

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ. 2. № 1. 1983

ISSN 0203-493X



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 2, ВЫП. 1.
Январь—март

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1983

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

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

Редакционный совет

Н. Г. Алексидзе, С. В. Гастева, Р. Н. Глебов, Б. А. Қазарян, Р. И. Кругликов, В. Қ. Лишко, В. Г. Мхитарян, В. С. Оганесян, М. И. Прохорова, А. Д. Рева, Д. А. Сахаров, А. А. Симонян, Т. М. Турпаев, А. М. Утевский, Е. М. Хвагова, Л. С. Черкасова, Р. Н. Этингоф

Ст. редактор В. С. Бегларян
Редактор Э. А. Хачатурова
Тех. редактор Л. А. Азизбекян

Сдано в набор 12.01. 1983 г. Подписано к печати 23.03. 1983 г. ВФ 01786
Бумага № 1, 70×108/16. Высокая печать. Печ. лист. 7,0. Усл. печ. лист. 9,8.
Учет.-изд. 8,16. Тираж 685. Заказ 27. Издат. 5870.
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака, 5/1, т. 24-89-00, 24-89-54.
Издательство АН АрмССР, Ереван 19, Барекамутян 24-г.
Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19, Барекамутян, 24.

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Новый всесоюзный журнал «НЕЙРОХИМИЯ» печатает статьи по всем разделам биохимии нервной системы. Журнал публикует наряду с оригинальными статьями также обзоры по актуальным вопросам нейробиологии и экспресс-информацию в виде кратких сообщений и писем в редакцию. Особое внимание уделяется работам по функциональной нейробиологии, касающимся структуры и биологической роли специфических белков, нейропептидов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов и других соединений нервной ткани, биохимии трансмиттеров и их рецепторов, миелиногенеза, глии и нейронов, аксонального транспорта и хромаффинных гранул.

В работе журнала принимают участие ведущие нейробиологи Советского Союза и известные зарубежные ученые.

Журнал предназначен для научных работников, занимающихся проблемами биохимии, физиологии, фармакологии, иммуногистохимии нервной системы. Он представляет также интерес для широкого круга клиницистов, работающих в области психиатрии, невропатологии и нейроэндокринологии.

Подписку на журнал «НЕЙРОХИМИЯ» можно осуществить во всех отделениях «Союзпечати» (индекс для подписки—77787), а за границей через агентство «Международная книга».

Журнал выходит 4 раза в год, цена одного номера—1 руб. 30 коп.

УДК 612.82.821.2

ЗАВИСИМОСТЬ ВЛИЯНИЯ Met-ЭНКЕФАЛИНА НА ПРОЦЕССЫ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ ОТ СОСТОЯНИЯ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

КРУГЛИКОВ Р. И., ОРЛОВА Н. В., ГЕЦОВА В. М., МАЦ В. Н.

В экспериментах на крысах исследовали влияние однократного подкожного введения 25 мкг Met-энкефалина (М-Энк) перед сеансом обучения на выработку и сохранение через 7 суток условных рефлексов двустороннего избегания (УРДИ) у интактных животных и животных с измененным с помощью фармакологических или хирургических воздействий содержанием биогенных моноаминов в головном мозгу. Введение М-Энк интактным крысам не изменяло содержания серотонина и норадреналина в целом мозгу и ухудшало выработку и сохранение УРДИ. Как снижение, так и в особенности повышение содержания в мозгу серотонина и катехоламинов приводили к модификации эффектов М-Энк, направленность которых зависела от особенностей выработки УРДИ и в определенной мере носила нормализующий характер.

Эндогенные опиоиды—эндорфины, помимо анальгезирующего действия, оказывают выраженное влияние на процессы обучения и памяти [1—3]. Хотя нейрохимические механизмы этого влияния пока во многом остаются неясными, можно предполагать, что в его реализации существенная роль принадлежит нейромедиаторным системам. Основанием для такого предположения служат эффекты эндорфинов на метаболизм катехоламинов [4], серотонина (5-ОТ) [5] и ацетилхолина [6], а также данные о влиянии эндорфинов на высвобождение нейромедиаторов пресинаптическими нервными окончаниями [7].

В настоящей работе была изучена роль моноаминергических систем головного мозга в механизмах действия пентапептида — М-Энк (Н-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH) на процессы образования и закрепления оборонительных временных связей.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на беспородных крысах-самцах массой 180—200 г, у которых вырабатывали оборонительные УРДИ. Условным раздражителем служил мелькающий свет, безусловным—электрокожное раздражение, которое сочетали со светом (5 с). В 1- и 2-м опытных сеансах, интервал между которыми составлял 7 суток, животным предъявляли по 50 сочетаний света и электрокожных раздражений и регистрировали количество условных реакций избегания. Показателем выработки и сохранения УРДИ служило количество из-

беганий в 1-м опытном сеансе и его прирост ко 2-му. Изменения функционального состояния моноаминергических систем мозга осуществляли с помощью хирургических и фармакологических вмешательств. Снижение содержания серотонина (5-ОТ) в головном мозгу осуществляли путем электролитического разрушения ядер шва (координаты по атласу Фифковой и Маршала AP—7,0; L—0; H—7,8) током 2 мА в течение 20 с или введением ингибитора синтеза 5-ОТ—*p*-хлорфенилаланина (ПХФА). Снижение содержания норадреналина (НА) в головном мозгу достигали с помощью двустороннего разрушения *locus coeruleus* (координаты по атласу Кенига и Клиппель AP—10,4; L—0,9; H—6,8) током силой 1 мА в течение 15 с или введением ингибитора синтеза НА—дисульфирама.

После завершения исследований проводили морфологический контроль локализации степени разрушений соответствующих ядер. Учитывали данные, полученные на животных, у которых оказывались разрушенными два основных ядра серотонинергической системы головного мозга (пп. *parae medialis et dorsalis*), а в случае норадренергической системы отмечалось билатеральное разрушение *locus coeruleus*. Ингибитор синтеза 5-ОТ ПХФА вводили внутривентрикулярно в дозе 100 мг/кг в течение 3 дней, а дисульфирам в дозе 100 мг/кг—за 4 ч до опыта. Повышение содержания 5-ОТ в мозгу достигали путем введения его предшественника—5-гидрокситриптофана (5 ГТ). Избыток катехоламинов в мозгу создавали путем введения L-ДОФА. Эти препараты вводили в дозе 100 мг/кг внутривентрикулярно за 1 и 4 ч соответственно до выработки УРДИ. У животных с разрушенными ядрами шва выработку УРДИ осуществляли через 2 недели, а у животных с разрушенными *locus coeruleus* через 3 недели после операции, к моменту максимального снижения содержания моноаминов в мозгу. Эти воздействия приводили к изменениям содержания моноаминов в мозгу, что было показано ранее [8, 9]. М-Энк вводили подкожно в дозе 25 мкг на животное за 10 мин до выработки УРДИ, что давало возможность исследовать его влияние как на процессы выработки, так и на самые ранние этапы консолидации. Общая схема эксперимента состояла в следующем: вначале предпринимали вмешательства в деятельность моноаминергических систем, затем вводили М-Энк. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту.

Результаты исследований

В начальной серии опытов было исследовано влияние М-Энк на содержание моноаминов в мозгу. Было установлено, что введение М-Энк не вызывало изменений количества моноаминов в передних отделах головного мозга (табл. 1).

В следующих сериях экспериментов исследовали особенности процессов выработки и закрепления УРДИ при введении М-Энк в той же дозе интактным животным и на фоне измененного функционального состояния моноаминергических механизмов.

Вмешательства в деятельность серотонинергических механизмов вызывали определенные изменения выработки и сохранения УРДИ, одновременно модифицируя эффекты М-Энк (табл. 2). Так, введение М-Энк intactным животным приводило к значительному снижению числа УРДИ в 1-м опытном сеансе ($p \text{ I-II} < 0,05$). При этом сохранение УРДИ, которое оценивали по числу избеганий во 2-м опытном сеансе, также ухудшалось. Сами по себе фармакологические вмешательства в деятельность серотонинергических механизмов, приводившие к снижению (группа III) или накоплению (группа V) 5-ОТ в головном мозгу, вызывали в целом нарушения как выработки, так и сохранения этих рефлексов, о чем свидетельствовало снижение числа избеганий в 1- и 2-м опытных сеансах у крыс этих экспериментальных групп по сравнению с контролем. Своеобразные изменения были отмечены у животных с разрушенными ядрами шва (группа IV). Число избеганий у этих животных в исходном опыте почти не отличалось от числа избеганий у контрольных животных, но значительно превосходило эту величину у крыс других подопытных групп. Сохранение УРДИ у животных этой группы (IV) практически не отличалось от контроля.

Таблица 1

Влияние введения Мет-энкефалина на содержание моноаминов в передних отделах головного мозга

Группы животных	5-ОТ (мкг/г сырого веса)	НА (мкг/г сырого веса)
Контроль (n 10)	0,441 $\pm$ 0,079	0,150 $\pm$ 0,023
Введение Мет-энке- фалина (n 10)	0,480 $\pm$ 0,049	0,149 $\pm$ 0,020

При введении М-Энк на фоне измененного функционального состояния серотонинергической системы наблюдаются определенные модификации его эффектов. Фармакологическое снижение количества 5-ОТ в мозгу модифицировало влияние М-Энк на процессы выработки УРДИ, что проявлялось в увеличении числа избеганий у животных группы VI в 1-м опытном сеансе по сравнению с группой II. Этот факт примечателен тем, что изолированное применение ПХФА приводило к резкому снижению числа избеганий в 1-м опытном сеансе (группа III). В противоположность этому оперативное снижение содержания 5-ОТ с помощью разрушения ядер шва не препятствовало «ухудшающему» влиянию М-Энк на процессы выработки УРДИ (группа VII): число избеганий у этих животных под влиянием М-Энк резко снижалось с 20,95 $\pm$ 2,56 (группа IV) до 10,90 $\pm$ 0,84 (группа VII) (табл. 2).

Эффекты М-Энк, имевшие место при снижении содержания 5-ОТ в мозгу, зависели в значительной степени от особенностей выработки условных рефлексов: при исходно низком числе избеганий (группа III) М-Энк улучшал выработку УРДИ (группа VI), при исходно высоком числе избеганий (группа IV) он ее ухудшал (группа VII).

Сохранение УРДИ при введении М-Энк на фоне сниженного количества 5-ОТ в мозгу практически не изменялось. Гораздо более выраженные модификации эффектов М-Энк наблюдали в условиях накопления 5-ОТ: его избыток почти полностью предотвращал отрицательное влияние М-Энк на выработку и сохранение УРДИ (группа VIII) (табл. 2). Об этом свидетельствовало значительное увеличение числа избеганий в 1- и 2-м опытных сеансах у животных группы VIII по сравнению с группами II и V. Следует подчеркнуть тот факт, что введенные порознь М-Энк и 5-ГТ существенно ухудшали выработку УРДИ, а их совместное воздействие способствовало значительному улучшению выработки и сохранения УРДИ. Таким образом, введение М-Энк на фоне избытка 5-ОТ в головном мозгу оказывало «нормализующее» действие на выработку и сохранение временных связей.

Таблица 2

Влияние введения Мет-энкефалина на выработку и сохранение условных рефлексов двустороннего избегания у животных с измененным функциональным состоянием серотонинергической системы

Группы животных	Количество избеганий	
	1-й опытный сеанс	2-й опытный сеанс
I—Контроль (n=34)	17,93±1,97	32,11±2,11
II—25 мкг Мет-энкефалина (n=16)	6,62±2,19*	20,11±4,13*
III—ПХФА 100 мг/кг (n=10), 3-кратно	3,92±0,90*	20,69±3,68*
IV—Разрушение ядер шва (n=18)	20,95±2,56	33,75±3,01
V—5-гидрокситриптофан 100 мг/кг (n=15)	8,60±2,28*	23,67±2,12*
VI—ПХФА+Мет-энкефалин (n=10)	8,00±3,25*	21,11±4,58*
VII—разрушение ядер шва+Мет-энкефалин (n=10)	10,90±0,84*	29,22±0,56
VIII—5-гидрокситриптофан+Мет-энкефалин (n=10)	15,53±4,11	30,67±4,29

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

В другой серии экспериментов исследовали особенности процессов выработки и закрепления УРДИ при введении М-Энк на фоне измененного функционального состояния катехоламинергических механизмов мозга.

