.
Издательство АН АрмССР, Ереван 19, Барекамутиян 24-г.
Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19, Барекамутиян, 24.

К 60-ЛЕТИЮ ОБРАЗОВАНИЯ СОЮЗА СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

30 декабря 1922 года волей народов нашей страны был создан Союз Советских Социалистических Республик—первое в мире единое союзное многонациональное государство рабочих и крестьян. Образование СССР по своей политической значимости и социально-экономическим последствиям занимает выдающееся место. Значение этого события выходит далеко за пределы нашей Родины. Создание первого в мире многонационального социалистического государства имеет всемирно-историческое значение.

Рождение Союза ССР—результат победы Великой Октябрьской социалистической революции, величайшая заслуга ленинской партии большевиков, многонациональной по своему составу и интернациональной по идеологии и политике, организационному строению, принципам деятельности.

После победы Октябрьской революции вопрос о выборе наиболее целесообразной формы государственного устройства не мог быть решен сразу. Решающее слово должны были сказать сами народы. Уже на II Всероссийском съезде Советов в 1917 г. было провозглашено, что Советская власть «обеспечит всем нациям, населяющим Россию, подлинное право на самоопределение». Создание Союза ССР—живое воплощение ленинских принципов национальной политики. История не знает государства, которое в кратчайшие сроки сделало бы так много для всестороннего развития наций и народностей, как СССР.

В суровые годы Великой Отечественной войны народы-братья плечом к плечу встали на защиту Отчизны, спасли народы мира от порабощения и уничтожения. Незабываемым народным подвигом стало послевоенное возрождение хозяйства.

Прошедшие 60 лет отмечены стремительным социально-экономическим развитием Советского Союза. В дружной семье народов динамично растут экономика и культура всех советских республик. Современная промышленность, сельское хозяйство, наука, подлинный расцвет культуры—вот что характеризует сегодня любую из них. Результатом всего этого явилось построение развитого социалистического общества. Тесное сплочение советских республик дало возможность ранее угнетенным народам и отдаленным районам догнать центральную Россию в государственном, культурном и хозяйственном отношениях. И политические причины требовали более прочного объединения, так как

важно было вырастить новые отряды рабочего класса из представителей всех национальностей и упрочить его союз с крестьянством. Нельзя было забывать о капиталистическом окружении и военной опасности для всех молодых советских республик, о необходимости выступать единым фронтом на международной политической арене.

Курс партии, как отметил XXVI съезд, предусматривает наращивание материального и духовного потенциала и, вместе с тем, его максимальное использование для гармонического развития всей страны. В то же время партия видит нерешенные проблемы, имеющиеся трудности и недостатки. Все советские люди как наказ восприняли слова товарища Л. И. Брежнева, сказанные на ноябрьском (1981 г.) Пленуме ЦК КПСС: «Надо лучше работать, лучше составлять планы и лучше выполнять их. Лучше организовывать производство и лучше производить. Словом, работать эффективнее».

Наряду с ростом производительных сил бывших отсталых районов, повышением культуры земледелия и развитием новых отраслей промышленности шло изучение природных богатств республик и исследование полезных ископаемых. Это приводило и к созданию в республиках новых отрядов рабочего класса, что, в свою очередь, повышало общую культуру населения ранее отсталых районов. Во всех национальных республиках была постепенно ликвидирована неграмотность, выросла сеть школ, увеличилось число средних и высших учебных заведений. Вершиной этих культурных преобразований явилось создание в союзных республиках своих академий наук.

С первых лет установления Советской власти Академии наук СССР вменялось в обязанность оказывать помощь братским республикам в подготовке молодых национальных кадров. В последние годы традицией стало устраивать на местах выездные сессии, широко практикуется проведение конференций и съездов, в том числе и всесоюзных в республиканских центрах. Республиканские институты стали получать значительную помощь оборудованием и средствами.

Все эти усилия дали блестящие результаты. Мы не имеем теперь «отсталых окраин». Все народы Советского Союза вносят свой вклад в развитие советской науки.

Можно считать, что у нас исчезло понятие «провинциальная наука». Мы уже достигли того, что один и тот же уровень исследований и преподавания проводится и в центральных городах Союза, и на периферии.

Всесоюзные журналы Академии наук СССР издаются теперь не только в Москве и Ленинграде, но и во Владивостоке («Биология моря»), Киеве («Нейрофизиология»), Ереване («Нейрохимия»).

Развитие науки в союзных республиках достигло таких масштабов, что многим институтам республиканских академий наук в настоящее время принадлежит ведущая роль в развитии ряда научных направлений. В отдельных областях биологической науки, в частности биохимии, наряду с научно-исследовательскими институтами Москвы и Ленинграда широкую известность приобрели Институт биохимии АН УССР

им. Палладина, Институт биохимии АН АрмССР, Институт биохимии АН Узбекской ССР и др.

Значительных успехов в последние десятилетия достигла отечественная нейрохимия.

Важную роль в организации нейрохимических исследований в СССР сыграла биохимическая школа, созданная академиком А. В. Палладиным. Наша страна стала подлинной родиной функциональной нейрохимии, в настоящее время крупные нейрохимические центры созданы в различных городах Советского Союза (Ленинград, Москва, Ереван, Тбилиси, Ростов-на-Дону, Минск, Тарту и др.). Советская нейрохимия достигла серьезных успехов в области изучения биохимических основ возбуждения и торможения, сна, обучения и памяти. Имеются достижения в исследовании биохимических механизмов синаптической передачи, рецепции внешних раздражений в органах чувств, действия фармакологических нейротропных препаратов и нейротрофических эффектов. В последнее время интенсивно и плодотворно изучаются эффекты многочисленных природных нейрогенных биологически активных соединений, в первую очередь нейропептидов и специфических белков. Результаты нейрохимических исследований находят применение в медицине, например, в невропатологической и психиатрической практике, а также при выработке режимов адаптации к действию экстремальных факторов.

Коллектив авторов, редколлегия и читатели журнала «Нейрохимия», встречая знаменательную дату—60-летие образования СССР целеустремленными усилиями, направленными на развитие советской науки, гордятся достижениями нашей страны, шагающей в первых рядах борцов за мир, независимость и счастье народов.

МОЗГ КАК ЭНДОКРИННЫЙ ОРГАН*

Р. ГИЛЛЕМИН

За последние несколько лет наши знания в области нейроэндокринологии мозга значительно углубились. Об этом свидетельствует даже неполный перечень недавно опубликованных обзоров по этой проблеме [1—4].

В данной статье сделана попытка обсудить некоторые вопросы, связанные с функцией мозга как эндокринного органа, которые, по всей вероятности, составят основное направление научных исследований ближайших лет. Ответы на некоторые из них уже получены, другие пока остаются открытыми.

1. Одним из фундаментальных принципов современной нейрофизиологии стал принцип, который в конце 30-х годов Д. Экклзом был назван законом или принципом Дейла. Независимо от дословной формулировки, данной Г. Дейлом в его Диксоновской лекции «Фармакология и нервные окончания», Экклз так выражает принцип Дейла: один нейрон должен пользоваться (то есть производить и расходовать) только одним нейротрансмиттером на каждом из своих окончаний. Существуют нейроны адренергические и холинергические—эти два термина Дейл ввел в обращение после своих знаменитых работ по регенерации нервов.

Если мы имеем дело с не полиплоидным нейроном взрослого организма, то можно говорить о правомерности принципа Дейла. Что касается нейрона плода, теперь мы знаем, что он имеет несколько возможностей относительно конечного выбора медиатора: адренергического или холинергического, но это отдельный случай, который был тщательно исследован несколькими лабораториями [5], и я не собираюсь на нем останавливаться, так же, как на уникальных структурах, исследуемых Е. Kandel у *Aplysia* [6].

Правилен ли принцип Дейла, когда имешь дело с такими нейропептидами, как нейропептиды? Для упрощения доказательств следует оговориться, что мы принимаем это положение. Другими словами, я не приведу никаких веских доводов в защиту того, что некоторые пептиды действительно считаются настоящими нейропептидами [4], такими же, как катехоламины или ацетилхолин. Если это предположение

* Статья оформлена по материалам лекции лауреата Нобелевской премии, профессора Р. Гиллемина, прочитанной им на 2 Международном симпозиуме по соматостатину в Афинах в 1981 г. (печатается с сокращениями).

принять, то принцип Дейла больше не имеет отношения к нейропептидам, так как нейрон, выделяющий и использующий пептид, должен секретировать больше, чем один пептид, и может пользоваться больше, чем одним пептидом (рис. 1).

Это положение вытекает из знания процессов биосинтеза белка в клетках, отличных от нейронов. Есть основания предполагать, что они применимы также и к нейронам.

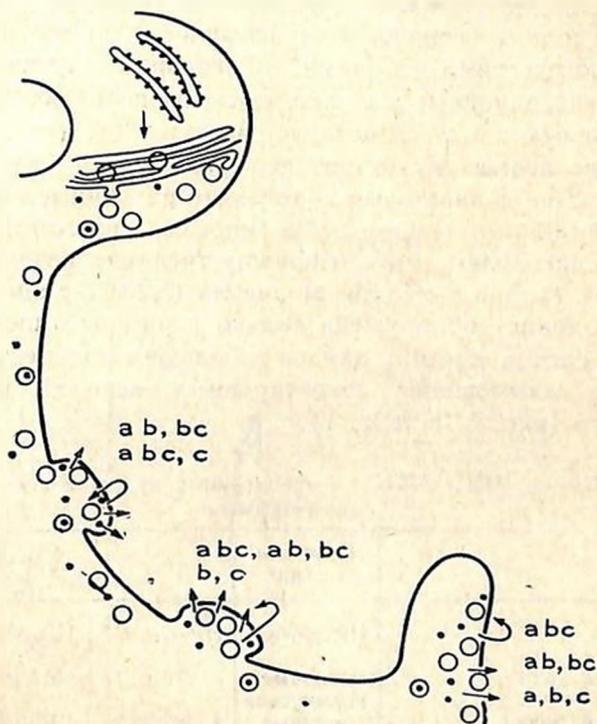


Рис. 1. Диаграмма, представляющая нейрон с синаптическим окончанием аксона и двумя боковыми окончаниями. Ток аксоплазмы приносит к различным окончаниям гранулы от эндоплазматического ретикулума Гольджи—классического метаболического пути синтеза белков. Эти гранулы содержат молекулы предшественника (*sabc*, *s*—для затравки пептида) одного или нескольких биологически активных пептидов (*a*, *b*, *c*) вместе с синтезирующими их ферментами. Они расщепляют предшественник *abc* на фрагменты, такие, как *ac*, *ab*, *bc*, и даже *a*, *b*, *c*. Фрагменты, так же, как и предшественник *abc*, могут выделяться из нейрона. Точка в некоторых гранулах означает присутствие биогенных аминов (допамин) обычно с синтезирующими их ферментами; изогнутые стрелки обозначают наличие системы обратного захвата для биогенного амина; для белков такая система не обозначена (прямые стрелки)

Возьмем пример из области нейроэндокринологии — биосинтез АКТГ, эндорфина и меланостимулирующего гормона (МСГ). В настоящее время хорошо известно, что все эти пептиды с различной биологической активностью действительно являются частью общего биосинте-

тического предшественника, полная аминокислотная последовательность которого известна и для которой была изолирована и клонирована мРНК, по крайней мере, у двух видов [7]. Это является хорошим доказательством того, что фрагменты γ_1 -МСГ, γ_3 -МСГ, АКТГ, СЛР или АКТГ-18—39, β -липотропин, α -эндорфин, β -эндорфин и γ -эндорфин могут быть выделены из экстракта гипофиза и базального гипоталамуса. Имеются веские доводы в пользу того, что эти фрагменты не являются артефактами, проявляющимися в процессе экстракции, а секретируются как таковые *in vivo* (измерения в периферической крови специфическими радиоиммунологическими методами, в некоторых случаях пропускание через гель-фильтрационные колонки, которые позволяют точно определить молекулярную массу секретируемых веществ) (рис. 2, 3, табл. 1) и *in vitro*—в монослойных культурах гипофизарных клеток [8]. Имеется также неоспоримое доказательство того, что различные ткани, в данном случае *pars distalis* и *pars intermedia* гипофиза, действительно осуществляют процессинг молекулярного предшественника различным образом (рис. 2, 3, табл. 1), при этом одна молекула (α -МСГ с ацетилированным серином на N-конце) обнаружена только в *pars intermedia*, тогда как β -эндорфин в *pars intermedia* найден в большем количестве, чем в *pars distalis*. Такое соотношение секретируемых веществ наблюдалось в опытах *in vitro* (рис. 2, 3, табл. 1).

Таблица 1

ИР- γ_1 -МСГ, - γ_3 -МСГ, -АКТГ и - β -эндорфин в культуральной жидкости гипофиза быка

	Пептиды (пг/мл)	M \pm m			
		ИР- γ_1 -МСГ	ИР- γ_3 -МСГ	ИР-АКТГ	ИР- β -эндорфин
Клетки передней доли Контроль	следовые количества	279 \pm 12	516 \pm 27	430 \pm 30	
Клетки передней доли +1,0 мМ IBMX	следовые количества	597 \pm 9*	1075 \pm 137**	835 \pm 30*	
Клетки промежуточной доли Контроль	65 \pm 2	1214 \pm 25	—	1494 \pm 4	
Клетки промежуточной доли +1,0 мМ IBMX	122 \pm 9**	1750 \pm 116*	—	2504 \pm 298*	

Двусторонний тест множественных сравнений по Дуннету

n=3; *p<0,05; **p<0,01

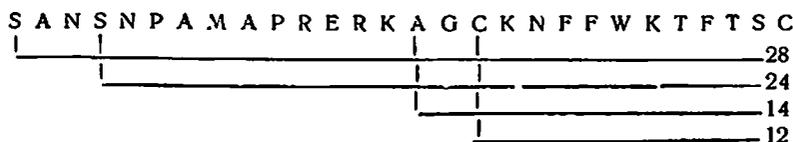
Таким же образом, но с небольшими вариациями, в нейронах *p. arcuatus* гипоталамуса были обнаружены вместе иммуореактивный (ИР) β -эндорфин, ИР-АКТГ и ИР- γ_3 -МСГ. Очевидно, некоторые нейроны, составляющие анатомически родственную популяцию *p. arcuatus*, могут осуществлять процессинг общего предшественника—про-опиомеланокортина по-разному, как и в клетках двух различных долей гипофиза [9].

Если теперь мы обратимся к соматостатину, то обнаружим сход-

ную картину. Изучение синтеза и процессинга соматостатина ведется сейчас в нескольких лабораториях, и эти работы идут вслед за развивающимися методами. Мы сейчас знаем (табл. 2), что несколько биологически активных форм соматостатина уже экстрагированы и охарактеризованы. Открытие соматостатина-28 в экстрактах двенадцати-

Таблица 2

Однобуквенный код аминокислотных последовательностей всех биологически активных соматостатинов, выделенных из различных тканей



A—Ala, C—Cys, E—Glu, F—Phe, G—Gly, K—Lys, M—Met, N—Asn, P—Pro, R—Arg, S—Ser, T—Thr, W—Trp

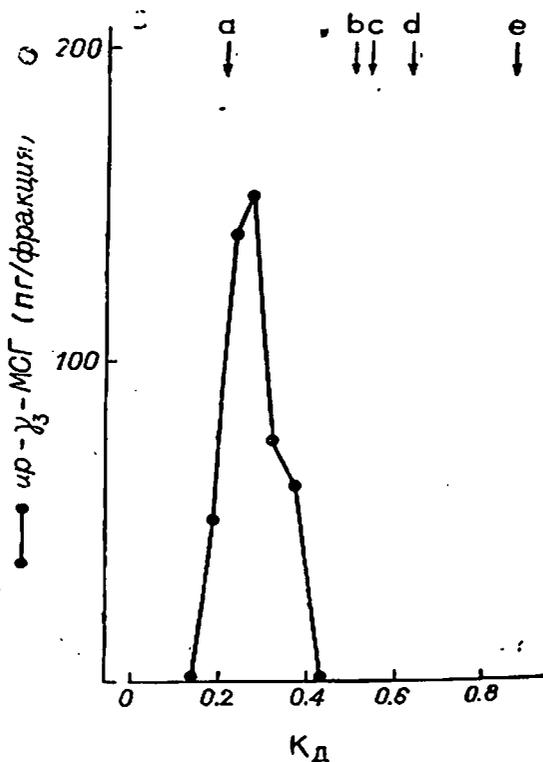


Рис. 2. Гель-фильтрационная хроматография (сефадекс G-75) среды культуры клеток передней доли гипофиза: *a*—¹²⁵I-β-липотропин; *b*—АКТГ; *c*—¹²⁵I-β-эндорфин; *d*—¹²⁵I-γ₃-МСГ; *e*—¹²⁵I-γ₁-МСГ

перстной кишки [10] было использовано для выявления этих же молекул в экстрактах гипоталамуса свиньи [11], овцы [12] и крысы [13]; кроме него в экстрактах гипоталамуса овцы мы обнаружили дополнительный соматостатин-25 [(Des/Ser¹-Ala²-Asn³]-соматостатин-28). Это

Содержание соматостатина-28 (СС-28) и соматостатина-14 (СС-14) в тканях крыс

Гипоталамус	Преобладает СС-14 и высокий уровень СС-28
Поджелудочная железа	Преобладает СС-14 и низкий уровень СС-28
Щитовидная железа в норме	Преобладает СС-14 и низкий уровень СС-28
—анapластическая медулярная карцинома	СС-28 единственная обнаруженная форма
Двенадцатиперстная кишка	
—выделенный в просвет холестикинином	Преобладает СС-28 с высоким уровнем СС-14

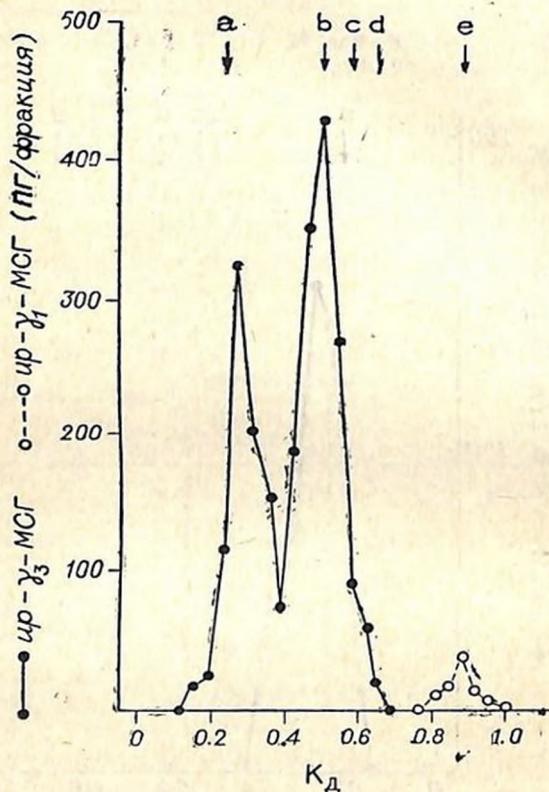


Рис. 3. Гель-фильтрационная хроматография (сефадекс G-75) среды культуры клеток промежуточной доли гипофиза: *a*— ^{125}I - β -липопиронин; *b*—АКТГ; *c*— ^{125}I - β -эндорфин; *d*— ^{125}I - γ_3 -МСГ; *e*— ^{125}I - γ_1 -МСГ

вещество и Des [Ala¹-Gly²]-соматостатин-14 могут быть артефактами методов экстракции и хранения тканей. Как и в случае про-опиомеланокортина, о котором говорилось ранее, процессинг биосинтетического предшественника этих различных форм соматостатина (просоматостатина) происходит по-разному в различных тканях. Все эти данные суммированы в табл. 3. В нашей лаборатории R. Venot недавно охарактеризовал новую антисыворотку, полученную от кролика, иммунизиро-

ваинного синтетическим аналогом соматостатина-28, которая «узнает» только N-терминальный участок соматостатина-28. При комбинированном использовании ее с полученной от овцы антисывороткой Вагбаг, которая «узнает» исключительно соматостатин-28 (15—28) (то есть соматостатин, открытый в 1972 г.), мы имеем хорошее доказательство того, что N-терминальный участок соматостатина-14 может быть обнаружен в экстрактах поджелудочной железы и гипоталамуса крысы (рис. 4). Таким образом, есть основания предполагать, что этот фрагмент в таком именно виде и выделяется.

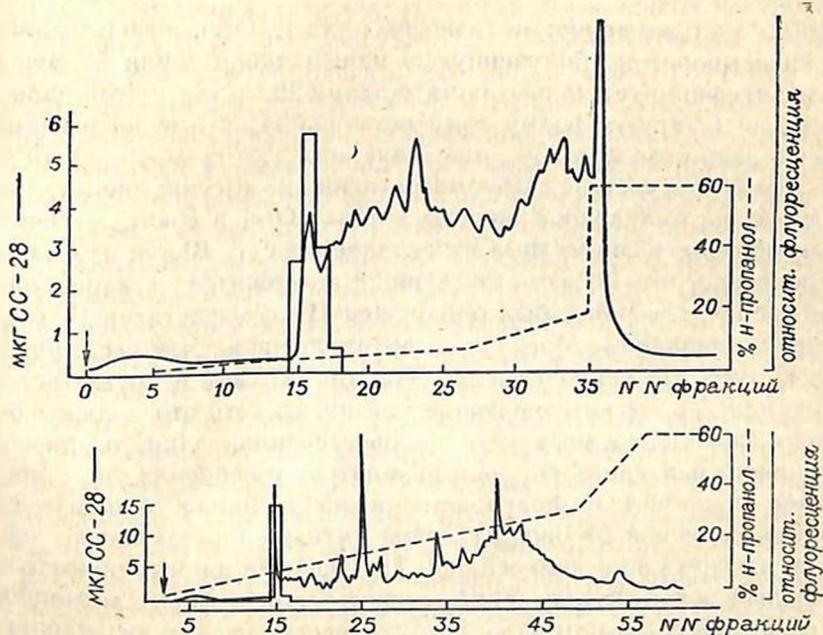


Рис. 4. Иммунореактивность, соответствующая N-терминальному фрагменту 1—12 соматостатина-28, полученная с помощью антисыворотки, не реагирующей с соматостатином-14. Верхний график: ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) очищенного экстракта поджелудочной железы крыс; нижний график: ВЭЖХ очищенного экстракта гипоталамуса крыс. Различное время задержки 2-х иммунореактивных зон обусловлено применением разных колонок и небольшими различиями в условиях опыта

Недавно P. Vollen и R. Venoit охарактеризовали это соединение как материал, имеющий скорее аминокислотный состав соматостатина-28 (1—12), чем соматостатина-28 (1—14); эти данные дают возможность считать, что процессинг просоматостатина должен включать ферментативное отщепление пары Arg-Lys, которая, как было выявлено, расположена между соматостатином-28 (1—12) и «старым» соматостатином-14. N. Ling воспроизвел эту последовательность с помощью синтеза. При этом не было обнаружено биологической активности у фраг-

мента соматостатина-28 (1—12) в проведенных тестах (ингибирование или стимуляция секреции гормонов роста, опиатоподобная активность).

Ранее, на первом симпозиуме, интересовались, есть ли доказательства тому, что соматостатин-28 найден в секреторных гранулах. Возвращаясь к этому вопросу, я полагаю, что соматостатин-28 может быть экстрагирован как самостоятельное вещество (этого никто оспаривать не будет), но не обязательно как истинный секреторный продукт, экстрагируемый из межклеточного пространства. Сравнивая размеры соматостатина-28 с ИР-формами соматостатина из плазмы, мы получим ответ на заданный вопрос.

Ответ на этот же вопрос недавно был дан L. Orci, использовавшим одну из антисывороток (полученную в нашей лаборатории R. Vepoit), которая идентифицирует только соматостатин-28 и его терминальный участок, но не «старую» форму соматостатина-14. Этими антигенами в сочетании с изящным методом молекулярного золота—белка-А им ясно было показано присутствие ИР-соматостатина-28 в секреторных гранулах D-клеток поджелудочной железы крысы (Orci и соавт., в печати). Подобным образом в совместных исследованиях с F. Bloom из Солк-института показано, что ИР-соматостатин-28 содержится в карิโอплазме тех же нейронов, где ранее был обнаружен ИР-соматостатин-14 (будет опубликовано подробно). Могу ли я предположить, что исследования подводят к тому, что нейроны ведут себя так же, как и другие пептидергические или пептидсинтезирующие клетки, то есть что должны быть обнаружены фрагменты молекулы предшественника данного биологически активного пептида и что они находятся в нейронах и секретируются ими. Обладают ли фрагменты предшественника биологической активностью, отличной от биологической активности известных пептидов, будет установлено в дальнейшем. Полученные данные обязательно вызовут целый поток исследований, скорее всего, в форме межлабораторного сотрудничества или даже сотрудничества нескольких лабораторий. Логических аргументов против того, что фрагменты предшественника АКТГ не имеют активности, подобной активности опиатов, нет. Таким образом, принцип Дейла не приложим к пептидам.

2. Другой вопрос, который подлежит обсуждению, был разрешен очень интересно. Он заключался в доказательстве того, что пептиды, обнаруживаемые иммуноцитохимически в той или иной форме, это, действительно, те самые антигены, которые используются для получения антисывороток, применяемых для определения их локализации в тканях. Если считать, что иммуноцитохимия выполнена максимально специфично (высокое разведение сыворотки, точные и обширные блокирующие тесты с синтетическими пептидами высокой чистоты), то можно сказать, что иммуногистологи действительно имеют дело с тем пептидом, который они предполагали увидеть, или с его биологическим предшественником больших размеров. Это положение вызывает некоторые интересные, но осторожные заключения. Для краткости я приведу только несколько примеров, не касающихся АКТГ, МСГ, эндорфинов или соматостатинов.

Антисыворотка, полученная для синтетического аналога бомбезина амфибий, выявила присутствие ИР-бомбезина в клеточных элементах кишечника и совсем недавно в мозгу млекопитающих [14]. Химическими методами показано, что соответствующие молекулы длиннее, чем тетрадекапептид-бомбезин; Т. McDonald сообщал, что найденный им в кишечнике пептид, состоящий из 27 остатков аминокислот, частично соответствует бомбезину. Как и бомбезин, этот более длинный пептид, выделенный из экстракта желудка свиньи, стимулирует секрецию гастрина [15]. Подобно этому ранее были получены доказательства того, что иммунореактивный бомбезин в экстрактах мозга млекопитающих похож на гораздо более длинную молекулу, чем бомбезин амфибий. В экстрактах тканей млекопитающих нет пептидов, соответствующих точной аминокислотной последовательности бомбезина амфибий, который используется как антиген для получения антисыворотки. После того, как были выделены и охарактеризованы энкефалины и эндорфины, гомологичность и схожесть их аминокислотных последовательностей заставили предположить, что биосинтез этих веществ должен быть общим, исключая, возможно, Leu-энкефалин, о чем будет сказано позже. Первое четкое подтверждение того, что биосинтез энкефалина и эндорфина различен, поступило из нашего совместного с Bloom [16] сообщения, в котором показано, что анатомическое распределение в мозгу нейронов, содержащих ИР-β-эндорфин и ИР-энкефалин, различно. Это положение получило развитие при исследовании отличных от мозга тканей. Schulzberg и соавт. [17] впервые сообщили о присутствии ИР-энкефалинов в клетках надпочечника. Недавно было обнаружено присутствие в экстракте надпочечника быка серии пептидов, начиная от пентапептидов Met-энкефалина и Leu-энкефалина до больших пептидов с молекулярной массой 50 000 дальтон. Все эти большие пептиды содержат в себе один или больше пентапептидов энкефалина; некоторые содержат и Met-, и Leu-энкефалиновые последовательности. Эти данные обобщены на рис. 5, взятом из работы Udenfriend и соавт. [18].

Так как эти результаты помогают прояснить вопрос биосинтеза ИР-энкефалинов в надпочечниках, они могут дать ключ и необходимую информацию при исследовании биосинтеза энкефалина в головном мозгу. В настоящее время эта проблема интенсивно исследуется несколькими лабораториями. Приведенные данные являются доказательством того, что эти пептиды выделяются в вену надпочечника вместе с катехоламинами; пептидно-аминная «упаковка» при этом не диссоциирует [19].

Подводя итоги, хочется сказать, что коллеги-морфологи, занимающиеся иммуногистологией, могут быть спокойны за свою работу. Они действительно видят то, что предполагают увидеть; правда, в отношении биосинтетического предшественника надо соблюдать осторожность.

3. Исходя из последнего положения относительно мозгового вещества надпочечников, можно прийти к следующему.

Один из наиболее волнующих вопросов современной нейробиологии касается взаимоотношения между биогенными аминами и биологи-

чески активными пептидами в нейронах. Характеризуя комплекс APUD, Pearse [20] подчеркнул, что он является частью цитохимических свойств клеток, продуцирующих полипептидные гормоны, которые могут «поглощать предшественники аминов» или содержать биогенные амины. Тщательно проведенные эксперименты свидетельствуют, что во всех нейронах, содержащих тот или иной пептид, имеются также и ферменты, участвующие в биосинтезе биогенных аминов (например, до-

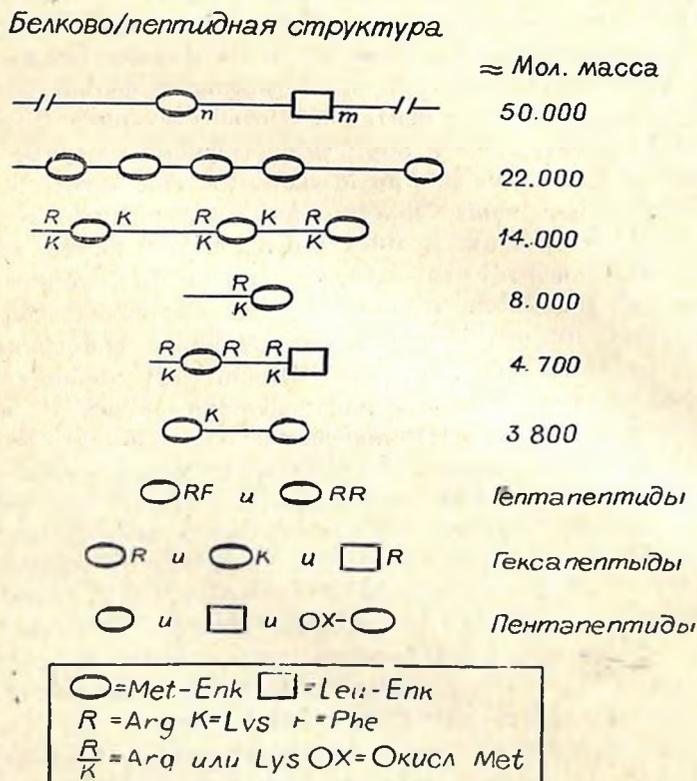


Рис. 5. Структура энкефалинсодержащих полипептидов; $n=6-7$, $m=1$ (определено по соотношению). По Lewis и соавт. [18]

памин-β-гидроксилаза), что было показано иммуногистологически [21] или простыми химическими способами. Как было предложено и обсуждено в данном сообщении, ответ на вопрос о функциональных взаимоотношениях аминов и пептидов в нейронах будет получен с помощью исследований, проведенных не на мозговой ткани. Уже упоминалось о работах, ведущихся с тканью надпочечников. Недавно из клеток карциномы мозгового слоя щитовидной железы были получены линии, то есть неограниченные количества клеток, которые в дополнение к серотонину содержат и секретируют и некоторые пептиды (ИР-кальцитонин, ИР-нейротензин, ИР-соматостатин) [22]. Такие клетки могут

стать идеальным инструментом в исследовании взаимодействия аминов с пептидами в нейронах. В работе, касающейся аденогипофиза, Porter и соавт. [23] пришли к выводу, что амины, в данном случае допамин, найдены в максимальном количестве внутри секреторной гранулы полипептида, а именно гранулы пролактина. В недавнем сообщении Ossi и соавт. [24] показано, что глюкагон и глицентин организованы в секреторных гранулах α -клеток поджелудочной железы. Первый локализован в центральной части, второй—только на периферии. Эти данные выдвигают новую интересную идею о том, что секреторные гранулы по своему строению могут быть скорее многослойными, чем однородными сферами. При такой структуре гранул имеется возможность выбрасывать центральное и периферическое содержимое в разное время.

Эти вопросы могут быть правомочны и по отношению к нейронам.

4. Наконец, возможно ли представить, что при окончательной вырождаемости принципа Дейла нейрон мог производить, использовать и выделять несколько пептидов, различных по их биосинтезу? Ничто не говорит против такой возможности, поскольку кодирующий материал имеется. В недавно появившихся статьях с осторожностью сообщается, что одновременное присутствие ИР-соматостатина и ИР-энкефалина обнаружено в некоторых спинальных нейронах [3] и мозговом веществе надпочечников [25], а также ИР-вещества Р и опии-подобных пептидов в клетках мозгового слоя надпочечников [26]. Мною уже упоминалось о линиях, полученных из клеток карциномы мозгового слоя щитовидной железы, секретирующих все три полипептида—кальцитонин, соматостатин и нейротензин [22]. Ответы на соответствующие вопросы по отношению к нейронам могут быть даны при изучении периферических тканей.

THE BRAIN AS AN ENDOCRINE ORGAN

R. GUILLEMIN

The Salk Institute, La Jolla, CA. 92037

In this paper several questions are discussed related to the brain as an endocrine organ that will apparently be paramount in the scientific approach of the next few years.

Experimental data are presented which indicate that Dalés Principle will not apply in the case of neuropeptides because a neuron releasing and using a peptide must secrete more than one peptide, and may well use more than one peptide.

The view is advanced that peptides seen in tissues in different forms by immunocytochemistry are actually the very antigens used to raise the antisera to locate them in tissues.

Amino acid sequence of all biologically active somatostatins so far isolated from various sources is given.

The relationship between the biogenic amines and biologically active peptides in neurons is discussed in detail.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Guillemin R.* Science, 202, 390—402, 1978.
2. *Schally A. V.* Science, 202, 18—28, 1978.
3. *Hökfelt T., Johannsson O., Ljungdaht A., Lundberg J. M., Schultzberg M.* Nature, 284, 515—521, 1980.
4. *Snyder S. H.* Science, 209, 976—983, 1980.
5. *Patterson P. H., Chun L. L. Y.* Developmental Biology, 60, 473—481, 1977.
6. *Kandel E. R.*—In: Psychopharmacology, Vol. 1, p. 385—398, Washington, D. C.; U. S. Printing Office.
7. *Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Numa S.* Nature, 278, 423—428, 1979.
8. *Shibasaki T., Ling N., Guillemin R.* Regulatory Peptides (submitted, 1980).
9. *Bloom F., Battenberg E., Shibasaki T., Benoit R., Ling N., Guillemin R.* Regulatory Peptides, 1, 205—222, 1980.
10. *Pradayrol L., Jörnvall H., Mutt H., Ribet A.* FEBS Lett., 109, 55—58, 1980.
11. *Schally A. V., Huang W. Y., Chang R. C. C., Arimura A., Redding T., Millar R., Hunkapiller M., Hood L. E.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 4489—4493, 1980.
12. *Esch F., Böhlen P., Ling N., Benoit R., Brazeau P., Guillemin R.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 6827—6831, 1980.
13. *Böhlen P., Brazeau P., Esch F., Ling N., Guillemin R.* Regulatory Peptides (submitted, 1981).
14. *Brown M., Rivier J., Kobayashi R., Vale W.*—In: Gut Hormone, S. R. Bloom (Ed.), Churchill-Livingston, London, p. 550—558, 1978.
15. *McDonald T. J., Jörnvall H., Nilsson G., Vagne M., Ghatel M., Bloom S. R., Mutt V.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 90, 227—233, 1979.
16. *Rossier J., Vargo T., Minick S., Ling N., Bloom F., Guillemin R.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5162—5166, 1977.
17. *Schultzberg M., Hökfelt T., Lundberg J. M., Terentius L., Elfvin L. G., Elde R. P.* Acta Physiol. Scand., 103, 475—477, 1973.
18. *Lewis R. V., Stern A. S., Kimura S., Rossier J., Stein S., Udenfriend S.* Science, 208, 1459—1461, 1980.
19. *Viveros O. H., Diliberto E. J., Hazum E., Jr., Chang K. J.*—In: Neural Peptides and Neuronal Communications, E. Costa and M. Trabucchi (eds.); Raven Press, p. 191—203, 1980.
20. *Pearse A. G. E.* Proc. Royal Soc. B., 170, 77—83, 1968.
21. *Hökfelt T., Elfvin L. G., Elde R., Schultzberg M., Goldstein M., Luft R.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 3587—3591, 1977.
22. *Zeytinoglu F. N., Gagel R. F., Tashjian A. H., Jr., Hammer F. A., Leeman S. E.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 3741—3745, 1980.
23. *Nansel D. D., Gudelsky G. A., Porter J. C.* Endocrinology, 105, 1073—1077, 1979.
24. *Ravazzola M., Orci L.* Nature, 284, 66—67, 1980.
25. *Lundberg J. M., Hamberger B., Schultzberg M., Hökfelt T., Granberg P. O., Efendic S., Terentius L., Goldstein M., Luft R.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 4079—4083, 1979.
26. *Saria A., Wilson S. P., Molnar A., Viveros O. H., Lembeck F.* Neuroscience Letters, 20, 195—200, 1980.

Институт Солка, Ла Йола,
Калифорния, США, 92037

Поступила 16.XI 1981

УДК 577.15.024

РЕГУЛЯЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЭТАПОВ ПРОЦЕССА СЕКРЕЦИИ
МЕДИАТОРОВ В СИНАПСАХ

ГЛЕБОВ Р. Н., КРЫЖАНОВСКИЙ Г. Н.

Приведены экспериментальные данные по проверке механо-химической гипотезы секреции медиаторов в синапсах и рассмотрены пути регуляции важнейших этапов секреции. При моделировании последней стадии мембран-мембранного взаимодействия синаптических пузырьков с пресинаптическими мембранами использован метод изучения Ca^{2+} -индуцируемой агрегации изолированных синаптических пузырьков мозга крыс. Показано, что синаптические пузырьки, содержащие и несодержащие в мембранах кальмодулин, в присутствии Mg^{2+} -АТФ отличаются между собой по степени осмотической чувствительности и Ca^{2+} -индуцируемой агрегации.

В последнее время широкое распространение получает механо-химическая гипотеза секреции медиаторов путем экзоцитоза [1—3]. Согласно этой гипотезе, процесс секреции медиаторов при возбуждении нервных окончаний состоит, по крайней мере, из трех этапов: 1) транспорт («скольжение») синаптических пузырьков (СП) по «рельсам» микротрубочек и нейрофиламентов при возможном участии системы актин—миозин в направлении к активной зоне синапсов; 2) Ca^{2+} -зависимое взаимодействие СП с комплементарными участками пресинаптической мембраны (пре-СМ) при участии системы актин—миозин, в результате этого взаимодействия при участии Ca^{2+} и белков тропонина и тропомиозина, ассоциированных с пре-СМ, образуется актомиозиновый комплекс, регулирующий правильную «состыковку» СП с пре-СМ, а, может быть, и сам процесс экзоцитоза; 3) мембран-мембранное взаимодействие СП и пре-СМ, приводящее к экзоцитозу.

Мы предполагаем, что эффективность процесса секреции медиаторов при возбуждении нервных окончаний определяется степенью «открытости» (доступности) актиновых участков пре-СМ для контакта с мембранами СП, точнее говоря, для контакта с миозином, ассоциированным с мембранами СП. Эта «открытость» в свою очередь может регулироваться специфическими компонентами пре-СМ, которые могут прочно связываться с актином в состоянии покоя и менее прочно—при возбуждении. В роли таких компонентов могут выступать ганглиозиды—специфические «маркеры» синаптических мембран. Данная гипотеза основывалась на ряде фактов, полученных в нашей лаборатории [1]. Во-первых, было показано, что ганглиозиды или цереброзиды мозга в отличие от других липидов способны связываться с актомиозином

мозга, вызывая агрегацию этого белкового комплекса. Во-вторых, ганглиозиды в большей степени, чем цереброзиды мозга, тормозят образование актомиозинового комплекса при взаимодействии изолированных СП мозга и актина мозга в присутствии Mg^{2+} -АТР. В-третьих, обнаружено, что ганглиозиды в большей мере, чем цереброзиды, избирательно тормозят реакцию истинной суперпрещиптациии выделенного актомиозина мозга быка.