Вмешательства в деятельность катехоламинергической системы мозга, приводившие к снижению (группы III и IV) или накоплению (группа V) катехоламинов в мозгу, вызывали как нарушение выработки УРДИ, так и их сохранения (табл. 3). Об этом свидетельствовало уменьшение числа условных реакций избеганий у животных этих групп в 1- и 2-м опытных сеансах по сравнению с контролем. При введении М-Энк на фоне изменения функционального состояния катехоламинер-

гической системы проявлялись определенные модификации эффектов нейропептида. При введении М-Энк животным на фоне фармакологически сниженного количества НА (группа V) наблюдали тенденцию к увеличению числа избеганий в исходном опыте по сравнению с группой животных, получавших только М-Энк (группа II) или только дисульфирам (группа III). Тот же эффект проявлялся при проверке сохранения этих рефлексов. Введение М-Энк животным, у которых уровень содержания НА снижали путем разрушения *locus coeruleus* (группа VII), существенно не сказывалось на выработке и сохранении УРДИ, хотя и наблюдали некоторую тенденцию к улучшению их сохранения. Гораздо более выраженные модификации эффектов М-Энк происходили в условиях накопления катехоламинов в мозгу с помощью L-ДОФА. Введение М-Энк животным с избытком катехоламинов в мозгу (группа VIII) существенно улучшало выработку и сохранение УРДИ; по соответствующим показателям эти животные не отличались от контрольных. Особо следует отметить тот факт, что М-Энк и L-ДОФА, примененные порознь, приводили к существенному ухудшению выработки УРДИ, а примененные совместно значительно улучшали как их выработку, так и сохранение.

Обсуждение результатов

Основной результат проведенных исследований сводится к тому, что эффекты М-Энк в виде нарушений выработки УРДИ у интактных животных модифицировались при изменении функционального состояния моноаминергических систем мозга. Оценивая этот факт, следует учитывать три важных обстоятельства—величину использованной дозы М-Энк (25 мкг); род и особенности вырабатываемых рефлексов; возможное влияние ухудшения их выработки на последующее сохранение. Зависимость эффектов нейропептидов, в том числе эндогенных опиоидов, от дозы носит своеобразный характер: с увеличением дозы эффекты либо исчезали, либо приобретали противоположную направленность [10]. Это касается как выработки, так и закрепления временных связей. Например, введение крысам сразу после выработки УРДИ от 0,3 до 10,0 мкг/кг М-Энк вызывало явления ретроградной амнезии, чего при увеличении его дозы до 20 мкг/кг не наблюдали [10]. М-Энк в дозе 25 мкг оказывал значительно более выраженный эффект на выработку временной связи, чем на ее закрепление [3]. Очевидно, использованная нами доза М-Энк находится в диапазоне доз, нарушающих выработку временных связей, но мало сказывающихся на их фиксации. Эта закономерность относится, по-видимому, лишь к активному избеганию, так как на выработку и закрепление условных рефлексов пассивного избегания М-Энк в дозах 0,1—100,0 мкг/г веса не оказывал действия [11]. Примечательно, что М-Энк не ухудшал, а напротив, улучшал выработку пищевых условных рефлексов [12]. Это означает, что его влияние на выработку условных рефлексов связано с их родом, а следовательно, с мотивацией. Можно, по-видимому, согласиться с Riley и соавт. [13], по-

лагающими, что эндорфины, ослабляя аверсивность безусловных раздражителей, тем самым ухудшают выработку соответствующих условных рефлексов. Учитывая, что М-Энк и другие эндогенные опиоиды в определенном диапазоне доз нарушают главным образом процессы выработки условных рефлексов, мало сказываясь на их сохранении [3, 14], можно думать, что ухудшение сохранения УРДИ, которое наблюдали в наших условиях при введении М-Энк интактным животным, является в основном следствием нарушения процесса собственно выработки условных рефлексов.

Таблица 3

Влияние введения Мет-энкефалина на выработку и сохранение условных рефлексов двустороннего избегания у животных с измененным функциональным состоянием катехоламинергической системы

Группы животных	Количество избеганий	
	1-й опытный сеанс	2-й опытный сеанс
I—Контроль (n=34)	17,93±1,97	32,11±2,11
II—25 мкг Мет-энкефалина (n=16)	6,62±2,19*	20,11±4,13*
III—100 мг/кг дисульфирама (n=10)	4,40±2,47*	17,20±4,55*
IV—Разрушение locus coeruleus (n=21)	8,71±1,82*	20,10±3,70*
V—L-ДОФА (n=14)	8,64±2,23*	25,29±4,31
VI—Дисульфирам + Мет-энкефалин (n=12)	8,08±2,26*	22,45±4,40
VII—Разрушение locus coeruleus + Мет-энкефалин (n=13)	6,63±2,37*	24,13±6,08
VIII—L-ДОФА + Мет-энкефалин (n=12)	15,25±3,27	31,75±3,97

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Как было установлено, фармакологическое снижение и повышение содержания моноаминов в мозгу сопровождались ухудшением выработки УРДИ—значительным уменьшением числа избеганий в 1-м опытном сеансе. На этом фоне М-Энк, также вызывавший при изолированном введении ухудшение выработки УРДИ, оказывал более или менее нормализующее действие, которое было слабо выражено при снижении содержания 5-ОТ и НА в мозгу. В отличие от этого введение М-Энк на фоне избытка моноаминов в мозгу полностью нормализовало выработку и закрепление временных связей. Эффекты М-Энк, введенного животным, у которых содержание моноаминов в мозгу изменялось в результате разрушения соответствующих ядер, не носили столь закономерного характера. Частично это объясняется тем, что снижение количества моноаминов в этих условиях сопровождалось, вероятно, побочными эффектами [9, 15], в меньшей мере контролируруемыми эндогенными опиоидами. Тем не менее хирургически вызываемое уменьшение моноаминов не препятствовало ухудшающему влиянию М-Энк на выработку УРДИ, которое при разрушении locus coeruleus было статистически недостоверно и достигало

статистически значимого уровня при разрушениях ядер шва (количество избеганий снижалось с 20,95 до 10,9; $p < 0,05$). Избыток в мозгу моноаминов полностью предотвращал отрицательное влияние М-Энк на выработку и закрепление УРДИ. Можно предположить, что отрицательные эффекты М-Энк обусловлены вызываемым им снижением содержания моноаминов. Однако содержание 5-ОТ и НА в целом мозгу под влиянием 25 мкг М-Энк не изменялось (табл. 1). Следовательно, региональные сдвиги метаболизма моноаминов под влиянием М-Энк не сказывались на их количестве при определениях в целом мозгу. По-видимому, избыток моноаминов может предотвращать те отрицательные последствия, к которым приводят региональные изменения их метаболизма, вызываемые М-Энк.

Обращает внимание на себя тот факт, что направленность влияния М-Энк на выработку УРДИ зависит от особенностей выработки: при исходно высоком числе избеганий М-Энк ухудшал выработку рефлексов; при исходно низком числе избеганий в случае фармакологически вызываемого дефицита или избытка моноаминов в мозгу введение М-Энк, напротив, улучшало выработку УРДИ. Это подтверждает ранее обнаруженные различия в эффектах М-Энк у хорошо и плохо обучающихся животных [3] и, возможно, отражает общую закономерность физиологического действия эндорфинов и нейропептидов в целом: при использовании в адекватных дозах нейропептиды оказывают нормализующее действие на деятельность мозга, поэтому столь перспективно их использование в клинической практике.

Модификации эффектов М-Энк при изменениях функционального состояния моноаминергических систем мозга указывают на участие моноаминов в механизмах действия М-Энк (и эндорфинов вообще). Применительно к катехоламинергической системе мозга это заключение подтверждается данными [16], согласно которым улучшение консолидации временных связей при введении опийного антагониста налоксона предотвращается блокадой дофаминергических и β -адренергических рецепторов. По отношению к серотонинергической системе мозга такого рода прямые данные пока отсутствуют. Однако, исходя из сведений о влиянии М-Энк на метаболизм 5-ОТ [5] и о предотвращении вызываемой 5-ГТ амнезии налоксоном [17] и данных, полученных в настоящей работе, можно сделать заключение о том, что представление об участии серотонинергической системы мозга в механизмах действия М-Энк достаточно обоснованно.

Наряду с этим необходимо учитывать, что вызываемые М-Энк изменения функционального состояния катехоламинергической системы мозга не могут не сказываться на серотонинергических механизмах. Это заключение вытекает как из данных о тесном взаимодействии моноаминергических систем [18], так и из исследований Kovacs и соавт. [19], показавших, что лизин-вазопрессин вовлекает серотонинергическую систему мозга в процесс консолидации не непосредственно, а через норадренергическую систему.

INVOLVEMENT OF BRAIN MONOAMINERGIC SYSTEM IN THE EFFECT OF Met-ENKEPHALIN ON LEARNING AND MEMORY

KRUGLIKOV R. I., ORLOVA N. V., GETZOVA V. M., MAZ V. N.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR Academy of Sciences, Moscow

The effect of Met-enkephalin (M-Enk, 25 μ g) a single subcutaneous injection) on the elaboration and consolidation (after 7 days) of bilateral avoidance conditioned reflexes (BACR) has been studied in rats with altered level of brain catecholamines caused by pharmacological agents or by surgical operations.

In control animals M-Enk didn't affect the content of serotonin and epinephrine in the whole brain and hampers the elaboration and consolidation of BACR. Both the decrease and especially the increase in the brain catecholamines and serotonin content altered the effect of M-Enk in the direction that depends on the peculiarities of BACR elaboration conditions and was to some extent of normalizing character.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ашмарин И. П. Ж. эвол. биох. и физиол., 13, 5, 570, 1977.
2. Izquierdo I., Perry M. L., Dias R. D., Souza D. O., Elisabetsky E., Carrasco M. A., Orsingher O. A., Netto A. C.—In: Endogenous peptides and learning and memory processes (eds. Martinez J. L., Jensen Jr. R. A., Messing R. B., Rigter H., McCaugh J. L.). N. Y., Academic Press, p. 269, 1981.
3. Кругликов Р. И., Гольдберг М. Б., Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л. Изв. АН СССР, Сер. биол., 5, 778, 1980.
4. Алгери С., Брунелло Н., Кальдерини Ц., Консолациони А.—В кн.: Эндорфины (под ред. Э. Коста, М. Трабукки), М., Мир, с. 200, 1981.
5. Algeri A., Consolazioni A., Calderini G., Achilli G., Puche Canas E., Garattini S. Experientia, 34, 1488, 1978.
6. Ihmadas K., Sawynok M., Sutak L. Nature, 269, 433, 1977.
7. Vizi E. S. Progress in Neurobiology, 12, 181, 1979.
8. Гецова В. М. Ж. высш. нервн. деятельности, 29, 737, 1979.
9. Стайкова Р. М., Орлова Н. В., Гецова В. М. Ж. высш. нервн. деятельности, 29, 762, 1978.
10. Izquierdo I., Dias R. D., Souza D. O., Carrasco M. A., Elisabetsky E., Perry M. L. Behav. Brain Research, 1, 451, 1980.
11. Martinez J. L., Rigter H. Neuroscience Letters, 19, 197, 1980.
12. Kastin H. J., Scollan E. L., King M. G., Schally A. V., Coy D. H. Pharmac. Biochem. Behav., 5, 691, 1976.
13. Riley A. L., Zellner D. A., Duncan H. I. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 4, 69, 1980.
14. Rigter H., Dekker I., Martinez J. L. Regulatory peptides, 2, 317, 1981.
15. Lorens S., Gulberg H., Holl K., Köhler Ch., Srebro B. Brain Res., 108, 97, 1976.
16. Izquierdo I., Graudenz M. Psychopharmacology, 67, 265, 1980.
17. Garzon J., Rubio J., del Rio J. Life Sciences, 29, 17, 1981.
18. Громова Е. А., Семенова Т. П., Векишина Н. Л. ДАН СССР, 227, 766, 1976.
19. Kovacs G. L., Bohus B., Versteeg H. L. Neuroscience, 11, 159, 1979.

Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Поступила 20. VII 1982

УДК 612.815.—8.015

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ХОЛЕЦИСТОКИНИНОМ МЕТАБОЛИЗМА ДОФАМИНА В МЕЗОЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

АНОХИН К. В., КОГАН Б. М., ХРИСТОЛЮБОВА Н. А.