Регуляция образования мозгового актомиозинового комплекса оказалась достаточно сложной и многоступенчатой [1]. Факторами, «запускающими» эту регуляцию при возбуждении терминалей, могут быть: 1) Ca^{2+} , при этом может происходить активация тропонин-тропомиозинового комплекса пре-СМ и затем актина пре-СМ или цитоплазматических актиновых микрофиламентов с последующей активацией взаимодействия модифицированного фибриллярного актина с миомином; 2) сАМР, который может активировать сАМР-зависимую протеинкиназу, которая, в свою очередь, может фосфорилировать легкие цепи миомина, после чего облегчается его связывание с актином (этот путь регуляции для мозговых сократительных белков пока не доказан); 3) комплекс кальмодулина с Ca^{2+} , активирующий цитозольную Ca^{2+} -зависимую протеинкиназу, которая, в свою очередь, фосфорилирует легкие цепи миомина мозга, или данный комплекс активирует Ca^{2+} -зависимую протеинкиназу синаптических мембран, фосфорилирующую актин в составе пре-СМ; 4) специфические низкомолекулярные пептиды мозга, ускоряющие процесс полимеризации глобулярного актина в фибриллярную форму.

Для понимания процесса секреции важное значение имеют модельные эксперименты по регуляции различными факторами высвобождения медиаторов в среду инкубации из изолированных СП мозга или катехоламинов из хромаффинных гранул (ХГ) клеток мозгового слоя надпочечников. Ранее было выяснено [1], что Mg^{2+} -АТР (1—5 мМ) и Ca^{2+} (10^{-6} — 10^{-5} М) индуцируют высвобождение запасов медиаторов или гормонов в среду инкубации из изолированных СП мозга или ХГ надпочечников. Было обнаружено [4], что низкомолекулярный, термостабильный, Ca^{2+} -связывающий белок (по-видимому, кальмодулин) резко ускоряет высвобождение катехоламинов из ХГ надпочечников, инкубированных в среде, содержащей Mg^{2+} -АТР и Ca^{2+} . Затем было установлено [5], что кальмодулин в указанных условиях действительно резко стимулирует высвобождение ацетилхолина, норадреналина и дофамина из фракции СП мозга крыс. При этом оказалось, что кальмодулин в присутствии Ca^{2+} активирует везикулярную протеинкиназу, которая фосфорилирует (при участии Mg^{2+} -АТР) два типа белков мембран везикул, в результате чего мембрана СП становится «дырявой» и усиливается высвобождение медиаторов в среду инкубации. Сам кальмодулин диффузно распределен в нервных окончаниях, где существует в цитозольной (растворимой) и мембраносвязанной форме.

Можно полагать, что при возбуждении кальмодулин встраивается из цитозоля или пре-СМ в мембраны СП, то есть тех СП, которые контактируют с пре-СМ и тем самым запускают секреторный процесс.

В связи с изложенным мы приводим новые данные по регуляции кальмодулином мембран-мембранного взаимодействия при изучении агрегации и осмотической чувствительности СП мозга в присутствии Mg^{2+} -АТР и Ca^{2+} .

Материалы и методы

Степень агрегации (и изменение осмотической чувствительности) регистрировали при помощи дифференциального двухлучевого фотокалориметра при 620 нм при 37° и постоянном перемешивании. Свежевыделенную фракцию СП мозга крыс [6], которую хранили в изотонической сахарозной или солевой среде (рН 7,4), переносили в среду 0,1 М КСl, 20 мМ трис-НСl, рН 7,4 (концентрация белка СП 125 мкг в пробе объемом 4 мл). Суспензию преинкубировали при 37° в течение 10—15 мин и затем последовательно добавляли микрообъемы (10 мкл) различных веществ, конечное значение E_{620} фиксировали через 10 мин при достижении плато после каждого добавления. В случае добавки раствора Mg^{2+} -АТР (нейтрализованного до рН 7,4) значение E_{620} фиксировали сразу же. Конечная концентрация сахарозы в этой части опытов была равна 1—5 мМ. Остальные вариации опытов оговорены в тексте и таблицах.

В экспериментах использовали два типа СП коры больших полушарий мозга крыс, содержащих в мембранах кальмодулин (СП_к) и не содержащих его (СП_о), используя методические рекомендации, приведенные в работе De Lorenzo и соавт. [5].

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов изучали влияние кальмодулина на мембран-мембранное взаимодействие везикул на примере Ca^{2+} -индуцируемой агрегации СП. Оба типа СП преинкубировали в изотонической среде, содержащей 0,1 М КСl, 20 мМ трис-НСl, рН 7,4. Реакцию запускали добавлением Ca^{2+} или Mg^{2+} в присутствии или в отсутствие Mg^{2+} -АТР. Отмечено, что добавление Ca^{2+} или Mg^{2+} (10^{-6} — 10^{-5} М) приводило к медленному увеличению E_{620} суспензии СП в течение 1—4 мин. Значения E_{620} фиксировали после достижения плато, то есть через 10 мин.

Ca^{2+} (Mg^{2+})-индуцируемая агрегация СП выявлялась при довольно низких концентрациях (10^{-6} М) хлоридов Ca^{2+} или Mg^{2+} (табл. 1). Отметим, что концентрация Ca^{2+} в нервных окончаниях в состоянии покоя равняется 10^{-8} — 10^{-7} М, а при возбуждении— 10^{-6} М; концентрация Mg^{2+} при покое и возбуждении одинакова— 10^{-3} М. Эффект агрегации СП прямо пропорционально зависит от концентрации двухвалентных катионов и не зависит от их природы.

Таблица 1

Влияние Mg^{2+} -АТФ, Ca^{2+} и Mg^{2+} на агрегацию различных типов СП мозга

Среда хранения СП (мМ)	Тип СП	Количество опытов	E_{620} через 10 мин после инкубации							
			Mg^{2+} -АТФ	Ca^{2+}				Mg^{2+}		
				10^{-3} М	10^{-7} М	10^{-6} М	10^{-5} М	10^{-7} М	10^{-6} М	10^{-5} М
Сахароза—2,0, трис-НСl—20 (рН 7,4) КСl—100, трис-НСl—20 (рН 7,4)	СП _к	2	—	0	0,026	0,112	—	—	—	
	СП _о	2	—	0,004	0,029	0,153	—	—	—	
	СП _к	4	—	—	—	—	0	0,078 $\pm 0,015$	0,082 $\pm 0,006$	
	СП _о	3	—	—	—	—	0,004	0,024 $\pm 0,005$	0,082 $\pm 0,006$	
	СП _к	10	—	0,002 $\pm 0,001$	0,018 $\pm 0,004$	0,085 $\pm 0,005$	—	—	—	
	СП _о	10	—	0,002 $\pm 0,001$	0,018 $\pm 0,004$	0,092 $\pm 0,006$	—	—	—	
	СП _к	8	—0,015 $\pm 0,002^*$	—	0,021 $\pm 0,002$	0,108 $\pm 0,003$	—	—	—	
	СП _о	8	—0,012 $\pm 0,002^*$	—	0,023 $\pm 0,003$	0,099 $\pm 0,003$	—	—	—	

Примечание. * значение E_{620} со знаком минус, то есть в этом случае наблюдалось просветление суспензии везикул

Из данных табл. 2 видно, что Ca^{2+} -индуцируемая агрегация характерна для различных секреторных гранул и липосом. Однако при моделировании процесса экзоцитоза при изучении мембран-мембранного взаимодействия везикул следует учитывать ряд важных обстоятельств: 1) длительность экзоцитоза в целом составляет ≤ 200 мс; 2) высокая специфичность Ca^{2+} по сравнению с Mg^{2+} ; 3) время контакта СП с пре-СМ и последующего акта секреции должно превышать время контакта мембран СП друг с другом и последующего выброса медиаторов в цитозоль при лизисе везикул [16]. По данным Наурес и сотр. [11], время полужизни для Ca^{2+} -индуцируемой агрегации СП мозга составляет 435 мс, то есть это величина такого же порядка, как и длительность экзоцитоза в целом. Хуже обстоят дела с избирательностью к Ca^{2+} и Mg^{2+} при агрегации СП. Как видно из наших и литературных данных (табл. 1, 2), такая избирательность отсутствует для СП, но следует заметить, что в большинстве случаев другие авторы использовали высокие, нефизиологические концентрации Ca^{2+} (≥ 1 мМ). Однако мы не обнаружили достоверной разницы в агрегации СП мозга, вызванной низкими концентрациями Ca^{2+} и Mg^{2+} (10^{-6} — 10^{-5} М). По данным Наурес и сотр. [11], $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -избирательность не была обнаружена при изучении агрегации СП электрических органов ската и фракции «теней» нативных ХГ надпочечников, но проявлялась в липосомах, приготовленных из фосфатидилсерина, но не фосфатидилхолина (табл. 2), и в «тенях» гранул надпочечников, из которых были удалены белки. Обращает на себя внимание факт, что при Ca^{2+} (Mg^{2+})-индуцируемой агрегации двух первых везикул структурные перестройки в мембранах наблюдали при 5—10°, а в двух последних типах везикул они отсутствовали.

Из результатов опытов пока не ясна природа Ca^{2+} -связывающих центров—являются ли таковыми СООН-группы белков или фосфолипидов мембран. По мнению Kelly и соавт. [17], факт увеличения числа слипаний СП с пре-СМ на криофрактограммах возбужденных нервных окончаний при одновременном снижении количества СП в терминалях является основным аргументом экзоцитоза. Авторы полагают, что в механизме Ca^{2+} -зависимого слипания СП с пре-СМ ведущую роль играют фосфолипиды мембран СП. Существует мнение [18], что ведущую роль в слипании могут играть белки пре-СМ, которые образуют с Ca^{2+} в присутствии СП обратимый хелатный комплекс, что сопровождается появлением в пре-СМ определенного числа «пор» размером 1 нм, позволяющих свободно выходить содержимому СП в синаптическую щель.

В литературе известны две работы, в которых мембран-мембранное взаимодействие, имитирующее состояние экзоцитоза, изучено на модели: СП+клеточные мембраны мозга. Так, показано [19], что связывание СП с микросомами мозга крыс не зависит от присутствия в среде инкубации Ca^{2+} , Mg^{2+} и кальмодулина, но связывание резко усили-

валось Ca^{2+} (1 мкМ). Обнаружено [20], что взаимодействие СП с фракцией синаптических мембран мозга крыс (или лучше всего с фракцией синаптических контактов) в среде, содержавшей Mg^{2+} -АТР и Ca^{2+} , приводило к Ca^{2+} -зависимому высвобождению ^3H -дофамина из везикул.

Таблица 2

Некоторые закономерности агрегации СП, секреторных гранул и липосом

Объект	Закономерности	Литература
СП мозга крыс	Ассоциация везикул друг с другом при pH 4,0 сопровождается потерей запаса медиаторов.	[7]
ХГ надпочечников быка	Агрегация, вызванная электростимуляцией, сопровождается снижением трансмембранного потенциала.	[8]
"Тени" ХГ	Ca^{2+} (Ca^{2+})-индуцируемая обратимая агрегация сопровождается разрушением мембран.	[9]
	Белок клеточных мембран надпочечников синексин (молекулярная масса 47 кД) стимулирует Ca^{2+} -индуцируемую агрегацию. Эффект наблюдается также для микросом и митохондрий печени крыс, липосом из фосфатидилсерина. В присутствии Mg^{2+} синексин не проявляет действия.	[10]
СП электрического органа ската	Ca^{2+} или Mg^{2+} (4 мМ) вызывает димеризацию, а затем агрегацию более высокого порядка. K^+ (50 мМ) вызывает только димеризацию. Ca^{2+} (в отличие от K^+) не только экранирует электростатическое взаимодействие СП, но и связывается с отрицательно заряженными группами белков мембран.	[11]
СП коры мозга морской свишки	Ca^{2+} (1 мМ) более эффективен, чем Mg^{2+} , нейтрализует отрицательный заряд мембран (рК 3,0–3,8), определяемый наличием COOH -групп (но только не нейраминовой кислотой и глюкозамингликанами).	[12]
	Ca^{2+} и Mg^{2+} (< 2 мМ) однако слабо нейтрализуют отрицательный заряд мембран.	[13]
Секреторные гранулы печени крыс	Ca^{2+} (1 мкМ), но не Mg^{2+} , вызывает удвоение гранул, а затем их слипание. Эффект тормозили Mg^{2+} и цитостатики.	[14]
Липосомы из фосфатидилсерина	Ca^{2+} (0,05 мМ), но не Mg^{2+} , при 25–37° вызывает слипание липосом и секрецию содержимого. Введение в липосомы белка спектрина в присутствии Ca^{2+} приводит к снижению процесса слипания липосом	[15]

Необходимо заметить, что достаточно быстрое слипание мембран СП с пре-СМ довольно затруднительно из-за электростатического отталкивания и гидратной оболочки. Преодолеть эти затруднения может жесткая фиксация СП с пре-СМ в районе слипания при участии определенных белковых компонентов, например, при участии сократительных белков.

Оба типа везикул (СП_k и СП_o) в описанных условиях эксперимента характеризовались практически одинаковой Ca^{2+} (Mg^{2+})-индуцируемой агрегацией. Mg^{2+} -АТР (1 мМ) в отсутствие низких концентраций Ca^{2+} вызывает небольшое ($p < 0,05$) снижение значения E_{620} , что может свидетельствовать о набухании везикул (табл. 1). Какая ферментативная реакция—АТРазная или протеинкиназная—лежит в основе этого эффекта, пока неясно. Снижение E_{620} , то есть просветление суспензии везикул, происходило практически мгновенно (эффект разбавления учитывали), однако затем наблюдали некоторую нормализа-

Изменения E_{620} двух типов СП мозга при их переносе из сахарозно-буферной среды в буферно-солевую

Тип СП	0,1 М КСI	0,1 М КСI + 1 мМ Mg^{2+} -АТР	0,1 М КСI + 1 мМ Mg^{2+} -АТР + 1 мкМ $CaCl_2$
СП _к	0,136 ± 0,016(1)	0,102 ± 0,008(2)	0,121 ± 0,011(3)
СП _о	0,107 ± 0,009(1)	0,113 ± 0,011(5)	0,080 ± 0,005(6)

Примечание. Приведены значения E_{620} из 5 опытов, которые фиксировали спустя 10 мин после добавления 100 мкл (125 мкг белка) суспензии СП в пробу (4 мл). Во всех случаях среда включала 20 мМ трис-НСI, рН 7,4. В скобках приведены номера опытов. Значения $p < 0,05$ характерны при сравнении опытов 6 и 3; 6 и 5

нию значения E_{620} , особенно в случае СП_к. Ca^{2+} -индуцируемая агрегация СП в присутствии Mg^{2+} -АТР была несколько выше (особенно при 10^{-5} М $CaCl_2$), чем таковая в отсутствие Mg^{2+} -АТР. В наших опытах Mg^{2+} -АТР-зависимая Ca^{2+} -индуцируемая агрегация была одинаковой для обоих типов везикул (СП_к и СП_о).

Во второй серии опытов был применен методический прием, использованный в работе Casey и соавт. [21]. Эти авторы показали Mg^{2+} -АТР-индуцируемое набухание ХГ надпочечников, тестируемое таким же способом, как и у нас. Но постановка опытов была другой: ХГ исходно хранили в 300 мМ сахарозе, 20 мМ НЕРЕС, рН 7,0; затем ХГ переносили в буферно-солевую среду (150 мМ КСI, 20 мМ НЕРЕС, рН 7,0), содержащую 1 мМ Mg^{2+} -АТР. Реакцию стартировали добавлением микрообъема суспензии ХГ, в этих условиях имело место медленное (≥ 20 мин) снижение E_{640} . Мы воспользовались этой методикой для изучения осмотической чувствительности СП. В этом случае СП исходно суспендировали и хранили в 200 мМ сахарозе, 20 мМ трис-НСI, рН 7,4. Стартировали реакцию добавлением микрообъема сахарозно-буферной суспензии везикул в пробу (4 мл), содержащую 100 мМ КСI или 100 мМ КСI + Mg^{2+} -АТР (1 мМ) или 100 мМ КСI + Mg^{2+} -АТР + $CaCl_2$ (1 мкМ). При переносе везикул из одной среды в другую оставались сохранеными ионная сила раствора, тип буфера и рН 7,4.

Опыты проводили на двух типах везикул. Предварительно отметим, что во всех случаях добавление суспензии СП к буферно-солевой среде вызывало двухфазную реакцию: 1) быстрое (1—3 мин) увеличение значения E_{620} , связанное, по-видимому, с изменением объема везикул; 2) медленное (10—30 мин) увеличение значения E_{620} , связанное, вероятно, как с процессами изменения осмотической чувствительности, так и с агрегацией СП. Оговоримся, что характер изменений E_{620} в наших опытах с СП отличался от таковых в опытах с ХГ [21], вследствие того, что крупные ХГ (80—150 нм) являются осмометрами в гораздо большей степени, чем СП мозга (40—60 нм).

Из табл. 3 следует, что СП_к и СП_о по-разному реагировали в среде, содержащей КСI, Mg^{2+} -АТР и Ca^{2+} , которая необходима для проявления действия кальмодулина. Окончательную трактовку полу-

ченных данных пока дать трудно. Но очевидно, что комплекс кальмодулина с Ca^{2+} в ходе мембран-мембранного взаимодействия СП с пре-СМ может значительно изменять осмотические свойства везикул, регулируя тем самым процесс высвобождения медиаторов.

ON THE REGULATION OF SOME STEPS OF MEDIATOR SECRETION PROCESS IN SYNAPSES

GLEBOV R. N., KRYZHANOVSKY G. N.

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

The study is devoted to the analysis of mechano-chemical hypothesis of mediator secretion and to the ways of regulation of the main steps of this secretion. For the modelling of the terminal step of membrane-membrane interaction of synaptic vesicles (SV) with presynaptic membranes the method studying Ca^{2+} -induced aggregation of the isolated rat brain SV has been used. It has been demonstrated that SV containing calmodulin in membranes differ from SV not containing calmodulin by the degree of osmotic sensitivity in the presence of Mg^{2+} -ATP as well by Ca^{2+} -induced aggregation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Глебов Р. Н.—В кн.: Биологическая химия, 17, М., ВИНТИ, с. 147—286, 1982.
2. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, с. 325 1978.
3. Trifaro J. M. *Neuroscience*, 3, 1—24, 1978.
4. Hata F., Kuo C. H., Matsuda T., Yoshida H. J. *Neurochem.*, 27, 139—144, 1976.
5. De Lorenzo R. J., Freedman S. D., Yohe W. B., Maurer S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1838—1842, 1976.
6. De Robertis E. *Science*, 156, 907—914, 1967.
7. Whittaker V. P. *Prog. Biophys. molec. biol.*, 15, 36—96, 1965.
8. Rosenheck K. et al. *J. Membrane Biol.*, 20, 1—9, 1975.
9. Edwards W., Phillips J. H., Morris S. J. *Biochim. Biophys. Acta*, 356, 164—173, 1974.
10. Morris S. J., Hughes J. M. X. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 91, 345—350, 1979.
11. Haynes D. H., Lansman J., Cahill A. L., Morris S. J. *Biochim. Biophys. Acta*, 557, 340—353, 1979.
12. McLaughlin J., Case K. K., Bosmann H. B. *Biochem. J.*, 136, 919—926, 1973.
13. Siegel D. P., Ware B. R. *Biophys. J.*, 30, 159—171, 1980.
14. Gratzl M., Dahl G. J. *Membrane Biol.*, 40, 343—364, 1978.
15. Portis A., Newton C., Pangborn W., Papahadjopoulos D. *Biochemistry*, 18, 780—790, 1979.
16. Lilnas R. R., Steinberg I. Z. *Neuroscience Res. Program. Bull.*, 15, 565—574, 1977.
17. Kelly R. B., Deutsch J. W., Carlson S. S., Wagner J. A. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2, 339—446, 1979.
18. Fayad R., Blum L. *Rev. colomb. fis.*, 10, 3—4, 164—194, 1974.
19. Hess W., Formanlak M. *Neurochem. Res.*, 4, 795—803, 1980.
20. Takeda M., Tanaka R. *Neurochem. Res.*, 4, 643—654, 1979.
21. Casey R. P., Njus D., Radda G. K., Sehr P. A. *Biochem. J.*, 158, 583—588, 1976

Институт общей патологии
и патологической физиологии
АМН СССР, Москва

Поступила 16. XI 1981

КИНЕТИКА ИНАКТИВАЦИИ МУСКАРИНОВОГО
ХОЛИНОРЕЦЕПТОРА

ЛАНГЕЛ Ю. Л., РИНКЕН А. А., ТЯХЕПЫЛД Л. Я., ЯРВ Я. Л.

Изучена кинетика спонтанной инактивации мускаринового рецептора в мембранах коры больших полушарий мозга крыс в интервале температур от -15° до 50° . Процесс инактивации измеряли по уменьшению специфического связывания $[^3\text{H}]$ -никотинилбензилата после преникубации мембранной суспензии при соответствующей температуре. Показано, что инактивация рецептора подчиняется кинетике первого порядка, и были определены соответствующие константы скорости k_d . Кажущаяся энергия активации этого процесса равна $13,8 \pm 3,6$ ккал/моль и значительно ниже ожидаемой для денатурации белка, но хорошо согласуется с соответствующими величинами, которые характеризуют изменение физико-химических параметров состояния липидного компонента мембран. Высказано предположение о тесной зависимости свойств мускаринового холинорецептора мозга от липидного окружения.

Ацетилхолиновый рецептор мускаринового типа локализован в пост- и пресинаптических мембранах нервных окончаний [1]. Кроме холинорецептора, с этими мембранами связан ряд ферментов [2], в том числе и ацетилхолинэстераза (АХЭ), выполняющая ключевую роль в ацетилхолиновом механизме передачи нервного импульса [2, 3]. Многие физико-химические свойства этого фермента [4], а также других мембранных ферментов, связанных с нейротрансмиссией, определяются состоянием липидов, взаимодействующих с этими белками [5]. Наличие тесного контакта с липидами, однако, не приводит к резким различиям в кинетических и термодинамических характеристиках процесса термоденатурации мембранных белков по сравнению с индивидуальными глобулярными водорастворимыми белками. Общим типам белков свойственны высокие значения эффективной (наблюдаемой) энергии активации (E_a) процесса денатурации [6]. Так, например, для термоденатурации мембранного препарата АХЭ получены величины E_a выше 60 ккал/моль [7]. При такой высокой E_a скорость денатурации значительно зависит от температуры. Имеющиеся в литературе данные о стабильности препаратов мембраносвязанного мускаринового рецептора свидетельствуют о том, что умеренную скорость денатурации можно наблюдать в весьма широком интервале температур [8—10]. Это заставило обратить большее внимание на закономерности денатурации мембранного мускаринового рецептора. В работе поставлена задача изучения кинетики термоденатурации мускаринового рецептора с целью получения новой информации об интеграции

его в нейрональных мембранах. Исследования в таком направлении представляют также интерес с точки зрения подбора оптимальных условий для хранения препаратов мускаринового рецептора при длительной экспериментальной работе с ним.

Материалы и методы

Мембранные препараты мускаринового рецептора получали из коры больших полушарий головного мозга крыс. Все процессы изолирования рецептора проводили при температуре не выше 4°. Растворы реактивов и суспензию рецептора хранили в ледяной бане. Мозговую ткань сразу после отделения помещали в охлажденный 0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 7,4) и обрабатывали в гомогенизаторе из плексигласа в течение 3 мин при скорости 1000 об/мин. Полученный гомогенат центрифугировали для удаления кусков ткани и ядер. Надосадочной жидкости при повторном центрифугировании осаждали микросомную фракцию мозговых мембран. Осадок промывали 0,05 М фосфатным буфером (рН 7,4) и суспендировали в этом же буфере с помощью гомогенизатора (3 мин, 1000 об/мин). Обычно первое центрифугирование проводили в течение 10 мин при 1000 g, второе 45 мин при 100 000 g (табл. 1).

Таблица 1

Изолирование связанного с микросомной фракцией мембран мускаринового рецептора из больших полушарий мозга крыс при разных условиях центрифугирования

Центрифугирование		Содержание рецептора*, нмоль/г белка
I	II	
Исходный тканевой гомогенат		0,6
10 мин 1000 g	—	0,6
- - 3000 g	—	0,8
- - 6000 g	—	0,5
- - 1000 g	30 мин 10000 g	1,7
- - 1000 g	45 - 50000 g	1,9
- - 1000 g	- - 100000 g	2,0
- - 3000 g	- - 100000 g	1,8
- - 6000 g	- - 100000 g	1,7
Синапсосомы		1,1

* средние значения из трех определений

Синапсосомы получали методом Whittaker [11]. 1 г коры мозга крыс гомогенизировали в 10 мл 0,32 М раствора сахарозы и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Надосадочную жидкость центрифугировали повторно 55 мин при 17 000 g, и осадок суспендировали в 4 мл 0,32 М сахарозы. Полученную суспензию центрифугировали при 63 000 g 90 мин в постепенном градиенте плотности сахарозы, образованном равными частями (по 14 мл) 0,8 и 1,2 М растворов сахарозы. Полученную после отсасывания 9 мл фракции с дна пробирки синапсосомную фракцию (12 мл) разбавляли до 32 мл водой и центрифугировали при 100 000 g 60 мин. Осадок (очищенные синапсосомы) гомогени-

зировали в 4 мл 0,05 М фосфатного буфера и использовали в опытах.

Определение мускаринового рецептора проводили по связыванию специфического радиоактивного лиганда—1-хинуклидинил [фенил-4- ^3H] бензилата (32 К_u/моль, «Amersham», Англия), используя метод фильтрования, описанный в [12]. После достижения равновесия связывания аликвоты инкубационной смеси пропускали через стеклофиберный фильтр GF/B («Whatman», Англия). Затем фильтры промывали 30 мл охлажденного 0,05 М фосфатного буферного раствора (рН 7,4), сушили несколько минут на воздухе и погружали в сосуды с 10 мл сцинтиллятора. Для изготовления сцинтиллятора перемешивали 1000 мл диоксана, 10 г 2,5-дифенилоксазола (РРО), 0,25 г 1,4-ди-2-(5-фенилоксазоллил) бензола (РОРОР) и 250 г нафталина [13]. После нескольких часов отстаивания измеряли радиоактивность проб в канале ^3H счетчика «Ultrobeta-1210» («LKB-Wallac», Швеция). Эффективность счета составляла 43%. По радиоактивности проб рассчитали общее количество связанного с мембранами радиоактивного лиганда $V_{\text{св}}$. Величину неспецифического связывания лиганда с мембранами— $V_{\text{нс}}$ определяли в присутствии 10 мкМ атропина («Merck», ФРГ) в инкубационной смеси, и было показано, что эта величина не превышала 3% от общего связывания. Величину специфического связывания радиоактивного лиганда с рецептором рассчитывали по разности $V = V_{\text{св}} - V_{\text{нс}}$. Как правило, определение V проводили в трех параллельных пробах. Специальными опытами было показано, что в используемых условиях фильтрации величина связанной с фильтрами радиоактивности остается практически постоянной уже при промывании 5 мл буфера и не меняется при значительном увеличении этого объема.

Определение белка в мембранных препаратах рецептора проводили по методу Lowry [14], в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин («Reanal», Венгрия).

Константу диссоциации комплекса рецептор-хинуклидинилбензилат (K_d) определяли в равновесных условиях по зависимости величины специфического связывания V от концентрации свободного лиганда в реакционной смеси [9], используя уравнение

$$V = \frac{[R]_0 \cdot [L]}{K_d + [L]}, \quad (1)$$

где $[R]_0$ —общая концентрация активных центров рецептора (максимальное значение специфического связывания) и $[L]$ —концентрация свободного лиганда в растворе. Для достижения равновесного связывания при всех используемых концентрациях антагониста реакционную смесь инкубировали 90 мин при 25° в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,4 [9]. Константу K_d рассчитали методом нелинейных наименьших квадратов на ЭВМ «Напри 3-2».

Кинетику инактивации рецептора измеряли по убыли специфического связывания хинуклидинилбензилата V во времени. Мембранную суспензию инкубировали при заданной температуре в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,4). Для определения $V_{\text{св}}$ и $V_{\text{нс}}$ использовали метод от-

бора проб. К пробам добавляли при 25° хинуклидинилбензилат до конечной концентрации 2 нМ. Использование такой концентрации хинуклидинилбензилата позволило уменьшить время для насыщения рецептора с радиоактивным лигандом до 60 мин [9]. Процессом инактивации рецептора за это время можно пренебречь. Величину неспецифического связывания определяли в присутствии 10 мкМ атропина. Препарат рецептора замораживали при -15° и хранили в морозильнике. Необходимое для определения В количество препарата быстро размораживали, температуру доводили до 25° и добавляли хинуклидинилбензилат.

Результаты и обсуждение

При достаточно длительном хранении мембраносвязанного препарата мускаринового рецептора уменьшается общее связывание [³H]-хинуклидинилбензилата с мембранами. Это является результатом уменьшения специфического связывания (рис. 1), поскольку в тех же условиях эксперимента неспецифическое связывание хинуклидинилбензилата с мембранами практически не менялось.

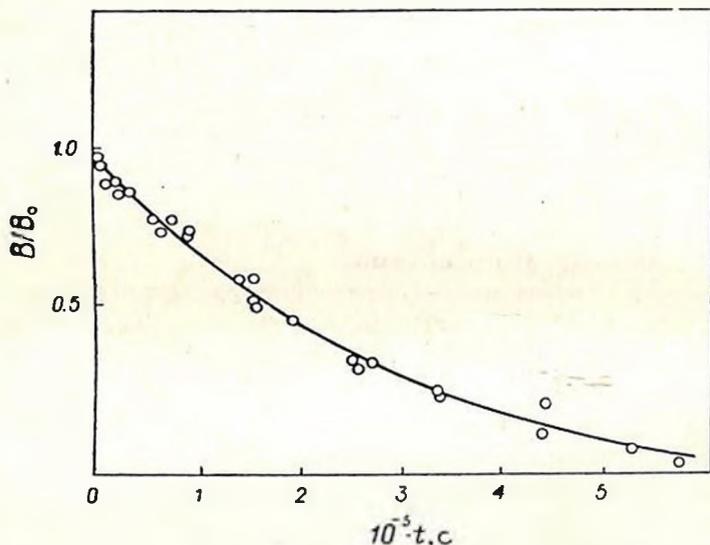


Рис. 1. Кинетика инактивации мембраносвязанного мускаринового рецептора мозга крыс при 20° в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4

Уменьшение специфического связывания В со временем является процессом первого порядка, и инактивацию рецептора можно представить такой схемой:



При условии, что концентрация нативного рецептора пропорциональна величине специфического связывания радиоактивного лиганда В (1), для расчета константы k_d можно применить следующее уравнение:

$$\ln \frac{B}{B_0} = -k_d t, \quad (3)$$

где B_0 характеризует величину специфического связывания при $t=0$. Результаты обработки экспериментальных данных согласно этому уравнению показаны на рис. 2. Из них видно, что при температурах 20°, 35° и 50° схема (2) хорошо соблюдается практически до конца процесса инактивации. При более низких температурах достигаемая за время опытов (до 7 суток) глубина инактивации значительно меньше. Тем не менее и здесь зависимости $\ln(B/B_0)$ от t описываются прямыми, что согласуется со схемой (2).

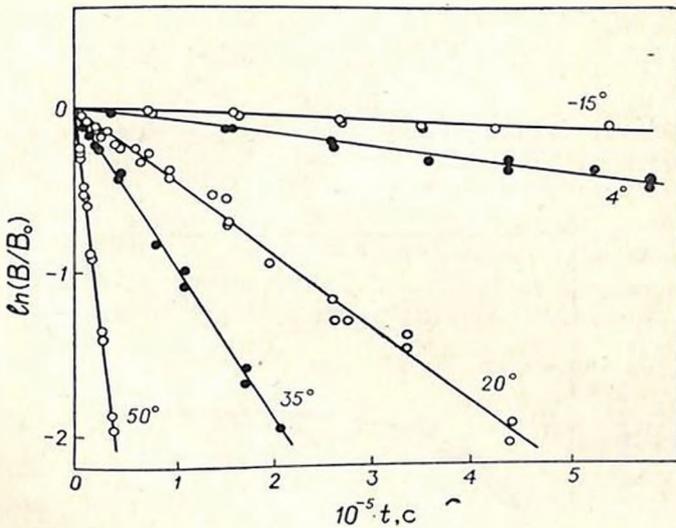


Рис. 2. Выражение кинетических кривых инактивации мускаринового рецептора при разных температурах в координатах $\ln(B/B_0)$ и t , где B_0 и B обозначают специфическое связывание [3H]-хинуклидинилбензилата с мембранами в начале опыта и в момент времени t .

Исходя из данных, приведенных на рис. 3, видно, что скорость процесса инактивации мускаринового рецептора мозга крыс не зависит от присутствия в реакционной среде 4 мМ ЭДТА и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида, которые используют в качестве ингибиторов металлопротеаз и сериновых протеаз соответственно. Представители обоих классов ферментов могут находиться в мозговой ткани, однако в изолированной микросомной фракции мембран растворимые протеазы, очевидно, отсутствуют. Поэтому можно предполагать, что наблюдаемый при хранении мембранной суспензии процесс инактивации мускаринового рецептора является «спонтанным» и не связан с действием протеаз на рецепторный белок.

Вычисленные на основании (3) величины k_d приведены в табл. 2.

Из этих результатов следует, что наиболее эффективным для длительного хранения препарата рецептора является замораживание суспензии мембран. Так, при -15° рецептор инактивируется наполовину только

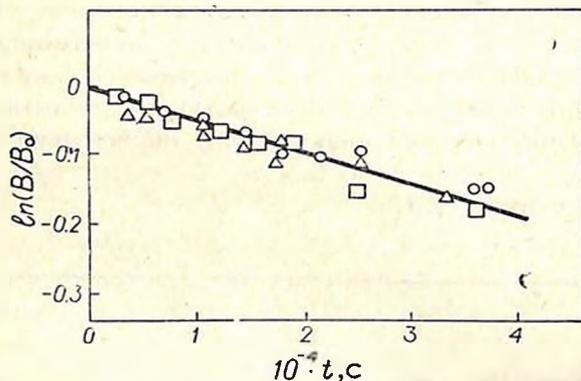


Рис. 3. Кинетика инактивации мускаринового рецептора в 0,05 М фосфатном буфере при 20° (○) и в присутствии 4 мМ ЭДТА (Δ) и 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида (□)

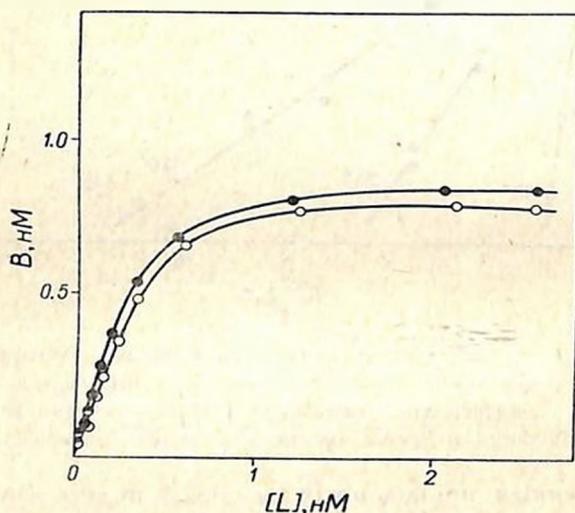


Рис. 4. Связывание $[^3\text{H}]$ -хиноклидинилбензилата с мускариновым рецептором мозга крыс до замораживания препарата (●) и после его хранения в течение 38 ч при -15° (○).

через месяц. Замораживание и хранение рецептора в таких условиях не меняет также его связывающих свойств в реакции с хиноклидинилбензилатом, так как кривые равновесного связывания этого антагониста до замораживания и после хранения препарата в течение 38 ч при -15° практически одинаковы (рис. 4). Результаты обработки этих данных по уравнению (1) приведены в табл. 3. Полученные значения k_d согласуются с опубликованными ранее результатами для мозга крыс [8, 12].

Из табл. 2 видно, что скорость инактивации мускаринового рецептора увеличивается с повышением температуры. Обработка констант скорости k_d по уравнению Аррениуса

$$\ln k_d = - \frac{E_a}{RT} - \ln A$$

Таблица 2

Константы скорости инактивации мускаринового рецептора
(0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4)

Температура, °C	$k_d \cdot 10^6, c^{-1}$
50	$51,8 \pm 5,5$
35	$8,65 \pm 1,16$
20	$4,47 \pm 0,37$
4	$0,730 \pm 0,110$
-15	$0,226 \pm 0,068$

приводит к линейной зависимости (рис. 5). На этой прямой находится также точка для замороженного препарата рецептора, хотя точность определения этой последней константы скорости заметно уступает точности определения остальных кинетических параметров k_d (табл. 2). Полученная величина $E_a = 13,8 \pm 3,6$ ккал/моль значительно ниже имеющих в литературе значений E_a денатурации многих других индивидуальных белков [6], в том числе мембраносвязанной АХЭ [7].

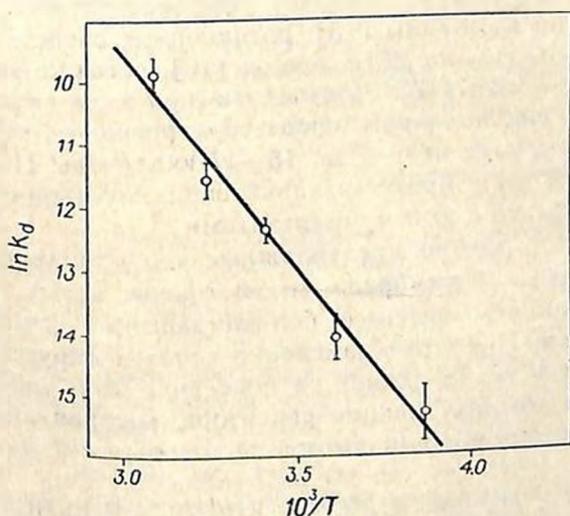


Рис. 5. Определение энергии активации процесса спонтанной инактивации мембраносвязанного препарата мускаринового холинорецептора мозга крыс

Полученная в координатах уравнения Аррениуса прямая (рис. 5) свидетельствует о том, что в изученном интервале температур может существовать единый механизм инактивации мускаринового рецептора.

Условно этот процесс можно назвать термоденатурацией, так как полученная зависимость охватывает достаточно высокие температуры, при которых обычно принято говорить о «тепловой денатурации» белков.

Таблица 3

Связывание 1-хиноклидинил [фенил-4-³H] бензилата с мускариновым рецептором до и после замораживания препарата (0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4)

Условия хранения	k_d , нМ	Количество рецептора, имоль/г белка
После выделения 38 ч при -15°	$0,15 \pm 0,02$ $0,18 \pm 0,03$	$2,02 \pm 0,06$ $1,90 \pm 0,04$

Высокие значения E_a процесса денатурации белков обычно объясняют разрывом большого числа слабых и некооперативных связей [6]. С другой стороны, можно полагать, что денатурация с малой энергией активации включает разрыв небольшого числа, но, возможно, весьма сильных и кооперативных взаимодействий [6]. Вероятно, в случае мускаринового рецептора эти связи характеризуют взаимодействие рецепторного белка с липидным окружением, и основным фактором его дестабилизации является изменение свойств этого окружения при повышении температуры. Например, известно, что многие физико-химические параметры, характеризующие состояние липидного бислоя, изменяются с температурой и могут быть описаны уравнением Аррениуса. К таким параметрам относятся коэффициент ротационной диффузии введенного в синаптическую мембрану флуоресцентного зонда [15], микровязкость этой мембраны [15], ротационные свойства связанных с мембранными фрагментами ЭПР зондов [16], а также характеристики проницаемости мембран [17]. Получаемые при этом параметры E_a зависят от природы наблюдаемого процесса, строения и состава мембран и находятся в интервале от 6—7 до 15—17 ккал/моль. Полученный выше коэффициент E_a для процесса инактивации мускаринового рецептора хорошо согласуется с этими результатами.