Изучено влияние сульфатированного октапептида холецистокинина (ХЦК) на обмен дофамина (ДА) в некоторых отделах мозга крыс, где этот пептид сосуществует с ДА в одних и тех же нейронах (миндалины, прилежащее ядро) и в тех отделах, где ДА-нейроны не содержат ХЦК (стриатум, гипоталамус). Внутривенное введение 5 и 15 мкг/кг ХЦК значительно увеличивало кругооборот ДА в миндалине и прилежащем ядре, не влияя на его обмен в других структурах мозга. Большие дозы ХЦК (30 и 100 мкг/кг), кроме лимбических структур, незначительно увеличивали обмен ДА и в стриатуме. В поведенческих тестах ХЦК тормозил спонтанную двигательную активность мышей и подавлял гиперактивность, вызванную фенамином. Высказывается предположение, что в мезолимбической ДА-системе, где ХЦК сосуществует с ДА в одних и тех же нейронах, этот пептид может быть модулятором ДА синаптической активности, тормозя передачу информации в ДА-синапсах.

Октапептид холецистокинин (ХЦК) широко распространен в нейронах коры больших полушарий и подкорковых образований головного мозга многих видов животных и человека [1]. Он синтезируется в нейронах и накапливается в пресинаптических пузырьках, откуда высвобождается при деполяризации с помощью Ca^{2+} -зависимого механизма [2]. В мозгу обнаружены предполагаемые рецепторы к ХЦК [3], а сам он оказывает возбуждающее действие на нейропальную активность [4], что дает основание некоторым авторам считать ХЦК нейромедиатором [5, 6].

Установлено, что ХЦК содержится в дофаминных нейронах мезолимбической системы [7]. В нигростриатной дофаминовой системе оба биоактивных вещества также имеются в больших количествах, но в разных нейронах [8]. Сосуществование нейропептидов и биогенных аминов в одних и тех же нейронах, по-видимому, является достаточно распространенным фактом, однако его функциональное назначение пока неясно. Существует предположение, что в нейроне, содержащем нейропептид и «классический» нейромедиатор, пептид может служить модулятором синаптической передачи, осуществляемой его основным медиатором [9].

Для проверки этой гипотезы факт сосуществования ХЦК с ДА лишь в одной из ДА-систем мозга представляет большой интерес и позволяет сопоставлять влияние ХЦК на синаптические процессы в тех

ДА-нейронах, где этот нейропептид сосуществует с ДА (мезолимбическая система), с его действием на ДА-нейроны, не содержащие ХЦК (нигростриатная система). Таким образом, нигростриатная ДА-система может служить контролем для тех эффектов ХЦК на ДА, которые не связаны с сосуществованием этих двух веществ в одном нейроне.

Поэтому в данной работе было проведено сравнительное изучение влияния ХЦК на интенсивность обмена ДА в областях проециций нейронов мезолимбической и нигростриатной систем.

Влияние ХЦК на функцию ДА-систем оценивали по его действию на спонтанную двигательную активность и вызванную фенаминную гиперактивность у мышей.

Материалы и методы

Интенсивность обмена ДА в проекции мезолимбической ДА-системы, в миндалине, прилежащем ядре, в нигростриатной ДА-системе, стриатуме, среднем мозгу и гипоталамусе определяли по содержанию самого ДА и продуктов его метаболизма—диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК)—в исследуемом отделе мозга. Опыты были выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 200—250 г. ХЦК (Институт медицинской химии, Сегед, ВНР) разводили в 0,9% NaCl и вводили внутривентриально в дозах 5, 15, 30, 100 мкг/кг. Контрольным животным вводили 0,9% NaCl. Через 30 мин крыс декапитировали и определяли содержание норадреналина (НА), ДА, ГВК и ДОФУК по методу Westernik, Korf [10]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре «Hitachi MPF—2 а».

О характере действия ХЦК на функцию ДА-нейронов судили по его влиянию на спонтанную двигательную активность и вызванную фенаминную гиперактивность. Вещества, облегчающие передачу в ДА-синапсах, увеличивают спонтанную двигательную активность, а ДА-блокаторы тормозят ее и уменьшают гиперактивность, вызванную агонистом ДА фенаминном [11]. Двигательную активность белых мышей массой 20—25 г измеряли на актометре ДАЭР-20. Двигательное возбуждение вызывали введением фенамина (3 и 5 мг/кг) за 30 мин до начала опыта; ХЦК (15 и 30 мкг/кг) вводили за 15 мин до начала регистрации двигательной активности (оба вещества вводили внутривентриально). Всего в опытах использовано 40 крыс и 45 мышей.

Статистический анализ результатов исследования производился по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Введение крысам 15 мкг/кг ХЦК вызывало значительное увеличение содержания продуктов обмена ДА—ГВК и ДОФУК в миндалине и прилежащем ядре (таблица). В стриатуме не наблюдали достоверных различий в уровне метаболитов ДА у контрольной и подопытной групп крыс. В среднем мозгу и гипоталамусе содержание ГВК и ДОФУК не

изменялось. Количество НА и ДА во всех исследованных областях оставалось практически таким же. Повышение концентрации продуктов метаболизма ДА в миндалине и прилежащем ядре без изменения содержания в стриатуме указывает на то, что ХЦК увеличивал высвобождение ДА в мезолимбической системе, не влияя на его обмен в nigrostriatalной ДА-системе.

Постоянство содержания самого ДА при увеличении его разрушения свидетельствовало об увеличении синтеза нейромедиатора в нейронах мезолимбической системы.

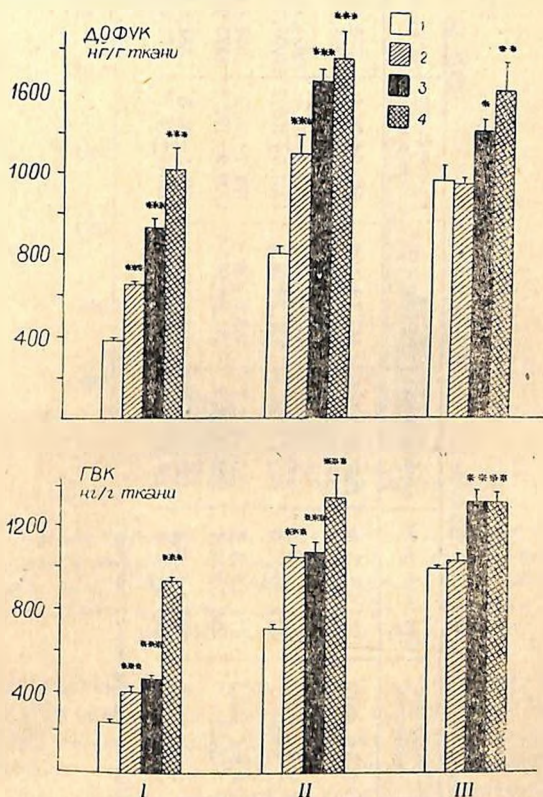


Рис. 1. Влияние разных доз холецистокинина на содержание ДОФУК и ГВК в миндалине (I), прилежащем ядре (II) и стриатуме (III) крыс: 1—0,9% NaCl; 2—5 мкг/кг ХЦК; 3—30 мкг/кг ХЦК; 4—100 мкг/кг ХЦК.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ —по сравнению с контролем

ХЦК в дозе 5 мкг/кг оказывал аналогичный, но менее выраженный эффект, а более высокие дозы ХЦК (30 и 100 мкг/кг), помимо лимбических структур, незначительно увеличивали содержание ГВК и ДОФУК и в стриатуме (рис. 1). Количество НА и ДА при этом во всех исследованных отделах оставалось прежним.

Таблица

Влияние ХЦК (15 мкг/кг) на содержание НА, ДА, ДОФУК и ГВК в мозгу крыс (нг/г)

Определяемые вещества	Вводимые вещества	Средний мозг	Гипоталамус	Миндаллина	Прилежащее ядро	Стриатум
НА	0,9% NaCl ХЦК	563,6 $\pm$ 72,0 599,9 $\pm$ 21,0	1367,5 $\pm$ 129,5 1333,8 $\pm$ 119,1	447,1 $\pm$ 20,9 461,7 $\pm$ 16,5	542,0 $\pm$ 26,4 531,9 $\pm$ 31,1	376,5 $\pm$ 26,9 355,3 $\pm$ 26,9
ДА	0,9% NaCl ХЦК	570,7 $\pm$ 42,9 577,7 $\pm$ 59,5	546,4 $\pm$ 76,1 632,2 $\pm$ 120,3	315,5 $\pm$ 18,9 321,7 $\pm$ 20,5	1244,5 $\pm$ 88,4 1263,9 $\pm$ 108,2	10954,7 $\pm$ 711,3 11005,3 $\pm$ 737,1
ДОФУК	0,9% NaCl ХЦК	177,4 $\pm$ 21,3 255,7 $\pm$ 52,1	273,7 $\pm$ 48,1 209,7 $\pm$ 52,6	309,6 $\pm$ 20,5 850,2 $\pm$ 103,9*	754,7 $\pm$ 56,2 1709,9 $\pm$ 182,9*	1373,1 $\pm$ 87,2 1373,9 $\pm$ 96,2
ГВК	0,9% NaCl ХЦК	192,1 $\pm$ 29,8 205,9 $\pm$ 21,5	180,2 $\pm$ 13,1 197,8 $\pm$ 20,9	428,9 $\pm$ 20,1 647,6 $\pm$ 50,9*	626,5 $\pm$ 30,5 1138,7 $\pm$ 86,7*	884,8 $\pm$ 51,2 871,0 $\pm$ 42,4

n=12, *p<0,001 по сравнению с контролем

В поведенческих тестах ХЦК (15 и 30 мкг/кг) значительно снизил спонтанную двигательную активность мышей и уменьшал гиперактивность, вызванную фенамином (рис. 2).

Проведенные эксперименты показали, что ХЦК может избирательно повышать обмен ДА в мезолимбической системе. Влияние ХЦК на обмен ДА в стриатуме было обнаружено лишь в дозах 30 мкг/кг, что примерно в 100 раз больше, чем необходимо для возникновения специфических поведенческих эффектов этого пептида [12].

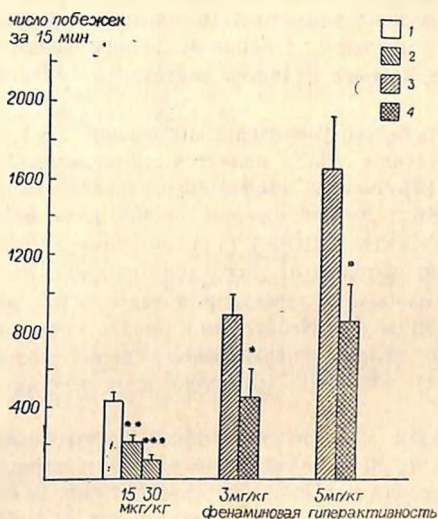


Рис. 2. Действие холестикинина на спонтанную двигательную активность мышей и двигательную гиперактивность, вызванную фенамином:

1—0,9% NaCl; 2—ХЦК; 3—фенамин; 4—фенамин+ХЦК (30 мкг/кг).

* $p < 0,05$ по сравнению с фенамином, ** $p < 0,01$ по сравнению с 0,9% NaCl,

*** $p < 0,001$ по сравнению с 0,9% NaCl

Иммуногистохимические исследования показали, что ХЦК не содержится в ДА-нейронах nigrostriatalной системы [7]. Более того, в стриатуме нет морфологического субстрата и для непосредственной пресинаптической регуляции ХЦК выделения ДА, поскольку ДА-терминали в этой структуре не несут на себе ХЦК рецепторов [8]. Все это позволяет считать, что действие больших доз ХЦК на nigrostriatalную ДА-систему неспецифично и не свидетельствует о наличии в этой области физиологического механизма регуляции ДА активности с помощью ХЦК.

Гораздо интереснее способность малых доз ХЦК избирательно изменять обмен ДА именно в той системе, в которой оба вещества сосуществуют в одних и тех же нейронах. Это позволяет предположить, что в ДА-синапсах, содержащих ХЦК, последний модулирует нейромедиа-

торные функции ДА. Исследование обмена ДА не может объяснить направленность действия ХЦК, поскольку интенсификацию этого процесса наблюдали как при усилении ДА функции (увеличение высвобождения ДА, торможение обратного захвата и т. п.), так и при ее торможении (к примеру, блокада ДА-рецепторов, приводящая к компенсаторному выбросу ДА). Однако поведенческие корреляты усиления и торможения ДА функций хорошо изучены, и поэтому, используя специальные тесты, можно судить о направленности действия ХЦК на активность ДА-системы. Эксперименты показали, что ХЦК тормозил спонтанную двигательную активность у мышей и устранял вызванное фенамином двигательное возбуждение, которое является следствием активации ДА-структур [11].

Можно полагать, что увеличение выделения ДА в мезолимбической системе при введении ХЦК является компенсаторной реакцией на вызываемое им торможение дофаминергической синаптической передачи. В пользу этого предположения говорит и то, что ХЦК устраняет поведенческие эффекты L-ДОФА [13], потенцирует гексабарбиталовый сон, вызывает птоз и тормозит исследовательское поведение [14], то есть обладает большим количеством поведенческих эффектов, свойственных антагонистам ДА. Необходимо, однако, отметить, что в некоторых проведенных экспериментах использовали высокие дозы ХЦК (100—200 мкг/кг), влияющие, очевидно, и на функции nigrostriatalной ДА-системы.

Таким образом, установленные нами факты позволяют высказать предположение, что ХЦК является модулятором дофаминергической синаптической передачи в мезолимбической системе, то есть в структурах, в которых он сосуществует с ДА в одних и тех же нейронах. Выделяющийся ХЦК, вероятно, может тормозить передачу информации в ДА-синапсах этой системы, напоминая по характеру своего действия эффекты ДА-блокаторов.

CHOLECYSTOKININ SELECTIVELY INCREASES DOPAMINE TURNOVER IN MESOLIMBIC SYSTEM

ANOKHIN K. V., KOGAN B. M., CHRISTOLUBOVA N. A.

P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology, USSR Academy of
Medical Sciences, Moscow

All-Union Research Institute of General and Forensic Psychiatry, Moscow

The effect of cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) on dopamine (DA) turnover in rat brain areas where both substances coexist in the same neuron (amygdala, n. accumbens) was compared with its action on DA turnover in the areas where DA neurons do not contain CCK-8 (striatum, hypothalamus). Intraperitoneal injection of 5 or 15 mcg/kg of CCK-8 markedly increased DA turnover in amygdala and n. accumbens but did not produce any changes in other areas. In addition to limbic structures high doses of CCK-8 (30 and 100 mcg/kg) slightly increased DA turnover in striatum.

In behavioural tests on mice CCK-8 inhibited the spontaneous locomotor activity and suppressed hyperactivity caused by amphetamine. It is supposed that in the neurons of mesolimbic DA system, where CCK-8 coexists with DA it may modulate DA activity by inhibiting DA synaptic transmission.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Dockray G. L. *Nature*, 264, 568—570, 1976.
2. Pinget M., Straus E., Yalow R. S. *Life Sci.*, 25, 4, 339—342, 1979.
3. Saito A., Sankaran H., Golfine I. D., Williams J. A. *Science*, 208, 1155—1156, 1980.
4. Dodd J., Kelly J. S. *Brain Res.*, 205, 337—350, 1981.
5. Emson P. C. *Progr. in Neurobiology*, 13, 1, 61—116, 1979.
6. Snyder S. H. *Science*, 209, 976—983, 1980.
7. Hokfelt T., Rehfeld J. F., Skirboll L., Ivemark B., Goldstein M., Markey K. *Nature*, 285, 476—478, 1980.
8. Hays S. F., Meyer D. K., Paul S. M. *Brain Res.*, 208, 214—222, 1981.
9. Hokfelt T., Lundberg J. M., Schultzberg M., Johansson, Ljungdahl A., Rehfeld J. F.—In: *Neural peptides and Neuronal Communications*. Eds: Costa E. M., Trabucchi M., Raven Press, N. Y., 1—23, 1980.
10. Westernik B. H. C., Korf J. *Eur. J. Pharmacol.*, 38, 281—291, 1976.
11. Clark W. G., Giudice J. D. (ed.) *Principles of psychopharmacology*. Academic Press, N. Y., 1978.
12. Mueller K., Hsiao S. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2, 79—87, 1978.
13. Itoh S., Katsuura G. *Eur. J. Pharmacol.*, 76, 313—317, 1981.
14. Zetler G. *Eur. J. Pharmacol.*, 66, 137—139, 1980.

НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина

АМН СССР, Москва

ВНИИ общей и судебной психиатрии им. Сербского

МЗ СССР, Москва

Поступила 15. III 1982

УЧАСТИЕ Ca^{2+} И Cl^- В ДЕЙСТВИИ ГАМК И ПИКРОТОКСИНА НА ВЫЗВАННОЕ K^+ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ^3H -НОРАДРЕНАЛИНА ИЗ СИНАПТОСОМ МЕЗОДИЭНЦЕФАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС

АРМЕНЯН А. Р., ЧИФЛИКЯН М. Д., БУНЯТЯН Г. Х.

Было изучено влияние ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение ^3H -норадреналина (^3H -НА) из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс и влияние пикротоксина на действие ГАМК в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} и Cl^- . Пикротоксин в концентрациях 10^{-5} — 10^{-3} М подавлял вызванное K^+ высвобождение ^3H -НА и не блокировал тормозящий эффект ГАМК на этот процесс. В бескальциевой среде вызванное K^+ высвобождение ^3H -НА ингибировалось. Дальнейших изменений в присутствии пикротоксина не наблюдалось; в этих условиях ГАМК не стимулировала высвобождение ^3H -НА, что происходило в отсутствие пикротоксина. При отсутствии Cl^- вызванное K^+ высвобождение ^3H -НА под действием пикротоксина подавлялось, и стимулирующее действие ГАМК на этот процесс блокировалось. В среде, из которой были удалены Ca^{2+} и Cl^- , вызванное высвобождение ^3H -НА из синапсом ингибировалось. При добавлении к этой среде ГАМК, пикротоксина или ГАМК на фоне пикротоксина ингибирование высвобождения ^3H -НА углублялось.

ГАМК является главным тормозным медиатором в ЦНС млекопитающих. Многие данные свидетельствуют, что в основе тормозящего действия ГАМК, кроме гиперполяризации, в некоторых структурах лежит и деполяризация. Деполяризующее пресинаптическое действие ГАМК показано в различных частях ЦНС (клиновидном ядре, обонятельной коре, спинном мозгу) [1—3], а также периферической НС (в ганглиях дорсальных корешков, верхнем шейном ганглии, синаптических ганглиях) [4—6].

Результаты исследований [7—9], показавшие при действии ГАМК усиление спонтанного высвобождения ^3H -норадреналина (НА) из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс и подавление высвобождения ^3H -НА, вызванное электрической стимуляцией, высокими концентрациями K^+ и протовератрином, указывают, что ГАМК деполяризует норадренергические нервные окончания и дают основание для предположения о ГАМК как возможном медиаторе пресинаптического торможения в этой области мозга. Показано также, что тормозящее действие ГАМК на вызванное деполяризацией высвобождение ^3H -НА из синапсом зависит от Ca^{2+} , и в его отсутствие направленность дей-

ствия ГАМК на этот процесс изменяется [8, 9]. Известно, что специфический блокатор действия ГАМК—пикротоксин антагонизирует как ее постсинаптическое, так и пресинаптическое действие [1, 4, 10—13]. Считается, что пикротоксин ингибирует действие ГАМК неконкурентно, влияя на ионную проницаемость мембраны, особенно на транспорт Cl^- [10, 14]. Для внесения некоторой ясности в понимание механизма действия ГАМК на высвобождение НА из нервных окончаний мезодиэнцефальной области мозга в настоящей работе изучено влияние пикротоксина на вызываемое K^+ высвобождение ^3H —НА из синапсом, выделенных из этой структуры, и на действие ГАМК на данный процесс в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} и Cl^- .

Материалы и методы

Синапсомы из мезодиэнцефальной области мозга крыс получали по методу Hajos [15]. Их инкубировали 10 мин в присутствии $5 \cdot 10^{-8}$ М ^3H —НА. Затем 1 мл инкубированной суспензии переносили в суперфузионные камеры на миллипоровые мембранные фильтры. Высвобождение ^3H —НА из синапсом изучали суперфузионным методом Raiteri и соавт. [16]. Суперфузию проводили со скоростью 1 мл/мин. Пробы брали каждые 30 с. ГАМК добавляли вместе с K^+ , пикротоксин—на 1 мин раньше ГАМК и K^+ . Радиоактивность суперфузионной среды и синапсом измеряли после добавления 0,5—1 мл этанола и 10 мл сцинтилляционной среды Брея на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique-SL-4221» (Франция). Величину высвобождения (i) рассчитывали по отношению радиоактивности суперфузионной среды к оставшейся радиоактивности синапсом (число распадов в мин). Подробности методики исследований описаны в предыдущих работах [7, 8].

Использовали Кребс-бикарбонатный буфер pH 7,2—7,4 со следующим составом (в mM): NaCl —113; KCl —4,75; KH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; NaHCO_3 —25; CaCl_2 —2,5; глюкоза—11,5. В буфер добавляли 0,1 мг/мл ипразида и 0,2 мг/мл аскорбиновой кислоты. В усиленной K^+ среде (40 mM) изотоничность раствора достигали изомолярным замещением NaCl на KCl . В бесхлорной среде Cl^- заменяли ионами ацетата и глюконата. В бескальциевую среду CaCl_2 не добавляли. Использовали ^3H —НА с удельной активностью 39 K_u /мМ фирмы «Amersham», ГАМК—фирмы «Reanal», пикротоксин и ипразид—фирмы «Sigma».

Результаты и обсуждение

Влияние ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга. Стимуляция синапсом 40 mM K^+ после 11-минутной преинкубации в Кребс-бикарбонатном буфере приводила к значительному усилению высвобождения ^3H —НА. При добавлении ГАМК вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА подавлялось (рис. 1, а). Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований [8]. Как видно из рис. 1, б, в, г, все использованные концентрации пикротоксина (10^{-5} — 10^{-3}

М) не влияли на спонтанное высвобождение ^3H —НА из синапсом. Изучение действия различных концентраций пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА показало, что при концентрации пикротоксина 10^{-5} — 10^{-3} М вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА подавлялось (рис. 1. б, в, г). Примечательно, что в присутствии пикротоксина (10^{-5} — 10^{-3} М) тормозящее действие ГАМК сохранялось (рис. 1,

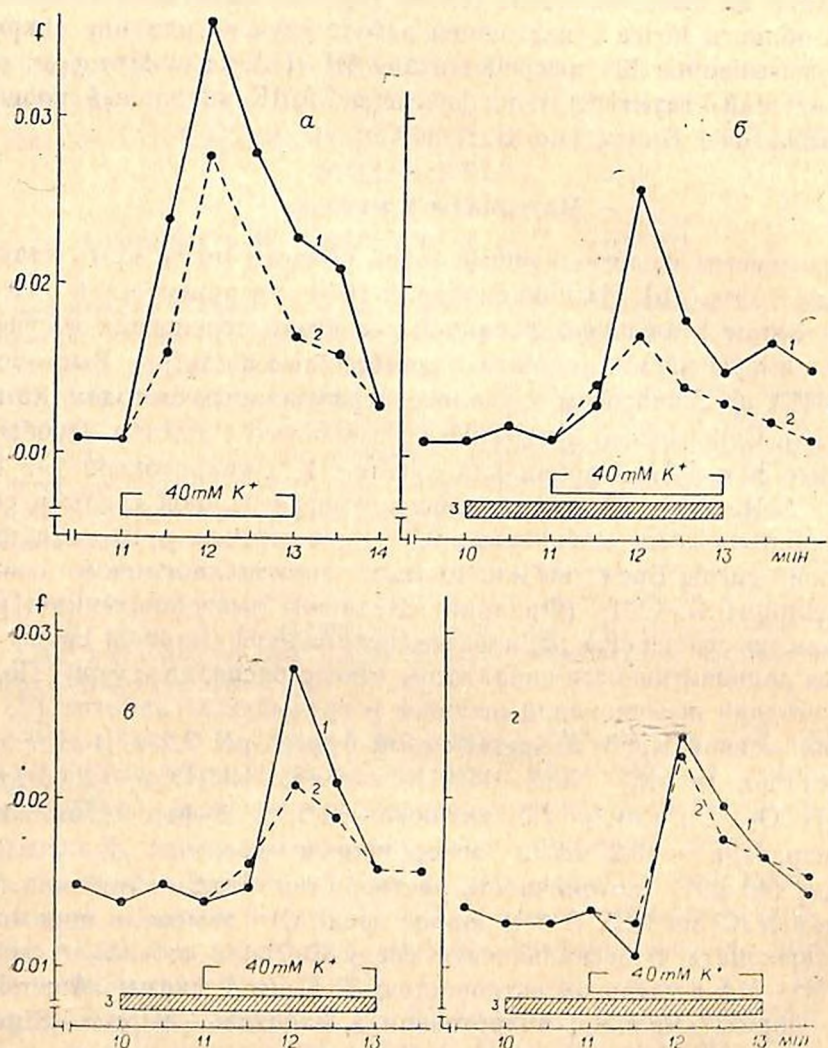


Рис. 1. Действие ГАМК (10^{-3} М) (пунктирная линия) на K^+ -вызванное высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс: а) в отсутствие и в присутствии различных концентраций пикротоксина (заштрихованная область), б) 10^{-5} М, в) 10^{-4} М, г) 10^{-3} М. Стандартное отклонение не более 10%. Средние данные 5—10 опытов

б, в, г). Таким образом, пикротоксин, подобно ГАМК, подавлял вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга и не блокировал действие ГАМК на этот процесс. ГАМК-подобное тормозящее действие пикротоксина (10^{-4} , 10^{-3} М)

описано на клетках Пуркинье [17]. Несмотря на то, что ГАМК и пикротоксин имели одинаковое тормозящее влияние на вызванное K^+ высвобождение 3H —НА из синапсом, в основе их действия, по всей вероятности, лежат разные изменения порадренигической нервной мембраны. Это можно предположить на основании того, что пикротоксин не действовал на спонтанное высвобождение 3H —НА из синапсом, тогда как ГАМК стимулировала этот процесс [7]. Степень ингибирования вызванного высвобождения 3H —НА при разных концентрациях пикротоксина различалась, а под действием ГАМК на фоне разных концентраций пикротоксина почти не изменялась (рис. 1, б, в, г).