Таким образом, можно предположить, что мускариновый холинорецептор синаптических мембран мозга прочно встроен в липидную структуру мембран и значительно больше зависит от нее, чем другие мембранные белки. При этом изменение свойств окружающей водной среды, по-видимому, мало влияет на поведение этой системы, так как механизм той стадии инактивации рецептора, которая лимитирует скорость процесса, остается, по-видимому, постоянным при замораживании.

KINETICS OF THE MUSCARINIC RECEPTOR INACTIVATION

LANGEL Ü., RINKEN A., TÄNEPÖLD L., JÄRV J.

Chairs of Biological Chemistry and Organic Chemistry, State University, Tartu, Estonian SSR

A spontaneous inactivation of rat brain cortex muscarin receptor was investigated at -15° , 4° , 20° , 35° and 50°C in 0,05 M phosphate buffer, pH 7,4. The inactivation process was followed by the loss of the speci-

fic H-QNB binding capacity of the brain membranes and obeys first-order kinetics. Addition of 4 mM EDTA and 0,1 mM phenylmethylsulfo-fluoride to the reaction medium has no effect on the inactivation rate, indicating that neither metalloproteases nor serine proteases are involved in the receptor inactivation process.

The Arrhenius plot of the first-order inactivation rate constants K_d was linear, and involves also the appropriate point for the frozen solution at -15°C . This indicates that within the whole temperature range from -15° to 50°C a common inactivation mechanism is possible. The apparent activation energy for the receptor denaturation $E_a = 13,8 \pm 3,6$ kcal/mole is considerably lower than the analogous values, usually obtained for the membrane-bound enzymes, but seems to be rather close to the activation parameters of different transition processes of the natural and synthetic lipid membranes. On this ground it was assumed that the receptor protein is more strictly integrated into the membrane structure than many other membrane-bound enzymes and any changes of the membrane „fluidity“ with the shift of temperature influence the stability of the receptor protein.

ЛИТЕРАТУРА

1. Heilbronn E., Bartfai T. *Progress in Neurobiology*, **11**, 171—188, 1978.
2. Seiler N. *Enzymes. Handbook of Neurochemistry*, Plenum Press, N. Y.—London, v. 1, p. 325—468, Ed. A. Lajtha, 1969.
3. Dawson R. M., Jarrott B. *Neurochemical Research*, **5**, 809—815, 1980.
4. Shtotang K. *Eur. J. Biochem.*, **63**, 519—524, 1976.
5. Рыбальченко В. К., Курский М. Д. Молекулярная организация и ферментативная активность биологических мембран, Киев, Наукова думка, с. 73—147, 1977.
6. Жолу М. Физическая химия денатурации белков. М., Мир, с. 212—351, 1968.
7. Coleman M. N., Eley D. D. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 646—657, 1963.
8. Aronstam R. S., Abood L. G., Baumgold J. *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1689—1936, 1977.
9. Järo J., Hedlund B., Bartfai T. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5595—5598, 1979.
10. Alberts P., Bartfai T. *J. Biol. Chem.*, **251**, 1543—1547, 1976.
11. Whittaker V. P. *The synaptosome. Handbook of Neurochemistry*, Plenum Press, N. Y.—London, v. 2, p. 327—364, Ed. A. Lajtha, 1969.
12. Yamamura H. I., Snyder S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**, 1725—1729, 1974.
13. Peng C. T. *Sample preparation in liquid scintillation counting*, The Radiochemical Centre, Amersham, England, p. 22—25, 1977.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
15. Cossins A. R. *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 395—411, 1977.
16. Boldyrev A., Ruuge E., Smirnova I., Tabak M. *FEBS Lett.*, **80**, 67—79, 1977.
17. Graziani Y., Livone A. *J. Membrane Biol.*, **7**, 275—284, 1972.

Тартуский государственный
университет

Поступила 11. III 1982

УДК 612.822.1:577.112.083

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИХ ГЛУТАМАТ

ДАМБИНОВА С. А., БЕСЕДИН В. П.

Методом двухступенчатой аффинной хроматографии на глутамат-сефарозе и конканавалин А-агарозе выделены и очищены более чем в 200 раз глутамат-связывающие белки из синаптических мембран коры головного мозга крысы. Показано, что исследуемая фракция мембранных белков солиобилизируется мягкими детергентами, 0,6% тритоном X-100 или 0,5% холатом натрия и имеет гликопротеидную природу. По данным седиментации в градиенте глицерина 5—15% обнаружено, что наибольшая глутамат-связывающая активность наблюдается в области белков с молекулярной массой 45 000—12 000 дальтон, в то время как по результатам электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия молекулярная масса пептидов составляет 14 000 дальтон. Методом изоэлектрофокусирования обнаружено, что гомогенная фракция мембранных белков, обладающая высоким сродством к глутамату, разделяется на три близлежащих пика в области рН 4,8—5,0. Предполагается, что выделенные и очищенные низкомолекулярные гликопротеиды мембран, активно связывающие глутамат, могут быть отнесены к глутаматным рецепторам.

Исследование механизмов регуляции ионной проницаемости возбудимых мембран, определяющих активность нервной клетки, в настоящее время является неполным без анализа молекулярных свойств рецепторных макромолекул, которые узнают и связывают нейромедиаторы. Существенный интерес в связи с этим представляет изучение глутаматных рецепторов — мембранных структур, специфически связывающих один из основных нейромедиаторов ЦНС — глутамат. Связывание глутамата с постсинаптическими рецепторами вызывает деполаризацию и падение сопротивления предположительно за счет повышения проницаемости для Na^+ и Ca^{2+} [1, 2] и сопровождается появлением возбуждающего постсинаптического потенциала на мембране нервной клетки.

Известно, что синаптические мембраны, изолированные из коры, гиппокампа и ряда других структур головного мозга крысы, обогащены высокоаффинными, стереоспецифическими участками, которые по некоторым физиологическим и химико-фармакологическим характеристикам соответствуют глутаматным рецепторам [3—5].

Практическая необходимость изучения свойств этих рецепторов в норме и при патологических состояниях ЦНС связана с возможностью

поска блокаторов, необратимо связывающихся с глутаматными рецепторами, способных специфически корректировать нарушения в нервной ткани. Несмотря на отсутствие таких блокаторов, подобных α -бунгаротоксину, селективно связывающему никотиновые холинорецепторы [6], появились попытки выделить и очистить глутамат-связывающие мембранные белки из головного мозга крыс на основе обратимого связывания глутамата.

Michaelis и соавт. [7—9] показали, что мягкая солиubilизация плазматических синаптических мембран неионными детергентами с последующей аффинной очисткой позволяет получить гликопротеид с молекулярной массой около 13800 дальтон, имеющий два участка специфического связывания для глутамата. Охарактеризованы и некоторые другие биохимические свойства глутаматных рецепторов [9]. De Robertis и соавт. использовали иной путь для выделения глутамат-связывающих белков мембран [10, 11]. Им удалось выделить методом экстракции в хлороформ-метаноле протеолипид с молекулярной массой 32000 дальтон из мышцы креветки и головного мозга крыс. Полученный протеолипид обладал тремя участками специфического связывания для глутамата. Обе группы исследователей приводят доказательства, по которым выделенные белки могут быть отнесены к глутаматным рецепторам. Однако требуется дальнейшее исследование функциональных свойств этих белков и природы их активного центра.

В задачу работы входила попытка выделить и очистить мембранные белки, обладающие высокой степенью сродства к глутамату, из синаптических мембран коры головного мозга крыс и выявить некоторые биохимические характеристики глутамат-связывающих белков.

Материалы и методы

В опытах использовали взрослых крыс-самцов линии Вистар массой 180—200 г.

Выделение плазматических синаптических мембран. Синаптические мембраны выделяли из коры головного мозга крыс методом дифференциального центрифугирования [12]. Ткань мозга гомогенизировали в десятикратном объеме 0,32 М сахарозы, центрифугировали 10 мин при 1000 g, затем гомогенат центрифугировали 20 мин при 20 000 g, и грубую постмитохондриальную фракцию ресуспендировали в холодной бидистиллированной воде. После осмотического шока гомогенат центрифугировали при 10 000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость собирали и центрифугировали при 40 000 g в течение 20 мин, полученный осадок промывали бидистиллированной водой и трижды центрифугировали в указанных условиях. Контроль за чистотой синаптических фракций проводили электронномикроскопически и путем определения ферментов-маркеров, например, активности Na^+ , K^+ -АТФазы, 5'-нуклеотидазы, цитохромоксидазы. Определение активности глутаматдекарбоксилазы служило тестом на отсутствие загрязняющих глутамат-утили-

зирующих ферментов [13]. Содержание белка определяли по методу Lowry [14].

Выделение глутамат-связывающих белков. Синаптические мембраны солиобилизировали буфером, содержащим 0,6% тритон X-100 или 0,5% холат натрия, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4; 1 мМ дитиотрептола (ДТТ) и 0,1 мМ фенолметилсульфофлюорида (ФМСФ) в присутствии или отсутствии меченого ^3H -L-глутамата (48 К_с/ммоль, «Изотоп», СССР) при низкой температуре (0°) в течение 20 мин. Все дальнейшие процедуры проводили при 0°. Белки осветляли центрифугированием при 100 000 г в течение 1 ч. Осадок несолиобилизованных мембран отбрасывали.

Фракцию низкомолекулярных глутамат-связывающих белков выделяли разделением тотального мембранного белка на сефадексе G-25 (колонка 1,6×100 см), элюирующий буфер содержал 50 мМ трис-НСl, рН 7,4; 1 мМ ДТТ; 0,1% тритона X-100 или 0,1% холат натрия. Скорость элюции составляла 36 мл/ч. Фракции отбирали по 1,5 мл, и в аликвотах определяли радиоактивность и содержание белка. Белки концентрировали в полиэтиленгликоле—40 000 (ПЭГ) и анализировали против бидистиллированной воды в течение 3 ч.

Седиментацию низкомолекулярных мембранных белков в неденатурирующих условиях в присутствии радиоактивного глутамата проводили в градиенте глицерина 5—15%, содержащем 0,1% тритон X-100 или соответственно 0,1% холат натрия, центрифугировали при 100 000 г 48 ч (ротор SW-41 Ti, «Spinco» L-2, Beckman).

Анализ мембранных белков проводили методом электрофореза в блоке [15] в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия. Размеры блока 190×100×2 мм, плотность тока 0,5 мА/мм². Электрофорез проводили 4 ч при 20°. Блоки фиксировали в смеси уксусная кислота: этанол:вода (10:20:70) и окрашивали 0,05% раствором Кумасси R-250. При изоэлектрофокусировании (ИЭФ) использовали коммерческие 2,4% амфолиты, рН 3,5—9,5 (ЛКВ, Швеция). Размеры блока 245×110×1 мм, анодный электрод—1 М Н₃РO₄, катодный электрод—1 М NaOH, сила тока—50 мА, напряжение—1500 В, время фокуса—1,5—2 ч. Гели фиксировали в 10% ТХУ и окрашивали 0,2% Кумасси R-250. Молекулярную массу выделенных мембранных белков определяли по отношению к стандартному набору белков-маркеров.

Аффинная хроматография на глутамат-сефарозе 4В. Очистку низкомолекулярной фракции синаптических белков, выделенных без инкубации с радиоактивным глутаматом, проводили методом двухступенчатой аффинной хроматографии по схеме, предложенной в работе Michaelis [7], с некоторыми модификациями. Аффинный носитель—глутамат-сефарозу—готовили перед использованием стандартным методом химического связывания L-глутаминовой кислоты с CNBr-сефарозой 4В. Свободные активные группы после связывания блокировали 1 М этаноламинном [16]. Наибольший процент «привязки» глутамата составлял 36,4% или 27,7 мМ глутамата на 1 г сефарозы. Неспецифическое связывание определяли по хроматографии цитохрома С, и оно не превыша-

ло 0,82% от количества наносимого белка. Низкомолекулярную фракцию мембранных белков (1 мг/мл) наносили на колонку 0,5×5 см, заполненную глутамат-сефарозой в буфере, содержащем 2 мМ трис-НСl, рН 7,4; 0,1% тритон X-100 или 0,1% холат натрия, 1 мМ ДТТ и 0,1 мМ ФМСФ. Колонку промывали тремя объемами буфера со скоростью 6 мл/ч, и связавшийся прочно на глутамат-сефарозе специфический белок снимали повышенным ионной силы, добавлением в буфер 1 М NaCl до конечной концентрации 0,5 М. Фракции отбирали по 0,5 мл, в аликвотах определяли содержание белка.

Аффинная хроматография на конкинавалин А-агарозе. В опытах использовали коммерческий препарат КонА-агарозы («Fagmasia», Швеция), содержащий 10 мг КонА/мл геля. Фракцию белков, обладающих сродством к глутамату после первой аффинной колонки, концентрировали в ПЭГ 40 000 и наносили на колонку, заполненную КонА-агарозой (0,5×6 см) и забуференную 2 мМ трис-НСl, рН 7,4, содержащим 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ MnCl₂ и 1 М NaCl в присутствии 0,1% тригона X-100 или 0,1% холата натрия. Элюирующий буфер содержал 1 М NaCl и 0,5% α-метилманнопиранозид. Скорость элюции не превышала 9 мл/ч, фракции отбирали по 0,5 мл.

Йодирование глутамат-связывающих мембранных белков. Низкий процент выхода очищенного белка (около 0,5% от тотального) из плазматических синаптических мембран предполагает дальнейший анализ йодированных белковых фракций и выявление их радиоактивности. Йодирование проводили по методу Чарда [17]. Белки концентрировали после аффинной очистки до минимального объема (50 мкл) и добавляли 20 мкл 5 мК_и ¹²⁵I (50 К_и/ммоль, «Изотоп», СССР) в фосфатном буфере рН 7,5 в присутствии 10 мкг хлорамин Т («Fagmasia», Швеция). Через 20 с реакцию останавливали добавлением 20 мкг метабисульфита («Serva», ФРГ) и анализировали от избытка йода в течение 3 суток против фосфатного буфера. Радиоактивные белки анализировали методом электрофореза в ПААГ и методом ИЭФ в амфолитах рН 3,5—9,5. Авторадиографию йодированных препаратов проводили непосредственной аппликацией гелей на рентгеновскую пленку (РТ-1, СССР), которую проявляли через 2 суток обычным способом.

Глутамат-связывающую активность определяли путем инкубации мембранных белков с 100 нМ ³H-L-глутамата на миниколонках (0,8×4 см), заполненных сефадексом G-25 в буфере 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, содержащем 0,1% тритон X-100 или 0,1% холат натрия, 1 мМ ДТТ и 0,1 мМ ФМСФ. Скорость элюции—1 мл/мин. Радиоактивность подсчитывали в сцинтилляционной смеси PPO—POROP, толуол-метилцеллозоль на счетчике Unilux—III (Франция).

Результаты и обсуждение

Для сохранения наибольшей нативности солюбилизованного белка обычно используются мягкие неионные и ионные детергенты, такие, как тритон X-100 или холат натрия. Высокая способность к инактивации

ции, то есть к потере способности связывать радиоактивный глутамат при комнатной температуре (в течение 20 мин). требует особой осторожности при выделении глутамат-связывающих белков. В экспериментах все процедуры выделения и очистки были сведены к максимальной возможной скорости выделения и осуществлялись только при низких температурах. Для контроля глутамат-связывающую активность определяли на каждой стадии выделения и очистки.

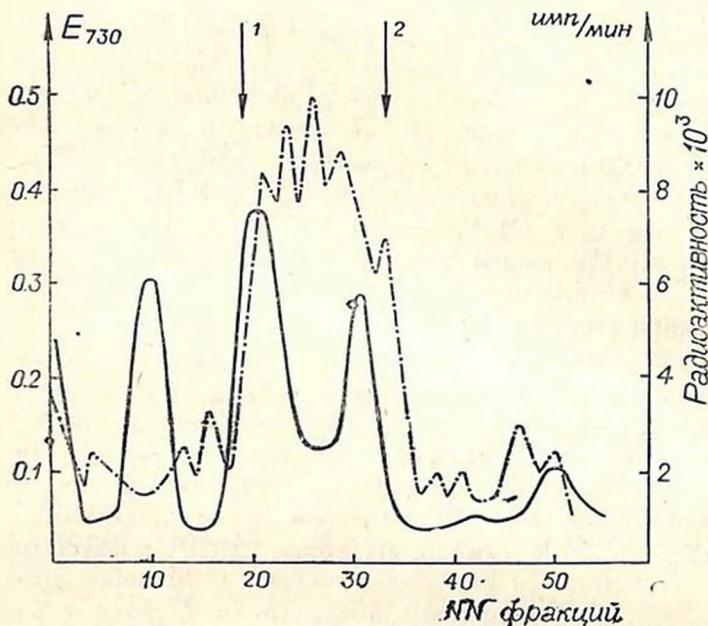


Рис. 1. Распределение ^3H -глутамат-связывающей активности в градиенте глицирина 5—15% для общей фракции синаптических мембранных белков коры головного мозга крысы. Сплошная линия — концентрация белка во фракциях, пунктирная — радиоактивность ^3H -глутамата во фракциях. Стрелками указано распределение маркеров: 1 — яичный альбумин 45000, 2 — шитохром С 12400

При солиubilизации общей фракции мембранных белков в присутствии тритона X-100 было выявлено, что повышение его концентрации от 0,6 до 1,2% существенно не влияет на выход растворимых белков. Обнаружено, что количество солиubilизированных белков не превышает 70—75% от общего его содержания в синаптических мембранах, выделенных из коры головного мозга крысы. При использовании 0,5% холата натрия «снимается» около 45—50% синаптических белков. Предварительные эксперименты показывают, что эти детергенты удаляют практически всю глутамат-связывающую активность с синаптических мембран, а это свидетельствует о возможности близкого расположения рецепторных белков к внешней поверхности мембраны. Эти данные не согласуются с предположением Michaelis и соавт. [9] о прочной взаимосвязи глутамат-связывающих белков с мембранами.

Фракционирование синаптических белков в градиенте глицерина 5—15% выявляет три основных пика, причем наибольший процент связывания радиоактивного глутамата соответствовал низкомолекулярной зоне градиента в области 45 000—12 000 дальтон (рис. 1). Преинкубация белков синаптических мембран с избытком немеченого глутамата перед центрифугированием в градиенте глицерина сдвигает зону радиоактивности в легкую область градиента, что свидетельствует в пользу специфичности связывания радиоактивного глутамата с солюбилизованными белками.

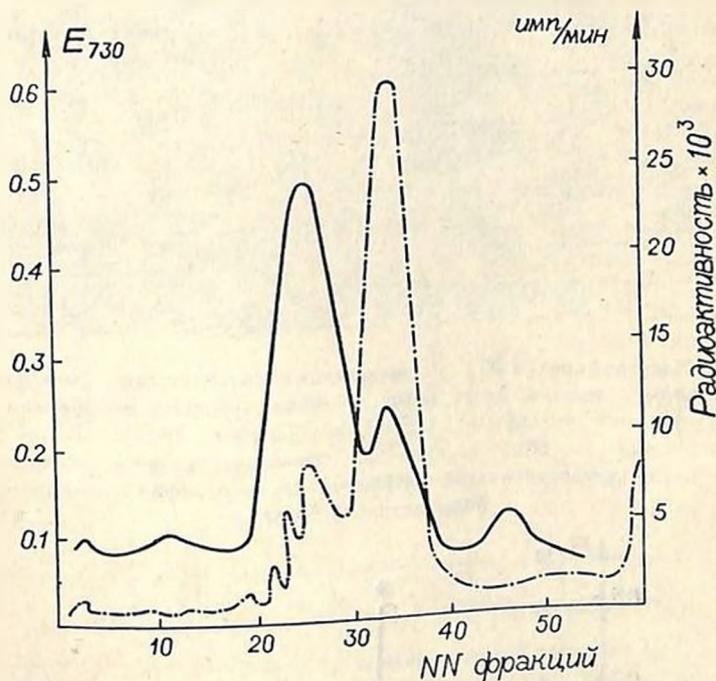


Рис. 2. Гель-хроматография на G-25 общей фракции синаптических мембранных белков после инкубации с ³H-глутаматом. Сплошная линия—концентрация белка, пунктирная—радиоактивность

Низкомолекулярные фракции глутамат-связывающих белков, выделенные гель-фильтрацией, составляли около 5% общих белков синаптических мембран и обладали высокой удельной активностью связывания радиоактивного глутамата (рис. 2).

Электрофореграмма общей фракции белков синаптических мембран представлена на рис. 3. Видно, что эти белки обладают сложным спектром, и низкомолекулярные белки составляют небольшой процент их количества.

На рис. 4 представлены профили элюции низкомолекулярных мембранных белков через глутамат-сефарозу. Видно, что первый пик соответствует мембранным белкам, не связавшимся на сорбенте, в то время

как второй пик снимается при повышенной ионной силе. Это свидетельствует о сродстве фракции мембранных белков к глутамату. Поскольку присоединение глутамата к сефарозе идет через аминогруппы [16] и связывающие участки имеют хорошую стерическую доступность,

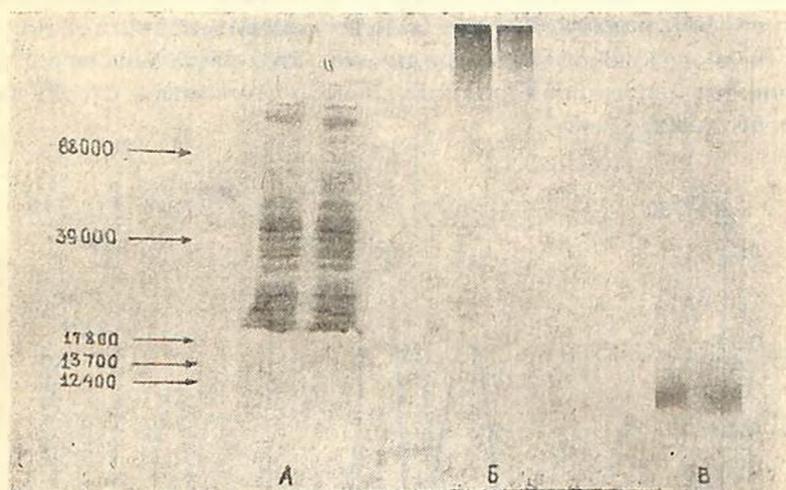


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ—выделенных синаптических мембранных белков коры головного мозга крыс. А—общая фракция мембранных белков. Б—фракция низкомолекулярных мембранных белков после гель-хроматографии на G-25. В—фракция низкомолекулярных мембранных белков после двухступенчатой аффинной хроматографии (радиоавтограф йодированного белка)

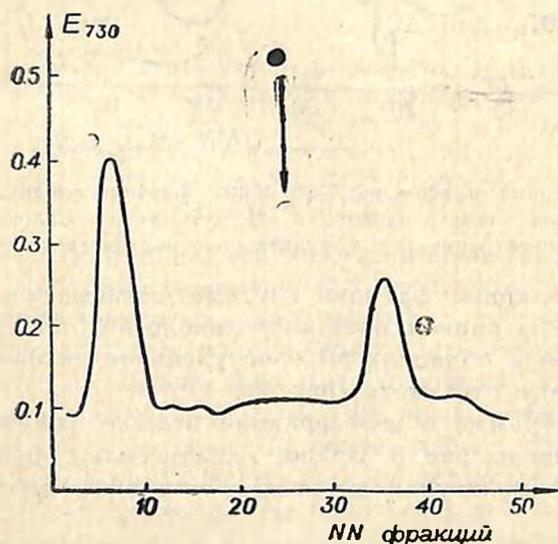


Рис. 4. Аффинная хроматография на глутамат-сефарозе 4В низкомолекулярной фракции синаптических мембранных белков. Стрелкой указан момент повышения ионной силы элюирующего буфера

можно предположить, что сохранение карбоксильных групп на «пришитой» молекуле глутамата играет важную роль во взаимодействии нейромедиатора с узнающим центром рецепторной макромолекулы.

Следующий этап очистки белков, обладающих сродством к глутамату, проводили на КонА-агарозе (рис. 5). Выделенные глутамат-связывающие белки сорбируются на КонА-агарозе и снимаются лишь α -метилманнопиранозидом. КонА—растительный лектин—связывается с углеводными группировками белковых молекул, следовательно, анализируемая фракция мембранных белков представляет собой гликопротеид. Эти результаты подтверждают данные Michaelis и соавт. [9] о гликопротеидной природе глутамат-связывающих мембранных белков.

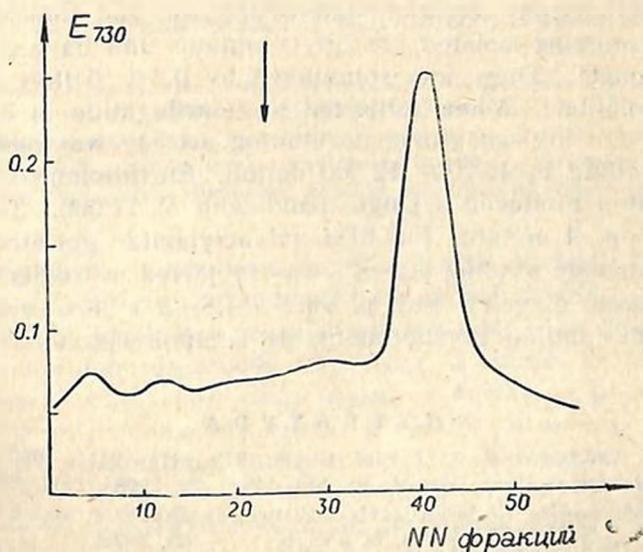


Рис. 5. Аффинная хроматография на конканавалин А-агарозе глутамат-связывающей фракции низкомолекулярных синаптических белков. Стрелкой указан момент смены элюирующего буфера на α -метилманнопиранозид-содержащий буфер

Установлено, что глутамат-связывающая активность выделенных белков на последней стадии очистки превышает более чем в 200 раз активность исходных общих белков синаптических мембран. Анализ свойств очищенной белковой фракции показал, что эти белки имеют гомогенный пик в области 14 000 дальтон при электрофорезе (рис. 3, в). Методом изоэлектрофокусирования выделенных фракций обнаружено существование трех близлежащих фракций в пределах pH 4,8—5,0. Эти данные свидетельствуют о различии субъединиц глутамат-связывающих белков, возможно, в липидных и углеводных компонентах. Полученные результаты хорошо согласуются с ранее описанными [9], позволяют отнести выделенные нами белки к глутаматным рецепторам ЦНС и являются первой ступенью изучения молекулярной модели хеморецепторного комплекса на возбудимой мембране нервной клетки. Дальней-

шие эксперименты по реконструкции очищенных белков с липосомами позволят идентифицировать функцию этих белков и их роль в регуляции ионной проницаемости мембран.

ISOLATION AND PURIFICATION OF SPECIFIC GLUTAMATE-BINDING PROTEINS FROM SYNAPTIC MEMBRANES OF RAT BRAIN CORTEX

DAMBINOVA S. A., BESEDIN V. I.

Institute of Experimental Medicine, USSR Academy of Medical Sciences, Leningrad

Glutamate-binding proteins have been purified 200-fold from rat brain cortex synaptic membranes by a procedure involving a two step affinity chromatography on glutamate-Sepharose and Concanavaline-A agarose. The proteins isolated are glycoproteins and have a specific affinity to glutamate. They are solubilized by 0,6% Triton X-100 and 0,5% sodium cholate. When subjected to centrifugation in 5-15% glycerol gradient the highest glutamate-binding activity was detected in the zone corresponding to 45 000-12 000 dalton. Electrophoresis of the purified preparation produced a single band with M 14 000. The homogeneous preparation of proteins (on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) with high glutamate-binding activity was subjected to isoelectric focusing and 3 peaks were detected with pI values 4,8-5,0. It is suggested that these glutamate-binding glycoproteins are components of CNS glutamate receptors.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Chang H. H., Michaelis E. K. J. Biol. Chem., 255, 2411-2417, 1980.
2. Baudry M., Lynch G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 2298-2302, 1980.
3. Johnston G. A. R.—In: Glutamic acid. Advances in Biochem. and Physiol. (ed. by Filler L. J. et al.). Raven Press, N.-Y., p. 177-185, 1979.
4. Nistri A., Constanti A. Progr. Neurobiol., 13, 117-235, 1979.
5. Baudry M., Lynch G. Mol. Cell. Biochem., 38, 5-18, 1981.
6. Вульфшус Е. А., Коваленко В. А.—В сб.: Биофизика. Итоги науки и техники, М., ВИНТИ, 1978.
7. Michaelis E. K. Biochem. Bioph. Res. Com., 65, 1004-1012, 1975.
8. Michaelis E. K. Biochem. Bioph. Res. Com., 87, 106-113, 1979.
9. Michaelis E. K., Michaelis M. L., Chang H. H., Grubbs R. G., Kuonen D. R. Mol. Cell. Biochem., 38, 163-179, 1981.
10. Fiszer de Plazas S., De Robertis E. J. Neurochem., 23, 1115-1120, 1974.
11. De Robertis E., Fiszer de Plazas S. Nature, 260, 347-349, 1976.
12. Zykin S. R., Young A. B., Snyder S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4802-4807, 1974.
13. Lowe J. P., Robins E., Egermen G. S. J. Neurochem., 3, 8-18, 1958.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. S. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
15. Veda T., Greengard P. J. Biol. Chem., 252, 5155-5163, 1977.
16. Туркова Я. Аффинная хроматография. М., Мир, с. 236-281, 1980.
17. Чард Т. Радиоммунологический анализ. М., Мир, с. 65-72, 1980.

Институт экспериментальной
медицины АМН СССР, Ленинград

Поступила 15. II 1982

УДК 612.8.015; 612.018

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ МОЗГА В УСЛОВИЯХ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ, ПРОВОДИМОГО НА ФОНЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ГЛИБУТИДА

ЧЕРКАСОВА Л. С., ДАШКОВСКАЯ О. П., НОВИК В. А., ФОМИЧЕНКО В. Г.

В исследованиях на половозрелых вистаровских крысах-самцах с продолжительным (в течение 6 недель) введенным глибутида установлено некоторое торможение функции инсулярного аппарата и изменение функциональной активности гипоталамо-гипофиз-адреналовой системы, что обуславливает менее выраженную метаболическую реакцию больших полушарий головного мозга в ответ на облучение животных в малой дозе.

Исследованиями, проведенными нами в течение ряда лет, показано, что в начальный период и отдаленные сроки после окончания фракционированного и хронического воздействия различных по физической природе источников ионизирующей радиации в малых дозах наступают функциональные изменения гипоталамо-гипофиз-адреналовой системы, во многом определяющие характер сдвигов в процессах углеводно-энергетического обмена головного мозга и других тканей [1—3].

Между гипоталамо-гипофиз-адреналовой системой и следующим важнейшим звеном нейроэндокринной регуляции—инсулярным аппаратом существует тесная функциональная связь. Сведения о влиянии ионизирующей радиации на инсулярный аппарат немногочисленны, нередко противоречивы и касаются воздействия облучения в больших дозах [4—7]. Работ, характеризующих функцию инсулярного аппарата при длительном или дробном воздействии на организм ионизирующей радиации в малой дозе, к началу настоящих исследований в литературе найти не удалось.

Нами установлена выраженная зависимость изменений в содержании различных форм инсулина от режима облучения при одинаковой суммарной дозе—12,9 мКл/кг [8]. Гликемические сдвиги при однократном облучении выражены значительно и удерживаются более длительный период времени по сравнению с таковыми после фракционированного воздействия в той же дозе. Секретция инсулина активируется в первые 15 суток после однократного облучения и угнетается после фракционированного.

Учитывая множественные механизмы действия инсулина в регуляции метаболических процессов в организме, представляет интерес изу-

чить характер постраднационных сдвигов в углеводном обмене больших полушарий головного мозга в условиях несколько измененного уровня инсулина.

Для решения этой задачи в качестве препарата, обладающего свойством потенцировать действие инсулина, был использован глибутид [9]. Глибутид-1-бутилбигуанид-гидрохлорид, синтезированный в Институте органического синтеза АН ЛатвССР, является гипогликемическим (антидиабетическим) препаратом, допущенным к использованию в клинике. Бигуаниды не стимулируют секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы, а усиливают проницаемость клеточных мембран для глюкозы, уменьшая потребность в инсулине и повышая тем самым ее утилизацию периферическими тканями. Основой терапевтического действия является потенцирование эффекта инсулина, направленного преимущественно на стимуляцию внутриклеточного обмена [10]. Однако влияние хронического введения глибутида на обменные процессы в ЦНС не изучено.

Материалы и методы

Было проведено четыре серии опытов на половозрелых вистаровских крысах-самцах массой 180—200 г. В первой серии животным 6 недель по пять раз в неделю внутрибрюшинно вводили раствор глибутида из расчета 15 мг/кг массы. Исследования проводили через 1, 15 и 30 суток после окончания введения препарата. В этой серии опытов, как и во всех последующих, было около 40 животных, не менее 10 на каждый срок исследования.

Во второй серии крыс подвергали 5-кратному рентгеновскому облучению, используя аппарат РУМ-II, с интервалами в 3-е суток в суммарной дозе 12,9 мКл/кг, которое проводили при следующих условиях: напряжение—160 кВ, сила тока—5 мА, кожно-фокусное расстояние—176 см, медный фильтр толщиной 1 мм. Доза облучения—2,15 мКл/кг/с. Исследования проводили через 1, 15 и 30 суток после окончания облучения.

В третьей серии крыс в последние 2 недели введения глибутида подвергали 5-кратному рентгеновскому облучению в тех же условиях эксперимента, что и во второй.

Контролем для каждой серии опытов служили данные, полученные на интактных животных, находившихся в аналогичных условиях содержания.

О состоянии инсулярного аппарата в условиях эксперимента судили на основании изучения содержания в сыворотке крови глюкозы и иммунореактивного инсулина (ИРИ).

С целью получения информации об интенсивности углеводного обмена в мозгу было проведено изучение активности следующих ферментов: гексокиназы (КФ 2. 7. 1. 1), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1. 1. 1. 49), лактатдегидрогеназы (КФ 1. 1. 1. 27) и ее изоферментов, а

также содержания в мозговой ткани гликогена и активности фосфофорилазы А.

Для наиболее объективного изучения функции инсулярного аппарата и определения содержания в сыворотке крови глюкозы и ИРИ декапитации подвергали крыс, голодавших 18 ч. ИРИ определяли, используя наборы реактивов «JNS-SET kit» (ГНП), глюкозу—ортотолуидиновым методом [11]. Активность гексокиназы [12] и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [13] изучали спектрофотометрически по увеличению интенсивности поглощения (при длине волны 340 нм) в присутствии NADP в гомогенате больших полушарий головного мозга. Определение общей активности и активности изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) проводили в гомогенате головного мозга после добавления детергента тритон X-100 колориметрическим методом [14, 15].

Результаты и обсуждение

Уровень глюкозы в сыворотке крови интактных контрольных животных находился в пределах 5,84—6,10 мМ, ИРИ—136, 99—176, 10 пМ.

Хроническое введение глибутида несколько тормозило функцию инсулярного аппарата в 1- и 30-е сутки после окончания введения (рис. 1). При отсутствии изменений в содержании ИРИ к 15- и 30-м суткам после окончания фракционированного рентгеновского облучения наблюдается достоверно увеличенное содержание в сыворотке крови глюкозы

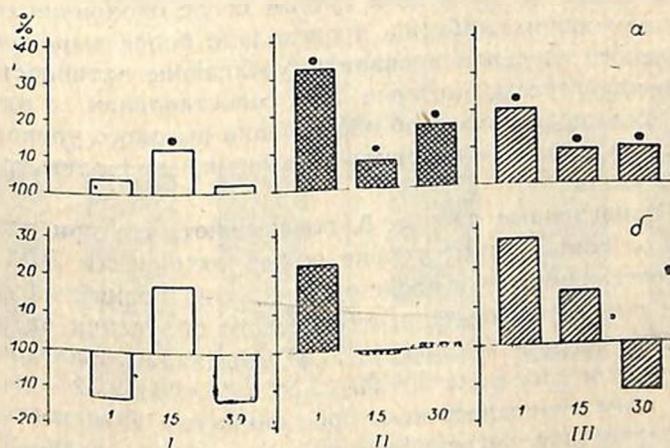


Рис. 1. Содержание глюкозы (а) и иммунореактивного инсулина (б) в крови крыс после введения глибутида и рентгеновского облучения: I—введение глибутида, II—фракционированное рентгеновское облучение, III—введение глибутида+фракционированное рентгеновское облучение; ●—достоверные изменения

во всех исследованных сроках. Облучение животных, получавших 6 недель глибутид, приводило к повышению уровня ИРИ через 1 и 15 суток после окончания введения препарата и облучения, что обуславливало выраженную гипергликемическую реакцию во все сроки исследования.

Исходя из выявленных изменений в реакции на облучение «глибутидных» животных, сопоставим их с полученными ранее результатами [3]. Через 1 и 15 суток после окончания введения глибутида в больших полушариях головного мозга снижалось содержание гликогена и активности фосфорилазы А. Облучение в течение 2 недель вызывало снижение содержания гликогена и активности фосфорилазы А только через 30 суток. Глибутид изменял ответную реакцию мозга на облучение, к 1- и 15-м суткам после окончания его введения и фракционированного облучения наступало снижение содержания в мозгу гликогена наряду с наличием высокой активности фосфорилазы А.

Активность гексокиназы больших полушарий головного мозга контрольной группы животных выражалась величинами $18,01 \pm 1,00$ — $20,18 \pm 0,51$ нкат, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы $7,84 \pm 0,34$ — $8,63 \pm 0,35$ нкат. Введение в течение 6 недель глибутида не вызывало изменений активности гексокиназы, однако активировало к 15-м суткам глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу мозга (рис. 2). 5-кратное рентгеновское облучение в суммарной дозе $12,9$ мКл/кг к 15- и 30-м суткам после окончания воздействия повышало активность гексокиназы и тормозило активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Фракционированное на фоне введения глибутида рентгеновское облучение в малой дозе вызывало к 15- и 30-м суткам тот же эффект повышения активности гексокиназы, что и облучение intactных животных. Иной характер изменений проявлялся в активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы мозга. К 15- и 30-м суткам после окончания облучения у животных, получавших глибутид, происходило более выраженное, чем после хронического введения препарата, увеличение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, которое при сопоставлении с активацией гексокиназы свидетельствовало об обеспечении высокого уровня использования мозгом глюкозы в условиях облучения, проводимого на фоне введения глибутида.

Данные, приведенные на рис. 3, показывают, что при неизменном по сравнению с контрольным уровне общей активности ЛДГ мозга— $473,00 \pm 2,47$ нкат через сутки после окончания введения глибутида, как и через сутки после окончания рентгеновского облучения на фоне введения глибутида, общая активность ЛДГ оставалась близкой к контрольной величине и достигала $454,00 \pm 2,56$ и $463,00 \pm 2,52$ нкат соответственно. При этом отмечалось некоторое снижение активности ЛДГ₂ и ЛДГ₃ при возрастании неспецифической для данной ткани ЛДГ₄. На 15-е сутки после окончания облучения «глибутидных» животных выявлялось достоверное до $643,20 \pm 3,35$ нкат увеличение (на 49%) общей активности ЛДГ и снижение активности ЛДГ₁ и ЛДГ₂.

Для более полной характеристики влияния глибутида на обменные процессы в мозгу и механизмов нейроэндокринной регуляции обратимся к данным [16], полученным нами в тех же условиях эксперимента. Через сутки после окончания хронического введения глибутида отмечалось некоторое увеличение содержания в гипоталамусе серотонина, сопро-

вождавшееся снижением активности МАО и содержания в плазме крови кортикостерона. К 15-м суткам уровень серотонина в гипоталамусе достигал контрольного, активность МАО оставалась пониженной, но достоверно возрастало содержание в плазме кортикостерона, к 30-м суткам наступала нормализация всех указанных показателей.

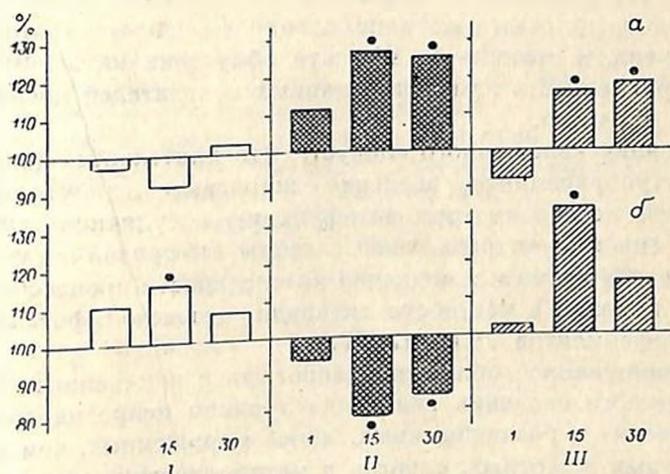


Рис. 2. Активность гексокиназы (а) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (б) в мозгу крыс после введения глибутида и рентгеновского облучения. Условные обозначения те же, что и на рис. 1

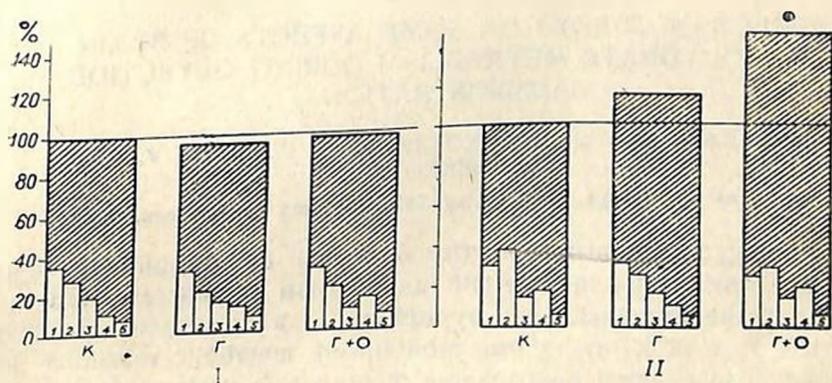


Рис. 3. Общая активность лактатдегидрогеназы мозга и ее изоэнзимы (в %): I—1-е сутки после введения глибутида и облучения, II—15-е сутки после введения глибутида и облучения; К—контроль, Г—«глибутидные» животные, Г+О—облучение на фоне введения глибутида; 1—5—фракции изоэнзимов. ● —достоверные изменения

Введение глибутида резко изменяло реакцию указанной системы на фракционированное двухнедельное облучение в суммарной дозе 12,9 мКл/кг в сравнении с таковой у облученных интактных животных. На

1-е сутки после окончания облучения «глибутидных» животных до 112,6% увеличивалось содержание в гипоталамусе серотонина и снижалась активность МАО, тогда как у облученных интактных животных уровень серотонина снижался до 60%, а активность МАО оставалась в пределах контрольных величин. К 15- и 30-м суткам после окончания облучения у «глибутидных» животных нормализовался уровень серотонина, то есть отмечалась та же направленность, что и у животных, получавших глибутид, в отличие от эффекта облучения интактных животных, где направленность изменений данных показателей носила противоположный характер.

На основании изложенного следует, что длительное (в течение 6 недель) внутрибрюшинное введение животным глибутид в дозе 15 мг/кг массы несколько тормозит функцию инсулярного аппарата и гипоталамо—гипофиз—адреналовой системы, что приводит к увеличению уровня глюкозы в крови и изменению интенсивности процессов углеводного обмена в мозгу, в частности активации глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и изоферментов ЛДГ (ЛДГ₄).

Фракционированное облучение животных с измененным под влиянием хронического введения глибутид уровнем нейроэндокринной регуляции приводит к развитию иных, менее выраженных, чем при облучении интактных животных, сдвигов в метаболических процессах больших полушарий головного мозга. Это, очевидно, связано с повышением проницаемости клеточных мембран, что является существенным в объяснении механизма действия данного соединения.

EFFECT OF X-RAYS ON SOME ASPECTS OF BRAIN CARBOHYDRATE METABOLISM DURING GLYBUTIDE ADMINISTRATION

CHERKASOVA L. S., DASHKOVSKAYA O. P., NOVIK V. A.,
FOMICHENKO V. G.

Institute of Physiology, Belorussian SSR Academy of Sciences, Minsk

A prolonged administration (for 6 weeks) of glybutide to mature Wistar male rats results in a certain suppression of pancreas and in an alteration of the hypothalamus—hypophysis—adrenals system reactivity. Upon small dose of X-raying less pronounced metabolic reactions have been detected in cerebral hemispheres of glybutide pretreated animals.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Черкасова Л. С., Тайц М. Ю. Вопросы нейрохимии. Сб. науч. тр. Л., с. 122—123, 1977.
2. Тайц М. Ю., Дудина Т. В. Радиобиология, 16, 301—304, 1976.
3. Миронова Т. М., Черкасова Л. С., Фомиченко В. Г. Радиобиология, 15, 42—45, 1975.
4. Баркалая А. И. Радиобиология, 10, 386—389, 1970.
5. Баркалая А. И. Радиобиология, 17, 596—599, 1977.

6. Мороз Б. Б., Кендыш И. М. Радиобиологический эффект и эндокринные факторы. М., Атомиздат, 1968.
7. Черкасова Л. С.—В кн.: Современные проблемы радиобиологии. Радиационная биохимия, М., Атомиздат, IV, с. 219—249, 1975.
8. Дашковская О. П. Радиобиология, 19, 750—753, 1979.
9. Машковский М. Д.—В кн.: Лекарственные средства, М., Медицина, с. 569—570, 1977.
10. Блюгер Н. А., Петерсоне И. Р., Чипенс Г. И., Павар А. П., Вискне З. А. Экспериментальное обоснование к клиническому применению противодиабетического препарата глибутида, Рига, Знание, в. 5, с. 37—43, 1973.
11. Райцис А. Б., Устинова А. О. Лабор. дело, 1, 33, 1965.
12. Vinuela E., Salas M., Sols A. J. Biol. Chem., 238, 1175—1177, 1963.
13. Kornberg A., Horecker B. L. Methods in Enzymology (Ed. by Colowick S. P., Kaplan N. O.) Acad. Press. v. 9, 1, 323—335, 1955.
14. Ševeta M., Tovarek J. Časop lekařu česk, 98, 844, 1959.
15. Крестникова Л. М., Товарек И. Вестник ЛГУ, 15, 126—130, 1969.
16. Кандыбо Т. С., Дашковская О. П., Дудина Т. В. Радиобиология, 19, 268—271, 1979.

Институт физиологии АН БССР.
Минск

Поступила 23. III 1982

УДК 612.8.015; 612.018

АКТИВНОСТЬ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ФЕРМЕНТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ АКТИВАЦИИ ГИПОТАЛАМО—ГИПОФИЗ—АДРЕНАЛОВОЙ СИСТЕМЫ

ТАНЦ М. Ю., ЦЫХУН Г. Ф.

Показано, что под влиянием глюкокортикоидов наблюдается изменение ультраструктуры и проницаемости митохондрий головного мозга. Возникающие при этом конформационные перестройки в липидах митохондриальных мембран ведут к изменению подвижности мембраносвязанных ферментов, в том числе Mg^{2+} -АТФазы, субстрат-тетразоль-редуктазных систем цикла трикарбоновых кислот и др. Эти изменения являются одним из возможных механизмов, обеспечивающих биоэнергетическую сторону адаптационных процессов в головном мозгу при стрессе.

Активация системы гипоталамус—гипофиз—кора надпочечников сопровождается значительным увеличением уровня глюкокортикоидов и интенсивности некоторых биоэнергетических процессов в митохондриях головного мозга [1—4]. Однако вопрос о механизме изменения активности мембраносвязанных ферментов митохондрий при перестройке организма, наступающей в условиях повышенного фона глюкокортикоидов и более экономного использования кислорода и субстратов окисления, остается открытым. В связи с этим в задачу настоящего исследования входило изучение некоторых сторон глюкокортикоидной регуляции редокс-процессов митохондрий головного мозга.

Материалы и методы

Работа была проведена на половозрелых крысах-самцах линии Вистар, которых содержали на стандартном рационе вивария. Животных декапитировали, все дальнейшие процедуры проводили в холодильной камере при температуре около 0°. Полушария головного мозга помещали в ледяной трис-НСl-сахарозный буфер, рН—7,4. Митохондриальный препарат получали методом дифференциального центрифугирования из 10% гомогената [5]. Полнота осаждения и чистота митохондриальной фракции контролировались с помощью электронной микроскопии. Критерием интенсивности биоэнергетических процессов в митохондриях головного мозга была активность субстрат-тетразоль-редуктазных систем: пируватдегидрогеназы (КФ—1. 2. 4. 1), 2-оксиглутаратдегидрогеназы (КФ—1. 2. 4. 2), сукцинатдегидрогеназы (КФ—1. 3. 99. 1) и малатдегидрогеназы (КФ—1. 1. 1. 37) [6].

Результаты и обсуждение

Под влиянием классического иммобилизационного стресса через 2 ч отмечалось увеличение уровня общего кортикостерона в плазме периферической крови на 60%, причем содержание свободного гормона возрастало в 2 раза. Одновременно снижалась глюкокортикоидсвязывающая функция транскортина. В этот же период обнаруживалось повышение активности исследованных дегидрогеназ митохондрий головного мозга (рис. 1). Активация субстрат-тетразолий-редуктазных систем митохондрий наблюдалась не только при иммобилизационном, но и при других видах стресса. Так, под влиянием лучевого стресса (50 Р) наряду с увеличением уровня общего и свободного кортикостерона в плазме

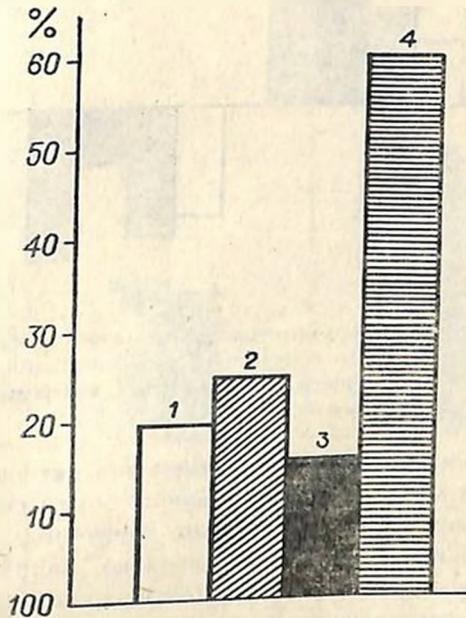


Рис. 1. Влияние иммобилизационного стресса на активность дегидрогеназ митохондрий головного мозга (% к контролю): 1—пируватдегидрогеназа, 2—2-оксиглутаратдегидрогеназа, 3—сукцинатдегидрогеназа, 4—малатдегидрогеназа

периферической крови существенно возрастала активность исследованных дегидрогеназ (рис. 2). Увеличение активности исследованных дегидрогеназ связано с возросшим уровнем глюкокортикоидов, так как после двусторонней адреналэктомии на фоне сниженного до 29% по сравнению с исходным уровнем кортикостерона, когда уровень свободного кортикостерона уменьшался не столь резко, отмечалось значительное снижение активности исследованных субстрат-тетразолий-редуктазных систем, то есть наблюдалась противоположная стрессу направленность сдвигов уровня глюкокортикоидов и активности исследован-

ных дегидрогеназ. Эти изменения происходили на фоне повышенного содержания флавопротеидов.

Весьма характерные сдвиги были выявлены под влиянием глюкокортикоидов при добавлении их в среду инкубации. Под влиянием глюкокортикоидов возрастала активность почти всех исследованных дегидрогеназ митохондрий головного мозга, выделенных из тканей intactных и адреналэктомированных животных (рис. 3).

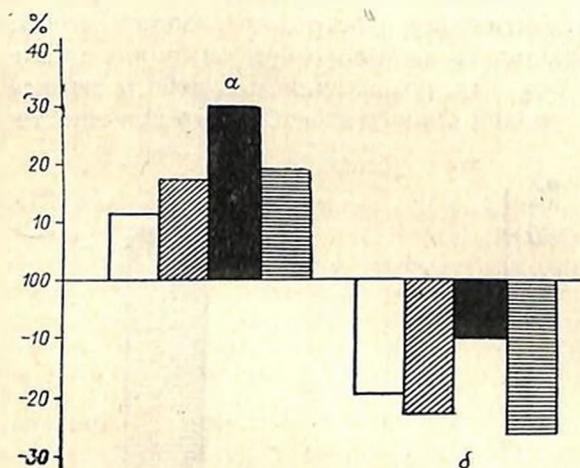


Рис. 2. Активность дегидрогеназ митохондрий головного мозга после фракционированного рентгеновского облучения в суммарной дозе 12,9 мКл/кг (а), после двусторонней адреналэктомии (б) (% к контролю). Условные обозначения те же, что и на рис. 1

Это дает основание полагать, что изменения активности биоэнергетических процессов в митохондриях головного мозга связаны с наступающими под влиянием глюкокортикоидов конформационными изменениями митохондриальных мембран и, вероятно, липидного окружения исследованных мембраносвязанных ферментных систем. Об этом свидетельствовали такие косвенные показатели, как изменение скорости светорассеяния и содержания цитохромов $C+C_1$ в митохондриях при их инкубации в присутствии глюкокортикоидов. Имелись и прямые доказательства, полученные при электронной микроскопии митохондриального препарата после инкубации в присутствии глюкокортикоидов.

Влияние глюкокортикоидов на проницаемость и ультраструктуру митохондриальных мембран не всегда одинаково и зависит от исходного функционального состояния последних. Как видно на микрофотограмме (рис. 4), в нормальных условиях (изотоническая среда) митохондрии имели овальную или округлую форму с электроннооптически плотным матриксом и развитыми кристами. При добавлении глюкокортикоидов в дозе 25 мкг (изотоническая среда) среди митохондрий, сохранивших структуру и величину, встречались набухшие, с разрушенными кристами (рис. 5). В гипотонической среде (рис. 6) основная мас-

са митохондрий набухшая с разрушенными кристами, в некоторых—почти отсутствовал матрикс, хотя и в этих условиях встречались единичные митохондрии, практически не отличавшиеся от нормальных. При добавлении глюкокортикоидов в гипотоническую среду, содержащую митохондрии (рис. 7), набухание последних не было столь интенсивным, кристы более четко выражены. Вероятно, под влиянием глюкокортикоидов в изотоническом растворе происходит набухание митохондрий, сопровождающееся изменением ультраструктуры и проницаемости. В гипотонической среде глюкокортикоиды оказывали противоположный, то есть стабилизирующий эффект. Следовательно, эффект глюкокортикоидов на митохондриальную мембрану во многом зависит от исходного функционального состояния митохондрий и их окружения.

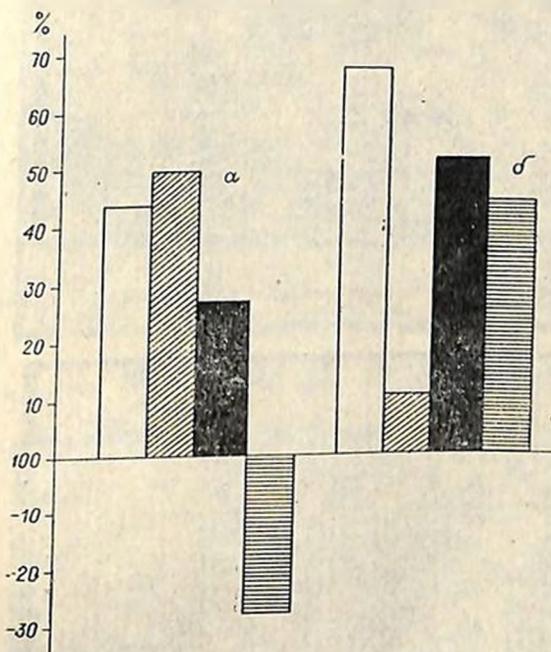


Рис. 3. Влияние добавленных в среду инкубации глюкокортикоидов на активность дегидрогеназ митохондрий головного мозга интактных (а) и адреналэктомированных (б) животных (% к контролю). Условные обозначения те же, что и на рис. 1

О наличии значительных конформационных изменений митохондрий головного мозга, наступавших под влиянием глюкокортикоидов, свидетельствовали не только структурные (электронномикроскопические), но и функциональные сдвиги. В частности, глюкокортикоиды приводили к значительному снижению активности Mg^{2+} -АТФазы митохондрий головного мозга как в тканях целостного организма, так и в опытах *in vitro*. Аналогичный эффект наблюдался под влиянием адреналина. В исследованиях на митохондриях головного мозга, выделенных из тканей

адреналэктомированных животных, получавших кортизол, выявлено снижение активности Mg^{2+} -АТФазы. Совместное введение кортизола и адреналина приводило к нормализации АТФазной активности. По-видимому, это связано с какими-то опосредованными эффектами, ибо внесение адреналина в среду инкубации, содержащую митохондриальный препарат, полученный из головного мозга адреналэктомированных животных, не снимало эффекта угнетения Mg^{2+} -АТФазы гидрокортизоном.



Рис. 4. Митохондрии головного мозга крыс в изотонической среде, $\times 12\,000$



Рис. 5. Митохондрии головного мозга крыс в изотонической среде с добавлением гидрокортизона, $\times 42\,000$

Таким образом, под влиянием глюкокортикоидов происходят определенные изменения ультраструктуры митохондриальных систем, сопровождающиеся сдвигами в ферментативной активности исследованных дегидрогеназ (тетразолий-редуктазных систем).

Каков же механизм активации исследованных дегидрогеназ? Возросшую под влиянием глюкокортикоидов ферментативную активность можно было связать с повышением проницаемости митохондриальных

мембран и в результате с субстратным активированием исследованных дегидрогеназ. Под влиянием кортизола возрастала активность сукцинат-тетразолий-редуктазной системы, которая может быть обусловлена субстратным активированием сукцинатдегидрогеназы. Однако в присутствии феназинметасульфата выявлялась незначительная активация этого фермента. Учитывая, что число оборотов сукцинатдегидрогеназы в несколько раз выше сукцинат-тетразолий-редуктазной системы, становится очевидным, что повышение активности последней было связано не только с субстратным активированием сукцинатдегидрогеназы, происходившим при повышении проницаемости митохондриальных мембран, но и благодаря их конформационным изменениям.



Рис. 6. Митохондрии головного мозга крыс в гипотонической среде, $\times 42\,000$



Рис. 7. Митохондрии головного мозга крыс в гипотонической среде с добавлением гидрокортизона, $\times 42\,000$

О зависимости функционирования мембраносвязанных дегидрогеназ от проницаемости и ультраструктуры митохондриальных мембран свидетельствуют полученные данные о влиянии на эти процессы бигуанидов, изменяющих проницаемость плазматических мембран. В частности, под влиянием глибутида отмечалась выраженная тенденция к по-

вышению активности исследованных субстрат-тетразолий-редуктазных систем, исключением являлось лишь 2-оксиглутарат-тетразолий-редуктазная система.

В заключение следует подчеркнуть, что возросший при активации гипоталамо—гипофиз—адреналовой системы уровень глюкокортикоидов приводит к изменениям ультраструктуры и проницаемости митохондрий головного мозга, что, вероятно, сказывается на подвижности мембраносвязанных ферментов, в том числе субстрат-тетразолий-редуктазных систем цикла трикарбоновых кислот, пируват-тетразолий-редуктазной системы и Mg^{2+} -АТФазы. Возможно, что эти изменения являются одним из механизмов, обеспечивающих биоэнергетическую сторону процессов адаптации в головном мозгу при стрессе.

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук Минрохмедову А. К., в лаборатории которого проведена электронная микроскопия митохондриальных препаратов.

ACTIVITY OF BRAIN MEMBRANE-BOUND ENZYMES UPON ACTIVATION OF HYPOTHALAMUS—HYPOPHYSIS—ADRENALS SYSTEM

TAITS M. U., TSYHUN G. F.

Institute of Physiology, Belorussian Academy of Sciences, Minsk

In experiments with mature Wistar male rats it has been demonstrated that both the increase in glucocorticoids upon activation of the hypothalamus—hypophysis—adrenals system and addition of cortisol to the incubation medium results in an alteration of brain mitochondrial ultrastructure and permeability. This conformational reorganization of mitochondrial membranes leads to a change in the mobility of membrane-bound enzymes, such as Mg^{2+} -ATPases, substrate-tetrazolium-reductase, systems of tricarboxylic acid cycle, etc. These changes represent one of the mechanisms ensuring bioenergetics of brain adaptation processes under stress conditions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Митюшов М. И., Богданова Т. С., Гарина И. А., Емельянов Н. А., Ноздрачев А. Д., Поддигина Т. Т., Ракицкая В. В., Соколова Е. В., Федорова Л. Д., Шалыпина В. Г. Гормоны коры надпочечников и центральная нервная система, Л., Наука, 159 с., 1970.
2. Тайц М. Ю. ДАН БССР, 14, 953—957, 1970.
3. Шалыпина В. Г. Тез. докл. Восьмой Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, Минск, Наука и техника, с. 100—101, 1980.
4. Черкасова Л. С., Тайц М. Ю., Цыхун Г. Ф. Тез. докладов VI конференции биохимиков прибалтийских республик, Белорусской ССР и Ленинграда, Рига, Зинатне, с. 323—324, 1981.
5. Samogy G., Fonto A. Acta physiol. Acad. Sci. Hung., 21, 4, 295—308, 1962.
6. Nordmann G., Nordmann R., Gauchery O. Bull. Soc. Chim. Biol., 33, 11—12, 1826—1840, 1951.

Институт физиологии
АН БССР, Минск

Поступила 23. III 1982

УДК 576.311.347

ПОГЛОЩЕНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ МЕМБРАННЫМИ ФРАКЦИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ И НЕРВА ЛЯГУШКИ

КРАВЦОВ Г. М., МАКСИМОВ Г. В., ОРЛОВ С. Н., ПОКУДИН Н. И.,
РЯЖСКИЙ Г. Г., СВЕРДЛОВА Е. А.

С помощью метода меченых атомов исследовалось поглощение кальция мембранными фракциями, выделенными из головного мозга крысы и нервного волокна лягушки. Определены параметры АТР-независимого поглощения (связывания) и энергозависимого поглощения (аккумуляции) кальция плазматическими мембранами, митохондриями и микросомами этих тканей. Показана ведущая роль аккумуляции кальция митохондриями головного мозга и плазматическими мембранами нерва в регуляции концентрации свободного внутриклеточного кальция. Исследованы зависимости Ca^{2+} -аккумуляционной способности этих фракций от концентрации АТР.

Проведение возбуждения нервной тканью сопровождается увеличением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток за счет его поступления по электрохимическому градиенту через потенциалзависимые каналы. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} приводит к увеличению проводимости аксолеммы для K^+ и ее реполяризации, что во многом определяет параметры проведения возбуждения по нервным волокнам [1, 2]. Повышение концентрации Ca^{2+} в нервном окончании служит триггерным сигналом для секреции нейротрансмиттеров [3, 4]. В обоих случаях механизмы, поддерживающие электрохимический градиент Ca^{2+} , изучены недостаточно. Предполагается, однако, что системы регуляции внутриклеточного распределения Ca^{2+} в нервном волокне и нервном окончании отличны друг от друга [5]. В связи с этим в настоящей работе исследовались особенности связывания и аккумуляции Ca^{2+} мембранными фракциями, изолированными из нервного ствола лягушки и головного мозга крысы.

Материалы и методы

В работе использовались крысы-самцы линии Вистар в возрасте 12—16 недель и массой 200—250 г. Головной мозг крысы за исключением мозжечка (3,7—4,2 г) гомогенизировали в 5-ти объемах раствора, содержащего 0,32 М сахарозу и 5 мМ ХЕПЕС-NaOH буфер (рН 7,5; 0—2°). Для гомогенизации использовали гомогенизатор тефлон-стекло (Клирленс 0,06—0,08 мм, 30 с, 600 об/мин). Гомогенат разбавляли сре-

дой гомогенизации в 2 раза и центрифугировали (3000 g, 5 мин). Полученный супернатант осаждали (20 000 g, 25 мин; осадок Р, супернатант S). Дальнейшую обработку осадка Р проводили в соответствии с методом Whittaker [6]. Осадок доводили до объема 30 мл и наносили по 5 мл на ступенчатый градиент фикола (7,5—12—17%), приготовленного на основе среды гомогенизации. После центрифугирования (25 000 об/мин, ротор SW-27, «Beckman») фракции на границах раздела фаз сахароза—7,5; 7,5—12, 12—17% фикола и на дне пробирки (фракции K₁, K₂, K₃ и K₄ соответственно), а также осадок, волученный при центрифугировании супернатанта S (30 000 g, 40 мин, фракция K₅), промывали в 80 мл 0,32 М сахарозы (57 000 g, 30 мин). Супернатант, полученный после центрифугирования при 30 000 g, осаждали 90 мин при 120 000 g. Полученный осадок (фракция K₆) промывали при тех же условиях центрифугирования 0,32 М сахарозой.

Фракцию K₂, охарактеризованную как синантосомы, подвергали гипосмотическому шоку путем добавления 8-кратного объема 5 мМ трис-НСI буфера (рН 8,1; 60 мин, постоянное перемешивание, 0,2°). Лизат центрифугировали (54 000 g, 30 мин), и осадок ресуспендировали в 0,32 М сахарозе и наносили по 5 мл в две пробирки, содержащие ступенчатый градиент фикола (3; 7,5; 9; 12; 17%), приготовленного на 0,32 М сахарозе. После центрифугирования (22 000 об/мин, 90 мин, ротор SW-27) фракции, находящиеся на границе раздела фаз сахароза-фикола (K₇) и различных концентраций фикола (K₇—K₁₁), а также на дне пробирки (K₁₂), промывали в 0,32 М сахарозе (110 000 g, 40 мин).

Отпиренирированные волокна седлашного нерва лягушки *Rana temporaria* измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Polytron (4 раза по 15 с с 15-секундными интервалами) в 10-кратном объеме среды, содержащей 0,25 М сахарозу, 10 мМ трис-НСI буфер и 1 мМ ЭДТА (рН 7,4; 0—2°), после чего гомогенат обрабатывали в гомогенизаторе тефлон-стекло (300 об/мин, 2 мин) и центрифугировали при 27 000 g 30 мин (осадок Р, супернатант S). Осадок Р ресуспендировали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Полученный супернатант центрифугировали (27 000 g, 30 мин), и осадок наносили на 7% раствор фикола, приготовленный в среде гомогенизации. После центрифугирования (22 000 об/мин, 45 мин, ротор SW-27) фракции, находящиеся над раствором фикола и на дне пробирки (фракции L₁ и L₂ соответственно), промывали раствором 0,25 М сахарозы (27 000 g, 30 мин). Супернатант S осаждали (120 000 g, 90 мин). Осадок (фракция L₃) промывали 0,25 М сахарозой при тех же условиях центрифугирования.

Определение активностей ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) описано ранее [7, 8]. Состав среды инкубации для определения активностей 5'-нуклеотидазы и глюкозо-6-фосфатазы предложен в ряде исследований [9, 10]. Содержание Р_i, образовавшегося в этих реакциях, определяли по методу Rathbun и соавт. [11].

⁴⁵Са и мембранные фильтры (НА, Millipore, США) были использованы для определения связывания и аккумуляции Са²⁺ мембранной

ми фракциями. Подробности этого подхода описаны нами ранее [12]. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [13].

Результаты и обсуждение

Характеристика мембранных фракций. Среди фракций K_1 — K_4 , полученных на ступенчатом градиенте фикола, наибольшей активностью ферментов-маркеров плазматической мембраны обладает фракция K_2 . Активность СДГ в этой фракции составляет всего 7,2% от общей активности фермента во фракциях K_1 — K_6 . Эта фракция идентифицирована нами как синапсомы, что согласуется с результатами других исследований [4, 6]. Фракция K_4 в большей степени обогащена митохондриями и составляет 48,4% от общей активности СДГ (табл. 1). Фракция K_1 , расположенная над верхней ступенькой фикола, по-видимому, образована миелином [4]. Фракции K_3 и K_5 представляют собой смесь синапсом и митохондрий. Во фракции K_6 , полученной после высокоскоростного центрифугирования, обнаружена максимальная активность 5'-нуклеотидазы и АХЭ; примесь митохондрий в этой фракции минимальна. Следует, однако, отметить, что эта фракция обладает также максимальной активностью глюкозо-6-фосфатазы—фермента, который в печени и почках считается маркером эндоплазматического ретикулула [10]. На основании полученных данных можно допустить, что в головном мозгу гликозо-6-фосфатазной активностью обладают плазматические мембраны несинапсомного происхождения, либо мембраны эндоплазматического ретикулула обогащены 5'-нуклеотидазой и АХЭ.

Таблица 1

Относительная активность маркерных ферментов во фракциях мембран из мозга крысы (K_1 — K_{12}) и керна лягушки (L_1 — L_3)

Фракции	Белок (% к белку гомогената)	СДГ (%)	АХЭ (%)	5'-нуклеотидаза (%)	Глюкозо-6-фосфатаза (%)
K_1	4,3	6,6	2,7	24	0,5
K_2	2,1	7,2	8,9	25	0,5
K_3	2,7	24,2	6,3	10	0,5
K_4	1,5	48,4	3,4	2	—
K_5	2,1	12,1	11,5	11	0,5
K_6	2,2	1,5	67,2	28	98
K_7	0,2	3,0	15,0	—	0
K_8	0,6	5,0	60,0	—	0
K_9	0,1	12,0	10,0	—	0
K_{10}	0,2	10,0	5,0	—	0
K_{11}	0,3	30,0	8,0	—	0
K_{12}	0,4	40,0	2,0	—	0
L_1	11,2	3,0	0	74,0	—
L_2	1,2	94,0	0	7,0	—
L_3	7,3	3,0	0	19,0	—

Примечание. За 100% принято значение суммарной активности во фракциях (K_1 — K_6), (K_7 — K_{12}) и (L_1 — L_3)

После лизиса синапсом была исследована активность маркерных ферментов в субсинапсомных фракциях (K_7 — K_{12}). Максимальная активность АХЭ обнаружена во фракции K_8 , а СДГ—во фракции K_{12}

(табл. 1). Активности глюкозо-6-фосфатазы в этих фракциях не обнаружено.

Для характеристики мембранных фракций, полученных из нервного волокна лягушки, были определены активности СДГ и 5'-нуклеотидазы. Активности АХЭ как в гомогенате, так и во фракциях Л₁—Л₃ не обнаружено. Фракция Л₁, составляющая основную часть мембранных фракций (11,2% от общего белка гомогената), обладает в 7—10 раз большей активностью 5'-нуклеотидазы, чем фракции Л₂ и Л₃. Активность СДГ во фракции Л₁ минимальна, и ее можно охарактеризовать как обогащенную плазматическими мембранами (табл. 1). Фракция Л₂, наименее представленная в нервном волокне (1,2% от общего белка гомогената), в основном содержит митохондрии. На это указывает высокая активность СДГ (в 30 раз выше, чем во фракциях Л₁ и Л₃). Полученная после центрифугирования при 120 000 g фракция микросом (Л₃) содержит минимальное количество митохондрий.

В дальнейших экспериментах включение ⁴⁵Са изучали во фракциях К₄ (митохондрии), К₆ (микросомы), К₂ (плазматические мембраны синапсом), Л₁ (плазматические мембраны нервного волокна), Л₂ (митохондрии нервного волокна) и Л₃ (микросомы нервного волокна).

Таблица 2

Зависимость Са²⁺-связывающей способности мембранных фракций от состава среды инкубации

Ткань	Фракция	Са ²⁺ (нмоль/мг белка/20 мин)				
		CaCl ₂ —0,015	CaCl ₂ —0,025	CaCl ₂ —0,050	CaCl ₂ —0,1	CaCl ₂ —0,050 KCl—120 NaCl—20 MgCl ₂ —5
Мозг	Плазматические мембраны	25	52	169	180	4,7
	Митохондрии	15	36	65	105	3,1
	Микросомы	14	30	49	75	1,9
Нерв	Плазматические мембраны	0,9	30	51	93	1,8
	Митохондрии	15	55	145	213	6,2
	Микросомы	0,8	19	32	41	1,2

Состав среды инкубации (мМ)

Имидазол-НСI—4), рН 7,4

Связывание и аккумуляция кальция. При сравнении АТР-независимого поглощения (связывания) ⁴⁵Са с вышеперечисленными фракциями оказалось, что плазматические мембраны синапсом и митохондрий нервного волокна обладают наибольшей Са²⁺-связывающей способностью (табл. 2). В случае, когда среда инкубации содержит Na⁺, К⁺ и Mg²⁺, связывание кальция существенно снижается во всех мембранных фракциях, что свидетельствует о конкуренции этих катионов с Са²⁺ за места связывания, либо об уменьшении доступности Са²⁺-связывающих групп под влиянием повышения ионной силы.

Как видно из рис. 1, связывание Ca^{2+} мембранами из пера лягушки достигает насыщения уже к третьей минуте, в то время как энергозависимое поглощение (аккумуляция) Ca^{2+} более медленный процесс. Аналогичные результаты получены для мембран, выделенных из мозга крысы. В соответствии с результатами этих экспериментов для определения скорости аккумуляции Ca^{2+} время инкубации ограничивали 1 мин, а для определения Ca^{2+} -аккумулирующей способности (максимального количества Ca^{2+} , поглощаемого мембранной фракцией за счет функционирования Ca^{2+} -транспортирующих систем) — 20 мин. Данные этих определений приведены в табл. 3.

Таблица 3

Ca^{2+} -связывающая способность (1), Ca^{2+} -аккумулирующая способность (2) и скорость аккумуляции Ca^{2+} (3) мембранными фракциями нервной ткани

Ткань	Фракция	Ca^{2+} (нмоль/мг белка/20 мин)		
		1	2	3
Мозг	Митохондрии	3,2	334,2	170,1
	Плазматические мембраны	1,1	2,4	—
	Микросомы	1,9	120,2	48,1
Нерв	Митохондрии	0,9	19,7	9,3
	Плазматические мембраны	0,1	36,6	13,54
	Микросомы	0,2	23,17	5,79
Состав среды инкубации (мМ)		KCl—100; NaCl—20; MgCl ₂ —5; CaCl ₂ —0,012 имидазол-HCl— (pH 7,4)—40	Среда инкубации 1 +АТФ—4+ +K ₂ HPO ₄ 3	Среда инкубации 2

Примечание. В случае митохондрий среда инкубации содержала 5 мМ сукцината

Так как при физиологических концентрациях одновалентных катионов и Mg^{2+} , Ca^{2+} -связывающая способность мембранных фракций в 10—100 раз меньше их Ca^{2+} -аккумулирующей способности (табл. 3), можно предположить, что основную роль в регуляции внутриклеточного распределения кальция в нервной ткани выполняют энергозависимые процессы аккумуляции катиона во внутреннем пространстве везикул и органелл.

При пересчете на содержание белка максимальная Ca^{2+} -аккумулирующая способность среди мембранных фракций мозга обнаружена в митохондриях. В отличие от других возбудимых тканей (скелетная, сердечная и гладкая мускулатура), где наибольшая скорость аккумуляции кальция обнаружена в саркоплазматическом ретикулуме или сарколемме [12, 14], скорость аккумуляции Ca^{2+} в митохондриях мозга в несколько раз выше, чем в микросомах (табл. 3). В связи с этим мы склонны полагать, что митохондрии головного мозга выполняют роль основной Ca^{2+} -буферной системы цитоплазмы.

Ca²⁺-аккумулирующая способность митохондрий нервного волокна в два раза меньше, чем плазматических мембран, и в 1,5 раза меньше по сравнению с микросомами. В плазматических мембранах также обнаружена наибольшая скорость аккумуляции Ca²⁺ (табл. 3). Таким образом, в отличие от головного мозга плазматические мембраны нервного ствола вносят основной вклад в регуляцию внутриклеточной концентрации Ca²⁺ при проведении возбуждения.

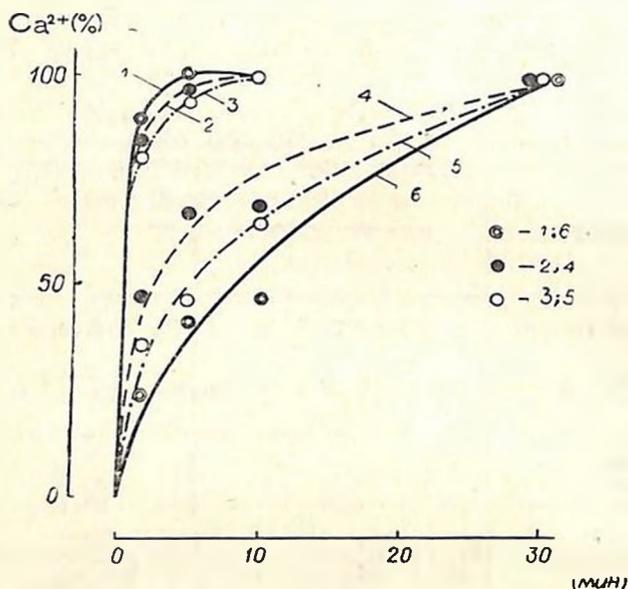


Рис. 1. Кинетика ATP-независимого связывания (1—3) и ATP-зависимой аккумуляции (4—6) Ca²⁺-мембранными фракциями из нервного волокна лягушки: 1, 6—микросомы; 2, 4—митохондрии; 3, 5—плазматические мембраны. Состав среды инкубации (мМ): 1—3—имидазол-HCl—40, KCl—100, NaCl—20, MgCl₂—5, CaCl₂—0,025, pH—7,4. В случаях 5, 6—то же+ATP—4, K₂HPO₄—3; в случае 4—то же+сукцинат-Na—5. За 100% принято максимальное значение Ca²⁺-связывающей или Ca²⁺-аккумулирующей способности мембранной фракции

До сих пор мы рассматривали аккумуляцию Ca²⁺ мембранными фракциями при фиксированной концентрации ATP (4 мМ). Известно, однако, что при проведении возбуждения содержание ATP в нервной ткани существенно снижается [15]. Как видно из рис. 2, при 2-кратном уменьшении концентрации ATP аккумуляция Ca²⁺ митохондриями нервного волокна и микросомами мозга снижается на 70—90%, а плазматическими мембранами нерва на 40%. В других мембранных фракциях сродство Ca²⁺-аккумулирующей системы к ATP гораздо выше.