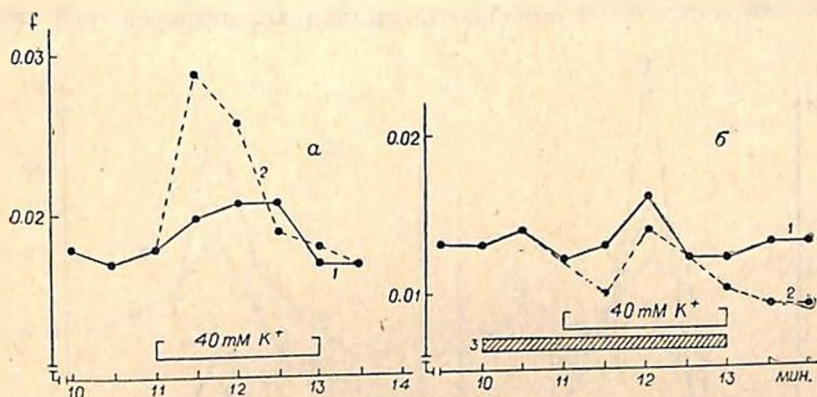


Рис. 2. Действие ГАМК (10^{-3} М) на K^+ -вызванное высвобождение 3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крысы: а) в отсутствие и б) в присутствии пикротоксина (10^{-3} М) в Ca^{2+} -свободной среде. Стандартное отклонение не более 10%. Средние данные 4—8 опытов. Обозначения те же, что и на рис. 1

Влияние ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение 3H —НА из синапсом мезодиэнцефальной области мозга в отсутствие Ca^{2+} . Полученные данные о подавлении под действием ГАМК высвобождения 3H —НА, вызванного электрической стимуляцией, добавлением 40 мМ K^+ или протовератрином [7—9] можно объяснить деполяризацией норадренигических нервных окончаний, при которой высвобождение медиатора является Ca^{2+} -зависимым процессом. Исследования показали, что вызванное K^+ и протовератрином высвобождение 3H —НА из синапсом блокируется в бескальциевой среде, но в присутствии ГАМК эффект деполяризующих веществ частично восстанавливается [8, 9], и стимулирующее действие ГАМК на спонтанное высвобождение 3H —НА из синапсом в бескальциевой среде сохраняется [9]. Это приводит к предположению, что под действием ГАМК, по всей вероятности, высвобождается Ca^{2+} из его внутриклеточных запасов. Исходя из этих данных, для выяснения участия Ca^{2+} в действии пикротоксина было изучено вызванное K^+ высвобождение 3H —НА в бескальциевой среде в присутствии пикротоксина. Как видно из рис. 2, а, вызванное K^+ высвобождение 3H —НА из синапсом в

бескальциевой среде ингибировалось, что было показано ранее [8]. Добавление пикротоксина не вносило ничего нового (рис. 2, б). В бескальциевой среде при добавлении ГАМК на фоне пикротоксина вызванное высвобождение ^3H —НА не стимулировалось (рис. 2, б), как это имело место в его отсутствие (рис. 2, а). В бескальциевой среде пикротоксин не проявляет ГАМК-подобного действия на вызванное высвобождение ^3H —НА из синапсом, следовательно, ГАМК и пикротоксин вызывают разные ионные изменения, и Ca^{2+} , вероятно, не вовлечен в действие пикротоксина. Есть данные, что пикротоксин влияет на K^+ -проводимость мембраны. Подавление под действием пикротоксина потенциалов дорсальных корешков, вызванных афферентной стимуля-

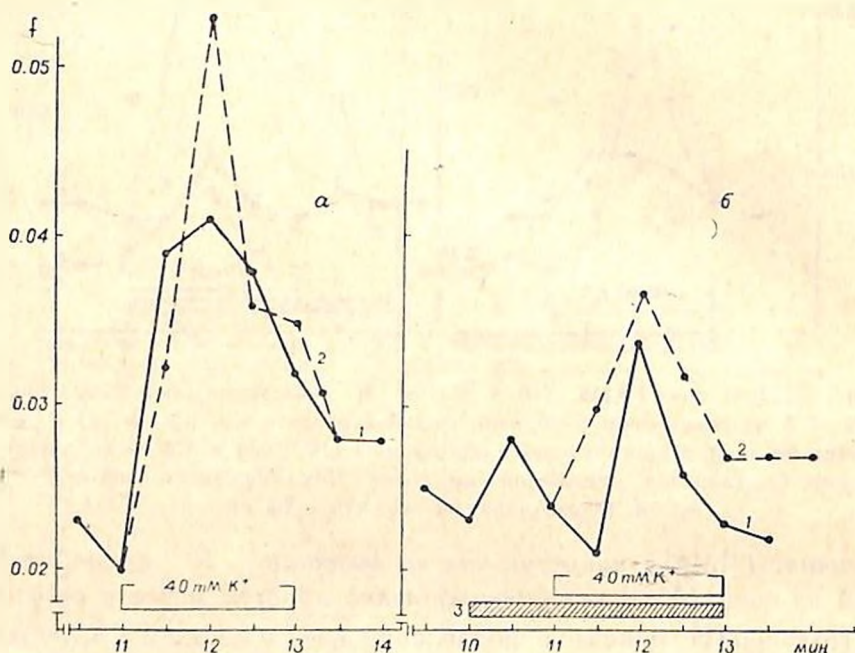


Рис. 3. Действие ГАМК (10^{-3} М) на K^+ -вызванное высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодienceфальной области мозга крыс: а) в отсутствие и б) в присутствии пикротоксина (10^{-3} М) в Cl^- -свободной среде. Средние данные 4—8 опытов. Стандартное отклонение не более 10%. Обозначения те же, что и на рис. 1

цией (при которой медиатором является ГАМК) и непосредственной аппликацией ГАМК, некоторые исследователи объясняли блокированием пикротоксином K^+ транспорта [18—20]. Возможно, в наших исследованиях подавление вызванного K^+ высвобождения ^3H —НА из синапсом пикротоксином, а также отсутствие стимулирующего действия ГАМК на высвобождение ^3H —НА в бескальциевой среде в присутствии пикротоксина были обусловлены изменением транспорта K^+ в синаптической мембране.

Влияние ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение ^3H —НА из синапсом мезодienceфальной области мозга в отсут-

ствие Cl^- . Полагают, что пикротоксин ингибирует действие ГАМК посредством блокирования хлорных каналов [10, 14]. Есть сведения, что в пресинаптическом действии ГАМК Cl^- играет важную роль [6]. И так как мы предполагаем, что ГАМК в мезодienceфальной области мозга является медиатором пресинаптического торможения, в следующей серии опытов было изучено влияние ГАМК на вызванное высвобождение ^3H -НА из синапсом в бесхлорной среде в отсутствие и в присутствии пикротоксина. Результаты исследований показали, что в бесхлорной среде 40 мМ K^+ стимулировали высвобождение ^3H -НА из синапсом, и ГАМК усиливала этот процесс (рис. 3, а), то есть в отсутствие Cl^- происходила реверсия действия ГАМК на вызванное K^+

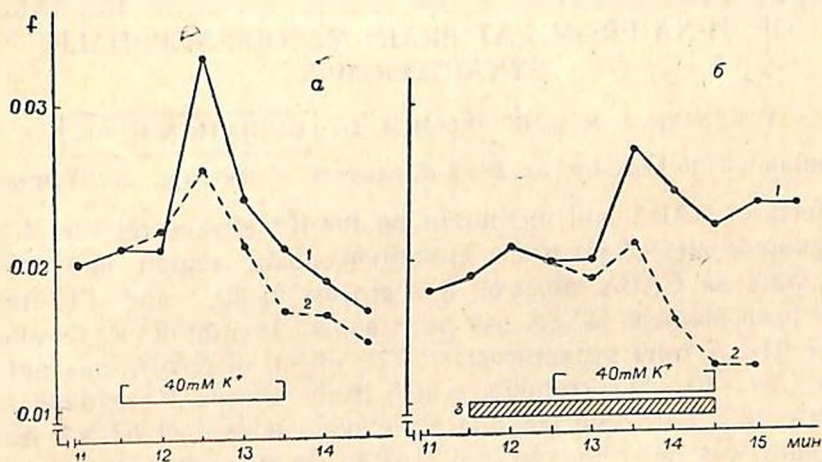


Рис. 4. Действие ГАМК (10^{-3} М) на K^+ -вызванное высвобождение ^3H -НА из синапсом мезодienceфальной области мозга крыс: а) в отсутствие и б) в присутствии пикротоксина (10^{-3} М) в Ca^{2+} и Cl^- -свободной среде. Средние данные 3–6 опытов. Стандартное отклонение не более 10%. Обозначения те же, что и на рис. 1

высвобождение ^3H -НА. В бесхлорной среде в присутствии пикротоксина вызванное высвобождение ^3H -НА из синапсом подавлялось. В этих условиях в присутствии пикротоксина ГАМК не вызывала изменений (рис. 3, б). Примечательно, что в отсутствие Cl^- пикротоксин стимулировал спонтанное высвобождение ^3H -НА из синапсом (рис. 3, б). Эти данные указывают на то, что Cl^- вовлечен как в действие ГАМК, так и пикротоксина, и, по всей вероятности, сдвиги транспорта Cl^- , вызванные ГАМК и пикротоксином, имеют противоположные направления, вследствие чего в бесхлорной среде пикротоксин подавлял вызванное высвобождение ^3H -НА, а ГАМК, наоборот, стимулировала этот процесс. Более того, в этой среде пикротоксин блокировал стимулирующее действие ГАМК на вызванное высвобождение ^3H -НА.

Когда из суперфузионной среды удаляли Ca^{2+} и Cl^- , вызванное высвобождение ^3H -НА из синапсом подавлялось и имело место тормозящее действие ГАМК на этот процесс (рис. 4, а). При этом пикро-

токсин ингибировал вызванное высвобождение ^3H —НА, и добавление ГАМК на фоне пикротоксина приводило к дальнейшему ингибированию процесса (рис. 4, б).

Сопоставляя полученные данные, можно полагать, что пикротоксин не блокирует пресинаптическое тормозящее действие ГАМК на высвобождение НА из норадренергических нервных окончаний мезодиэнцефальной области мозга. Это, по всей вероятности, обусловлено тем, что, кроме действия на транспорт Cl^- , ГАМК и пикротоксин вызывают и другие более существенные, но разные сдвиги в ионной проницаемости мембран норадренергических нервных окончаний.

INVOLVEMENT OF Ca^{2+} AND Cl^- IONS IN THE EFFECTS OF GABA AND PICROTOXIN ON THE K^+ -EVOKED RELEASE OF ^3H -NA FROM RAT BRAIN MESODIENCEPHALIC SYNAPTOSOMES

ARMENIAN A. R., CHIFLIKIAN M. D., BUNIATIAN H. Ch.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Arm. SSR, Yerevan

Effects of GABA and picrotoxin on the K^+ -evoked release of ^3H -NA from synaptosomes of rat brain mesodiencephalic region and influence of picrotoxin on GABA effect on this process in Ca^{2+} and Cl^- -free media has been studied. GABA has been shown to inhibit K^+ -evoked release of ^3H -NA from synaptosomes. The effect of GABA was not blocked by 10^{-5} — 10^{-3} M picrotoxin, which itself reduced K^+ -evoked release of ^3H -NA. In a Ca^{2+} -free medium K^+ -evoked release of ^3H -NA from synaptosomes was not observed and GABA has stimulated K^+ -evoked release. This effect of GABA was blocked by picrotoxin. In a Cl^- -free medium K^+ -evoked release of ^3H -NA from synaptosomes was not altered. Under these conditions GABA stimulated K^+ -evoked release of ^3H -NA while picrotoxin reduced this process. In the presence of picrotoxin the effect of GABA on the K^+ -evoked release was reversed. The results obtained indicate that picrotoxin does not block the presynaptic inhibitory effect of GABA in the brain mesodiencephalic region.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Davidson N., Southwick A. B. J. Physiol. Lond., 210, 172P, 1970.
2. De Groat W. C. J. Pharmacol., 172, 384—396, 1970.
3. Galvan M., Scholfield C. N. J. Physiol., 284, 129—130, 1978.
4. De Groat W. C., Lalley P. H., Saum W. P. Brain Res., 44, 273—277, 1972.
5. Bowery N. G., Brown D. A. Br. J. Pharmacol. 50, 205—213, 1974.
6. Adams P., Brown D. A. J. Physiol. Lond., 250, 85—120, 1975.
7. Армянян А. Р., Чифликян М. Д., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 14, 135—142, 1980.
8. Чифликян М. Д., Армянян А. Р., Бунятян Г. Х. Физиол. ж. СССР, 67, 1001—1006, 1981.
9. Армянян А. Р., Чифликян М. Д. Физиол. ж. СССР, 67, 1265—1268, 1981.
10. Takeuchi A., Takeuchi N. J. Physiol., 205, 377—391, 1969.
11. Galindo A. Brain Res., 14, 763—767, 1965.

12. *Barker J. L., Nicoll R. A.* Science, 176, 1043—1057, 1972.
13. *Kelly J. S., Renaud L. P.* Nature, New Biology, 232, 25—26, 1971.
14. *Takeuchi A., Takeuchi N. J.* Physiol., 212, 337—351, 1971.
15. *Hajos F.* Brain Res., 93, 485—489, 1975.
16. *Ralteri M., Angelini F., Levi G.* Eur. J. Pharmacol., 25, 411—414, 1974.
17. *Gahwiler B. H.* Brain Res., 99, 85—95, 1975.
18. *Krnjević K., Morris M. E.*—In: Drugs and Central Synaptic Transmission (eds. Bradley P. B., Dhawan B. N.), McMillan, London, p. 273—282, 1976.
19. *Freeman A. R. J.* Neurobiol., 4, 567—582, 1973.
20. *Stková E., Vyklíček L.* Neuroscience, 3, 1001—1007, 1978.

Институт биохимии
АН АрмССР, Ереван

Поступила 16. XI 1981

УДК 577.1:547.96+612.822.1:547.96

ВНУТРИЯДЕРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА S-100 В МОЗЖЕЧКЕ БЫКА

КАПРАЛОВ А. А., СМЕРЧИНСКАЯ Л. С., БЕЛИК Я. В., ТЮЛЕНЕВ В. И.

Методом иммунодиффузии изучали наличие нейроспецифического белка S-100 во фракциях, образующихся при дифференциальной экстракции изолированных ядер мозжечка быка. Наличие белка обнаружено в ядерном соке и ядерной мембране. Белок S-100 не выявлен в исходном препарате хроматина и его фракциях, полученных методом хроматографии на гидроксипатите. Обсуждаются возможные механизмы действия белка S-100 в реализации генетической информации.

С помощью иммуногистохимических методов установлено наличие нейроспецифического белка S-100 в ядрах нейронов и отсутствие его в ядрах глиальных клеток [1—4]. Обнаружены также специфические участки связывания этого белка в изолированных ядрах [5]. Показано, что белок S-100 может стимулировать активность РНК-полимеразы [6]. На возможную роль этого белка в процессах регуляции экспрессии генома указывает также его способность увеличивать включение ^{32}P в ядерные белки при его добавлении к препаратам ядерной протеникиназы [7]. В то же время фосфорилирование как негистоновых белков [8], так и гистонов [9] имеет важное значение в регуляции активности генов.

Для выяснения функции белка S-100 в клеточных ядрах и механизма его действия необходимо знание его субъядерной локализации, что и являлось целью настоящей работы.

Материалы и методы

Ядра выделяли из 50 г серого вещества мозжечка быка и проводили дифференциальную экстракцию белков, в основном, по методу Burdman [10]. Изолированные ядра суспендировали в 30 мл раствора, содержавшего 0,14 М NaCl, 0,02 М трис-HCl и 0,005 М MgCl_2 (pH 7,5). После 30-минутного экстрагирования надосадочную фракцию отделяли центрифугированием при 27 000 г в течение 20 мин; осадок экстрагировали последовательно дважды таким же объемом 0,35 М NaCl. Осадок после извлечения растворимых белков дважды суспендировали в 30 мл 2 М NaCl и энергично перемешивали с помощью магнитной мешалки 60 мин с последующим центрифугированием в течение 30 мин при 27 000 г. Оба гелеобразных экстракта рассматривали как

фракции дезоксирибонуклеопротенов (ДНП). Остаток ядерной фракции, нерастворимый в 2 М NaCl и представленный, главным образом, ядерными мембранами и, видимо, ядрышками и элементами рибонуклеопротеидной сети, экстрагировали в 10 мл 0,05 н. NaCl (щелочерастворимая фракция 1) с последующим центрифугированием. В части опытов из остатка ядерной фракции получали экстракт с помощью 0,2%-ного раствора дигитонина. Осадок обозначали как остаточную фракцию. Для дальнейшего разделения белков ДНП фракции экстракт, полученный с помощью 2 М NaCl, диализировали против 13 объемов охлажденной воды 15—16 ч и центрифугировали при 20000 g 20 мин. Надосадочную фракцию (фракцию ДНП, растворимую в 0,14 М NaCl) исследовали отдельно, а осадок последовательно обрабатывали 10 мл 0,25 н. HCl и 0,1 н. NaOH и получали соответственно кислоторастворимую фракцию и щелочерастворимую фракцию 2.

В отдельных опытах из фракции ядер получали хроматин методом, предложенным Bloom, Anderson [12]. Хроматин фракционировали при помощи хроматографии на гидроксипатите, используя последовательно растворы: 0,35 М NaCl, 1 М NaCl, 2 М NaCl и 2 М NaCl с 5 М мочевиной. Все растворы готовили на 0,8 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Гидроксипатит готовили по методу Siegelman и соавт. [13].

Ядрышки получали, в основном, по методу Busch [14]. При этом ядра суспендировали в растворе 0,25 М сахарозы, озвучивали в течение 3 мин при 15 кГц и центрифугировали 15 мин при 4500 g, наслоив их на 30%-ный раствор сахарозы. Осадок ресуспендировали в 0,25 М сахарозе и еще два раза очищали подобным образом.

Мембраносвязанный белок S-100 экстрагировали 5%-ным пентанолом [15, 16] из осадка ядер, отмытых раствором, содержащим 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ MgCl₂.

Все полученные субъядерные фракции исследовали методом иммунодиффузии по Ouchterlony в модификации Гусева и Цветкова [17]. В этих исследованиях была использована специфическая кроличья антисыворотка, полученная к бычьему белку S-100 [18].

Электрофорез белковых фракций проводили в 7%-ном геле в системе геля № 1 по Мауреру [19] с добавлением ЭДТА и 2-меркаптоэтанола (1 мМ) или с использованием 1%-ного додецилсульфата натрия [20].

Результаты и обсуждение

Согласно данным электронной и световой микроскопии, полученные препараты ядер не содержали цитоплазматических загрязнений, и их морфологическая структура была сохранена (рис. 1). Отношение белок/ДНК в них составляло 4,6, что соответствует чистым ядрам по критериям, предложенным Busch [21].

Вначале ядра фракционировали по модифицированному нами методу Michetti и соавт. [22]. При использовании метода двойной иммунодиффузии в геле (рис. 2) белок S-100 был обнаружен в растворимой

фракции, экстрагируемой при последовательном применении растворов 0,14 М NaCl и 0,35 М NaCl. Из двух последовательных экстрактов ДНП только первый взаимодействовал с иммунной сывороткой в иммунодиффузионных опытах. Фракция ДНП, образующаяся в результате понижения концентрации соли до 0,14 М NaCl, также взаимодействовала с антисывороткой к белку S-100. Иммунодиффузионным методом белок S-100 не был выявлен во фракциях кислот- и щелочерастворимых ядерных белков. Четкое взаимодействие со специфической антисывороткой в иммунодиффузионном тесте было обнаружено для фракции, экстрагируемой щелочью или дигитонином из остатка ядер после экстракции 2 М NaCl.

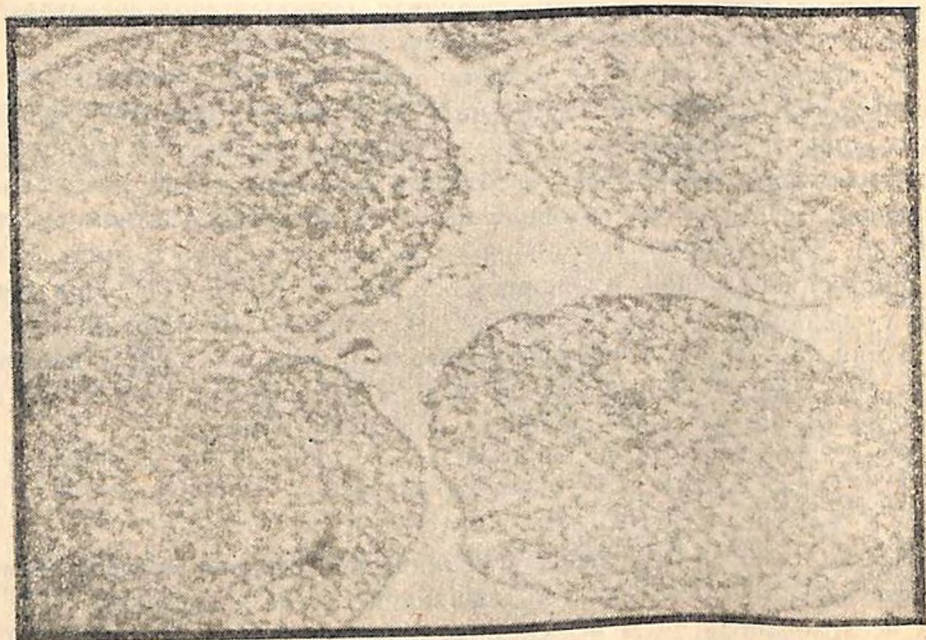


Рис. 1. Электронномикроскопическое изображение ядер мозжечка;
× 20 000 раз

На рис. 3 представлены результаты электрофореза полученных субъядерных фракций в 7%-ном ПААГ. Необходимо отметить, что существенная часть материала всех фракций оставалась на старте и не входила в разделяющий гель. Значительная часть белка мигрировала с бромфеноловым синим, примененным в качестве маркера фронта. Эта же зона белка, но выраженная гораздо слабее по сравнению с таковыми других субъядерных фракций, имеется также в щелочерастворимой фракции 2, экстрагируемой из ДНП. Очевидно, эта белковая зона не содержит белка S-100, хотя нельзя исключить того, что он может терять иммунологическую активность в результате воздействия химических агентов.

Полученные результаты в целом как будто бы согласуются с данными, согласно которым белок S-100 был обнаружен в растворимой

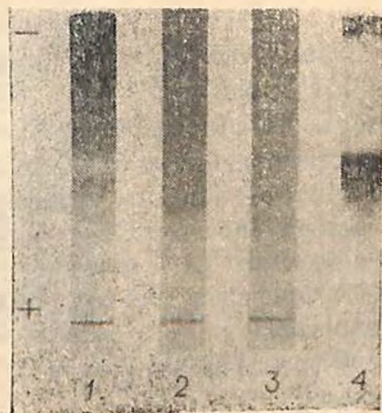
фракции ядер, ДНП комплексе и остаточной фракции [20]. Однако из двух последовательных экстрактов ДНП с иммунной сывороткой взаимодействовал только первый. Белок S-100, обнаруженный в ДНП комплексе, полностью переходит в надосадочную фракцию после снижения концентрации NaCl до 0,14 М. Кроме того, электрофоретические спектры белков растворимой фракции ядер и белков, переходивших в раствор при днализе ДНП фракции, были подобны. На основании этих фактов сделано предположение о возможном взаимозагрязнении растворимой фракции ядер и ДНП при выделении. Поэтому далее была модифицирована схема фракционирования ядерных белков путем увеличения объема и количества применяемых отмывок и использования метода хроматографии на гидроксипатите.