Таким образом, системы регуляции концентрации внутриклеточного Ca²⁺ в нервных волокнах и головном мозгу имеют ряд особен-

ностей. АТФ-зависимое поглощение Ca^{2+} плазматическими мембранами—ведущий механизм снижения концентрации свободного кальция цитоплазмы при проведении нервного возбуждения в волокнах. В центральных нейронах ситуация меняется, и митохондрии выдвигаются на первый план как наиболее мощная и кинетически мобильная

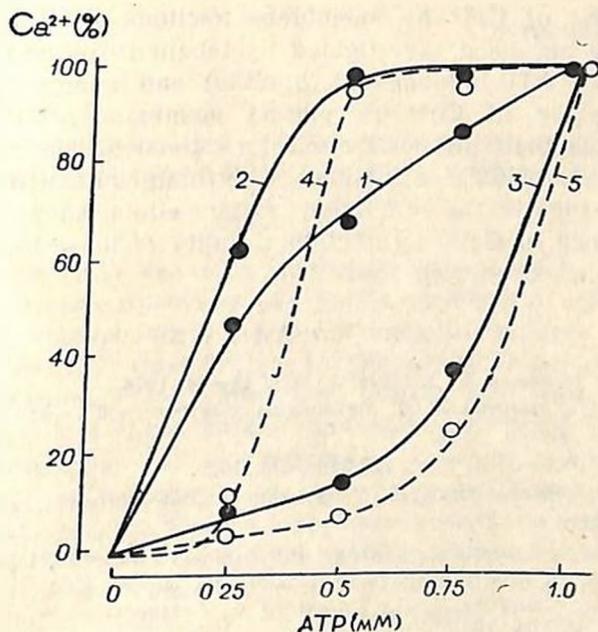


Рис. 2. Зависимость Ca^{2+} -аккумулирующей способности мембранных фракций от концентрации АТФ. 1—3—фракции от нервного волокна лягушки: 1—плазматические мембраны, 2—микросомы, 3—митохондрии; 4, 5—фракции из мозга крысы: 4—митохондрии, 5—микросомы. Состав среды инкубации (мМ): имидазол- HCl —40; KCl —100; NaCl —20; MgCl_2 —5; CaCl_2 —0,025, рН—7,4. За 100% принята Ca^{2+} -аккумулирующая способность при концентрации АТФ 1 мМ

система аккумуляции кальция. В нервных волокнах от концентрации АТФ существенно зависит Ca^{2+} -аккумулирующая способность митохондрий, а в центральных нейронах головного мозга— Ca^{2+} -аккумулирующая система микросом. По-видимому, именно эти системы ответственны за нарушение Ca^{2+} -баланса нервной ткани при ухудшении ее энергообеспечения.

Ca²⁺ UPTAKE BY MEMBRANE FRACTIONS OF RAT BRAIN AND FROG NERVE FILAMENTS

KRAVTSOV G. M., MAXIMOV G. V., ORLOV S. N., POKUDIN N. I.,
RIYZHISKY G. G., SVERDLOVA E. A.

Department of Biology, Moscow State University, Moscow

The uptake of Ca²⁺ by membrane fractions of rat brain and frog nerve filaments has been investigated by labelled isotope technique. Parameters of both ATP-independent (binding) and energy-dependent (accumulation) uptake of Ca²⁺ by plasma membranes, mitochondria and microsomes from these tissues have been estimated. The results point to the essential role of Ca²⁺ accumulation by brain mitochondria and nerve plasma membranes in the regulation of intracellular amount of free Ca²⁺.

Dependence of Ca²⁺ accumulating ability of these fractions on ATP concentration has been also studied.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Meech R. W., Standon N. J. *Physiol.*, **237**, 43—44, 1974.
2. Костюк П. Г., Крышталёв О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки, М., Наука, 1981.
3. Rubin R. P. *Pharmacol. Rev.*, **22**, 389—428, 1970.
4. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
5. Sulakhe P. V., St. Louis P. I. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **35**, 135—195, 1980.
6. Whittaker V. P. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **15**, 39—96, 1965.
7. Ellman G. L., Courtney K. D., Valentino A., Featherstone R. M. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88—95, 1961.
8. Cooper R. J. *Biol. Educat.*, **1**, 57—63, 1967.
9. Potzier G., De Lean A. J. *Biol. Chem.*, **249**, 316—322, 1974.
10. Walls M. A., Lygre D. O. *Can. J. Biochem.*, **58**, 1731—1748, 1980.
11. Rathbun W. B., Bettlach M. V. *Analit. Biochem.*, **28**, 436—442, 1969.
12. Кравцов Г. М., Покудин Н. И., Орлов С. Н. *Биохимия*, **44**, 2058—2065, 1979.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
14. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Постнов Ю. В. *Кардиология*, **20**, 94—100, 1980.
15. Максимов Г. В. Доклады МОИП за 1972 г., секция биофизики, с. 45, 1974.

Биологический факультет МГУ,
IV главное управление при МЗ СССР, Москва

Поступила 15. II 1982

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 636:612.398:577.1

УЧАСТИЕ ЭТАНОЛАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ОБМЕНЕ
КАТЕХОЛАМИНОВ МОЗГА И НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ

КАМАЛЯН Р. Г.

Этаноламин (ЭА) является активным метаболитом, широко представленным в тканях животных [1—4]. Основной путь обмена ЭА в организме—фосфорилирование, взаимодействие фосфорного эфира с СТР и эстерификация СDP-этанолamina диглицеридами с образованием фосфатидилэтанолamina [5—8]. Этот путь обмена ЭА приводит к синтезу фосфолипидов, в том числе фосфатидилхолина, который наряду со свободным холином крови является основным источником синтеза ацетилхолина мозга [9—11]. Количество последнего повышается в большей степени при включении в рацион животных метилпроизводных ЭА, чем холина [12, 13]. Введение серина, ЭА и диметилэтанолamina животным должно способствовать синтезу ацетилхолина в мозгу [13].

Вместе с тем при инкубации со срезами мозга ЭА вызывает уменьшение концентрации N-ацетиласпартата [14], поставляющего ацетат для синтеза ацетилхолина [15]. Аналогичный эффект оказывают катехоламины, но не ацетилхолин.

Этаноламин-О-сульфат (СЭА), являясь ингибитором ГАМК-трансаминазы, резко повышает концентрацию ГАМК при внутрицистернальном, внутрибрюшинном и пероральном введениях [16—18]. В последнее время появились указания на активацию им глутаматдекарбоксилазы [17].

Учитывая данные о стимулировании ЭА [19—20] и диметилэтанолamiном функциональной активности мозга [18, 21], в настоящей работе нами изучено действие внутрибрюшинного введения ЭА, СЭА и N-ацетилэтанолamina (АЭА) на концентрацию катехоламинов и некоторых аминокислот в мозгу белых крыс.

В опытах были использованы ЭА («Sigma») и коммерческий отечественный препарат, который перед использованием подвергали вакуумной перегонке (12 мм рт. ст., 70°). Для синтеза АЭА использовали перегнанные препараты ЭА и этилацетата [22]. Смесь из 12,2 г ЭА и 50 г этилацетата кипятили в круглодонной колбе с обратным холодильником в течение 4 ч, остужали и подвергали вакуумной перегонке при 120—122° и остаточном давлении 1 мм рт. ст. Калневую соль СЭА синтезировали по ранее описанному методу [23].

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 180—200 г. За час до забоя крысам вводили ЭА, СЭА и АЭА в дозе 2,5 мг на 100 г живой массы. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Забой животных, удаление мозга, взятие навесок и гомогенизацию проводили в холодильной комнате (-4°). Аминокислоты экстрагировали, используя 6% раствор HClO_4 . Перхлорнокислые экстракты нейтрализовали раствором KOH и после центрифугирования выпаривали на водяной бане. Сухой остаток разводили в 1 мл H_2O и использовали для разделения аминокислот методами многократной нисходящей хроматографии на бумаге в двух системах растворителей или электрофореза в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,0.

Катехоламины определяли модифицированным Матлиной и сотр. методом [24—26]. Флуоресценцию катехоламинов регистрировали на спектрофлуориметре MRF-2A фирмы «Hitachi» и модифицированном отечественном флуориметре ЭФА 3А с соответствующим набором интерференционных светофильтров.

В табл. 1 приведены результаты определения концентрации катехоламинов в мозгу (без гипоталамуса) белых крыс через 1 ч после внутрибрюшинного введения ЭА, СЭА и АЭА. Представленные данные выявляют достоверное уменьшение концентрации норметанефрина при введении ЭА и ДОФА—при введении СЭА.

Таблица 1

Действие этаноламина и его производных на содержание катехоламинов в мозгу и гипоталамусе, мкг/г ткани, $n=10$

		Адреналин	Норадреналин	ДОФА	Дофамин	Норметанефрин
Мозг без гипоталамуса	Контроль	$0,012 \pm 0,002$	$0,34 \pm 0,02$	$0,022 \pm 0,004$	$0,36 \pm 0,02$	$0,077 \pm 0,006$
	Этаноламин	$0,015 \pm 0,002$	$0,30 \pm 0,07$	$0,021 \pm 0,002$	$0,47 \pm 0,05$	$0,045 \pm 0,004^*$
	Этаноламин —О-сульфат	$0,014 \pm 0,002$	$0,30 \pm 0,03$	$0,013 \pm 0,001^*$	$0,39 \pm 0,04$	$0,068 \pm 0,005$
	N-ацетил- этанолламин	$0,017 \pm 0,003$	$0,35 \pm 0,04$	$0,015 \pm 0,003$	$0,42 \pm 0,05$	$0,072 \pm 0,006$
Гипоталамус	Контроль	$0,17 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,05$	$0,135 \pm 0,016$	$1,11 \pm 0,09$	$0,026 \pm 0,008$
	Этаноламин	$0,29 \pm 0,01^*$	$0,82 \pm 0,04^*$	$0,110 \pm 0,023$	$1,27 \pm 0,19$	$0,065 \pm 0,007^*$

* $p < 0,05$

Учитывая, что в гипоталамических ядрах сосредоточено значительное количество норадреналин- и дофаминергических нервных окончаний, нами исследовалось содержание катехоламинов в изолированном гипоталамусе. В этих опытах использовали лишь ЭА, который вызывал статистически достоверное повышение концентрации адреналина, норадрена-

лина и норметанефрина в этом регионе мозга. Возможно, ЭА обладает избирательным действием на гипоталамус, о чем свидетельствует усиление под его влиянием нейросекреции гипоталамуса [20].

Являясь ингибитором ГАМК-трансаминазы мозга, СЭА путем повышения уровня ГАМК может влиять на уровень норадреналина [27]. В срезах коры мозга крыс СЭА способствует высвобождению норадреналина [28].

Введение в наших опытах СЭА крысам не влияло на уровень ГАМК в мозгу. Однако СЭА и ЭА вызывали заметное снижение концентрации глутамата и резкое увеличение количества аланина в мозгу крыс (табл. 2). Недавно было показано увеличение концентрации аланина и таурина в мозгу при введении СЭА [18]. N-ацетилпроизводное ЭА оказывает противоположное действие на уровень глутамата, не влияя на концентрацию аланина в мозгу. Вместе с тем ЭА уменьшает, а АЭА повышает концентрацию ГАМК в мозгу.

Таблица 2

Действие этаноламина и его производных на концентрацию свободных аминокислот в мозгу, мкМ/г ткани, $n=10$

Аминокислоты	Контроль	Этаноламин	Этаноламин-О-сульфат	N-ацетил-этаноламин
Глутамат	7,48±0,28	6,15±0,45*	5,27±0,24*	8,95±0,30*
Аспарат	3,01±0,20	2,50±0,09	3,39±0,17	3,84±0,22*
Аланин	0,80±0,11	3,12±0,06*	4,05±0,10*	0,88±0,08
ГАМК	2,10±0,06	1,81±0,05	2,12±0,06	2,41±0,08*
Тирозин	0,30±0,03	0,37±0,05	0,45±0,05*	сл.*

* $p < 0,05$

Учитывая данные о специфическом ингибировании ГАМК-трансаминазы СЭА, были проведены опыты на гомогенатах мозга по изучению влияния ЭА и СЭА на трансаминирование ГАМК. В условиях *in vitro* СЭА полностью подавлял трансаминазную реакцию ГАМК, тогда как ЭА не действовал на нее.

Проведенные исследования показали, что ЭА оказывает выраженное влияние на обмен катехоламинов, но на какое его звено он действует пока остается неясным. Однако отсутствие изменений в концентрации катехоламинов в мозгу и наличие таковых в гипоталамусе свидетельствует, скорее всего, об усилении захвата катехоламинов из крови. Известно, что ГЭБ проницаем для катехоламинов именно в области гипоталамуса [29].

Отсутствие эффекта СЭА в опытах *in vivo* на уровень ГАМК объясняется, по-видимому, недостаточным подавлением ГАМК-трансаминазы мозга. Показано, что уровень ГАМК повышается спустя 4—8 ч после введения СЭА в желудочки мозга, когда подавление активности фермента достигает 60% [16]. Вместе с тем ЭА, и в особенности его сульфат, приводит к снижению концентрации глутамата и соответствующему увеличению аланина, но не аспартата, что свидетельствует об активировании трансаминирования глутамата с пируватом.

Действие ЭА и его производных на уровень катехоламинов и ней-роактивных аминокислот указывает на то, что ЭА может играть опре-деленную роль в регуляции метаболизма и функциональной активнос-ти мозга.

PARTICIPATION OF ETHANOLAMINE AND ITS DERIVATIVES IN THE METABOLISM OF CATECHOLAMINES AND NEUROACTIVE AMINO ACIDS IN RAT BRAIN

KAMALIAN R. G.

Institute of Zootechnics and Veterinary, Yerevan

The concentration of catecholamines, GABA, glutamate, aspartate, alanine and tyrosine has been determined in rat brain after intraperito-Neal infusion of ethanolamine (EA), ethanolamine-O-sulphate (EOS) and N-acetyethanolamine (N-AEA).

The injection of EA causes the increase in the concentration of noradrenaline, adrenaline and normetanephrine in the hypothalamus. EA and EOS decrease glutamate concentration and increase that of alanine. The administration of N-AEA results in the increase of glutamate and in the decrease of tyrosine concentration.

In the brain cortex homogenate the transamination of GABA didn't change in the presence of EA, but was almost completely inhibited by EOS.

However, *in vivo* EA decreases GABA level and N-AEA increa-ses it.

Data obtained it suggest the that effects of EA and its derivatives are realised through the catecholamines and different neuroactive amino acids.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Tallan H. H., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 211, 2, 927—934, 1954.
2. De Ropp R. S., Snedeker E. H. Analytical Biochem., 1, 424—432, 1950.
3. Knauff H. G., Bock F. J. Neurochem., 6, 3, 171—182, 1961.
4. Spanner S., Ansell G. B. J. Neurochem., 30, 2, 497—498, 1978.
5. Kennedy E. P., Weiss S. B. J. Biol. Chem., 222, 193—197, 1957.
6. Schneider W. C., Fiscus W. G., Kawler J. A. B. Analytical Biochem., 14, 1, 121—129, 1966.
7. Ansell G. B., Metcalfe R. F. J. Neurochem., 18, 4, 617—665, 1971.
8. Salerno D. M., Beeler D. A. Biochim. Biophys. Acta, 326, 3, 325—338, 1973.
9. Schuberth J., Spare B., Sundwall A. J. Neurochem., 16, 695—700, 1969.
10. Ansell G. B., Spanner S. Biochem. J., 122, 741—750, 1971.
11. Illingworth D. R., Portman O. W. Biochem. J., 130, 557—567, 1972.
12. Dahlberg L., Schuberth J. J. Neurochem., 29, 5, 933—934, 1977.
13. Geder G., Dahlberg L., Schuberth J. J. Neurochem., 30, 6, 1245—1252, 1978.
14. Reichelt K. L., Wedege E., Kwamme E. J. Neurochem., 18, 2129—2136, 1971.
15. Бунятыя Г. X., Огнесян В. С. Вопросы биохимии мозга, 2, Ереван, Изд-во АН АрмССР, с. 17—28, 1961.
16. Fowler L. J. J. Neurochem., 21, 2, 437—440, 1973.

17. *Loscher W. J.* Neurochem., 36, 4, 1521—1527, 1981.
18. *Fletcher A., Fowler L. J.* Biochem. Pharmacol., 29, 11, 1451—1454, 1980.
19. *Камалян Г. В.* Коламин и его биологическое значение, Ереван, Изд-во МСХ АрмССР, с. 106—110, 1960.
20. *Барсегян Г. В., Галочян А. А.* Вопросы биохимии мозга, 1, Ереван, Изд-во АН АрмССР, с. 151—156, 1964.
21. *Pfaffler C. C., Jenney E. H., Gallagher W. et al.* Science, 126, 610, 1957.
22. *Mc Quillin F. J., Stewart J. J.* Chem. Soc., 2966—2967, 1955.
23. *Lloyd A. G., Tudball N., Dodgson K. S.* Biochim. Biophys. Acta, 52, 3, 413—418 1961.
24. *Матлина Э. Ш., Рахманова Т. Б.*—В кн.: Методы исследования некоторых систем гуморальной регуляции, М., Изд-во I МОЛМИ, с. 136—142, 1967.
25. *Матлина Э. Ш., Щедрина Р. Н., Ширинян Э. А.*—В кн.: Новые методы определения гормонов и др. биол. активн. веществ, М., Изд-во I МОЛМИ, с. 98—103, 1969.
26. *Матлина Э. Ш., Большакова Т. Д., Ширинян Э. А.*—В кн.: Новые методы определения гормонов и др. биол. активн. веществ, М., Изд-во I МОЛМИ, с. 117—125, 1969.
27. *Yessaian N. H., Armenian A. R., Buntatian H. Ch.* J. Neurochem., 16, 1425—1428, 1969.
28. *Starr M. S., Tanner T. J.* Neurochem., 25, 5, 573—577, 1975.
29. *Закусов В. В., Высоцкая Н. Б., Толмачёва Н. С.* Бюл. экспер. биол. и мед., 5, 64—67, 1972.
30. *Камалян Р. Г., Авагимян Э. А., Арванов В. Л., Айрапетян С. Н.* Биол. ж. Армении, 32, 5, 455—459, 1979.

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт

Поступила 25. V 1982

УДК 577.11+612.8.015.547.96+616.011

ДИНАМИКА ПРЕАЛЬБУМИНОВ В МОЗГУ ПРИ ГИПЕРБАРООКСИГЕНАЦИИ

СИНИЧКИН А. А., СТРАДОМСКИЙ Б. В.

При острой форме кислородной интоксикации обнаружены значительные метаболические сдвиги в ткани НС, в том числе в ее белковом обмене [1]. Представляет интерес исследовать преальбумины мозга в связи с их низкой молекулярной массой, высокой анионностью, химической реактивностью, высокой скоростью обмена, проницаемостью через энцефалические барьеры, а также тем, что среди них обнаружены нейроспецифические белки [2]. Ранее были даны биохимическая и иммунохимическая характеристики «крайне кислому» белку мозга крыс [3], который при диск-электрофорезе в ПААГ мигрирует с фронтом «свидетеля» бромтимолового синего (БТС) и обозначен БТС-преальбумином. В настоящей работе приводится количественная характеристика структурной гетерогенности БТС-преальбумина головного мозга крыс и изучено изменение содержания белка в его отдельных компонентах при судорогах животных, вызванных действием 0,7 МПа кислорода.

В опытах использовали белых крыс массой 200—250 г. Контрольную группу животных составляли интактные крысы. Животных подопытной группы подвергали однократным сеансам гипербарооксигенации (ГБО)—0,7 МПа—до развития генерализованных судорог, затем декапитировали, извлекали ткань мозга. Белки экстрагировали водой из расчета 250 мг/мл и подвергали препаративному диск-электрофорезу в 7,5% ПААГ, рН 9,5 [4]. Зону БТС-преальбумина с R_f 1,0 вырезали. Белок из гелей элюировали водой. Структурную гетерогенность белка изучали в диск-электрофорезе в 20% геле, рН 9,5 [4].

Для количественной обработки зонального распределения белковых зон на электрофореграммах проводили их денситометрирование. О содержании белков судили по величинам площадей пиков, которые вычисляли по формуле $I = k \cdot c \cdot a$, где I —площадь под колоколообразной гауссовской кривой пика, c —ордината максимума пика, a —ширина пика на половине его высоты, k —коэффициент гауссовской кривой, равный 1,064. Находили процентное отношение величины площади пика соответствующей зоны белка к величине общей площади пиков [4]. Определя-

ли достоверность количественных изменений содержания белка в зонах [5].

Разделение БТС-преальбумина мозга крыс в диск-электрофорезе в 20% ПААГ свидетельствует о его структурной гетерогенности. На денситограмме выявляли 8 пиков (рисунок, таблица). Основной пик V содержал 49,4% белка. Пики I, II, IV, VI—VIII выявляли в виде небольших пиков, содержание белка в которых колебалось от 6,6 до 12,2%. На диск-электрофореграммах в областях пиков VI и VIII обнаруживали по 2 зоны, близкорасположенные друг к другу. Пик III выявляли в следовых количествах.

Таблица

Распределение содержания белка в % по зонам на денситограмме

Состояние животных	Номера пиков							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Контроль	8,2±1,1	12,2±2,3	следы	5,3±0,5	49,4±1,2	8,1±1,7	6,6±1,1	8,3±1,1
Гипероксия	10,1±2,2	25,5±1,6	следы	2,8±0,6	35,9±1,5	6,7±1,2	6,7±1,0	5,3±1,2
p	>0,1	<0,05	—	<0,05	<0,05	>0,1	>0,1	<0,05

Примечание. В каждую серию опыта брали по 6 крыс

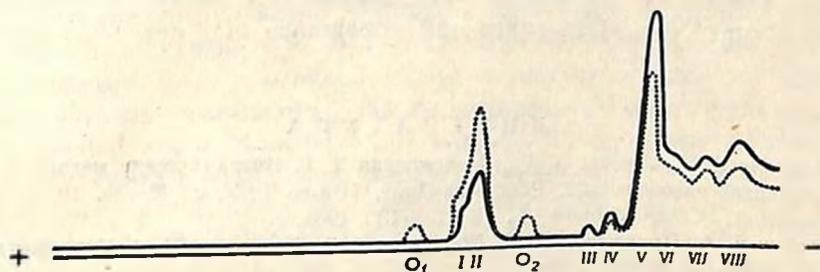


Рис. Схема денситограммы спектра белковых компонентов БТС-преальбумина мозга крыс: — в контроле, при гипербарооксигенации; O₁, O₂, I—VIII—номера пиков

Развитие кислородных судорог у крыс сопровождается количественным перераспределением белковых компонентов БТС-преальбумина мозга крыс. Содержание белка в пике II возрастает вдвое. В пиках IV, V и VIII наблюдали уменьшение содержания белка в 1,9, 1,4 и 1,6 раза соответственно. Показано появление дополнительных зон белков и соответствующих пиков O₁ и O₂, составлявших 2,2; 3,6% белка.

Полученные данные свидетельствуют о значительном количественном перераспределении и качественных изменениях в составе белковых компонентов БТС-преальбумина головного мозга крыс при острой форме кислородной интоксикации. Обнаруженные сдвиги происходят за непродолжительный период времени (25—35 мин) действия кислорода под повышенным давлением. Разнонаправленность изменений мы связываем

ваем с вхождением во фракцию БТС-преальбумина различных по структуре, свойствам, функциям и тканевой специфичности белковых компонентов [3].

Таким образом, преальбумины мозга, в том числе «крайне кислые» белки, принимают большое участие в патохимии острой формы ГБО. Выявленные изменения в количественных и качественных сдвигах преальбуминов в ткани мозга при ГБО необходимо связывать с суммарным результатом действия таких процессов, как протеолиз, диссоциация высокомолекулярных белковых комплексов, кровенаполнение сосудов и капилляров в ткани мозга, проницаемость энцефалических барьеров [1, 6, 7], а также окисление тиоловых групп с образованием дисульфидных связей между отдельными белками [8].

DYNAMICS OF BRAIN PREALBUMINS ON HYPERBARIC OXYGENATION

SINICHKIN A. A., STRADOMSKY B. V.

Chair of Biochemistry, State University, Rostov-on-Don

The dynamics of 8 brain extremely acid prealbumins has been studied by means of electrophoretic technique in rats with pronounced convulsions caused by hyperbaric oxygenation (0,7 MPa). A quantitative redistribution of 4 protein zones and appearance of 2 new ones has been detected.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Броницкая З. Г. Биохимические механизмы кислородной интоксикации, Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, с. 28—33, 1980.
2. Синишкин А. А. Укр. биохим. ж., 58, 121—130, 1981.
3. Синишкин А. А., Прокофьев В. Н., Шерстнев К. Б., Кучеренко Н. А. Укр. биохим. ж., 50, 429—434, 1978.
4. Маурер Г. Диск-электрофорез, М., Мир, 102, с. 58—59, 1971.
5. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика, Минск, Высшая школа, с. 88—91, 1967.
6. Синишкин А. А., Прокофьев В. Н. Бюл. exper. биол., 87, 417—419, 1979.
7. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Чихачев А. С. Изв. Сев.-Кавк. научн. центра высш. школы, 3, 8—13, 1975.
8. Тютюников В. П. Автореф. канд. дис., Ростов, РГУ, с. 3—17, 1964.

Кафедра биохимии
Ростовского государственного
университета

Поступила 8. IV 1982

УДК 612.015.33:576.8.097.32

ГЛУТАМАТ, ГАМК И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ В МОЗГУ СОБАК ПРИ ВНУТРИЦИСТЕРНАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ АНТИТЕЛ К ОСНОВНОМУ БЕЛКУ МИЕЛИНА

МЕНДЖЕРИЦКИИ А. М.

В предыдущих работах было показано изменение метаболизма мозга при действии противомозговых антител и при действии иммуно-*G*-глобулинов (IgG) сыворотки крови, содержащих главным образом антитела к основному белку миеллина (ОБМ) [1, 2], после их внутрицистернального введения. Исследован эффект интравентрикулярного введения антисыворотки к ОБМ на электрогенез коры больших полушарий мозга. Установлено развитие глубокого тормозного состояния с выраженной дельта-активностью. В противоположность этому введение антител к целому мозгу провоцирует эпилептиформные судороги [3, 4].

Для изучения механизма действия антител к ОБМ на функциональное состояние коры больших полушарий исследовали содержание ГАМК, глутамата и активность глутаматдекарбоксилазы в отделах мозга собак после введения им в четвертый желудочек IgG-фракции сыворотки крови, содержащей антитела к ОБМ.

Опыты поставлены на взрослых беспородных собаках массой 10—12 кг, которым в четвертый желудочек вводили IgG, содержащий антитела к ОБМ, по методике, описанной ранее [5]. У животных через 48 ч развивались симптомы, сходные с неврологическими проявлениями экспериментального аллергического энцефаломиелиита (ЭАЭ).

Получение антигена ОБМ, моноспецифической антисыворотки к нему и выделение фракции IgG было изложено ранее [5].

Глутаминовую кислоту и ГАМК определяли в безбелковом экстракте методом электрофореза на бумаге. Активность глутаматдекарбоксилазы (К. Ф. 4. 1. 15) (ГДК) определяли по накоплению ГАМК [6].

В таблице представлены результаты определения содержания глутамата и ГАМК при внутрицистернальном введении IgG в трех отделах мозга собак: коре больших полушарий, белом веществе головного мозга и в спинном мозгу. При введении IgG происходило снижение на 19% уровня глутамата в коре больших полушарий, такой же эффект наблюдался и при развитии ЭАЭ [7]. При ЭАЭ содержание глутамата понижалось также в белом веществе и спинном мозгу. При внутрицистер-

нальном введении достоверного уменьшения концентрации глутамата в этих отделах не отмечалось.

Введение антител к ОБМ приводило к значительному возрастанию содержания ГАМК в мозгу. В коре больших полушарий оно составляло 82, в белом веществе головного мозга—93 и в спинном мозгу—48%.

При ЭАЭ, развитие которого связано с иммунизацией животного гомогенатом мозга и сопровождается судорожной активностью, происходят сдвиги противоположного характера. Во всех перечисленных отделах мозга наблюдается уменьшение концентрации ГАМК [6]

Таблица

Содержание глутамата и ГАМК (в мкмоль/г ткани) и активность ГДК (мкмоль/г ткани/ч) в отделах мозга собак при внутрицистернальном введении антител к ОБМ (n=7)

Исследуемые показатели	Отделы мозга					
	кора больших полушарий		белое вещество головного мозга		спинной мозг	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Глутамат	9,42± 0,52	7,62± 0,62 <0,01	5,74± 0,28	5,48± 0,31 <0,1	3,42± 0,25	3,94± 0,30 <0,1
р						
ГАМК	2,56± 0,06	4,57± 0,10 <0,001	1,40± 0,05	2,71± 0,09 <0,001	1,33± 0,80	1,98± 0,12 <0,001
р						
ГДК	9,00± 0,42	5,69± 0,35 <0,001	4,34± 0,18	2,69± 0,20 <0,01	4,25± 0,13	1,95± 0,10 <0,001
р						

Активность ГДК после внутрицистернального введения антител к ОБМ снижалась на 36—54%, что было особенно выражено в спинном мозгу (таблица).

В литературе в последнее время обсуждается роль ГДК в процессах возбуждения и торможения в связи с регулирующей ею содержания ГАМК и глутамата в цитозоле нейронов [8, 9]. При ЭАЭ ингибирование активности ГДК коррелирует с уменьшением содержания ГАМК [6] и некоторой судорожной активностью мозга [10]. При демиелинизирующих заболеваниях установлено уменьшение уровня пиридоксальфосфата [11], что может лимитировать активность ГДК. Активность ГДК лимитируется содержанием глутамата. В данной серии опытов установлено уменьшение его количества в коре больших полушарий. Снижение содержания глутаминовой кислоты можно объяснить вовлечением ее в другие метаболические пути, и в первую очередь в трансаминирование, энергетический обмен мозга. В то же время образование ГАМК может происходить другими путями, например в ГАМК-шунте.

Таким образом, при внутрицистернальном введении антител к ОБМ наблюдается появление медленноволновой активности, которая свиде-

тельствует о развитии тормозного эффекта в коре больших полушарий. Это согласуется с полученными данными о значительном увеличении содержания ГАМК именно в этом отделе мозга и в меньшей степени в белом веществе и спинном мозгу.

GLUTAMATE, GABA AND GLUTAMATE DECARBOXYLASE ACTIVITY IN DIFFERENT AREAS OF DOG BRAIN ON INTRACYSTERNAL ADMINISTRATION OF ANTIBODIES

MENDZHERITSKY A. M.

State Medical School, Rostov-on-Don

The intracisternal administration of antibodies to myelin basic protein in 48 hours leads to a considerable increase in GABA concentration, which correlates with the delta-activity, developing in cortex after this injection. A decrease in glutamate level and glutamate decarboxylase activity in the cortex has been also found. These results were compared with the dynamics of these processes in animals with experimental allergic encephalomyelitis.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Менджеричкий А. М., Вовченко И. Б., Вилков Г. А., Трапезонцева Р. А.—В кн.: Биохимия животных и человека, 4, Киев, с. 40—47, 1980.
2. Киной Р. И., Менджеричкий А. М., Вилков Г. А. Вопросы мед. химии, 28, 2, 49—52, 1982.
3. Менджеричкий А. М., Буриков А. А., Вилков Г. А. ДАН СССР, 255, 487—489, 1980.
4. Штарк М. Б. Иммунопрофиология, Л., Медицина, с. 174, 1978.
5. Менджеричкий А. М., Вовченко И. Б. Укр. биохим. ж., 50, 586—588, 1978.
6. Менджеричкий А. М., Волчо Л. С., Хоружая Т. А., Вилков Г. А., Трапезонцева Р. А. Известия Сев-Кав. научн. центра, Естеств. науки, 3, 84—88, 1978.
7. Сааков Б., Трапезонцева Р., Менджеричкий А., Вилков Г. Biologia (Bratislava), 27, 9, 693—700, 1972.
8. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
9. Tapia R., Sendoval M. E., Contreras P. J. Neurochem., 24, 1283—1285, 1975.
10. Вилков Г. А. Механизмы аллергической демиелинизации в эксперименте. Автореф. докт. дис., Ростов-на-Дону, 29 с., 1974.
11. Бельман Е. Л., Гордеев Я. Я.—В кн.: Демиелинизирующие заболевания в эксперименте и клинике. Минск, Наука и техника, с. 154—162, 1975.

Ростовский государственный
медицинский институт

Поступила 24. IV 1982

ОБЗОРЫ

УДК 547.963

ОБ ЭФФЕКТАХ НЕЙРОПЕРЕДАТЧИКОВ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
АППАРАТ НЕРВНОЙ ТКАНИ

КОМЕТИАНИ П. А.

В обзоре обобщены данные, полученные при изучении действия нейротрансмиттеров на генетический аппарат. Постулируется, что нейротрансмиттеры активируют процессы, протекающие в ядрах нервных клеток теми же путями, которые были описаны при изучении механизмов их действия на синаптические мембраны, а именно посредством системы сАМР и, возможно, кальций-кальмодулина. Эффекты нейротрансмиттеров на уровне ядра реализуются сАМР-зависимыми и независимыми протектиновыми реакциями. Это находит выражение в фосфорилировании ядерных белков, в том числе ферментов.

Результаты изучения индуктивного синтеза ферментов, с одной стороны, и эффектов нейротрансмиттеров, разыгрывающихся в клеточном ядре, с другой, приводят к заключению о наличии релаксационной связи между реакциями, протекающими в синаптических мембранах, и работой триады ДНК—РНК—белок. Эту связь можно выразить в виде схемы: нейротрансмиттер—синаптическая передача—активирование генетического аппарата—синтез ферментов, регулирующих уровень нейротрансмиттеров.

Данные о том, нейротрансмиттеры стимулируют метаболические процессы, известны давно, но до последнего времени не были изучены механизмы, которыми осуществляется их действие. Большие успехи в изучении характера действия нейротрансмиттеров на уровне синаптических мембран [1, 2] и исследования механизмов, которыми реализуется действие гормонов на генетический аппарат [3, 4], имели важное значение в выяснении характера действия нейротрансмиттеров на процессы, протекающие в клеточном ядре [5].

Нейротрансмиттеры играют роль химического сигнала в объединении нервных клеток в ансамбль. Им приписывается исключительная роль в основных процессах нервной ткани, в реакциях, связанных с синаптической передачей, работой возбудимых мембран. Установлено, что роль химического сигнала нейротрансмиттеры выполняют и в активировании генетического аппарата, которым, со своей стороны, регулируется индуктивный синтез ферментов, определяющих уровень самих нейротрансмиттеров. Таким образом, выясняется характер работы механизма, с помощью которого осуществляется связь синаптической передачи с активностью генетического аппарата.

О механизмах действия нейронепередатчиков на уровне синаптических мембран. Исходя из положения, что нейронепередатчики выполняют роль химического сигнала в регуляции активности нервной клетки, а последняя находится в исключительной зависимости от мембранных процессов, мы можем утверждать, что действие нейронепередатчиков должно найти отражение в поинных сдвигах и изменениях активности мембранных энзимов.

Последнее десятилетие ознаменовалось крупными успехами в изучении молекулярных основ действия нейронепередатчиков. Имеются в виду факты, связанные с реализацией эффектов нейронепередатчиков посредством протенинназных (ПК) реакций и кальций-кальмодулина на мембранные ферментные системы и рецепторные белки [6—11, 24—26]. Аналогичные механизмы используются нейронепередатчиками и в активировании ядерных процессов.

Решающим в изучении роли фосфопротенинов в нервной ткани было установление того факта, что стимулирование реакции фосфорилирования мембранных белков происходит при участии циклических нуклеотидов [12]. При изучении ПК реакций была обнаружена стимуляция нейронепередатчиками активности циклазы, катализирующей образование сАМР [13, 14], что было использовано для обоснования положения о химическом сигнале, который в виде гормона или нейронепередатчика вызывает в эффекторных клетках ответные реакции при участии ПК реакций.

Характер ответных реакций на действие химического сигнала определяется свойствами воспринимающего сигнал рецепторного белка клетки-мишени, а также свойствами белков-модуляторов и ферментов, которые должны фосфорилироваться ПК реакциями в результате усиления продукции циклических нуклеотидов [7, 8, 15] и действия кальмодулина [31, 32].

Роль циклических нуклеотидов в ПК реакциях, как выясняется, не является универсальной. Фосфорилирование может осуществляться и независимыми от циклических нуклеотидов ПК. Причем эффекты нейронепередатчиков не во всех случаях сопровождаются фосфорилированием белков [16, 17], что свидетельствует о том, что в эффектах нейронепередатчиков принимают участие и другие механизмы [18], но их регуляция окончательно не выяснена [19].

Катионными АТР-азами поддерживаются градиенты концентрации протонов, ионов кальция, натрия, калия. Ими в основном определяется функциональное состояние нервной клетки, адекватным выражением которого является биоэлектрическая импульсация. Все те агенты, в том числе и нейронепередатчики, эффект которых обнаруживается в сдвигах функционального состояния клетки, должны действовать на катионные АТР-азы. В отношении протонных АТР-аз мы пока сведениями не располагаем. О других АТР-азах имеются данные, указывающие на то, что их взаимоотношение с нейронепередатчиками имеет сложный, до конца не выясненный характер. Характерен, например, такой факт, что ней-

ропередатчики при их непосредственном воздействии на Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазу никаких сдвигов в активности фермента не вызывают [20, 21]. Установлено, что в нервной ткани так же, как и в мышечной, представлены такие белки, фосфорилирование которых без участия сАМР усиливает транспорт Ca^{2+} [17, 22].

Исходя из того, что фосфорилирование белка-модулятора Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы является обязательным звеном в проявлении активности этого фермента, и имея в виду участие ПК реакций в реализации эффектов нейропередатчиков, ставится под вопрос утверждение о том, что нейропередатчики не влияют на Mg^{2+} -зависимую Na^+ , K^+ -АТФазу. Это противоречие было объяснено опытами, показывающими, что в процесс высвобождения иммобилизованного кальция включаются как АТФ, так и нейропередатчики. Величина захвата Ca^{2+} микросомной фракцией находится в зависимости от АТФ, и этот захват в присутствии 0,5 мМ норадреналина снижается на 60%. Дофамин снижает захват Ca^{2+} на 45, а серотонин — на 52%. С повышением концентрации биогенных аминов проявляется тенденция снижения их отрицательного эффекта, и они могут оказывать даже положительное действие на захват Ca^{2+} [72].

Таким образом, биогенные амины, не влияя непосредственно на активность Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы, могут снизить иммобилизацию Ca^{2+} и этим облегчить их доступ к ферменту. Это достигается исключением положительного действия АТФ на захват Ca^{2+} [17].

Более сложные взаимоотношения обнаруживаются между нейропередатчиком и Na^+ , K^+ -АТФазой. Было показано, что все нейропередатчики вызывают сдвиги в активности фермента, которые в зависимости от концентрации нейропередатчика, а также других условий опыта, бывают неравнозначны. Они могут быть вызваны тремя причинами. Первая обусловлена локальным перераспределением Ca^{2+} в мембране под действием нейропередатчика. Вторая связана с изменениями самой Na^+ , K^+ -АТФазы после непосредственного воздействия на нее нейропередатчика. Третья мотивирована активированием циклазы и ПК реакций.

Ca^{2+} ингибирует Na^+ , K^+ -АТФазу. В присутствии ЭДТА положительный эффект биогенных аминов на активность фермента усиливается. Отсюда можно заключить, что объяснение первой причины нужно искать в устранении высвобождающегося во время раздражения иммобилизованного кальция. Вторая причина взаимодействия нейропередатчика с Na^+ , K^+ -АТФазой выяснена на примере того эффекта, который оказывает ацетилхолин на активность фермента. Показано, что ацетилхолин вызывает деполяризацию мембран торможением натриевого насоса при таком соотношении Na^+ к K^+ , когда активность фермента максимальна [23]. Третий путь взаимодействия нейропередатчика с Na^+ , K^+ -АТФазой связан с теми процессами, которые происходят в мембране в результате фосфорилирования белка-модулятора, катализируемого ПК.

Исключительное значение Ca^{2+} в регуляции внутриклеточных процессов известно давно. Полученные в последнее время данные привлекают внимание в связи с выяснением молекулярных механизмов взаимоотношения биохимических превращений с функцией нервной клетки [24—28]. Крупным успехом в изучении роли Ca^{2+} можно считать идентификацию кальций-рецепторного белка, названного кальмодулином. Ионам кальция, иммобилизированным кальмодулином, приписывают роль второго химического сигнала в активации ряда ферментных систем, играющих ведущую роль в функциональной активности нервной клетки. Кальмодулин представлен во всех тканях животных и растительных организмов, но в наибольшем количестве он содержится в нервной ткани (5—50 мг%). Кальмодулин принимает участие в активации циклазы, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы, ПК, триптофан- и тирозингидроксилаз [26, 29—33]. Действие кальмодулина ассоциируется с белками, модулирующими процессы митоза и генной экспрессии [34, 35].

Пока до конца не выясненным остается молекулярный механизм действия кальмодулина, но не вызывает сомнения его роль в регуляции аденилатциклазной системы и ПК реакций.