Рис. 2. Иммунодиффузионный анализ суб-фракций ядер. 1—растворимые белки ядер; 2—фракция ДНП; 3—щелочерастворимая фракция 2; 4—щелочерастворимая фракция 1; 5—фракция ДНП, растворимая в 0,10 М NaCl; 6—белок S-100

Необходимо было выяснить вопрос, содержится ли белок S-100 в хроматине и на какой стадии получения последнего он может экстрагироваться. Во избежание взаимозагрязнения получаемых фракций на каждом этапе получения хроматина ядра экстрагировали небольшими объемами соответствующих растворов (1/3 от веса ткани), центрифугировали и в надосадочной фракции после днализа и концентрирования методом иммунодиффузии определяли присутствие белка S-100. Полученные осадки экстрагировали еще 3—4 раза объемом раствора, рав-

Рис. 3. Диск-электрофореграммы белков субъядерных фракций. 1—растворимые белки ядер; 2—фракция ДНП, растворимая в 0,14 М NaCl; 3—щелочерастворимая фракция 1; 4—щелочерастворимая фракция 2



ным исходному весу ткани. Препараты хроматина имели следующие характеристики: $E_{230}/E_{260} = 1,1$, $E_{260}/E_{320} = 13$, что является свидетельством его чистоты [23]. В суммарном хроматине, полученном таким образом, белок S-100 не обнаруживался. Используя метод иммунодиффузии, было показано (рис. 4), что он полностью экстрагировал из ядер уже первым раствором, который применяется для получения хроматина и

содержит 80 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА (рН 6,5). Предполагая, что белок S-100 может связываться с другими белками и ДНК и поэтому не диффундировать в геле, было проведено фракционирование хроматина с использованием гидроксипатита. Во фракциях белка, полученных при отмывке гидроксипатита растворами с возрастающими концентрациями NaCl и мочевиной, белок S-100 также не обнаруживался (рис. 4), хотя во всех фракциях, образовавшихся как при очистке хроматина, так и при его фракционировании была выявлена белковая полоса, мигрирующая вместе с фронтом бромфенолового синего в 10,5%-ном ПААГ с додецилсульфатом натрия (рис. 5).

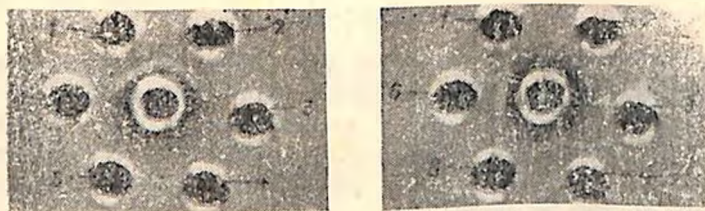


Рис. 4. Иммунодиффузионный анализ экстрактов, образующихся при выделении хроматина (а) и его фракционировании на гидроксипатите (б). а) 1—белок S-100; 2—экстракт исходных ядер раствором 80 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА; 3—экстракт раствором 0,15 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА (рН 7,0); 4—экстракт раствором 1,5 мМ NaCl, 0,15 мМ цитрата натрия (рН 7,0); 5—исходный хроматин; 6—физиологический раствор б) 1—экстракт хроматина раствором 0,35 М NaCl, 80 мМ фосфата натрия (рН 7,0); 2—экстракт раствором 1 М NaCl, 80 мМ фосфата натрия (рН 7,0); 3—экстракт раствором 2 М NaCl, 80 мМ фосфата натрия; 4—экстракт раствором 2 М NaCl, 5 мМ мочевины, 80 мМ фосфата натрия (рН 7,0); 5—экстракт раствором 2 М NaCl, 5 М мочевины, 0,5 М фосфат натрия (рН 7,0); 6—белок S-100

При последовательном применении для экстракции ядер растворов 0,14 М NaCl (рН 7,0), 0,14 М NaCl (рН 8,0), 0,3 М NaCl (рН 8,0) объемы которых превышали вес исходной ткани в 5; 1,5 и 1,5 раза соответственно, белок S-100 обнаруживался в каждом из этих экстрактов (рис. 6). Первым раствором проводили одну экстракцию, вторым и третьим—по три. Однако при применении второго раствора в больших объемах (в 7 раз превышавшем вес взятой ткани) белок S-100 экстрагировался только первыми двумя растворами. Белок S-100 был обнаружен также в осадке, образовавшемся после обработки ядер этими растворами; в этом случае он экстрагировался 5%-ным пентанолом.

Можно сделать вывод, что белок S-100 не входит в состав хроматина, а локализуется в нуклеоплазме и на ядерной мембране. Подобные результаты были получены и с использованием иммунофлуоресцентной техники [11, 24]. Не исключено, что белок S-100, локализующийся в нуклеоплазме, образует два различных пула, так как раствором 0,14 М NaCl при рН 7,0 экстрагируются ядерные рибосомы, а пр

pH 8,0—ядерные РНП и некоторые другие белки [25]. Обнаружение белка S-100 в составе хроматина [22], по-видимому, можно объяснить недостаточной отмывкой последнего от белков нуклеоплазмы.

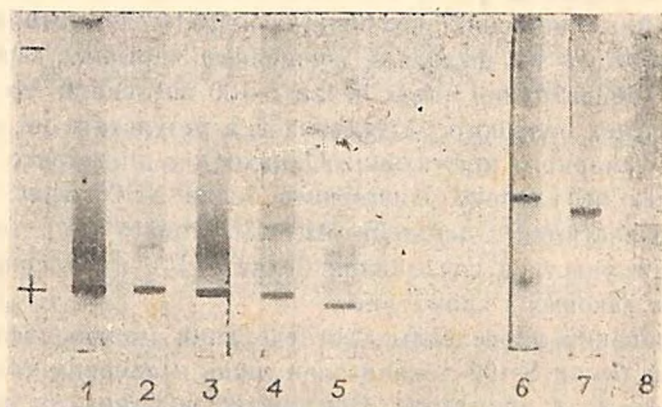


Рис. 5. Диск-электрофореграммы белковых фракций, полученных при выделении хроматина и фракционировании его на гидроксипатите (электрофорез фракций 1—5 проводили в течение 3 ч, а фракций 6—8—2,5 ч). 1—фракция, экстрагируемая из ядер раствором 80 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА (pH 6,5); 2—фракция, экстрагируемая из ядер раствором 1,5 мМ NaCl и 0,15 мМ цитрата натрия (pH 7,0); 3—хроматин; 4—фракция, экстрагируемая из хроматина раствором 0,35 М NaCl и 80 мМ фосфата натрия (pH 7,0); 5—фракция, экстрагируемая раствором 1 М NaCl и 80 мМ фосфата натрия (pH 7,0); 6—фракция, экстрагируемая раствором 2 М NaCl, и 80 мМ фосфата натрия (pH 7,0); 7—фракция, экстрагируемая раствором 2 М NaCl, 5 М мочевины, 80 мМ фосфат натрия (pH 7,0); 8—фракция, экстрагируемая раствором 2 М NaCl, 5 М мочевины, 0,5 М фосфата натрия (pH 7,0)



Рис. 6. Иммунодиффузионный анализ экстрактов при фракционировании ядер. 1—фракция, экстрагируемая из ядер раствором 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 7,0); 2—фракция, экстрагируемая 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 8,0); 3—фракция, экстрагируемая 0,3 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 8,0); 4—фракция, экстрагируемая 0,3 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 8,0) после интенсивной экстракции раствором 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 8,0); 5—фракция, экстрагируемая 5% пентанолом; 6—ядрышки

Была предпринята попытка выяснить, содержится ли белок S-100 в ядрышках. Учитывая способность белка S-100 увеличивать актив-

ность РНК-полимеразы I [6], можно предположить, что его функции связаны именно с этой структурой. В работах с использованием иммуофлуоресценции получены как данные о том, что белок S-100 входит в состав ядрышка [3, 4, 27], так и что он там отсутствует [1, 2, 26]. Полученные в наших условиях препараты хроматина содержали ядрышки, поэтому мы выделили очищенные ядрышки, так как в случае низких концентраций в них белка S-100 последний мог бы маскироваться за счет большого разведения и в результате не определяться в составе суммарного хроматина. Однако и в препарате изолированных ядрышек не удалось обнаружить белка S-100 (рис. 6). Эти результаты согласуются с данными Michetti, Donato [27], которые показали наличие участков связывания белка S-100 на ядерной мембране и отсутствие таковых в хроматине.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что ядерный белок S-100 локализован лишь в ядерном соке и ядерной мембране, но не в хроматине. Следовательно, вряд ли он может непосредственно принимать участие в регуляции генетической активности клетки на уровне транскрипции. Однако, оказывая влияние на фосфорилирование ядерных белков и, возможно, на другие процессы в ядре, белок S-100 может опосредованно изменять степень экспрессии генома, а также участвовать в посттранскрипционной регуляции на этапах процессинга и транспорта РНК.

INTRANUCLEAR DISTRIBUTION OF NEUROSPECIFIC PROTEIN S-100 IN BOVINE CEREBELLUM

KAPRALOV A. A., SMERCHINSKAYA L. S., BELIK Ya. V., TJULENEV V. I.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

The presence of neurospecific protein S-100 has been studied by means of Ouchterlony immunodiffusion technique in the fractions obtained on differential extraction of isolated nuclei from bovine cerebellum. The protein was discovered in the nuclear juice and membrane. S-100 was not detected in the initial chromatin preparation and its fractions. When all chromatin fractions were subjected to SDS gel electrophoresis a protein zone had been detected that comigrated with bromphenol blue and didn't crossreact with antiserum against S-100. A possible mechanism of S-100 involvement in the realization of genetic information is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hyden H., Mc Ewen B. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 354—358, 1966.
2. Hansson H. A., Hyden H., Ronbäck L. Brain Res. 98, 349—352, 1975.
3. Корочкин Л. Н., Свиридов С. М., Иванов В. Н., Малецкая Е. И., Бахтина Т. К., ДАН СССР, 204, 468—470, 1972.
4. Свиридов С. М., Корочкин Л. Н., Иванов В. Н., Малецкая Е. И., Бахтина Т. К. J. Neurochem., 19, 713—719, 1972.
5. Donato R., Michetti F. J. Neurochem., 36, 1698—1705, 1981.

6. Miani N., Michetti F., De Renzis G., Caniglia A. *Experientia*, 29, 1499—1501, 1973.
7. Perumal A., Rapport S. *Life Science*, 22, 363—368, 1978.
8. Уманский С. Р. *Успехи биол. химии*, 17, 26—44, 1976.
9. Jonson J. D., Douvas A., Bolker J. *Int. Rev. Cyt.*, 4, 273—361, 1979.
10. Burdman J. A. *J. Neurochem.*, 19, 1459—1469, 1972.
11. Soudek D., Beneš L. *Folia Biol. (Prague)*, 1, 261—267, 1955.
12. Bloom N. S., Anderson J. N. *J. Biol. Chem.*, 253, 4446—4450, 1978.
13. Siegelman H. W., Wleczorek G. A., Turhern B. C. *Anal. Biochem.*, 402—404, 1965.
14. Busch H.—In: *Methods of Enzymol.*, 12, p. A. (Ed. by L. Grossman, K. Moldave), New York—London, Acad. Press, p. 421—448, 1967.
15. Rusca G., Calissano P., Alema S. *Brain Res.*, 49, 223—227, 1973.
16. Haglid K. G., Stavrou D. J. *J. Neurochem.*, 20, 1523—1532, 1973.
17. Гусев А. А., Цветков В. С. *Лабор. дело*, № 2, 43—45, 1961.
18. Смерчинська Л. С., Белік Я. В., Сироватська Л. П., Бірилло Г. М. *Укр. біохім. ж.*, 48, 609—614, 1976.
19. Маурер Г. *Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле*, М., Мир, 1971.
20. Laemmli U. K. *Nature*, 227, 680—685, 1970.
21. Busch H.—In: *Methods of Enzymol.* v. 12, p. A. (Ed. by L. Grossman, K. Moldave). New York—London, Acad. Press., p. 448—467, 1967.
22. Michetti F., Miani N., De Renzis G., N., Caniglia O., Correr S. *J. Neurochem.*, 22, 239—244, 1974.
23. Shaw M. M. J., Huang R. Ch. C. *Biochemistry*, 9, 4530—4542, 1970.
24. Tabuchi K., Kirsch M., Nakane P. K. *J. Neurol. Sci.*, 28, 65—76, 1976.
25. Георгиев Г. П., Самарина О. П. *Успехи биол. химии*, 10, 5—63, 1969.
26. Coechia D. *Neurosci. Lett.*, 13, suppl № 3, 158, 1979.
27. Michetti F., Donato K. *J. Neurochem.*, 36, 1706—1711, 1981.