Ферментативный распад АТФ, который связан с образованием сАМР, находится под контролем кальций-кальмодулина. Последний принимает участие в регуляции и сократительной и плазматической Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы. Биоэлектрический стимул вызывает торможение активности плазматической Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы, и Ca^{2+} устремляется из внешней среды в клетку путем диффузии. Здесь он связывается со своим рецепторным белком—кальмодулином. Образовавшийся комплекс взаимодействует с рядом мембранных белков и ферментов. Важную роль в транспорте Ca^{2+} внутрь синапсов играет протени I, являющийся модулятором синаптической передачи [36], фосфорилирование которого осуществляется под влиянием сАМР-зависимой и кальмодулин-зависимой ПК.

Большая часть кальмодулин-зависимых ПК представлена в синапсах. В каком взаимоотношении они находятся с ПК, активируемыми сАМР, остается пока не ясным. Но необходимо учесть, что кальций-кальмодулин наряду с сАМР играет роль второго посредника, при участии которого в ряде случаев реализуются эффекты нейронервоточников.

Индуктивный синтез ферментов, регулирующих уровень нейротрансмиттеров в нервной ткани. Общеизвестным является положение о том, что генетический аппарат принимает участие в функциональной активности нервной клетки, обеспечивая пластическим материалом структуры, ответственные за выполнение функции. Но остается открытым вопрос, каким путем активируется генетический аппарат и как реализуется закодированная в нем информация в процессе функциональной активности НС. Первые указания о путях активирования генетического аппарата были получены в опытах, в которых изучались изменения в голов-

ном мозгу активности ферментов, регулирующих уровень нейротрансмиттеров в процессе тренировки и обучения.

Важное значение в изучении участия генетического аппарата в явлениях памяти имели исследования, которыми было установлено, что при резких изменениях соотношения содержания ацетилхолина и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) ухудшается межнейронная передача, возрастает порог возбудимости, удлиняется латентный период условных рефлексов и угасает ряд выработанных двигательных реакций [37]. Увеличение АХЭ активности ассоциируется с улучшением памяти. Способные к обучению крысы характеризовались более высокой АХЭ активностью ткани мозга, чем крысы линии «малоспособных» [38].

Обучение и тренировка крыс сопровождалось увеличением АХЭ активности, которое носило специфический характер. Показано, что в процессе обучения крыс доставать пищу непредпочитаемой лапой, активность АХЭ возрастает также в контралатеральной по отношению к «работающей» лапе зоне двигательной коры [39].

АХЭ является ключевым ферментом в холинергических нейронах. Стимуляция ее активности должна быть обусловлена усилением продукции ацетилхолина (субстрата) и вовлечением генетического аппарата в индуктивный синтез фермента.

В настоящее время мы располагаем только косвенными доказательствами активирования ацетилхолином генетического аппарата. Установлено, что ацетилхолин усиливает продукцию cGMP, а последняя путем стимулирования ПК реакций принимает участие в регуляции генной экспрессии хроматина [7]. Имеются и более ранние сведения об усилении биосинтеза РНК ацетилхолином [40]. Связь индукции ферментов со стимулированием работы генетического аппарата была показана в исследованиях синаптической регуляции синтеза ферментов, определяющих уровень биогенных аминов в нервной клетке, в группе которых оказались тирозин- и триптофангидроксилазы [41]. Эти данные доказывают высказанные ранее предположения [42] о том, что нейротрансмиттеры выполняют не только медиаторную функцию в синапсах, но и регулируют работу генетического аппарата [40, 43].

Стимулирующее влияние ацетилхолина на генетический аппарат проявляется и в изменениях активности тех ферментов, которые участвуют в синтезе катехоламинов. Было показано, что индуктивный синтез тирозин β -гидроксилазы и дофамин β -гидроксилазы происходит в процессе деполяризации симпатического ганглия в результате раздражения холинергического нерва [41]. Важно отметить, что селективно усиливается индукция вышеупомянутых ферментов и не затрагивается активность других, также регулирующих уровень биогенных аминов.

Таким образом, изучение индуктивного синтеза ферментов, определяющих уровень нейротрансмиттеров, выявляет пути, благодаря ко-

торым генетический аппарат вовлекается в активность нервной клетки. В индуктивном синтезе ферментов принимают участие и циклические нуклеотиды. Это говорит о том, что в роли посредника в эффектах нейрорепердатчиков на генетический аппарат выступают циклические нуклеотиды и, возможно, кальций-кальмодулин.

Влияние нагрузки животных свободными аминокислотами на активность генетического аппарата. Исследования показали, что продолжительная нагрузка крыс малыми дозами аминокислот (по 125 мг на 1 кг массы) в продолжение 45 дней в определенном сочетании вызывает в головном мозгу закономерные сдвиги в распределении аминокислот, биогенных аминов, циклических нуклеотидов и активности ферментов, регулирующих их уровень, что находит отражение в функциональной активности головного мозга [50].

В литературе имеются указания на то, что сдвиги свободных аминокислот в тканях животных могут влиять на активность генетического аппарата [44—49]. Односторонняя перегрузка пищевого рациона свободными аминокислотами вызывает дисбаланс азотистого обмена, поэтому одновременно с аминокислотами в рацион добавляли кофакторы их обмена в виде витаминов (рибофлавин, тиамин, никотинамид, пантотенат кальция и пиридоксин) [50].

Было изучено изменение в распределении всех аминокислот и биогенных аминов (катехоламинов и серотонина) в мозговой ткани. Установлено, что при введении животным смеси глутамата и метномина наблюдается закономерный прирост всех аминокислот и в наибольшей степени метномина, лизина и глутамина. При этом имеют значение не изменения в распределении аминокислот вообще, а сдвиги в соотношении между аминокислотами, играющими роль нейрорепердатчиков (глутамат, аспартат, ГАМК и глицин). В опытах с нагрузкой смесью глутамата и метномина в головном мозгу значительно увеличивается соотношение глутамата и аспартата к сумме глицина и ГАМК, что свидетельствует об увеличении соотношения возбуждающих нейрорепердатчиков к тормозным и должно найти отражение в функциональной активности головного мозга.

Другой факт, который должен иметь не меньшее значение, чем изменение в распределении свободных аминокислот в головном мозгу после нагрузки животных смесью глутамата и метномина, связан с изменением содержания и распределения биогенных аминов. Было установлено, что вышеуказанная смесь вызывает неравнозначный прирост содержания биогенных аминов, который выражается в заметном снижении соотношения норадреналина к серотонину.

Увеличение соотношения возбуждающих аминокислот к тормозящим, с одной стороны, и снижение соотношения норадреналина к серотонину, с другой, находит выражение в улучшении функционального состояния головного мозга. Специальными исследованиями было установлено, что условнорефлекторная память, изученная методом проб и ошибок при обучении крыс в Т-образном лабиринте, улучшалась. Под-

опытные крысы допускали меньше ошибок по сравнению с контрольными в решении лабиринтных задач [50].

Продолжительная нагрузка крыс малыми дозами лизина также вызывала закономерные сдвиги в распределении как свободных аминокислот, так и биогенных аминов. Аналогично смеси глутамата и метионина это выражалось в увеличении соотношения возбуждающих аминокислот к тормозным. Но соотношение норадреналина к серотонину не уменьшалось, а, напротив, увеличивалось. Эти неравнозначные сдвиги нашли другое выражение в изменении активности головного мозга по сравнению с тем, что наблюдалось в опытах нагрузки смесью глутамата и метионина [51, 52].

Так как нагрузки животных аминокислотами вызывают значительные сдвиги в распределении биогенных аминов и, имея в виду, что эффекты биогенных аминов на функциональное состояние реализуются при участии циклических нуклеотидов, возникла необходимость выяснить, какое действие оказывает нагрузка аминокислот на содержание сАМР. Проведенные исследования показали, что нагрузка животных смесью глутамата и метионина, а также лизином увеличивает продукцию сАМР.

В другой серии опытов были изучены эффекты введения в пищевой рацион крыс тирозина и триптофана. Эти аминокислоты используются как предшественники биосинтеза катехол- и индоламинов. Поэтому нагрузка тирозином и триптофаном должна вызывать значительные сдвиги в распределении как аминокислот, так и биогенных аминов. Под влиянием тирозина, и в особенности триптофана, значительно снижается соотношение аминокислот к сумме глицина и ГАМК, а изменение распределения биогенных аминов выражается в более значительном увеличении содержания дофамина. Характерным как для тирозина, так и триптофана является уменьшение продукции сАМР. Сдвиги в распределении аминокислот и биогенных аминов, вызванные тирозином и триптофаном, находят выражение в ухудшении условнорефлекторной памяти. В снижении продукции сАМР следует, вероятно, искать причину нарушения синаптической передачи и работы генетического аппарата.

Эффекты нейронных передатчиков на синтез РНК в опытах in vitro и in vivo. В литературе есть указания на то, что в ответ на действие катехоламинов усиливается биосинтез РНК [53—55], а для активирования рибосом требуются белки-факторы инициации [56]. Кроме того, имеется много данных, свидетельствующих о том, что для нормального течения процессов трансляции требуется фосфорилирование белков и модуляторов, связанных непосредственно с рибонуклеотидами. Активация как белков-иницирующих факторов, так и рибонуклеопротеидов происходит путем их фосфорилирования зависимыми и независимыми от циклических нуклеотидов ПК [57].

Исходя из положения, что в стимулировании процессов трансляции принимают участие ПК, а активность последних регулируется

нейропередатчиками, была поставлена задача изучить эффект нейропередатчиков на содержание РНК в нервных клетках, для чего были предприняты опыты, в которых исследовалось изменение содержания РНК после введения биогенных аминов.

Было показано, что интравентрикулярное или интракраниальное введение крысам норадреналина (20 мкг) вызывает заметный прирост содержания ядрышковой РНК в гипоталамусе и гиппокампе. Сдвиги в остальных фракциях РНК или не обнаруживались, или оказались незначительными. Важность этого факта заключается в том, что именно этой фракцией РНК определяется скорость продукции белка в клетке [58].

Адреналин оказывает неравнозначный эффект в разных структурах головного мозга. Изменения в содержании РНК оказались неодинаковыми как в разных структурах, так и в отношении разных РНК [59]. Серотонин в аналогичных условиях введения оказывал достоверное снижение содержания РНК, синтез которой усиливался в таких условиях опыта, когда уровень серотонина снижался под влиянием нагрузки организма ингибиторами его синтеза. Этот факт указывает на изменение при этом соотношения нейропередатчиков.

С целью выявления путей, посредством которых реализуются эффекты нейропередатчиков на биосинтез РНК, были поставлены эксперименты с использованием сАМР и его деривата — дибутирил сАМР. Был применен метод аппликации растворов нейропередатчиков и препаратов АМР на мозжечок при экспозиции 10—30 мин и выяснено, что норадреналин вызывает прирост ядрышковой РНК в клетках Пуркинье, а аппликация ГАМК — только карноплазматической РНК. сАМР и ее дибутирил-дериват достоверно увеличивает только карноплазматическую РНК. Этот эффект циклического нуклеотида усиливается в присутствии теофиллина — ингибитора фосфодиэстеразы [60].

В опытах с интракраниальным введением или аппликацией растворов нейропередатчиков выясняется, что они вызывают сдвиги в содержании РНК в нервных клетках, используя систему сАМР. Причину неоднозначных ответов нужно искать в побочных явлениях, сопровождающих реакцию действия нейропередатчиков, и специфике клеточных мишеней.

То, что нейропередатчики реализуют свой эффект на биосинтез РНК в нервной ткани посредством сАМР, было установлено также при исследовании РНК-синтезирующей способности изолированных клеточных ядер.

Крысам предварительно в третий желудочек вводили нейропередатчик (20 мкг адреналина или норадреналина). Спустя 1 ч животных декапитуировали, выделяли клеточные ядра и определяли в них активность двух форм РНК-полимеразы. Адреналин при 1-часовой экспозиции приводил к значительному повышению полимеразной активности. Норадреналин в этих условиях опыта не вызывал достоверных изменений и посредством ПК реакции активировал другой фермент хроматина — ДНК-полимеразу, играющую ведущую роль в про-

дессе репликации [62]. Отсюда был сделан вывод, что биогенные амины могут оказывать влияние на матричную и полимеразную активности клеточных ядер и таким образом регулировать уровень РНК в мозгу. К такому же заключению можно прийти на основании данных об изменении уровня РНК в нервных клетках под влиянием психотропных веществ [61].

Антидепрессант, ингибитор МАО—трансамин после подкожного хронического введения стимулировал одновременно содержание биогенных аминов и продукцию сАМР. Эти изменения сопровождались усилением синтеза РНК и, в первую очередь, ядрышковой РНК. При этом активность РНК-полимеразы I увеличивалась на 100%. Амизин и резерпин—представители транквилизаторов, наоборот, снижали активность аденилатциклазы. Продукция сАМР уменьшалась, и одновременно тормозился биосинтез РНК в результате отрицательного влияния этих соединений на полимеразную активность. Важно отметить, что в препаратах клеточных ядер ни одно из взятых для исследования психотропных веществ не оказывало влияния на полимеразную активность, так как для реализации эффектов этих веществ на нее требуется целостность клетки.

Влияние нейротрансмиттеров на активность генетического аппарата путем стимуляции протеинкиназных реакций. Langan был одним из первых, обнаруживших, что сАМР стимулирует фосфорилирование ядерных белков [63]. В дальнейшем было показано, что вместе с увеличением фосфорилирования ядерных белков улучшается способность животных к обучению [64] и высказано предположение, что положительный эффект сАМР на активность генетического аппарата обусловлен дерепрессией ДНК в результате фосфорилирования гистонов, экранирующих ее фрагменты. Мы располагаем данными, доказывающими, что нейротрансмиттеры, как и гормоны вообще, принимают участие в регуляции работы генетического аппарата стимулированием ПК реакций [65—67]. Участие нейротрансмиттеров осуществляется активацией синтеза нуклеиновых кислот, а также процессов транскрипции и трансляции.

Как выясняется, в клеточном ядре представлены сАМР-зависимая и независимая формы ПК. О наличии сАМР-зависимой ПК можно было судить из указания [68] о том, что каталитическая субъединица ПК в присутствии сАМР транслоцируется в ядро, где происходит реассоциация ПК из регуляторной и каталитической субъединицы.

Были предприняты специальные опыты с целью изучения действия нейротрансмиттеров на активность ядерных ПК. Эффекты нейротрансмиттеров изучались при инкубации препаратов фермента в присутствии меченого по терминальному фосфату АТР [69, 70]. В элюатах ферментного препарата после инкубации было обнаружено, что норадреналин усиливает включение метки в три белковых пика, обладающих ПК активностью, и в ядрах клеток нервной ткани активность этих трех форм ПК не зависит от сАМР.

В дальнейшем при изучении свойств вышеуказанных ПК выясни-

лось, что одна из них является, по-видимому, ДНК-зависимой полимеразой. Если ядерный экстракт инкубировать с ^3H сАМР и фракционировать на сефадексе G-200, в элюате появляется новый пик белка, с которым связана меченая сАМР, но не обладающий активностью ПК. По своим свойствам этот белок идентифицируется как регуляторная субъединица сАМР-зависимой ПК.

Исследование эффекта норадреналина на активность ядерных ПК показало, что этот нейротрансмиттер усиливает активность той ПК, которая не стимулируется сАМР. Сложнее обстоит дело с регуляторной субъединицей ПК, представленной в ядерном экстракте, так как усиление активности одной из ядерных ПК обусловлено транслокацией каталитической субъединицы из цитозоля. Вместе с тем выясняется, что активность этой ПК в присутствии норадреналина в цитозоле не увеличивается, а снижается. Активность восстанавливается после реассоциации ее регуляторной субъединицы с каталитической.

То, что нейротрансмиттеры могут действовать на ядерные процессы посредством ПК реакций, доказывается также опытами, в которых изучались сдвиги в активности фермента в присутствии соединений, изменяющих уровень сАМР, оказывая действие на активность аденилциклазы и фосфодиэстеразы. Полученные данные выявили, что все те нейротропные соединения, которые увеличивают уровень биогенных аминов (ингибиторы МАО), стимулируют ПК реакции, а транквилизаторы (аминазин и резерпин) подавляют их, трентал-ингибитор фосфодиэстеразы и ряд аналогов сАМР стимулируют активность ядерных ПК в 5—10 раз [71].

Подытоживая сказанное об эффектах нейротрансмиттеров на процессы, протекающие в ядрах нервных клеток, необходимо отметить, что они реализуются тем же путем, который был описан при изучении механизмов их действия на синаптические мембраны, то есть посредством циклических нуклеотидов.

EFFECTS OF NEUROTRANSMITTERS ON THE NERVOUS TISSUE GENETIC APPARATUS

KOMETIANI P. A.

Institute of Physiology, Georgian SSR Academy of Sciences, Tbilisi

The present review deals with the effect of neurotransmitters on the genetic apparatus. It is postulated that neurotransmitters activate the processes in the nervous cells nuclei in the same way as it has been described for synaptic membranes, namely by means of сАМР and calmodulin. Data on the phosphorylation of the nuclear proteins including enzymes present good evidence for this idea.

The study of the inductive synthesis of the enzymes stimulated by the membrane processes and the effect of neurotransmitters on the events in the cell nuclei allow us to conclude that there is a reciprocal relationship between the reactions in the synaptic membrane and the activity

of the triad DNA—RNA—protein. This interrelationship may be expressed by the following scheme: neurotransmitter-synaptic transmission-activation of the genetic apparatus-synthesis of the enzymes regulating the level of neurotransmitters.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *McIlwain H.* Progress in Neurobiology, 11, 189—204, 1978.
2. *Osborne N. N.* Neuroch. Intern., 1, 1—16, 1981.
3. *Campbell P. N., Craig R. K.* FEBS Lett., 99, 223—237, 1979.
4. *Fain J. N.*—In: Receptors a. Recognition. Ser. A. (Ed-s: P. Cuatrecasas a. M. F. Greaves), London. Chapman a. Hall. 6, 3—61, 1978.
5. *Sonnerberg M., Schneider A. S., Kettering S.*—In: Receptors a. Recognition. Ser. A. (Ed-s: P. Cuatrecasas a. M. F. Greaves). London. Chapman a. Hall. 4, 1—74, 1977.
6. *Rodnight R.*—In: Synaptic Constituents in Health a. Disease., Proc. 3 rd Meet. Europ. Soc. Neuroch. (Ed. M. Brsin et al.). Ljubljana-Oxford. 81—96, 1980.
7. *Greengard P.*—In: Cyclic nucleotides, phosphorylated proteins and neuronal functions. Raven Press, N.-Y., 1978.
8. *Weller M.* (Ed.) Protein phosphorylation. Acad. Press, London, 1979.
9. *Розанов С. Н., Янюшина Г. В.* Успехи совр. биол., 87, 404—408, 1979.
10. *Hosey M. M., Tao M.*—In: Current topics in membranes and transport. (Ed-s: F. Bronner a. A. Kleingeller). Acad. Press. N.-Y. 9, 233—320, 1977.
11. *Wilson Y. E.*—In: Biochemistry of brain. (Ed. S. Kumar). Perg. Press, London 523—544, 1980.
12. *Kuo J. F., Greengard P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 1349—1355, 1969.
13. *Reddington M., Rodnight R.* Bioch. J., 126, 14—15, 1972.
14. *Greengard P., McAfee D. A.* British Biochem. Soc. Symp., 36, 87—102, 1972.
15. *Cohen P.*—In: Molecular aspects of cellular regulation. Vol. I. (Ed. P. Cohen) Elsevier, Amsterdam, 1, 1—10, 1980.
16. *Микеладзе Д. Г., Кометиани П. А.* Тез. докл. III советско-шведского симп. «Физико-химическая биология», Тбилиси, 206, 1981.
17. *Микеладзе Д. Г.* Сообщ. АН ГССР, 8, 701—704, 1978.
18. *Nathanson Y. A.* Physiol. Rev., 57, 157—255, 1977.
19. *Williams M., Rodnight R.* Progress in Neurobiol., 8, 183—230, 1977.
20. *Джаришвили Т. И.* Сообщ. АН ГССР, 79, 701—704, 1975.
21. *Kometiani P. A., Kometiani Z. P., Mikeladze D. G.* Progress in Neurobiol., 11, 223—247, 1978.
22. *Козиева Н. В., Микеладзе Д. Г.* Сообщ. АН ГССР, 95, 425—428, 1979.
23. *Kometiani Z. P.*—In: Membrane transport. Progress. (Ed. O. C. Tosteson), Raven Press. N.-Y. 359—369, 1978.
24. *Baker P. P., Reuter H.* Pergamon Press, Oxford, 1975.
25. *Кудинов С. А.*—В сб.: Молекул. биология, 13. Биологические мембраны. (Ред. Г. Х. Мацука). Киев, Наукова Думка, с. 57—74, 1976.
26. *Wolf D. I., Brostrom Ch. O.* Adv. Cycl. Nucleot. Res., 11, 28—88, 1979.
27. *Henkart M.* Feder. Proc., 39, 2776—2794, 1980.
28. *Martonosi A. A.* Feder. Proc., 39, 2401—2454, 1980.
29. *Wang Y. H.*—In: Cyclic 3'5'-nucleotide mechanisms of action. (Ed. H. Cramer a. Y. Schults), J. Willey, London. 37—56, 1977.
30. *Mullins L. I., Brintley F. J.*—In: Calcium binding proteins and calcium function in health and disease. (Ed-s: R. H. Wasserman et al). Elsevier, Amsterdam, p. 87—106, 1977.
31. *Erulkar S. D., Fine A.* Reviews in Neurobiol., 4, 180—232, 1979.
32. *Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. C.* Ann. Rev. Bioch. 49, 487—515, 1980.
33. *Pollard H. B., Pazoles Ch., Creutz P. F., Zimler O.*—In: Neurobiol. cholinerg. a. adrenerg. transmitters. (Ed. H. Basel et al.), 106—116, 1980.

34. *Welsh M. Y., Dedman J. R., Brinkley B. R., Means A. R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 1867—1871, 1978.
35. *Schibeci A., Martonosi A.* Europ. J. Biochem., 113, 5—14, 1971.
36. *Huttner W. B., Greengard P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 5402—5406, 1979.
37. *Deutsch Y. A.*—In: Physiological Basis of Memory. (Ed: Y. A. Deutsch.) Acad. Press, N.-Y., 59—76, 1973.
38. *Bennet E. L., Diamond M. G., Kreck D., Rosenzweig M. R.* Science, 146, 610—612, 1964.
39. *Алексидзе Н. Г., Балавадзе М. В.* ДАН ГССР, 198, 1455—1458, 1971.
40. *Демин Н. Н.* Проблемы нейрохимии. Л., Наука, с. 197—208, 1966.
41. *Thoenen H., Otten U.* Essays in Neurochemistry a. Neurobiology, 1, 73—101, 1977.
42. *Glassman E., Machlus B., Wilson Y. E.*—In: Memory and transfer of information. (Ed: H. P. Zippel), Plenum Press, N.-Y., p. 521—530, 1973.
43. *Gelehrter Th. D.* Metabolism, 22, 85—100, 1973.
44. *Castells S., Zischka R. Z., Addo N.* Pediatr. Res., 5, 329—334, 1971.
45. *Clemens M. Y.* Proc. Nutr. Soc., 31, 273—279, 1972.
46. *Garlick P. Y., Millward D.* Proc. Nutr. Soc. 31, 249—255, 1972.
47. *Roberts S.*—In: Aromatic amino acids in the brain cell. (Ed. H. Basel et al.), Foundation Symp. 22, 299—321, 1973.
48. *Balley R. P., Vrooman Y., Sawat Yasuko, Tsukada Kingi, Short Y., Lieberman Y.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3201—3205, 1976.
49. *Wannenmacher R. W.* Proc. Nutr. Soc., 31, 281—290, 1972.
50. *Кометиани П. А.*—В сб.: Механизмы модуляции памяти. (Ред. Н. П. Бехтерева), Наука, с. 144—157, 1976.
51. *Ментешаивили Н. П.* Укр. биохим. ж., 51, 267—269, 1979.
52. *Ментешаивили Н. П.* Сообщ. АН ГССР, 97, 169—172, 1980.
53. *Елаев Н. Р.* ДАН СССР, 216, 452—454, 1974.
54. *Елаев Н. Р.* Цитология, 20, 1173—1178, 1978.
55. *Демин Н. Н., Нечаева Г. А., Рубинская Н. Л.* Вопросы мед. химии, 17, 254—260, 1971.
56. *Thomas A. A. M., Benne R., Voorma H. O.* FEBS Lett., 128, 177—185, 1981.
57. *Leader D. P.*—In: Molecular aspects of cellular regulation. Vol. I. Recently discovered system of enzyme regulation by reversible phosphorylation. (Ed. P. Cohen). Elsevier, Amsterdam, 203—233, 1980.
58. *Казахашвили М. Р., Воронова Н. В.* Сообщ. АН ГССР, 88, 185—188, 1977.
59. *Казахашвили М. Р., Воронова Н. В.* Сообщ. АН ГССР, 92, 445—448, 1978.
60. *Казахашвили М. Р., Воронова Н. В.* Сообщ. АН ГССР, 93, 705—708, 1979.
61. *Ахалкаци Р. Г., Чкония Х. М.* Бюл. экп. биол. мед., 88, 162—163, 1979.
62. *Danase J. M., Engly J. W., Kemp J.* FEBS Lett., 124, 84—88, 1981.
63. *Langan L.* Ann. N. Y., Acad. Sci. 183, 166—180, 1981.
64. *Machlus B., Entling D., Wilson J. E., Glassman E.* Behav. Bioch., 10, 63—73, 1974.
65. *Jungmann R. A., Kranias E. G.* Intern. J. Biochem., 8, 819—830, 1977.
66. *Rosenfeld M. G., Barreux A.* Adv. Cycl. Nucleot. Res., 11, 205—264, 1979.
67. *Campbel P. N., Craig P. K.* FEBS Lett., 99, 223—237, 1979.
68. *Kelly S. L., Corbin J. D., Park C. R.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 72, 1501—1504, 1975.
69. *Фрайкина Т. Я.* Сообщ. АН ГССР, 100, 465—468, 1980.
70. *Фрайкина Т. Я., Микеладзе Д. Г.* Изв. АН ГССР, Сер. Биол., 6, 223—230, 1980.
71. *Хучуа Т. О., Микеладзе Д. Г.* Сообщ. АН ГССР, 96, 457—460, 1979.

Институт физиологии АН ГССР,
Тбилиси

Поступила 5. IV 1982

УДК 577.12+612.82:547.466.3

МЕТАБОЛИЗМ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ГАМК-КОНЬЮГАТОВ И ГАМК-ПРОИЗВОДНЫХ В ЦНС МЛЕКОПИТАЮЩИХ

РОЗАНОВ В. А.

Проанализированы и обобщены данные экспериментальных исследований, посвященных метаболическим превращениям, возможным физиологическим функциям и биохимическим эффектам гомокарнозина, гомоансерина, ГАМК-холина, ГАМК-лизина, гомопантотената, ГАМК-цистатинина, ГОМК, β -окси- γ -аминобутирата, γ -бутиролактона, γ -гуанидинбутирата, интрацеребрального карнитина, α , γ -диаминобутирата и циклических пиррольных производных ГАМК в ЦНС млекопитающих.

В ЦНС млекопитающих обнаружен ряд естественных метаболитов, содержащих ГАМК в виде аминокислотного остатка (ГАМК-конъюгаты), либо представляющих собой химически модифицированную молекулу γ -аминобутирата (ГАМК-производные). В первую группу входят вещества, содержащие неизмененную молекулу ГАМК, соединенную амидной или эфирной связью с другими естественными метаболитами организма. Сюда относятся гомокарнозин, гомоансерин, ГАМК-лизин, ГАМК-холин, гомопантотенат и ГАМК-цистатинин. Вторую группу составляют соединения, построенные на основе молекулы ГАМК путем введения новых функциональных групп или циклизации γ -аминобутирата. Это также естественные метаболиты, как ГОМК, γ -бутиролактон, γ -гуанидинбутират, β -окси- γ -аминобутират, карнитин, α , γ -диаминобутират и производные пиррола.

Подробное описание метаболизма и физиологических функций некоторых из перечисленных выше соединений дано в монографии И. А. Сытинского [1]. В настоящее время в ЦНС млекопитающих открыты новые метаболиты ГАМК, накоплены экспериментальные данные об их обмене и функциях. Некоторые из этих соединений нашли применение как нейротропные фармакоагенты [2, 3]. В последние годы интенсивно развивается такая область нейрофармакологии, как поиск и испытание синтетических ГАМК-подобных соединений, обладающих эффектами ГАМК, влияющих на ее обмен в мозгу или модифицирующих ее нейрофизиологические влияния [4—7]. Подходы к созданию подобных соединений в значительной степени основываются на сведениях о естественных ГАМК-конъюгатах и производных и их физиологической активности.

Гомокарнозин и гомоансерин. Kalyankar, Meister обратили внима-

ние на неспецифичность действия карнозинсинтетазы (КФ 6.3.1.11) из грудной мышцы цыпленка и показали возможность синтеза *in vivo* ряда ГАМК-конъюгатов: ГАМК-гистидина (гомокарнозина), ГАМК-1- и 3-метилгистидина (гомоансерина), ГАМК-лизина, ГАМК-аргинина и ГАМК-орнитина [8]. В связи с этим возникло предположение, что доступность субстрата (β -аланина в мышцах и ГАМК в головном мозгу) определяет состав синтезируемого гистидин-содержащего дипептида в соответствующем органе [9]. Содержание гомокарнозина (мкмоль/кг) в головном мозгу млекопитающих сильно варьирует: минимальное содержание (5,0) отмечается у кошек и собак, затем — крысы (56,0—69,0), обезьяна (83,0), бык (103,0—144,0), кролик (179,0) и человек (153,0—606,0) [1, 10, 11]. У быка, обезьяны и человека содержание гомокарнозина в стволовой части мозга значительно превышает его содержание в мозжечке; в белом веществе головного мозга человека уровень его выше, чем в сером [10, 11], максимальным содержанием гомокарнозина отличались таламус, скорлупа и красное ядро, филогенетически древние отделы мозга характеризуются более высоким содержанием дипептида [11, 12]. С возрастом содержание гомокарнозина в головном мозгу людей повышается [10, 13], а в СМЖ снижается [13]. В течение первых 30-ти суток постнатального периода жизни кролика уровень гомокарнозина в мозгу возрастает в 2,5 раза [14].

Гомокарнозин и гомоансерин близки структурно и функционально, их обмен катализируется одними и теми же ферментами, хотя содержание гомоансерина на порядок ниже, чем гомокарнозина [15]. Из головного мозга крысы выделен фермент, катализирующий образование гомокарнозина и гомоансерина [16], он идентичен L-гистидин- β -аланин-лигазе (КФ 6.3.1.11). Оптимум pH фермента—7,4, он требует АТФ, Mg^{2+} и NAD^+ . В реакции расходуется молекула АТФ с образованием АМР и РР, предполагается существование промежуточного продукта реакции—аминоацил-АМР [16]. В головном мозгу быка этот фермент синтезирует гомоансерин со скоростью порядка 7,5 нмоль/г ткани/ч [16]. Распределение гомокарнозин-карнозинсинтетазной активности в отделах мозга крыс коррелирует с уровнем гомокарнозина [12], реакция синтеза дипептида выявлена как в телах нейронов, так и в глии, митохондриях и цитозоле клеток [17]. В мозгу крыс максимальная активность фермента выявлена в обонятельных луковицах, в цитозоле апикальной части клеток. Он имеет одинаковые величины K_m для ГАМК и β -аланина [18].

Гидролиз гомокарнозина и гомоансерина (как и других дипептидов гистидина) осуществляется неспецифической карнозиной (аминоацил-L-гистидингидролазой, КФ 3.4.13.3). Максимальная ее активность также определяется в обонятельных луковицах, но преимущественно в митохондриях нервных клеток [18]. Карнозиная мозга имеет оптимум pH в пределах 7—8, активируется Ca^{2+} и Mg^{2+} и подавляется хелатирующими соединениями дитиотрептолом и меркаптоэтанолом [19]. Фермент обладает большим сродством к карнозину, чем к гомокарнозину, и обнаружен не только в головном мозгу, но и в других органах и тканях. Как следствие этого парентеральное введение 10 мкмоль/кг карнозина

и гомокарнозина приводит лишь к кратковременному подъему содержания обоих соединений в головном мозгу (через 5 мин после инъекции), затем следует снижение их содержания, более быстрое в случае карнозина [20].

Содержание и обмен гомокарнозина тесно связаны с состоянием азотистого метаболизма нервной ткани и всего организма в целом. Так, при резком ограничении белка в диете (2% казеина, 3—5 месяцев) уровень гистидина и гомокарнозина в головном мозгу возрастал [21], однако гомокарнозин и другие дипептиды гистидина практически исчезали из мозга при кормлении животных пищей, не содержащей последнего [22], их содержание резко менялось при В₁-, В₂-, В₃- и В₆-витаминной недостаточности [23].

При экспериментальной черепно-мозговой травме наблюдается повышение уровня гомокарнозина [24, 25]. При судорожной фазе кислородного отравления отмечается снижение содержания гомокарнозина и ГАМК, торможение карнозинсинтетазной и глутаматдекарбоксилазной активности. Высказывается предположение о вероятной роли снижения уровня гомокарнозина в генезе судорог при гипероксии [12, 14, 26, 27]. Интерес представляют данные о снижении содержания гомокарнозина в СМЖ у больных паркинсонизмом и хореей Гентингтона, тесно связанные с аналогичными изменениями уровня ГАМК [28, 29].

Многие авторы указывают на тесную взаимосвязь метаболизма гомокарнозина и гомоансерина с ГАМК и высказывают предположение о возможной тормозной нейромедиаторной функции этих ГАМК-конъюгатов [2, 10, 17, 21, 26]. Действительно, по многим признакам (неравномерность в распределении по морфо-функциональным образованиям ЦНС, быстрая утилизация в постсинаптических структурах, эволюционные различия концентраций в мозгу) гомокарнозин напоминает ГАМК. Однако прямых доказательств нейромедиаторного эффекта гомокарнозина и гомоансерина нет. Гомокарнозин является неконкурентным ингибитором ГАМК- α -кетоглутаратаминотрансферазы (ГАМК-Т) и глутаматдекарбоксилазы (ГДК)—ферментов ГАМК-шунта [30].

Необходимо учитывать, что в ЦНС наряду с гомокарнозином содержится и карнозин, причем во всех отделах мозга его содержание незначительно по сравнению с гомоаналогом, кроме обонятельных луковиц, где он сильно преобладает [31] и где отмечается высокая активность ферментов его обмена [18]. Полагают, что обонятельные луковицы—уникальное нервное образование, специфическим дипептидом которого является карнозин [32]. В головном мозгу обнаружены также их N-ацетильные производные: N-ацетилгомокарнозин и N-ацетилкарнозин [33].

ГАМК-лизин (α -(γ -аминобутирил)-лизин). В 1969 г. Nakajima с соавт. [34] сообщили об идентификации в головном мозгу кроликов ГАМК-лизина. Этот дипептид, по-видимому, является специфическим для нервной ткани, в других тканях животного организма он не обнару-

жен. Доказано его наличие в головном мозгу крысы, морской свинки, кролика, быка, собаки и человека, у кошки ГАМК-лизина, по-видимому, отсутствует [34, 35]. Существенных различий в его распределении между морфо-функциональными образованиями ЦНС кролика не выявлено [34].

Содержание ГАМК-лизина в головном мозгу примерно на порядок ниже, чем гомокарнозина (у кролика оно составляет 10 мкмоль/кг). Это, вероятно, связано с различиями в скорости синтеза или распада этих дипептидов, поскольку концентрация свободных лизина и гистидина в нервной ткани почти одинакова [33], и уровень соответствующих дипептидов не лимитируется различиями в доступности их компонентов. В мозгу человека содержание ГАМК-лизина выше, чем у низших млекопитающих, оно значительно варьирует в его образованиях и коррелирует с концентрацией гомокарнозина; максимальным содержанием ГАМК-лизина (до 140 мкмоль/кг) отличается черная субстанция, минимальным (40 мкмоль/кг)—хвостатое ядро [11]. С возрастом у людей содержание ГАМК-лизина в головном мозгу повышается, в СМЖ—снижается, что также коррелирует с аналогичными изменениями уровня гомокарнозина [13] и указывает на существование тесной взаимосвязи между ГАМК-лизином и гомокарнозином.

ГАМК-холин. Этому дипептиду присущ широкий спектр физиологических эффектов (ингибирование секреции, антигистаминное влияние), ему приписывается тормозное нейромедиаторное действие [36]. Ингибиторный эффект ГАМК-холина показан в периферической НС ракообразных и ЦНС млекопитающих, в частности, ГАМК-холин оказывал противосудорожное действие по тесту коразоловых судорог и у спонтанно «судорожащих» мышей. В дозах, близких к токсическим, ГАМК-холин вызывал угнетение дыхания, а при непосредственном введении в нейроструктуры мозга—явления, аналогичные интоксикации ацетилхолином [1].

Предполагалось, что именно ГАМК-холин, по конформации соответствующий структуре биккуллина, выступает тормозным нейромедиатором, поскольку для свободной ГАМК более существенным является участие в азотистом метаболизме мозга [37]. Согласно другой точке зрения, фармакологические эффекты ГАМК-холина связаны с холинэргической системой, а не с ГАМК-ергической.

Синтез ГАМК-холина в ткани головного мозга *in vitro* подтвержден опытами с использованием меченых препаратов ГАМК и холина [39] и можно предположить, что его катализирует холин- γ -аминобутирилтрансфераза, аналогичная холин-ацетилтрансферазе (КФ 2.3.1.6). Гидролиз ГАМК-холина осуществляется под действием неспецифической холинэстеразы (КФ 3.1.1.8). В одной из работ, посвященных ГАМК-холину, описан высокочувствительный метод его индикации в ЦНС. Содержание его в коре головного мозга кошки составляет 12,7 мкмоль/кг [40].

Гомопантотеновая кислота (пантоил-ГАМК). Гомопантотеновая кислота (ГПК, α , γ -диокси- β , β -диметил-бутирил- γ -аминобутират)—гомо-

аналог пантотената—естественный метаболит ряда растений и микроорганизмов описана как ковалентно-связанная форма ГАМК [41]. ГПК при парентеральном введении быстро выводится из организма и медленно транспортируется в мозг [42], оказывая ощутимые седативный и противосудорожный эффекты [6], что послужило основанием для ее клинического применения.

В опытах на крысах-биотопнонтах (исключалось возможное влияние микрофлоры кишечника) было обнаружено накопление в головном мозгу пантотенат-подобного соединения после введения [^{14}C] ГАМК. Ингибирование трансаминазного пути утилизации ГАМК в НС приводило к значительному усилению синтеза гомопантотената [43, 44]. Это является прямым доказательством того, что гомопантотенат представляет собой естественный метаболит животного организма. В связи с этим следует ожидать наличия гомопантотенат-синтетазы и гомопантотеназы в ткани мозга аналогично ферментам синтеза и распада пантотената.

ГПК в течение ряда лет является объектом наших исследований. Нами были подтверждены данные о слабой биотрансформации и быстром выведении ГПК из организма и показано, что в первые минуты после подкожного введения эквимолярных доз меченых ГПК и ГАМК метка ГПК значительно преобладает над ГАМК как в крови, так и в головном мозгу [45]. ГПК *in vivo* метаболизируется до $^{14}\text{CO}_2$, а в выделяемой живогными моче среди ряда метаболитов присутствует [^{14}C] ГАМК. Интенсивность катаболизма гомопантотената кальция при его парентеральном введении мышам в дозе 1,5 ммоль/кг массы оценена в пределах 6—8% от введенной дозы за 6 ч [46]. В экспериментах показано, что многократное введение D-гомопантотената кальция в дозе 150 мкмоль/кг массы вызывает торможение ГАМК-шунта в головном мозгу животных, особенно в течение первых часов после последней инъекции [47]. Эти функциональные взаимоотношения между экзогенной ГПК и системой ГАМК имели место (в несколько видоизменном виде) и при экстремальных состояниях организма, в частности при локальном воздействии на область головного мозга γ -лучей [48]. Итогом этих исследований явилось представление о возможной регуляции альтернативных путей окисления α -кетоглутарата в нервной ткани пантотенат-подобными соединениями, в частности гомопантотенатом [49]. Описанные особенности влияния ГПК на систему ГАМК головного мозга подтверждены рядом авторов [50, 51].

ГАМК-цистатинин (ГАМК-серин-гомоцистеин). Ранее сообщалось о существовании взаимосвязи между цистатинином и ГАМК. В головном мозгу кроликов с эпилепсией уровень ГАМК и цистатинина снижался пропорционально [52]. Выявлено, что γ -тиоцианаминномасляная кислота является субстратом пиридоксальзависимой цистатиназы (КФ 4.4.1.1), которая расщепляет ее на α -кетобутират, NH_3 и тиоцианат (аналогично действию на цистатинин) [53]. ГАМК-цистатинин был выделен из головного мозга человека и идентифицирован в 1977 г. [54]. Выявлено, что концентрация этого ГАМК-конъюгата в окисли-

гальной коре, бледном шаре, покрывке, черной субстанции, таламусе, зубчатом ядре составляет 10,0—90,0 мМ, что сравнимо с уровнем ГАМК-лизины. В СМЖ содержится 0,1—0,2 мМ ГАМК-цистатинина. В головном мозгу новорожденных он практически отсутствует, но с возрастом его содержание нарастает. ГАМК-цистатинин не был обнаружен в головном мозгу крыс, кошек и низших обезьян, но найден у бабуинов [54].

ГОМК (γ -оксимасляная кислота) и ГБЛ (γ -бутиролактон). ГОМК является метаболитом ГАМК, предшественником энергетически важных субстратов мозга. ГБЛ образуется из ГОМК, как полагают, в результате процесса лактонизации, осуществляемого специфическим ферментом. Другим вероятным продуктом превращения ГОМК является обнаруженный в организме млекопитающих 1,4-бутандиол, существование которого в ЦНС пока не доказано [1]. Присутствие ГОМК в ЦНС является следствием восстановления образующегося в результате переаминирования из ГАМК янтарного полуальдегида (ЯПА); в гиппокампе, среднем мозгу и мозжечке морских свинок этот процесс происходит интенсивнее, чем в других нейроструктурах [55]. В головном мозгу крыс наибольшая скорость этой реакции выявлена в мозжечке, перегородке мозга и коре больших полушарий, наименьшая—в гипоталамусе и черной субстанции. Реакция восстановления ЯПА наиболее интенсивно происходит в цитозоле в присутствии NADPH_2 [56]. Ранее приводились данные о том, что восстановление ЯПА в ЦНС осуществляется обратимо действующей лактатдегидрогеназой [1]. В последнее время полагают, что эта реакция катализируется по меньшей мере двумя NADP -зависимыми ферментами, отличными от лактат- и алкогольдегидрогеназы [56]. В то же время есть данные, что обратимое превращение $\text{ГОМК} \rightleftharpoons \text{ЯПА}$ катализируется NADP -зависимой алкогольдегидрогеназой с M 31—38 000 дальтон [57]. Природа и специфичность фермента, катализирующего эту реакцию, требуют дальнейшего изучения.

Вероятно, ГАМК превращается в ГОМК с достаточно большой скоростью. Так, в опытах *in vivo* уже через 30 с после введения меченой ГАМК через хронически имплантированный катетер в боковой желудочек мозга обнаруживалось максимальное включение метки в ГОМК. Период обновления ГОМК составляет 26 мин, введение аминооксикукусуной кислоты (ингибитора переаминирования ГАМК) тормозит образование ГОМК из ГАМК [58]. Логическим завершением этих исследований стали работы, продемонстрировавшие включение метки глутамата в ГОМК [59, 60].

Убедительно доказано также обратное превращение ГОМК в ГАМК. При нагрузке ГОМК уровень ГАМК в головном мозгу незначительно, но достоверно возрастал [61], значительная часть радиоактивности ГОМК через 15—180 мин обнаруживалась в составе аминокислот, главным образом, в аланине, глутамате и ГАМК [62]. Эти данные были неоднократно подтверждены [63, 64]. При внутривенном введении меченая ГОМК легко поступает в головной мозг, время полу-

жизни ее составляет 5 мин, метка через 2—3 мин включается в аспарат, через 10 мин—в глутамат и глутамин, медленнее всего—в ГАМК [69]. По всей видимости, превращение ГАМК в ГОМК происходит интенсивнее, чем обратный процесс.

Углеродный скелет как эндогенной, так и экзогенной ГОМК быстро вступает в цикл трикарбоновых кислот на уровне сукцината. При введении крысам в желудочек мозга [$1-^{14}\text{C}$] ГОМК и [$1-^{14}\text{C}$] сукцината включение метки в $^{14}\text{CO}_2$ было практически одинаковым. Предполагается, что превращения ГОМК катализируются в особом, быстро метаболизирующем компартменте головного мозга, сосредоточенном в глимальных клетках и синапсосомах [65]. Получены данные, подтверждающие β -окисление ГОМК, в частности, при нагрузке γ -бутиролактоном в моче людей повышалось содержание 3,4-диоксибутирата [66], однако этот путь, по-видимому, не является основным, как предполагалось ранее [1].

Прямых доказательств лактонизации ГОМК и обратного превращения ГБЛ в ГОМК или в 1,4-бутадиол в ЦНС и сведений о специфических ферментах, катализирующих эти процессы, в литературе нами не обнаружено. Есть данные, что 1,4-бутадиол может в организме крыс превращаться в ГОМК и, следовательно, выполнять роль ее резервной формы [67].

ГОМК обладает выраженным противогипоксическим эффектом, что, вероятно, связано с ее быстрым превращением в ЯПА, а затем в энергично окисляемый сукцинат [1, 3], усилением окислительных процессов [68], активацией утилизации глюкозы мозгом [69] под ее влиянием. ГБЛ в противоположность ГОМК угнетает утилизацию глюкозы тканью мозга и энергообмен в нервной ткани [70].

Седативное, наркотическое и спотворное действия ГОМК и ГБЛ хорошо известны [1—3, 6], они, очевидно, реализуются в силу влияния на дофаминергические нейроны. Согласно многочисленным экспериментальным данным, ГОМК повышает уровень дофамина в стриопаллидарной системе, блокируя высвобождение вновь синтезированного нейромедиатора и замедляя его обмен. Эти эффекты ГОМК коррелируют с ее анестезирующим и седативным действием [71]. Введение ГБЛ в зависимости от дозы, длительности наблюдения, вида животных и последующего отдела ЦНС вызывает как понижение [72], так и повышение [73, 74] уровня дофамина. Необходимо учитывать, что это эффекты экзогенных ГОМК и ГБЛ, применяемых в больших дозах (до 1000 мг/кг массы).

Значительный интерес представляют данные о том, что ГОМК является конкурентным ингибитором ферментов обмена ГАМК-глутамат-декарбоксилазы и ГАМК- α -кетоглутаратаминотрансферазы [75], возможно, с этим также связаны ее эффекты.

γ -Гуанидинмасляная кислота (ГГМК). ГГМК, впервые описанная как продукт окисления аргинина, широко распространена в животном и растительном мире [76, 77], ее содержание в головном мозгу млекопитающих сравнимо с содержанием ГАМК-лизина, ГАМК-цистатицина, но на

порядок меньше содержания гомокарнозина, в частности, в головном мозгу телят, собаки и человека оно составляет 34,0; 55,0 и 34,0—69,0 мкмоль/кг. ГГМК содержится не только в головном мозгу, но и в других органах и тканях [78]. Синтез ГГМК *in vitro* и *in vivo* осуществляется вследствие аргинин: ГАМК-трансаминирования [1, 79], можно предположить, что эту функцию выполняет L-аргинин-ГАМК-амидин-трансфераза, аналогичная L-аргинин-глицин-амидин-трансферазе (КФ 2.1.4.1). Реакции образования ГГМК придается особое значение как вероятному механизму синтеза мочевины в головном мозгу [79]. Активность фермента, расщепляющего ГГМК с выделением мочевины— γ -гуанидинбутират-уреогидролазы или γ -гуанидинбутират-амидногидролазы (КФ 3.5.3.7) в головном мозгу крыс, всего лишь вдвое ниже, чем активность аргиназы (КФ 3.5.3.1); этот фермент сосредоточен в цитоплазматической и синаптической фракциях нервной ткани, активность его в глии выше, чем в телах нейронов [80]. Таким образом, ГГМК является типичным гуанидиновым производным, тесно связанным с обменом аргинина. Выделение этого соединения с мочой (как и других производных гуанидина) усиливается при гипераргининемии детей [81].

Экспериментальные данные свидетельствуют о возможности взаимодействия ГГМК и других ω -гуанидинаминокислот с ГАМК-рецепторами НС [82, 83], в связи с чем они выступают как слабые конкурентные антагонисты ГАМК [84]. ГГМК, по данным рентгеноструктурного анализа, относится к конформационно-лабильным соединениям [85], что хорошо согласуется с приводимыми ранее сведениями о ГГМК как о судорожном агенте, действие которого проявляется при парентеральном и интрацеребральном введениях [1, 2].

β -Окси- γ -аминомасляная кислота (БОГАМК). БОГАМК в ЦНС млекопитающих образуется, по-видимому, в результате β -окисления ГАМК. Предполагается, что γ -аминобутирил-СоА окисляется до β -окси- γ -аминобутирил-СоА, затем аминогруппа переносится на α -кетоглутарат, β -оксибутирил-СоА окисляется дальше обычным путем [1]. БОГАМК может возникать в этой цепи реакций в результате деацилирования.

Имеются сведения о возможности β -окисления ГАМК в головном мозгу. Для этого процесса необходимы АТФ, FAD и P_i . Реакция ускоряется Mg^{2+} , ингибируется Na^+ , NAD^+ и метиленовым синим [86]. Приведены косвенные доказательства образования бутирил-СоА из ГАМК и ГОМК в организме и высказано предположение, что этот процесс имеет большое значение для регуляции метаболизма [87].

Содержание БОГАМК в головном мозгу крысы ($480,0 \pm 20,0$ мкмоль/кг) на порядок ниже, чем содержание ГАМК [88], но примерно в 10 раз выше, чем содержание ГГМК. Для БОГАМК, как и для ГАМК, характерно тормозное влияние на НС [2, 88]. В последнее время однообразие влияния ГАМК и БОГАМК неоднократно была подтверждена [84, 88].

В опытах *in vitro* БОГАМК при добавлении в инкубационную среду стимулировала выход ГАМК из синапсом [89], возможно, это связано с тормозным эффектом БОГАМК, то есть ее действие опосредовано.

Карнитин. Изолированные из головного мозга кротонбетаин и карнитин оказались сильными судорожными агентами [90]. Одновременное существование в головном мозгу γ -бутиробетаина и карнитина дало основание предполагать, что синтез карнитина в нем осуществляется путем метилирования аминогруппы ГАМК с последующим гидроксилированием γ -бутиробетаина [91], не исключено также образование карнитина метилированием аминогруппы БОГАМК [1].

Несмотря на обнаружение в головном мозгу γ -бутиробетаина, карнитина и карнитил-СоА [90], превращение ГАМК в карнитин, в том числе меченой ГАМК, экспериментально не подтвердилось [91]. Основным путем синтеза карнитина является последовательность реакций, включающая метилирование лизинового остатка, входящего в состав белка, с последующим протеолитическим освобождением ω -N-триметиллизина, который расщепляется альдозазой с образованием γ -N-триметилбутирата (γ -бутиробетаина), последний при гидроксилировании превращается в карнитин [92, 93].

Нейротропные эффекты карнитина, вероятнее всего, обусловлены его структурным сходством с ГАМК, так как по происхождению карнитин имеет к ней лишь косвенное отношение.

а. γ -Диаминомасляная кислота (ДАМК) при парентеральном введении проявляет себя как судорожный агент [2]. ДАМК и продукт ее декарбоксилирования 1,3-диаминопропан идентифицированы в головном мозгу быка [94]. ДАМК сильно ингибирует поглощение ГАМК срезами мозга [95] и синапсом [96], усиливает аналогично K^+ выход меченой ГАМК из срезов [97] и синапсом [98], не оказывая существенного влияния на активность ферментов обмена ГАМК [99]. Большинство экспериментальных данных свидетельствуют о том, что ДАМК оказывает ингибирующий эффект на процесс поглощения ГАМК в нейрональных, но не в глимальных структурах [100]. Сама ДАМК ведет себя аналогично ГАМК—активно поглощается срезами головного мозга [101], локализуясь при этом в терминалях [102], а также способна выходить из срезов при смене среды инкубации, что позволяет приписывать ей псевдомедиаторные свойства по отношению к ГАМК [103]. Вероятно, именно конкурентные отношения между ГАМК и ДАМК лежат в основе судорожного действия этого соединения.

Продукты циклизации ГАМК—производные пиррола. До недавнего времени соединения этого типа (пирролины, пирролидины и пирролидоны) исследовались главным образом как синтетические фармакоагенты [3]. Однако имеются сообщения о том, что они являются естественными метаболитами организма млекопитающих. В частности, показано превращение путресцина в печени крысы в Δ' -пирролин, а затем в 2-пирролидон, а также обратное превращение последнего в ГАМК [104]. Другим идентифицированным в ЦНС продуктом циклизации ГАМК яв-

ляется 2-пирролидином. Полагают, что между ГАМК и продуктами ее циклизации, в частности 2-пирролидином, содержание которого в интактном головном мозгу сравнимо с количеством других ГАМК-конъюгатов и производных (42,9 мкмоль/кг), существует равновесие, которое может иметь значение для регуляции уровня ГАМК [105]. В функциональном отношении пиррольные производные ГАМК (2-пирролидон, 1-оксн-3-аминопирролидон-2 и пирацетам) известны как фармакоагенты с тормозным действием, частично имитирующие эффекты ГАМК [3, 6]. Подчеркивается быстрое проникновение этих соединений через ГЭБ и возможное превращение в ГАМК или ГОМК в головном мозгу [5].

Заключение

Известные на сегодняшний день естественные метаболиты ГАМК с точки зрения их структуры, метаболизма и функции были разделены нами на две группы—ГАМК-конъюгаты и ГАМК-производные. В состав ГАМК-конъюгатов ГАМК входит в неизменном виде, а ГАМК-производные представляют собой самостоятельные вещества, построенные на основе ГАМК путем химической модификации ее молекулы. В связи с этим ГАМК-конъюгаты целесообразно рассматривать как резервные формы ГАМК, обладающие физиологической активностью. В отличие от них ГАМК-производные—это, скорее, формы деградации γ -аминобутирата, появляющиеся на путях ее метаболических превращений (например, при включении в цикл Кребса, как ГОМК и ГБЛ, или при β -окислении, как БОГАМК). Следует подчеркнуть, что все ГАМК-конъюгаты в физиологических условиях обладают ГАМК-подобным эффектом, а некоторые из них рассматриваются как вероятные нейромедиаторы (гомокарнозин, ГАМК-холин) [10, 17, 21, 26, 37]. В противоположность этой группе веществ среди ГАМК-производных есть функциональные антагонисты ГАМК—это судорожные агенты ГГМК, ДАМК, карнитин [2,90]. Вероятно, это связано с тем, что ГАМК-конъюгаты, содержащие целую молекулу ГАМК, сохраняют важнейшие функциональные группы («ониевую» и карбонильную), представляющие собой заряженные центры [6, 100], необходимые для взаимодействия с ГАМК-рецептором и, следовательно, для проявления ГАМК-ергической активности. Среди ГАМК-производных лишь БОГАМК содержит эти группы в неизменном виде; ГОМК, ГБЛ действуют опосредованно, через дофаминергические пути, а циклические производные пиррольного типа, по-видимому, разрушаются в мозгу с образованием ГАМК [5].

ГАМК-конъюгаты и ГАМК-производные, очевидно, несут многообразную функциональную нагрузку. Некоторые из них в отличие от ГАМК хорошо проникают через ГЭБ, например, ГОМК, пиррольные производные, в известной степени гомопантотенат [5, 45, 69]. Возможно, синтез этих соединений в экстрацеллюлярных структурах позволяет углеродному скелету ГАМК проникать в мозг с последующим внутри-мозговым образованием молекулы функционально активного нейромедиатора. Особый интерес в этом отношении представляет ГОМК, кото-

рая может образовываться непосредственно в стенке капилляров мозга, обладающих ГАМК-Т-активностью, и гомопантотенат, синтезируемый микрофлорой кишечника. Функция ГАМК-конъюгатов как резервных ковалентно-связанных форм ГАМК подкрепляется тем обстоятельством, что их образование в головном мозгу легко обратимо. Их распад, происходящий интенсивнее, чем синтез [20], осуществляется малоспецифичными гидролазами, что приводит к высвобождению ГАМК. Образование же ГАМК-производных (за исключением ГОМК, ГБЛ, ГГМК и пирролидинов) предусматривает дальнейшее превращение этих соединений по метаболическим путям, уже не связанным с ГАМК. Для них более характерны самостоятельные функции. Так, ГГМК может участвовать в синтезе мочевины в головном мозгу [79], карнитин служит для переноса ацилов через мембраны митохондрий [92], система превращений ЯПА \rightleftharpoons ГОМК выступает в роли буфера, регулирующего соотношение окисленных и восстановленных форм пиридиннуклеотидов [68].

Важной функцией ГАМК-конъюгатов и производных является их влияние на обмен ГАМК и реализацию ее постсинаптических эффектов. Продукты обмена ГАМК служат факторами регуляции ее обмена, что является отражением общей закономерности обмена нейромедиаторов и гормонов [106].

Таким образом, ГАМК-конъюгаты и ГАМК-производные представляют собой две разновидности естественных метаболитов ГАМК, различающихся по происхождению и функциональной активности. Многие стороны их метаболизма, особенно количественные характеристики их синтеза и распада, компартментализация, распределение между нейронами и глией, не до конца выяснены.

METABOLISM AND PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF GABA-DERIVATIVES AND GABA-CONTAINING COMPOUNDS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF MAMMALS

ROZANOV V. A.

State Medical School, Odessa

The experimental data dealing with metabolic conversions, possible physiological functions and biochemical effects of homocarnosine, homoanserine, GABA-choline, GABA-lysine, homopanthotenic acid, GABA-cystathionine, γ -hydroxybutyric acid, β -hydroxy- γ -aminobutyric acid, γ -butyrolactone, γ -guanidinebutyrate, cerebral carnitine, α , γ -diaminobutyric acid and cyclic pyrrol derivatives of GABA in the central nervous system of mammals are reviewed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности центральной нервной системы, Л., Наука, с. 200, 1972.
2. Сытинский И. А. ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 23, 2, 182—192, 1973.
3. Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота—медиатор торможения. Л., Наука, с. 139, 1977.
4. *Kytilsky T. A., Soldatenkov A. T., Lajtha A.* Progr. Neurobiol., 10, 89—133, 1978.
5. Копелевич В. М., Сытинский И. А., Гунар В. Н. Хим.-фарм. ж., 5, 27—39, 1981.
6. Раевский К. С. Фармакол. и токсикол., 5, 517—529, 1981.
7. *Saelens J. K., Vintek F. J.* Ann. Repts. Med. Chem., N. Y., e. a., 13, 31—40, 1978.
8. *Kalyankar G. D., Meister A. J.* Biol. Chem., 234, 3210—3218, 1959.
9. *Abraham D., Pisano J. J., Udenfriend S.* Biochem. Biophys. Acta, 50, 570—572, 1961.
10. *Abraham D., Pisano J. J., Udenfriend S.* Arch. Biochem. Biophys., 99, 210—213, 1962.
11. *Perry T. L., Berry K., Hansen S. et al.* J. Neurochem., 18, 513—519, 1967.
12. Бондаренко Т. И., Калинина Е. И. Укр. биохим. ж., 51, 483—486, 1979.
13. *Regemorter Van N., Marbeus Y., Lowenthal A. et al.* Clin. Chim. Acta, 38, 59—65, 1972.
14. Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г. Укр. биохим. ж., 51, 135—138, 1979.
15. *Nakajima T., Wolfgram F., Clark K. G.* J. Neurochem., 14, 1107—1112, 1967.
16. *Yockey W. C., Marshall F. D.* J. Neurochem., 21, 1429—1445, 1973.
17. *Hg R. H., Marshall F. D., Henn F. A. et al.* J. Neurochem., 28, 449—452, 1977.
18. *Hg R. H., Marshall F. D.* J. Neurochem., 30, 187—190, 1978.
19. *Kunze N., Kleinkauf H., Bauer K.* Biochem. Soc. Trans., 9, 162—168, 1981.
20. *Balگوoy Van J. N. A., Roberts E.* Biochem. Pharmacol., 24, 1421—1425, 1975.
21. *Enwonwu C. O., Worthington B. S.* J. Neurochem., 21, 1045—1052, 1974.
22. *Chung-Hwang E., Khurana H., Fisher H. J.* Neurochem., 26, 1087—1091, 1976.
23. *Tamaki N., Tsunemori F., Wakabayashi W. et al.* Vitamins, 51, 395—399, 1977.
24. Проmysлов М. Ш., Мирзоян Р. А. Вопросы мед. химии, 22, 209—212, 1976.
25. Проmysлов М. Ш., Мирзоян Р. А.—В кн.: Вопросы биохимии мозга, Ереван, АН АрмССР, 11, с. 71—77, 1976.
26. Бондаренко Т. И., Кричевская А. А., Шугалей В. С. Укр. биохим. ж., 50, 573—575, 1978.
27. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Менджеричкая Л. Г. и др.—В кн.: Вопросы биохимии мозга, Ереван, АН АрмССР, 12, с. 51—61, 1977.
28. *Gjessing L. R., Gjesdal P., Dietrichson P. et al.* Eur. Neurol., 12, 33—37, 1974.
29. *Böhlen P., Tell G., Schechter P. J. et al.* Life Sci., 26, 1009—1012, 1980.
30. *Tardy M., Rolland B., Bardakjian J. et al.* Experimentia, 34, 823—824, 1978.
31. *Neldte A., Kandra J.* Brain. Res., 80, 359—364, 1974.
32. *Margolls F. R.* Science, N. Y., 184, 202—211, 1974.
33. *Sobue K., Kontshi H., Nakajima T.* J. Neurochem., 24, 1261—1262, 1975.
34. *Nakajima T., Kakimoto Y., Kumon A. et al.* J. Neurochem., 16, 417—422, 1969.
35. *Perry T., Sander H. D., Hansen S. et al.* J. Neurochem., 19, 2651—2656, 1972.
36. *Kurtaki R., Yakushiji T., Noro T. et al.* Nature, 185, 1336—1337, 1958.
37. *Howells D. J.* J. Pharm. Pharmacol., 23, 794—795, 1971.
38. *Johnston G. A., Curtiss D. R.* J. Pharm. Pharmacol., 24, 251—252, 1972.
39. *Umraih K., Kim Dan-Sook.* Zool. Jahrb. Zool. und Physiol. Tiere, 78, 560—567, 1974.
40. *Lichtstein D., Dobkin J. J.* Neurochem., 30, 1461—1465, 1978.
41. Мойсенок А. Г., Копелевич В. М., Нэразлит М. А. и др. Фармакол. и токсикол., 4, 489—494, 1973.
42. *Nakamura S., Takahashi T., Sato Y.* Vitamins, 45, 193—200, 1972.
43. *Davril M., Biserte G., Boulanger P. C.* r. Acad. Sci., 270, 2460—2461, 1970.

44. Davril M., Biserte G., Boulanger P. *Biochemie*, 53, 419—429, 1971.
45. Розанов В. А., Копелевич В. М., Савицкий И. В., Розанов А. Я. *Укр. биохим. ж.*, 49, 34—38, 1977.
46. Розанов В. А. *Укр. биохим. ж.*, 51, 629—633, 1979.
47. Розанов В. А. *Вопросы мед. химии*, 26, 42—46, 1980.
48. Savičklj J. V., Rozanov V. A. *Radiobiol., Radiother.*, 21, 800—808, 1980.
49. Розанов В. А. Автореф. канд. дис., Киев, с. 20, 1980.
50. Дерофеев Б. С. Автореф. канд. дис., Смоленск, с. 21, 1980.
51. Ковалев Г. Н. Автореф. канд. дис., Москва, с. 24, 1980.
52. Yamamoto T., Mori A., Jinnai D. *J. Biochemistry (Jap.)*, 49, 368—372, 1961.
53. Abe K., Ressler C. *Biochem. Pharmacol.*, 24, 2161—2171, 1975.
54. Perry T. L., Hansen S., Schier G. M. et al. *J. Neurochem.*, 29, 791—795, 1977.
55. Roth R. H. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 3012—3019, 1970.
56. Anderson R. A., Ritzman R. F., Tabakoff B. *J. Neurochem.*, 28, 633—639, 1977.
57. Kaufman E., Nelson T., Goochee C. et al. *J. Neurochem.*, 32, 699—712, 1979.
58. Gold B., Roth R. *J. Neurochem.*, 28, 1069—1073, 1977.
59. Santaniello E., Mangocci A., Tossi L. *Ital. J. Biochem.*, 27, 24—26, 1978.
60. Santaniello E., Mangocci A., Tossi L. *J. Neurochem.*, 31, 1117—1118, 1978.
61. Промыслов М. III., Соловьева Т. В., Соковина Л. М.—В кн.: Тез. докл. 5-й Всесоюзн. конф. по биохимии нервн. системы, Тбилиси с. 59—60, 1968.
62. Feudis de F. V., Collier B. *Experimentia*, 26, 1072—1073, 1970.
63. Stransky Z. *Biologia (CSSR)*, 27, 735—738, 1972.
64. Mohler H., Patel A., Balazs R. *J. Neurochem.*, 27, 253—258, 1976.
65. Doherty G. D., Roth R. *J. Neurochem.*, 30, 1305—1309, 1968.
66. Lee C. R. *Biochem. Med.*, 17, 284—291, 1977.
67. Roth R., Giarmar N. *Biochem. Pharmacol.*, 18, 247—250, 1969.
68. Высоцкая Н. В., Чулика З. Н.—В кн.: Второй Всесоюзн. биохим. съезд. Тез. секционн. сообщ., Ташкент, с. 62—63, 1969.
69. Taberner P. V. *J. Neurochem.*, 20, 669—680, 1973.
70. Wolfson L. J., Sakurada O., Sokoloff L. *J. Neurochem.*, 29, 777—783, 1977.
71. Roth R. H. *Pharm. and Ther.*, 2, 71—88, 1976.
72. Heftl F., Lionhart R., Lichtensteiger W. *Nature*, 263, 341—342, 1976.
73. Glanuzos G., Thornburg G. E., Moore K. E. *Psychopharmacology*, 50, 225—229, 1976.
74. Pencic D., Walters R. J. *Pharm. and Pharmacol.*, 28, 527—530, 1976.
75. Успенский А. Е., Сколдинов А. П., Климко В. Т. *Хим.-фарм. ж.*, 12, 7, 19—27, 1978.
76. Irreverre F., Evans R. L., Hyden A. R. et al. *Nature*, 180, 704—705, 1957.
77. Yamada Y., Hagitwano K., Igushi K. et al. *Phytochemistry*, 14, 582—586, 1975.
78. Mori A., Hiramatsu M., Takahashi K. et al. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 51, 143—144, 1975.
79. Гершеневич З. С., Кричевская А. А., Векслер Я. И. и др.—В кн.: Биохимия и функция нервной системы, Л., Наука, с. 18—32, 1967.
80. Шугалей В. С., Чупич Л. С., Япунжич Н. и др. *Биохимия*, 42, 67—73, 1977.
81. Weichert H., Mortelmans J., Lavinka F. et al. *J. Genet. Hum.*, 24, 61—72, 1976.
82. Takeuchi A., Takeuchi N. *Neuropharmacology*, 14, 627—634, 1975.
83. Takeuchi A., Takeuchi N. *Neuropharmacology*, 14, 635—641, 1975.
84. Constanti A. *J. Physiol. (France)*, 75, 645—649, 1979.
85. Ахрем А. А., Галактионов С. Г., Голубович В. П. *Конформация биогенных аминов*, Минск, Наука и техника, с. 176, 1979.
86. Seo S. *Med. J. Osaka Univ.*, 7, 833—839, 1957.
87. Лабору А. *Регуляция обменных процессов*, М., Медицина, с. 384, 1970.
88. Hayashi T. *J. Physiol.*, 145, 570—578, 1954.
89. Raiteri H., Federico R., Coletti A. et al. *J. Neurochem.*, 24, 1243—1250, 1975.
90. Hoesln E. A., Proulx P. *Nature*, 187, 321—322, 1960.

91. *Lindstedt G., Lindstedt S. J. Biol. Chem., 240, 316—328, 1965.*
92. *Englard S., Carnicero H. H. Arch. Biochem. and Biophys., 190, 361—364, 1978.*
93. *Paik W. K., Nochumson S., Kim S. Trans. Biochem. Sci., 2, 159—161, 1977.*
94. *Nakajima T., Wolfgram F., Clark W. B. J. Neurochem., 14, 1113—1121, 1967.*
95. *Kennedy A. G., Neal M. J. Brit. J. Pharm., 61, 477—478, 1977.*
96. *Feudts De F. V., Ossola L., Elcouby A. et al. Gen. Pharmacol., 10, 423—426, 1979.*
97. *Hammerstadt J. P., Lyttle C. R. J. Neurochem., 24, 399—403, 1976.*
98. *Brennan M. J. D., Cantrill R. C. J. Neurochem., 31, 1339—1341, 1978.*
99. *Schleztger H. M., Applebaum S. W., Bierkt Y. Insect. Biochem., 7, 447—451, 1977.*
100. *Сытинский Н. А. Биохимия, 43, 771—781, 1978.*
101. *Leach M. J., Ridduall D. F., Winkley C. J. Neurochem., 27, 1281—1282, 1976.*
102. *Kelly J. S., Dick F. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. Vol. 40, Cold Spring Harbour, p. 93—106, 1976.*
103. *Wettsch-Dick F., Jessell T. M., Kelly J. S. J. Neurochem., 30, 799—806, 1978.*
104. *Lindgren D. W., Lloyd H. A., Hankins J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 97, 667—672, 1980.*
105. *Callery P. S., Geelhear L. A., Stogniew M. Biochem. Pharmacol., 27, 2061—2063, 1978.*
106. *Утевский А. М.—В кн. Биохимия—медицина (тез. докл. респ. конф.), Одесса, с. 31—33, 1981.*

Одесский государственный
медицинский институт

Поступила 15. III 1982

ХРОНИКА

МЕЖДУНАРОДНОЕ СОБРАНИЕ НЕЙРОХИМИКОВ

В сентябре 1981 года в Англии (г. Ноттингем) состоялось очередное VIII собрание Международного нейрохимического общества, в работе которого участвовало более 900 делегатов из 30 стран мира. Собрание открыл президент Международного нейрохимического общества проф. М. Aprison (США). Председатель местного организационного комитета проф. J. Newthorne (Англия) приветствовал участников и ознакомил их с программой.

Работа этого нейрохимического собрания была организована в виде симпозиальных и секционных заседаний, а также стендовых докладов и бесед за круглым столом. Было представлено 637 докладов и сообщений. Наиболее активными участниками (по количеству докладов) были Англия, США, Франция, Швеция, Италия, Япония, Финляндия, Канада, Нидерланды. Несмотря на то, что в СССР нейрохимические исследования получили большое развитие, на этом собрании было лишь 4 доклада из нашей страны. Можно надеяться, что на следующих международных нейрохимических конференциях будет представлено больше работ, достойно отражающих истинную картину исследований советских нейрохимиков.

Заседания проходили в одном здании, где все залы и коридоры были оснащены телевизионными установками, информирующими о программе и ходе проводимых заседаний во всех залах. В последний день на конференции были заслушаны отчеты руководящих органов общества, избран новый состав президиума общества и Оргкомитет очередного IX собрания Международного нейрохимического общества, которое состоится в июле 1983 г. в Ванкувере (Канада). Президентом Международного нейрохимического общества на новый срок был избран E. Kwamme (Норвегия), секретарем— E. Porcellati (Италия), казначесом— A. Boulton.

Из Советского Союза в Совет общества избран П. А. Кометнани, а в программный комитет— А. А. Галоян.

Кроме основного собрания, которое состоялось в Ноттингеме, были организованы следующие сателлитные симпозиумы:

1. Регенерация нервной системы. (Катания, Италия, 1—5 сентября 1981 г.)
2. Клеточные и молекулярные механизмы созревания (Св. Винсент, Италия, 27—29 августа 1981 г.)
3. Метаболизм фосфолипидов в нервной системе (Бирмингем, Англия, 12—15 сентября 1981 г.)
4. Тиреотропин-рилизинг гормон (Ноттингем, 11—13 сентября 1981 г.)
5. Фармакологические и нейрохимические подходы к мышечной дистрофии (Лондон, 3—5 сентября 1981 г.)

В программу собрания были включены следующие 13 симпозиумов:

1. Новые аспекты рецепторов нейротрансмиттеров (физиологическая регуляция и молекулярная генетика)
2. Иммуногистохимия
3. Миелиногенез
4. Биосинтез и метаболизм нейропептидов
5. Пуриновые производные в нейротрансmissione
6. Аминокислотные трансмисмиттеры и нейрон-глиальные взаимоотношения
7. Перинатальные биохимические изменения и развитие мозга

8. Моноаминоксидаза: клинические и фундаментальные проблемы
9. Взаимоотношение трансмиттеров в базальном ганглии
10. Иммуный ответ к белкам нервной системы при неврологических заболеваниях
11. Визуальная система как нейрохимическая модель
12. Нейрохимические корреляты поведения
13. Наследственные и приобретенные болезни углеводного обмена

На заседаниях за круглым столом и коллоквиумах обсуждались вопросы, относящиеся к нейрофиламентам, нейрохимической роли Ca^{2+} , незаменимым жирным кислотам и простагландинам, механизмам нейротоксических заболеваний, использованию жидкостной хроматографии высокого разрешения в нейрохимии, фосфорилированию протенинов и т. д. Были заслушаны также доклады по биохимии астроглиальных культур, нейрохимическому эффекту этанола на ЦНС, структуре и биохимической организации хромаффинных гранул и т. д.

В данной статье приводятся лишь основные данные по белкам и пептидам, многие из которых были впервые доложены в Ноттингеме.

О. Langley и др. из Страсбургского нейрохимического центра (Франция) изолировали из мозжечка крыс путем обработки тритоном X-100 нерастворимый конканавалин А (КонА)—связывающий гликопротеин и получили иммунную сыворотку против этого белка с М 24 000. Эта сыворотка строго специфично связывается с клетками Пуркинье, что было показано электронномикроскопически с помощью иммунопероксидазной гистохимической методики. Функция этого гликопротеина еще не выяснена.

В. Моогс (США), открывший неспецифический белок S-100, на этом собрании представил данные о его субъединичном строении. Получив этот белок из мозга крупного рогатого скота и других видов животных в индивидуальном виде, автор исследовал его иммуноэлектрофоретическим методом на тритон-мочевина-ПААГ. Ему удалось идентифицировать не менее 7 субъединиц, которые имели размер около 10000 дальтон при хроматографировании на гуанидин-НСI-сефарозе. У различных животных обнаруживается аналогичная картина, но соотношения этих субъединиц у разных животных отличаются.

Тот же автор с сотрудниками выделил из синаптических мембран и из синаптических везикул путем дифференциального центрифугирования гликопротеин, содержащий остатки галактозы или галактозаминна. Мембраны обрабатывали нейраминидазой, которая удаляет концевую сиаловую кислоту и облегчает получение полипептидных фрагментов. Удалось выделить полипептиды с М 66000 (ИЭТ—7,6), 39000 (ИЭТ—7,4—7,81), 27000 (ИЭТ—5,1), 26000 (ИЭТ—8,5) и 48000 (ИЭТ—7,5).

У. Takahashi и К. Sakimure (Япония) выделили из мозга крыс мРНК, кодирующую неспецифический белок 14-3-2, являющийся маркером при изучении процессов клеточной дифференциации в ЦНС. Размер этой РНК 19—20 дальтон. Используя очищенную РНК, им удалось выделить соответствующую ДНК, что дает возможность методом геной инженерии получить белок 14-3-2.

J. Gurd и др. (Канада) идентифицировали КонА-связывающие белки, связанные с мембранами синапсов ЦНС. Эти высокомолекулярные гликопротеины реагируют с несколькими лектинами, в том числе с КонА, WGA (Wheat Germ Agglutinin) и с фукозосвязывающим протенином. Они находятся в ряде регионов мозга, и появление этих белков идет параллельно с развитием процессов синаптогенеза. Манноза, входящая в состав олигосахаридной части гликопротеина, связывается через N-гликозидную связь с аспарагином белковой молекулы. К. Uemura и сопр. (Япония), S. Stein и S. Brostoff (США), М. Kadlubowski и J. Huges (Англия) доложили о структуре и функции белка P2 человека и быка.

Белок P2, содержащий большое количество основных аминокислот, локализуется в миелиновой мембране периферической НС и, возможно, является антигеном, вызывающим аллергические невриты. Однако предыдущие попытки этих авторов вызвать экспериментальный аллергический неврит у морских свинок и кроликов не увенчались успехом. На этом собрании они привели данные о том, что белок P2 быка вы-

зывает аллергический неврит у крыс Lewis-a. Для того, чтобы идентифицировать пептидные участки, ответственные за это действие в протеине P2, K. Uemura и соотр. установили полную аминокислотную последовательность этого белка путем анализа 4 шпаноген-бромидных пептидов и 12 пептидов, полученных путем распада белка протеазой стафилококка V3. Этот белок содержит 131 аминокислотный остаток. Человеческий белок P2 был изучен под влиянием протеазы V8. В этом белке пептид CB2 (93 аминокислотных остатка, 21—113) обладал биологической активностью, вызывая невриты у крыс Lewis-a. Интересно, что если белок P2 кролика смешать с липидами, то он также приобретает способность вызывать невриты у этих крыс. Белок P2 быка, как отмечалось, сам вызывает невриты у этих крыс и может быть более мощным невритогенным фактором, чем P2 кролика.

В 1980 г. W. Gispen и J. Jolles (Нидерланды) вместе с H. Zwiers (Zwiers H. et al., J. Neurochem., 34, 1689—1699) сообщили об очистке и некоторой характеристике Ca^{2+} /кальмодулин чувствительной киназы, связанной с мембранами мозга крыс (70 K, ИЭТ 5,5). На этом собрании они показали, что структурно близкие к АКТГ пептиды оказывают ингибирующее влияние на этот фермент. Был выделен и очищен один из субстратов этого фермента—белок B-50 (ИЭТ—4,5). Иммуноцитохимические исследования показали, что этот белок имеет синаптическую локализацию (скорее всего, находится в пресинаптических мембранах). Белок-ферментный комплекс в растворимой форме обладает свойством фосфорилировать липиды. Экзогенно добавленный к этому комплексу фосфатидилинозитол-4-фосфат (DPI) фосфорилируется, превращаясь в фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (DPI). DPI-киназная активность зависит от фосфорилирования белка B-50. Полагают, что фосфорилирование белка оказывает воздействие на метаболизм полифосфоинозитидов в клеточных мембранах мозга. АКТГ₁₋₂₄ может принимать участие в поведенческих реакциях путем изменения активности DPI-киназы, АКТГ₁₋₂₄ стимулирует образование DPI и ингибирует фосфорилирование белка B-50. Образование фосфатидиловой кислоты также ингибируется под влиянием АКТГ. Белок B-50 наилучшим образом фосфорилируется при наличии Ca^{2+} , в то время как максимальное образование DPI происходит в его отсутствие. Существуют функциональные взаимоотношения между фосфорилированием белка B-50 и метаболизмом мембранных фосфолипидов. Молекулярные механизмы поведенческого воздействия АКТГ-подобных пептидов, по-видимому, реализуются через указанный механизм.

V. Whittaker и соотр. привели данные об очистке и функции сократительного белка—синексина, который был открыт в 1978 г. (Greutz C. F., J. Biol. Chem., 253, 2858—2866). Установлено, что этот белок имеет M 17000, находится в цитоплазме клеток мозгового слоя надпочечников, усиливает Ca^{2+} -вызванную агрегацию мембран хромаффинных гранул и других органелл, содержащих липосомы, но не влияет на агрегацию, вызванную Mg^{2+} .

Используя этот тест, авторы очищали синексин и показали, что очищенный протеин содержит единственную полипептидную цепь с M 47000.

P. Cohen (Франция) из нейрогипофиза быка выделил и идентифицировал белок с M 80 000, содержащий в своей структуре нейрофизин и вазопрессин.

Методами радиоиммунологического анализа и ИЭФ экстрактов нейрогипофиза было показано наличие двух типов высокомолекулярного предшественника: I—с M 17—22000 и II—с M 80000. S. Stein и S. Udenfriend (США) изолировали и охарактеризовали проэнкефалин из мозгового слоя надпочечников быка, с M около 45 000, содержащий 7 повторяющихся участков Met-энкефалина и один—Leu-энкефалина. Интересно, что каждый энкефалиновый участок разделен друг от друга двумя аминокислотами (Arg и Lys). Образование энкефалинов из проэнкефалинов происходит параллельно.

Сходные данные были получены J. Rossier (Франция). Он изолировал из мозгового слоя надпочечников белок с M 50000, содержащий 7 повторяющихся участков Met-энкефалина и один участок Leu-энкефалина. Другие белки, имеющие M 10000—22 000, были изолированы и некоторые из них очищены и получены в гомогенном виде.

Один из них содержит как Leu-, так и Met-энкефалин и является общим предшественником для обеих форм энкефалинов. Таким образом, проформой энкефалинов являются не только β -эндорфин или β -липотропин.

D. Cocchia (Италия) показал наличие белка S-100 в меланоцитах и в клетках Лангенгарса из человеческой кожи. Было показано, что S-100 находится в эпифизе, аденогипофизе и в мозговом слое надпочечников, являясь скорее не специфическим прогормоном нервной системы, а своеобразным маркером нейроэндокриальных клеток.

G. Vincendon и сопр. (Франция) из мозжечка 12-дневной крысы выделили гликопротеин с M 23000. Этот белок специфически локализован в клетках Пуркинье, функция его пока не выяснена.

J. Rehfeld (Дания) показал, что холецистокинин (ХЦК), полипептидный гормон желудочно-кишечного тракта, синтезируется также в различных центральных и периферических нейронах. Полученные данные свидетельствуют о том, что ХЦК действует как нейротрансмиттер. Нейрональный ХЦК синтезируется в различных молекулярных формах: макромолекулярная форма (M 10000), ХЦК-33 (M—4000), ХЦК-12 (M—1600) и ХЦК-8 (M—1150). Была обнаружена также малая форма ХЦК (M 600). Имеется ряд ХЦК-подобных пептидов в НС.

Иммуногистохимическими и радиоиммунологическими методами P. Marley (Англия) показал, что ХЦК-подобные пептиды связываются с определенными нейронами головного и спинного мозга крыс. Наличие ХЦК в телах нейронов гипоталамических магнотеллюлярных ядер, его свойство вызывать секрецию нейрогипофизарных гормонов указывает на роль ХЦК в регуляции нейроэндокринной функции. ХЦК был найден также в мезэнцефальных допаминергических нейронах. ХЦК, по-видимому, играет роль в этиологии паркинсонизма и шизофрении. В спинном мозгу ХЦК найден в популяции первичных афферентных нейронов.

J. Fahrenkrug (Дания) привел данные о том, что вазоактивный кишечный полипептид (VJP—Vasoactive Intestinal Peptide), первоначально в 1970 г. выделенный из кишечника свиней, обнаруживается как в центральной, так и периферической НС и имеет ряд свойств классического нейротрансмиттера. Хотя он обнаружен в большом количестве в коре, гиппокампе, гипоталамусе и других отделах мозга, его роль до сих пор неизвестна. опыты показывают, что VJP оказывает влияние на нервную активность и регулирует секрецию некоторых гипофизарных гормонов. VJP-содержащие клеточные тела и волокна находятся в желудочно-кишечном тракте и VJP-ергических нервных волокнах, иннервирующих кровяные сосуды, гладкую мускулатуру, эпителий и т. д. VJP может выполнять роль трансмиттера, принимая участие в нервной регуляции вазодилатации.

Недавно было показано сосуществование VJP и ацетилхолина в холинергических нейронах, иннервирующих экзокринные железы. A. Cuervo (Англия) доложил о трансмисмиттерной роли вещества P в ЦНС. Были получены данные о наличии вещества P и индоламина в одних и тех же нейронах. VJP и энкефалины были обнаружены в нервных волокнах в симпатических ганглиях как человека, так и крысы и морской свинки.

K. Tatemoto (Швеция) изолировал и охарактеризовал новые нейропептиды и гормоны с использованием химических методов определения. Автору удалось обнаружить 2 новых кишечных пептида, названных им РНД и РУУ, из экстракта кишечника свиньи. РНД содержит 27 аминокислотных остатков и является новым членом семьи глюкагон-секретининов. Он обладает VJP- и секретин-подобным свойством. РУУ содержит 36 аминокислотных остатков и принадлежит к семье панкреатических полипептидов. Этот пептид сильно ингибирует секрецию поджелудочной железы, стимулируемую инфузией VJP у анестезированных кошек. Автор выделил также из мозга свиньи новый пептид, обозначенный им ВРУУ, который всецело относится к структуре РУУ и находится в большом количестве в мозгу (0,1—1,0 мг/кг). Подобно РУУ, ВРУУ ингибирует панкреатическую секрецию у кошек.

Представленные на нейрохимическом собрании доклады убедительно показали, что в настоящее время интенсивно изучаются физико-химические свойства изолированных холино-, адрено- и опиатных рецепторов, выделенных из самых различных отделов

ЦНС. Характерная особенность этих исследований—выделение субъединиц рецепторов, попытка установить первичную структуру и найти структурно-функциональные взаимоотношения рецепторов с ферментами мембран. Так, например, из электрического органа *Torpedo marmorata* выделены ацетилхолиновый рецептор и Na^+ , K^+ -АТРаза, которые, по радиоиммунологическим данным, имеют общие структурные участки в молекуле (L. Elftan и др., Швеция).

Работа VIII Международного нейрохимического собрания показала, что нейрохимия стала одной из фундаментальных биологических наук, играющих важную роль в развитии биологии и медицины. Принципы и методы молекулярной биологии и биоорганической химии прочно вошли в нейрохимию. Вместе с тем многие результаты нейрохимических исследований находят свое широкое применение в медицинской практике.

ГАЛОЯН А. А.

О ЗАСЕДАНИИ СЕКЦИИ НЕЙРОХИМИИ (4—5 октября 1982 г., Махачкала)

4—5 октября 1982 г. состоялось очередное заседание Секции нейрохимии научных советов АН СССР по проблемам биохимии животных и человека и комплексным проблемам физиологии человека и животных.

Заседание было приурочено к проходившему накануне в г. Махачкале Всесоюзному симпозиуму по механизмам пластичности мозга, в работе которого приняли активное участие нейрохимики из различных городов нашей страны. Члены секции ознакомились с работой проблемной лаборатории нейрохимии Дагестанского государственного университета, руководимой проф. Э. З. Эмирбековым, в которой на протяжении многих лет интенсивно изучается метаболизм мозга при гипотермии и зимней спячке, внесли ряд полезных предложений и дали положительную оценку проводимым исследованиям.

Была обсуждена программа IX Всесоюзной нейрохимической конференции, которую намечается провести в октябре 1983 г. в Цахкадзоре. Предполагается включить в нее 6 симпозиальных заседаний, посвященных следующим вопросам: нейроспецифические белки и нейропептиды; нуклеиновые кислоты и нуклеотиды; биохимия мембран нервной ткани; биохимия синапсов и нейромедиаторы; функциональная нейрохимия; биохимия сенсорных процессов.

По каждой из перечисленных тем будет заслушано 3 доклада, примерный перечень которых был утвержден членами секции нейрохимии. На симпозиумах будут представлены также стендовые сообщения. По предложению председателя секции проф. Н. Н. Демнина и акад. Е. М. Крепса, учитывая важность прикладных аспектов нейрохимии, было принято решение *впервые* за время проведения нейрохимических конференций организовать «круглый стол» на тему «Нейрохимия—медицине и сельскому хозяйству».

На пленарном заседании будут представлены доклады, касающиеся липидов как рецепторов нейропептидов, биоактивных нейропептидов и роли кальмодулина в нервной системе.

В секцию нейрохимии поступили предложения от акад. АН СССР П. А. Кометяни о проведении в 1983 году рабочего совещания на тему «Молекулярные основы памяти животных» и проф. А. Ю. Буданцева о созыве совещания, посвященного «Молекулярным механизмам синаптической передачи». Ознакомившись с этими предложениями, секция вынесла решение о целесообразности объединения этих мероприятий с ежегодно проводимыми на базе Института биофизики АН СССР в г. Пушкино-на-Оке совещаниями по механизмам памяти.

Проф. А. Д. Рева информировал членов секции о том, что в июне-июле 1984 г. в Днепропетровске планируется провести конференцию по белкам мозга.

Была заслушана информация проф. Н. Н. Демнина о созыве очередного IX Международного нейрохимического симпозиума в июле 1983 г. в Ванкувере (Канада) и обсужден вопрос о принятии мер по организации делегации и группы научных туристов на этот форум.

Следующее заседание секции нейрохимии, на котором будет обсужден план работы на 1983 г., было решено провести 25—27 января 1983 г. в Москве.

АРУТЮНЯН А. В.

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ СТАТЕЙ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ В ТОМЕ I (1982)

- Абелян Ж. Г. 36 (1)
Аврова Н. Ф. 290 (3)
Азимова А. М. 275 (3)
Азьмуко А. А. 66 (1)
Акопян А. С. 261 (3)
Алексидзе Н. Г. 43 (1)
Априкян Г. В. 261 (3)
Армениян А. Р. 111 (2)
Арутюнян А. В. 287 (3), 425 (4)
Ашмарин И. П. 11, 99 (1)
- Барышников В. А. 249 (3)
Белик Я. В. 43 (1), 303 (3)
Бережной Г. А. 43 (1)
Березняк Ю. Л. 148 (2)
Берман А. Л. 275 (3)
Беседин В. И. 352 (4)
Беспалова Ж. З. 66 (1)
Бресткин А. П. 28 (1)
Броновицкая З. Г. 282 (3)
| Бунятын Г. Х. / 111 (2)
Буснюк М. М. 128 (2)
- Вартамян Г. С. 139 (2)
Виняр Т. Н. 28 (1)
Вольф Г. 75 (1)
Воронова Н. В. 148 (1)
- Галоян А. А. 7, 36 (1), 420 (4)
Генгин М. Т. 118 (2)
Герштейн Л. М. 128 (2)
Гиллемин Р. 324 (4)
Глебов Р. Н. 79 (1), 335 (4)
Голикова Ю. И. 66 (1)
Горошинская Н. А. 282 (3)
Глущенко Т. С. 75 (1)
- Дамбинова С. А. 174 (2), 352 (4)
Дашковская О. П. 361 (4)
Демина М. Н. 174 (2)
Демин Н. Н. 20 (1), 313 (3)
Дмитриев А. Д. 66 (1)
Думлер И. Л. 87 (1)
- Ещенко Н. Д. 200 (2)
- Камалян Р. Г. 383 (4)
Карабухина Е. Г. 282 (3)
Карагезян К. Г. 139 (2)
Кветнянский Р. 221 (3)
Кленикова В. А. 231 (3)
Кобылянский А. Г. 66 (1)
Козлов Н. Б. 269 (3)
Кометнянн П. А. 394 (4)
Кочарян М. Г. 287 (3)
Кравцов Г. М. 375 (4)
Крепс Е. М. 11 (1)
Кричевская А. А. 231, 272 (3)
Крыжаповский Г. Н. 79 (1), 335 (4)
- Лансел Ю. Л. 343 (4)
Лепехин Е. А. 118 (2)
Ломакина Л. В. 231 (3)
Лонатина Н. Г. 237 (3)
Лосева С. П. 231 (3)
- Максимов Г. В. 375 (4)
Манукян К. Г. 51 (1)
Менджеричкий А. М. 391 (4)
Мкртчян Г. А. 243 (3)
- Нечаева Г. А. 237 (3)
Никурадзе В. О. 43 (1)
Новик В. А. 361 (4)
- Орлов С. Н. 375 (4)
- Паносян А. Г. 139 (2)
Паронян Ж. А. 243 (3)
Пащенко А. Е. 166 (2)
Пигарева З. Д. 128 (2)
Покудин Н. И. 375 (4)
Промыслов М. Ш. 261 (3)
Прохорова М. И. 184 (2)
- Рева А. Д. 118 (2)
Ринкен А. А. 343 (4)
Розенгарт В. И. 100 (1)
Розенгарт Е. В. 28 (1)
Ряжский Г. Г. 375 (4)

Саакян С. А. 36 (1)
Сакс Т. Р. 66 (1)
Самовилова Н. Н. 66 (1)
Свердлова Е. А. 375 (4)
Синичкин А. А. 388 (4)
Смирнов А. В. 261 (3)
Срапионян Р. М. 36 (1)
Страдомский Б. В. 388 (4)
Суджан Ц. М. 156 (2)
Срапионян Р. М. 36 (1)

Тайц М. Ю. 368 (4)
Тигранян Р. А. 221 (3)
Трушина Е. Д. 66 (1)
Туманова С. Ю. 184 (2)
Турова Н. Ф. 249 (3)
Туровский В. С. 174 (2)
Гольцова Е. И. 179 (2)
Тягепылд Л. Я. 343 (4)

Фабри Э. П. 166 (2)
Фомиченко В. Г. 361 (4)

Цыхун Г. Ф. 368 (4)

Черкасова Л. С. 361 (4)
Чифликян М. Д. 111 (2)
Чумаченко А. А. 148 (2)

Шаннская А. М. 118 (2)
Шаров А. Н. 269 (2)
Шугалей В. С. 231 (3)

Эмирбеков Э. З. 254 (3)
Этингоф Р. Н. 87 (1)

Ярв Я. Л. 343 (4)
Ярыгин К. Н. 66 (1)

CUMULATED AUTHOR INDEX
(VOLUME I, 1982)

- Abelian J. G. 36 (1)
Akopyan A. S. 261 (3)
Aleksidze N. G. 43 (1)
Aprikian G. V. 261 (3)
Armenian A. R. 111 (2)
Ashmarin I. P. 1, 99 (1)
Avrova N. F. 290 (3)
Azimova A. H. 275 (3)
Azmuko A. A. 66 (1)
- Baryshnikov V. A. 249 (3)
Belik Ya. V. 43 (1), 303 (3)
Berman A. L. 275 (3)
Besedin V. I. 352 (4)
Bespalova I. D. 66 (1)
Berezhnyj H. A. 43 (1)
Bereznick Yu. L. 148 (2)
Brestkin A. P. 28 (1)
Bronovtckaja Z. G. 282 (3)
Buniatian H. Ch. 111 (2)
Busnuk M. M. 128 (2)
- Cherkasova L. S. 361 (4)
Chiflikian M. D. 111 (2)
- Dambinova S. A. 174 (2), 352 (4)
Dashkovskaya O. P. 361 (4)
Demina M. N. 174 (2)
Dmitriev A. D. 66 (1)
Doemin N. N. 20 (1), 313 (3)
Dumler I. L. 87 (1)
- Emirbekov E. Z. 254 (3)
Eschenko N. D. 200 (2)
Etingof R. N. 87 (1)
- Fabri Z. I. 166 (2)
Fomichenko V. G. 361 (4)
- Galoyan A. A. 7, 36 (1), 420 (4)
Gengin M. T. 118 (2)
Gerstein I. M. 128 (2)
Guillemin R. 324 (4)
Glebov R. N. 79 (1), 335 (4)
Golikova U. I. 66 (1)
Goroshinskaja I. A. 282 (3)
Gluschenko T. S. 75 (1)
- Harutjunian A. V. 287 (3), 425 (4)
- Järv J. 343 (4)
- Kamalian R. G. 383 (4)
Karabuhina E. G. 282 (3)
Karaguesian K. G. 139 (2)
Klenikova V. A. 231 (3)
Kobylyansky A. G. 66 (1)
Kochartian M. G. 287 (3)
Kometiani P. A. 334 (4)
Kozlov N. B. 269 (3)
Kravtsov G. M. 375 (4)
Kreps E. M. 11 (1)
Krichevskaja A. A. 231, 272 (3)
Kryzhanovsky G. N. 79 (1), 335 (4)
Kvetnansky R. 221 (3)
- Langel U. 343 (4)
Lepehin E. A. 118 (2)
Lomakina L. V. 231 (3)
Lopatina N. G. 237 (3)
Loseva S. P. 231 (3)
- Maximov G. V. 375 (4)
Manukian K. H. 51 (1)
Mendzheritsky A. M. 391 (4)
Mkrtchian G. A. 243 (3)
- Nechaeva G. A. 237 (3)
Nikuradze V. O. 43 (1)
Novik V. A. 361 (4)
- Orlov S. N. 375 (4)
- Panossian A. G. 139 (2)
Paronian J. A. 243 (3)
Paschenko A. E. 166 (2)
Pigareva Z. D. 128 (2)
Pokudin N. I. 375 (4)
Prokhorova M. I. 184 (2)
Promyslov M. Sh. 261 (3)
- Reva A. D. 118 (2)
Rinken A. 343 (4)
Rlyzhsky G. G. 375 (4)
Rosengart E. V. 28 (1)

Rosengart V. I. 100 (1)

Rozanov V. A. 406 (4)

Sahakian S. A. 36 (1)

Saks T. R. 66 (1)

Samoilova N. N. 66 (1)

Shalinskaya A. M. 118 (2)

Sharov A. H. 269 (3)

Shugaley V. S. 231 (3)

Sinichkin A. A. 388 (4)

Sitinski I. A. 100 (1)

Smirnov A. V. 261 (3)

Srapionian R. M. 36 (1)

Stradomsky B. V. 388 (4)

Sudjian Th. M. 156 (2)

Sverdlova E. A. 375 (4)

Tähepõld L. 343 (4)

Taits M. U. 368 (4)

Tchumatchenko A. A. 148 (2)

Tigranian R. A. 221 (3)

Trushina E. D. 66 (1)

Tulkova E. I. 179 (2)

Tsyhun G. F. 368 (4)

Tumanova S. Yu. 184 (2)

Turova N. F. 249 (3)

Turovsky V. S. 174 (2)

Vartanian G. S. 139 (2)

Vinjar T. M. 28 (1)

Volf G. 75 (1)

Voronova N. V. 148 (2)

Yarygin K. N. 66 (1)

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются статьи, содержащие ранее не опубликованные результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной нейробиологии, 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 более 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. Перед каждой статьей, кроме кратких сообщений, должно быть напечатано краткое резюме (через 1,5 интервала) объемом не более 0,5 с., которое должно отражать цель и основные результаты работы. Ко всем статьям без исключения на отдельном листе прилагается тот же текст на английском языке.

Экспериментальные статьи должны быть разбиты на разделы: материалы и методы, результаты и обсуждение, литература. Иногда более целесообразным являются разделы—результаты исследований и обсуждение результатов. В кратких сообщениях выделять указанные разделы не следует. Заглавие статьи должно быть ясным, кратким и информативным. Под заглавием следует указать фамилии и инициалы авторов, а в правом верхнем углу над ним индекс универсальной десятичной классификации (УДК).

3. 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.

Под списком литературы слева указывается полное название учреждения, в котором выполнена работа, а справа—дата ее поступления в редакцию.

4. 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 указывать достоверность данных.

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 фотографии (на глянцевой бумаге) обозначить ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе.

5. В приложении к правилам для авторов, которое публикуется 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. Фамилии иностранных авторов даются на языке оригинала.

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

7. Редакция высылает автору второй экземпляр отредактированной рукописи для ознакомления и доработки. В случае возврата статьи для исправления датой поступления ее в редакцию считается день поступления исправленного текста.

8. Корректуру авторам редакция не высылает.

СОДЕРЖАНИЕ

К 60-летию образования Союза Советских Социалистических республик	321
<i>Гиллемин Р.</i> Мозг как эндокринный орган	324
<i>Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.</i> Регуляция некоторых этапов процесса секреции медиаторов в синапсах	335
<i>Лангел Ю. Л., Ринкен А. А., Тяхепылд Л. Я., Ярс Я. Л.</i> Кинетика инактивации мускаринового холинорецептора	343
<i>Дамбинова С. А., Беседин В. И.</i> Выделение и очистка белков синаптических мембран коры головного мозга крыс, специфически связывающих глутамат	352
<i>Черкасова Л. С., Дашковская О. П., Новик В. А., Фомиченко В. Г.</i> Некоторые показатели обмена углеводов мозга в условиях рентгеновского облучения, проводимого на фоне продолжительного введения глибутида	361
<i>Тайц М. Ю., Цыхун Г. Ф.</i> Активность мембраносвязанных ферментов головного мозга при активации гипоталамо—гипофиз—адреналовой системы	368
<i>Кравцов Г. М., Максимов Г. В., Орлов С. Н., Покудин Н. И., Рязский Г. Г., Свердлов Е. А.</i> Поглощение ионов кальция мембранными фракциями головного мозга крысы и нерва лягушки	375

Краткие сообщения

<i>Камалян Р. Г.</i> Участие этаноламина и его производных в обмене катехоламинов мозга и нейроактивных аминокислот	383
<i>Синичкин А. А., Страдомский Б. В.</i> Динамика преальбуминов в мозгу при гипербарооксигенации	388
<i>Менджерцицкий А. М.</i> Глутамат, ГАМК и активность глутаматдекарбоксилазы в мозгу собак при внутримышечном введении антител к основному белку миелина	391

Обзоры

<i>Кометиани П. А.</i> Об эффектах нейротрансмиттеров на генетический аппарат нервной клетки	394
<i>Розанов В. А.</i> Метаболизм и физиологические функции ГАМК-копьюгатов и ГАМК-производных в ЦНС млекопитающих	400

Хроника

<i>Галоян А. А.</i> VIII Международное собрание нейрохимиков (сентябрь 1981 г., Поттингем, Англия)	420
<i>Арутюнян А. В.</i> О заседании Секции нейрохимии (4—5 октября 1982 г., Махачкала)	425

CONTENTS

On the 60-th Anniversary of the formation of the USSR	321
<i>Guillemín R.</i> The brain as an endocrine organ	324
<i>Glebov R. N., Kryzhanovskiy G. N.</i> On the regulation of some steps of mediator secretion process in synapses	335
<i>Langel U., Rinken A., Tähepõld L., Jarv J.</i> Kinetics of the muscarinic receptor inactivation	343
<i>Dambinova S. A., Besedin V. I.</i> Isolation and purification of specific glutamate-binding proteins from synaptic membranes of rat brain cortex	352
<i>Cherkasova L. S., Dashkovskaya O. P., Novik V. A., Fomichenko V. G.</i> Effect of X-rays on some aspects of brain carbohydrate metabolism during glybutide administration	361
<i>Taitis M. U., Tsyhyn G. F.</i> Activity of brain membrane-bound enzymes upon activation of hypothalamus—hypophysis—adrenals system	368
<i>Kravtsov G. M., Maximov G. V., Orlov S. N., Pokudín N. I., Ryzhskiy G. G., Sverdlova E. A.</i> Ca ²⁺ uptake by membrane fractions of rat brain and frog nerve filaments	375

Short communications

<i>Kamalian R. G.</i> Participation of ethanolamine and its derivatives in the metabolism of catecholamines and neuroactive amino acids in rat brain	383
<i>Sinichkin A. A., Stradomsky B. V.</i> Dynamics of brain prealbumins on hyperbaric oxygenation	388
<i>Menzheritsky A. M.</i> Glutamate, GABA and glutamate decarboxylase activity in different areas of dog brain on intracisternal administration of antibodies	391

Reviews

<i>Kometiant P. A.</i> Effects of neurotransmitters on the nervous tissue genetic apparatus	394
<i>Rozanov V. A.</i> Metabolism and physiological functions of GABA-derivatives and GABA-containing compounds in the central nervous system of mammals	406

Chronicles

<i>Galoyan A. A.</i> VIII-th International Meeting on Neurochemistry (September, 1981, Nottingham)	420
<i>Harutjunian A. V.</i> Plenary Session on Neurochemistry (October, 1982, Makhachkala).	425

СОДЕРЖАНИЕ

ЖУРНАЛА «НЕЙРОХИМИЯ», том I, 1982 год

Выпуск I

Грачи́я Хачату́рович Бу́нятян	3
Кре́нс Е. М., Ли́шмарин И. П. Липиды мембран как информационные молекулы	11
Де́мин Н. Н. Биохимические изменения мембранных структур нервной ткани крыс при лишении сна (о нейрохимических причинах необходимости сна у высших позвоночных)	20
Бре́стких А. И., Ви́няр Т. Н., Ро́зенга́рт Е. В. Взаимодействие холинэстеразы зрительного ганглия тихоокеанского кальмара с некоторыми аммониевыми соединениями	23
Сра́пио́нчя Р. М., Саа́кян С. А., Абе́лян Ж. Г., Га́лоян А. А. Об участии триптического кардиоактивных фрагментов специфических белков гипоталамуса в регуляции активности фосфорилазы и фосфодиэстеразы циклического аденозинмонофосфата	36
Алекси́дзе Н. Г., Бере́жной Г. А., Ни́курадзе В. О., Бе́лик Я. В. К вопросу о специфичности белка S-100 в процессах обучения и памяти	43
Ма́нукян К. Г. Липидный компонент протеолипидов разных отделов нервной системы и субклеточных образований мозга	51
Дми́триев А. Д., Го́ликова Ю. И., Ко́былянский А. Г., Само́вилова Н. Н., Тру́шина Е. Д., Я́рымин К. Н., Бе́спалова Ж. Д., А́змүко А. А., Са́кс Т. Р. Получение специфических антисывороток к опсондным пептидам и их использование для радиоиммунологического определения этих соединений	66

Краткие сообщения

Глу́щенко Т. С., Во́льф Г. Цитофотометрия содержания суммарных белков в системах нейрон-нейроглия разных отделов головного мозга крыс в ходе постнатального онтогенеза	75
--	----

Обзоры

Гле́бов Р. Н., Кры́жановский Г. И. АТРа́зная активность микротрубочек мозга	79
Э́тингоф Р. И., Ду́млер И. Л. Природа фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов сетчатки и сопряжение фермента с рецептором	87

Рецензии

Ли́шмарин И. П. Е. М. Кре́нс. ЛИПИДЫ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов	99
Ро́зенга́рт В. И., Сы́тинский И. А. Я. В. Бе́лик. Нейрохимия. Библиографический указатель. Книга первая (1953—1962); книга вторая (1963—1967)	100

Выпуск 2

Чи́фликян М. Д., Арме́мян А. Р., Бу́нятян Г. Х. Действие ГАМК и бикикуллина на вызванное ионами калия Ca^{2+} -зависимое высвобождение 3H -норадреналина из синапсом мезодорзальной области мозга крыс	111
Ре́ва А. Д., Ша́инская А. М., Ге́нжин М. Т., Ле́пехин Е. А. Выделение и свойства глицилглицилдинипептидазы головного мозга крупного рогатого скота	118

<i>Лигарева З. Д., Буснюк М. М., Герштейн Л. М.</i> Цитохимические особенности возрастной дифференцировки корковых нейронов в условиях ранней световой депривации	128
<i>Карагезян К. Г., Вартамян Г. С., Паносян А. Г.</i> Влияние физиологически активных соединений из <i>Vaccinia alba</i> L. на некоторые стороны липидного метаболизма в головном мозгу и других тканях при аллоксановом диабете	130
<i>Чумаченко А. А., Воронова Н. В., Березняк Ю. Л.</i> Влияние ингибирования цикла Кребса на функционирование первой клетки	148
<i>Суджан Ц. М.</i> К регуляции метаболизма гликогена головного мозга	156
<i>Фабри З. Я., Пащенко А. Е.</i> Распределение йода, его гормональных и негормональных соединений в головном мозгу человека и животных	166

Краткие сообщения

<i>Демина М. Н., Туровский В. С., Дамбинова С. А.</i> Влияние аудиогенных судорог на активность глутаматдекарбоксылазы в синантосомах головного мозга крыс линии Крушинского—Молодкиной	174
<i>Тюлькова Е. И.</i> Изучение содержания лактата и пирувата в больших полушариях мозга крыс в разные сроки после перевязки общих сонных артерий	179

Обзоры

<i>Туманова С. Ю., Прохорова М. И.</i> Участие ганглиозидов в модификации нейрональных мембран	184
<i>Ещенко Н. Д.</i> Цикл трикарбоновых кислот и его регуляция в головном мозгу	200

Хроника

Виктор Иосифович Розенгарт (к 70-летию со дня рождения)	214
---	-----

Выпуск 3

<i>Тигранян Р. А., Кветцянски Р.</i> Регуляция метаболизма катехоламинов в гипоталамусе крыс в условиях космического полета	221
<i>Кричевская А. А., Шугалей В. С., Кленикова В. А., Ломакина Л. В., Лосева С. П.</i> Ядерные белки нейронов и глиоцитов в двигательной зоне коры мозга крыс при акклимации к холоду	231
<i>Нечаева Г. А., Лопатина Н. Г.</i> Влияние обучения на активность кислой и щелочной рибонуклеаз и ингибитора последней в субклеточных фракциях головного мозга крыс	237
<i>Априкин Г. В., Мкртчян Г. А., Паронян Ж. А.</i> Субклеточное распределение амидных групп белков мозга при старении	243
<i>Турова Н. Ф., Барышников В. А.</i> К вопросу о влиянии антенатальной гипоксии на региональное распределение фонда свободных аминокислот в постнатальном онтогенезе мозга крыс	249
<i>Эмирбеков Э. З.</i> Влияние гипотермии на поглощение аминокислот срезами мозга	254
<i>Промыслов М. Ш., Смирнов А. В., Акопян А. С.</i> Регуляция обмена гликогена мозга при черепно-мозговой травме	261
<i>Шаров А. Н., Козлов Н. Б.</i> Влияние перегревания и защитного действия ионола на окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга крыс	269
<i>Берман А. Л., Азимова А. М.</i> Локализация и механизмы АТР-зависимого транспорта кальция в фоторецепторах (палочках) сетчатки позвоночных	275

Краткие сообщения

<i>Горошинская И. А., Броницкая З. Г., Кричевская А. А., Карабухина Е. Г.</i> Активность и субстратная специфичность моноаминооксидаз мозга крыс в условиях гипоксии	282
--	-----

<i>Арутюнян А. В., Кочарян М. Г.</i> Дезаминирование АМР и аденозина в хромофинной ткани	287
--	-----

Обзоры

<i>Аврова Н. Ф.</i> О роли ганглиозидов в дифференцировке нервных клеток и синаптической передаче нервного импульса	290
---	-----

Библиографическая информация

<i>Белик Я. В.</i> Перечень международных и национальных периодических и продолжающихся изданий по нейронаукам	303
--	-----

Рецензии

<i>Демин Н. Н. Г. С. Хачатрян.</i> Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга	313
---	-----

Выпуск 4

К 60-летию образования Союза Советских Социалистических республик	321
<i>Гиллемин Р.</i> Мозг как эндокринный орган	324
<i>Глебов Р. Н., Крыжановский Г. И.</i> Регуляция некоторых этапов процесса секретиции медиаторов в синапсах	335
<i>Лангел Ю. Л., Ринкен А. А., Тяхепылд Л. Я., Ярв Я. Л.</i> Кинетика инактивации мускаринового холинорецептора	343
<i>Дамбинова С. А., Беседин В. И.</i> Выделение и очистка белков синаптических мембран коры головного мозга крыс, специфически связывающих глутамат	352
<i>Черкасова Л. С., Дашковская О. П., Новик В. А., Фомиченко В. Г.</i> Некоторые показатели обмена углеводов мозга в условиях рентгеновского облучения, проводимого на фоне продолжительного введения глутутида	361
<i>Тайц М. Ю., Цыхун Г. Ф.</i> Активность мембраносвязанных ферментов головного мозга при активации гипоталамо—гипофиз—адреналовой системы	368
<i>Кравцов Г. М., Максимов Г. В., Орлов С. Н., Покудин Н. И., Рязжский Г. Г., Свердлова Е. А.</i> Поглощение ионов кальция мембранными фракциями головного мозга крысы и нерва лягушки	375

Краткие сообщения

<i>Камалян Р. Г.</i> Участие этаноламина и его производных в обмене катехоламинов мозга и нейроактивных аминокислот	383
<i>Синичкин А. А., Страдомский Б. В.</i> Динамика преальбуминов в мозгу при гипербарооксигенации	388
<i>Менджеряцкий А. М.</i> Глутамат, ГАМК и активность глутаматдекарбоксилазы в мозгу собак внутривенным введением антител к основному белку миелина	391

Обзоры

<i>Кометиани П. А.</i> Об эффектах нейротрансмиттеров на генетический аппарат нервной клетки	394
<i>Розанов В. А.</i> Метаболизм и физиологические функции ГАМК-конъюгатов и ГАМК-производных в ЦНС млекопитающих	406

Хроника

<i>Галоян А. А.</i> VIII Международное собрание нейрохимиков (сентябрь 1981 г., Поттингем, Англия)	420
<i>Арутюнян А. В.</i> О заседании Секции нейрохимии (4—5 октября 1982 г., Махачкала)	425

CONTENTS

Number 1

<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., Vlnjar T. N., Rozengart E. V.</i> Interaction of optical ganglia cholinesterase of pacific squid with some ammonium compounds	28
<i>Srapionian R. M., Sahaktian S. A., Abellan 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 processes and memory	43
<i>Manukian K. H.</i> Lipid moiety of proteolipids from various parts of nervous system and brain subcellular particles	51
<i>Dmitriev A. D., Golikova U. I., Kobylansky A. G., Samovillova N. N., Trushina E. D., Yarygin K. N., Bespalova 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>Etingof R. N., Dumler I. L.</i> Cyclic nucleotides phosphodiesterase from retina and its coupling with the receptor	87

Book reviews

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

Number 2

<i>Chiflikian M. D., Armentan A. R., Bunlatian H. Ch.</i> GABA, bicuculline and K ⁺ -evoked Ca ²⁺ -dependent H ³ -noradrenaline release from rat mesodiencephalic region synaptosomes	111
<i>Reva A. D., Shainskaya A. M., Genhin M. T., Lephin E. A.</i> Purification and properties of glycylglycine dipeptidase from bovine brain	118
<i>Pigareva Z. D., Busnuk M. M., Gerstein L. M.</i> Cytochemical peculiarities of age-related differentiation of cortex neurons under early light deprivation	128
<i>Karagesian K. G., Vartanian G. S., Panossian A. G.</i> Effect of physiologically active substances from Bryonia Alba L. on some processes of lipid metabolism in diabetic rats brain and other tissues	139

<i>Tchumatchenko A. A., Voronova N. V., Berezniack Yu. L.</i> The influence of Krebs cycle inhibition on the functioning of a nerve cell	148
<i>Sudjian Th. M.</i> On the regulation of glycogen metabolism in brain	156
<i>Fabri Z. J., Paschenko A. E.</i> The distribution of total iodine, its hormonal and nonhormonal compounds in brain of man and animals	166

Short communications

<i>Demina M. N., Turovsky V. S., Dambinova S. A.</i> The influence of audiogenic convulsions on glutamate decarboxylase activity in Krushinsky-Molodkina rats brain synaptosomes	174
<i>Tulkova E. I.</i> Lactate and pyruvate content in rat brain hemispheres after ligation of carotid	179

Reviews

<i>Tumanova S. Yu., Prokhorova M. I.</i> Participation of gangliosides in the modification of neuronal membranes	184
<i>Eschenko N. D.</i> Tricarboxylic acid cycle and its regulation in brain	200

Chronicles

V. I. Rozengart (on his 70th Birthday)	214
--	-----

Number 3

<i>Tigranian R. A., Kvetnansky R.</i> Regulation of catecholamine metabolism in rat hypothalamus during space flight	221
<i>Krichevskaya A. A., Shugaley V. S., Klenikova V. A., Lomakina L. V., Loseva S. P.</i> Nuclear proteins of neurons and gliocytes from rat brain cortex motor zone in the course of cold acclimation	231
<i>Nechueva G. A., Lopatina N. G.</i> Effects of learning and pseudolearning on the activity of acid and alkaline ribonuclease and on the alkaline ribonuclease inhibitor in rat brain hemispheres subcellular fractions	237
<i>Aprikian G. V., Mkrtichian G. A., Paronian J. A.</i> Subcellular distribution of protein amide nitrogen of brain in senescence	243
<i>Turova N. F., Baryshnikov V. A.</i> Effect of antenatal hypoxia on the regional distribution of free amino acids in rat brain in the course of postnatal ontogenesis	249
<i>Emirbekov E. Z.</i> Effect of hypothermia on the uptake of amino acids by brain slices	254
<i>Promyslov M. Sh., Smirnov A. V., Akopyan A. S.</i> Cranio-cerebral injury and brain glycogen metabolism	261
<i>Sharov A. N., Kozlov N. B.</i> Influence of hyperthermia on oxidative phosphorylation in rat brain mitochondria and protective effect of ionol	269
<i>Berman A. L., Azimova A. M.</i> Localization and mechanisms of ATP-dependent transport of calcium in retinal rods of vertebrates	275

Short communications

<i>Goroshinskaya I. A., Bronovitskaya Z. G., Krichevskaya A. A., Karabuhina E. G.</i> Effect of hypoxia on the activity and substrate specificity of rat brain monoamine oxidases	282
<i>Harutjunjan A. V., Kocharian M. G.</i> AMP and adenosine deamination in chromaffin tissue	287

Reviews

<i>Avrova N. F.</i> On the role of gangliosides in nervous cell differentiation and in synaptic transmission	270
--	-----

Bibliographic information

- Belik Ya. V.* The list of international and national periodicals and serials on neurosciences 303

Book reviews

- Doemin N. N.* G. S. Khachatryan. Biochemistry of nucleic acids and higher functions of the brain 313

Number 4

- On the 60-th Anniversary of the formation of the USSR 321
- Guillemin R.* The brain as an endocrine organ 324
- Glebov R. N., Kryzhanovskiy G. N.* On the regulation of some steps of mediator secretion process in synapses 335
- Langel U., Rinke A., Tähepõld L., Jarv J.* Kinetics of the muscarinic receptor inactivation 343
- Dambinova S. A., Besedin V. I.* Isolation and purification of specific glutamate-binding proteins from synaptic membranes of rat brain cortex 352
- Cherkasova L. S., Dashkovskaya O. P., Novik V. A., Fomichenko V. G.* Effect of X-rays on some aspects of brain carbohydrate metabolism during glybutide administration 361
- Taits M. U., Tsyhun G. F.* Activity of brain membrane-bound enzymes upon activation of hypothalamus—hypophysis—adrenals system 368
- Kravtsov G. M., Maximov G. V., Orlov S. N., Pokudin N. I., Rtyzhsky G. G., Sverdlova E. A.* Ca²⁺ uptake by membrane fractions of rat brain and frog nerve filaments 375

Short communications

- Kamalian R. G.* Participation of ethanolamine and its derivatives in the metabolism of catecholamines and neuroactive amino acids in rat brain 383
- Sinichkin A. A., Stradomsky B. V.* Dynamics of brain prealbumins on hyperbaric oxygenation 388
- Mendzheritsky A. M.* Glutamate, GABA and glutamate decarboxylase activity in different areas of dog brain on intracisternal administration of antibodies 391

Reviews

- Kometiani P. A.* Effects of neurotransmitters on the nervous tissue genetic apparatus 394
- Rozanov V. A.* Metabolism and physiological functions of GABA-derivatives and GABA-containing compounds in the central nervous system of mammals 406

Chronicles

- Galoyan A. A.* VIII-th International Meeting on Neurochemistry (September, 1981, Nottingham) 420
- Harutjunian A. V.* Plenary Session on Neurochemistry (October, 1982, Makhachkala) 425