Институт биохимии
им. А. В. Палладина
АН УССР, Киев

Поступила 15. VI 1982

УДК 547.963

ДЕЙСТВИЕ НОРАДРЕНАЛИНА НА ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., ФРАПКИНА Т. Я.

Показано, что норадреналин (НА) снижал активность формы 1 сАМР-зависимой протеникиназы (ПКазы) в цитозоле и увеличивал ее в ядрах клеток головного мозга крыс.

Изучено также фосфорилирование эндогенных субстратов ядерных ПКаз мозга. Обнаружено 4 фракции фосфорилирующихся белков, одна из которых обладала РНК-полимеразной активностью. Одним из механизмов действия НА на фосфорилирование ядерных белков в нервной ткани может быть транслокация цитоплазматической сАМР-зависимой ПКазы в ядро. Показано, что влияние НА на генетический аппарат нервной ткани может быть опосредовано сАМР.

Эффекты сАМР реализуются, в основном, через активацию протеникиназ (ПКаз), катализирующих фосфорилирование белков [1]. Реакции фосфорилирования—дефосфорилирования белков, по-видимому, являются одним из важных механизмов, регулирующих функциональную активность клетки [2]. В последнее время интенсивно исследуют ядерные ПКазы и их участие в процессах транскрипции и депрессии генома [3]. Показано, что в ядро транслоцируется каталитическая субъединица ПКаз, и ее специфическое воздействие на акцепторные участки хроматина сопровождается фосфорилированием ядерных белков [4—6]. Появились сведения о возможной миграции свободных регуляторной и каталитической субъединиц, а также комплекса холофермент—сАМР из цитоплазмы в ядро [7]. Взаимодействие сАМР с регуляторной субъединицей сАМР-зависимой ПКазы может стимулировать не только фосфорилирование белков, но и процессы транскрипции по типу стероид-рецепторных комплексов [8].

В нервной, как и в других тканях, ПКазы опосредуют эффекты сАМР в ответ на действие гормонов или нейромедиаторов, фосфорилируя белки синаптических мембран, ферменты, участвующие в синтезе нейромедиаторов и т. д. [9]. Согласно модели, предложенной Williams [10], фосфорилирование ядерных белков в нервной ткани, осуществляемое ядерными ПКазами, может принимать участие в депрессии генома и контролировать таким образом функциональную активность ЦНС. Однако в механизме действия нейромедиаторов и сАМР на фосфорилирование ядерных белков мозга многое еще остается неясным.

Настоящая работа была посвящена изучению механизма действия НА на фосфорилирование ядерных белков и активность ядерных ПКаз, а также выявлению эндогенных субстратов указанных ферментов в нервной ткани.

Материалы и методы

Опыты были проведены на белых крысах массой 100—150 г. Активность ПКазы определяли по методу Chuang и др. [11]. Инкубационная среда содержала: 50 мМ трис-НСl (рН 6,5), 8 мМ $MgCl_2$, 2,5 мМ теофиллина, 550 мкМ γ - ^{32}P -АТР ($2-5 \times 10^5$ имп/мин в пробе), 6,2% глицерина, 0,6 мг/мл суммарного гистона и 25—40 мкг фермента. Инкубацию проводили при 30° в течение 15 мин. Реакцию начинали добавлением фермента и останавливали охлаждением инкубационной смеси до 4°. К реакционной смеси добавляли 50 мкл 50%-ной ТХУ, содержащее пробирки наносили на смоченный стандартный диск диаметром 24 мм из бумаги Whatman 3 ММ, пробирку промывали 200 мкл 25%-ной ТХУ. Фильтры промывали 4 мл 10%-ной ТХУ, 4 мл раствора солевой смеси (10 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ $Na_4P_2O_7$, 10 мМ Na_2WO_4), далее 4 мл смеси спирт-ацетон (1:1) и, наконец, 2 мл ацетона. Высушенные фильтры заливали 10 мл толуольного сцинтиллятора и измеряли радиоактивность на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «Intertechnique-SL-30» (Франция).

Определение активности РНК-полимеразы проводили по методу, описанному Hirsch, Marielo [12]. Инкубационная смесь в объеме 50 мкл содержала в мкмоль: трис-НСl—2 (рН 7,9), АТР, GTP, CTP—по 0,3; $MnCl_2$ —0,1, ^{14}C -УТР ($1-2 \times 10^6$ имп/мин в пробе)—0,018, $(NH_4)_2 SO_4$ —2,6; ДНК тимуса—20 мкг (в контрольную пробу ДНК не добавляли) и белковый раствор—10—15 мкг. Инкубацию проводили 10 мин при 37°, после чего инкубационную смесь охлаждали до 0° и наносили на смоченный 5%-ной ТХУ стандартный диск диаметром 24 мм из бумаги Whatman 3 ММ. В дальнейшем такой фильтр промывали на воронке с водоструйным насосом 4 раза по 5 мл охлажденной 5%-ной ТХУ и один раз 10 мл охлажденного 95%-ного этанола. Высушенные фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы и измеряли радиоактивность.

Срезы готовили на микротоме ($d=0,4$ мм) из замороженного мозга. Инкубацию срезов с НА в концентрации 500 мкМ [13] проводили согласно Reddington и соавт. [14]. Инкубационная среда содержала в мМ: NaCl—128; KCl—6,3; $CaCl_2$ —2,8; $MgSO_4$ —1,3; трис-НСl (рН 7,4)—25; глюкозы—10; АТР—5. Инкубацию проводили при 37° в течение 15 мин из расчета 5 мл инкубационной смеси на 1 г срезов. В контроле срезы инкубировали без НА в тех же условиях. После инкубации смесь охлаждали и центрифугировали 10 мин при 11 000 g.

Ядра из срезов мозга крысы получали по методу, описанному Majumder [15]. Для получения ядерных белков ядра суспендировали в буфере, содержащем 1 М NaCl; 0,02 М трис-НСl (рН 7,5); и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Далее к го-

могенату добавляли 1,5 объема 0,02 М трис-НСl (рН 7,5) и оставляли на 30 мин. Суспензию центрифугировали 1 ч при 20 000 g. Супернатант анализировали в течение ночи против 0,4 М NaCl, 0,02 М трис-НСl (рН 7,5). Все процедуры проводили при 4°.

Для получения цитозольной фракции белков срезы после инкубации суспендировали в трех объемах 0,32 М сахарозы, центрифугировали 45 мин при 20 000 g и собирали надосадочную жидкость. Далее проводили хроматографию ядерных и цитоплазматических белков на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (0,9×30). Элюцию осуществляли в градиенте NaCl (0—0,4 М) со скоростью 20 мл/ч, собирали фракции по 2 мл, в элюатах определяли активность ПКаз. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и др. [16].

В работе были использованы: γ -³²-Р-АТР „Amersham“ (Англия), ¹⁴С-АТР, ¹⁴С-УТР „UBBR“ (Чехословакия), АТР, GTP, CTP „Reanal“ (Венгрия), суммарный гистон „Sich“ (Польша), сефадекс G-200, G-50, „Pharmacia“ Швеция, тритон X-100 „Schuchardt“ (ФРГ), ДЭАЭ-32-целлюлоза „Whatman“ (Англия), ДНК тимуса „Олайн“ (г. Рига), норадреналин „Koch-Light“ (Англия).

Результаты и обсуждение

Действие НА на активность ядерных и цитоплазматических ПКаз мозга. Большинство исследователей придерживается гипотезы, согласно которой присутствие ПКаз в ядрах клеток является результатом опосредованной сАМР транслокации регуляторной или каталитической субъединиц фермента из цитоплазмы в ядро [6]. Другая точка зрения предполагает присутствие в ядрах собственно ядерных сАМР-зависимых ПКаз; в пользу этого мнения в литературе представлено мало работ [17, 18].

Ранее нами в мягких условиях очистки также была выделена сАМР-зависимая ПКаз из ядер клеток мозга крыс, диссоциирующая на регуляторную и каталитическую субъединицы в присутствии сАМР [19]. Полученные данные свидетельствовали в пользу того, что одним из механизмов действия сАМР на фосфорилирование ядерных белков является, возможно, непосредственный эффект циклического нуклеотида на ядерный фермент.

В настоящей работе транслокация сАМР-зависимых ПКаз из цитоплазмы в ядро в нервной ткани была исследована в опытах по изучению действия НА на активность ядерных и цитоплазматических ПКаз в срезах мозга крыс. На рис. 1 представлены данные, указывающие на изменения ПКазной активности в растворимой фракции мозга под действием НА. При хроматографии цитоплазматических белков из срезов мозга на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте NaCl было получено две формы ПКазы, что согласуется с литературными данными о том, что в цитозоле клеток различных тканей присутствуют две формы сАМР-зависимых ПКаз: I и II [20]. После инкубирования срезов мозга с НА в цитозоле уменьшалась активность обеих форм ПКаз (рис. 1).

При хроматографии ядерных белков из срезов мозга на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте NaCl были получены три формы ПКаз (рис. 2). НА вызывал увеличение активности формы I ПКазы в ядре. Возможно, увеличение ПКазной активности в ядрах мозговой ткани, сопровождавшееся уменьшением активности фермента в цитозоле, было обусловлено транслокацией сАМР-зависимой ПКазы из цитоплазмы в ядро под действием НА. Ранее было установлено [6], что увеличение ядерной ПКазной активности может быть результатом транслокации сАМР-зависимых ПКаз из цитоплазмы в ядро.

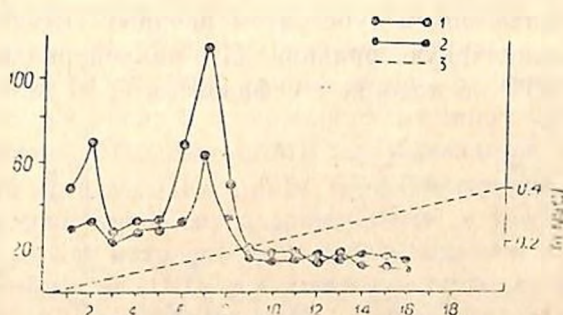


Рис. 1. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе цитоплазматических белков из срезов мозга, инкубированных с норадреналином. На оси абсцисс—номера проб, на оси ординат—активность протеинкиназы (пмоль ^{32}P в пробе). Условные обозначения: 1—контроль (срезы инкубировались в отсутствие норадреналина); 2—срезы инкубировались в присутствии норадреналина; 3—градиент NaCl

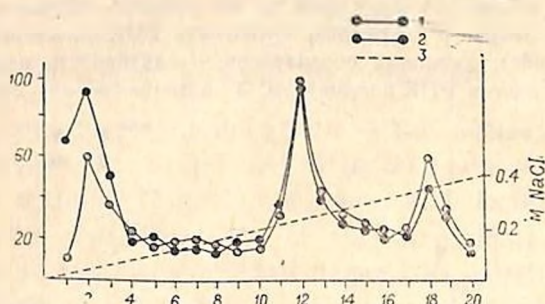


Рис. 2. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе ядерных белков из срезов мозга, инкубированных с норадреналином; обозначения те же, что и на рис. 1

Таким образом, было выявлено два механизма регуляции активности ядерных ПКаз в нервной ткани: непосредственный эффект сАМР на собственно ядерную ПКазу и транслокация сАМР-зависимой ПКазы из цитоплазмы в ядро под действием НА.

Фосфорилирование эндогенных субстратов ядерных ПКаз мозга. При изучении эндогенных субстратов ядерных ПКаз в нервной ткани вызывает интерес фракция, элюирующаяся в свободном объеме колонки при гель-фильтрации ядерного экстракта из мозга крысы на сефадексе G-200 [19], так как в некоторых тканях ядерные ПКазы могут

быть ассоциированы с высокомолекулярными белками, в частности, с РНК-полимеразой [21]. На рис. 3 дан профиль элюции ядерного экстракта из мозга крысы на сефадексе G-200.

Оказалось, что указанная выше фракция ядерной ПКазы мозга обладает РНК-полимеразной активностью. Мы предположили, что она ассоциирована с РНК-полимеразой, связь с которой не разрушается при мягких условиях выделения и фракционирования. РНК-полимераза может быть субстратом для ядерных ПКаз в некоторых тканях [22, 23], однако в литературе нет сведений о ее фосфорилировании в мозгу. В связи с этим была поставлена задача выяснить, может ли РНК-полимераза служить эндогенным субстратом ядерных ПКаз мозга. С этой целью высокомолекулярную фракцию ПК инкубировали с γ - ^{32}P -АТР. После удаления АТР на колонке с сефадексом G-50 дальнейшее разде-

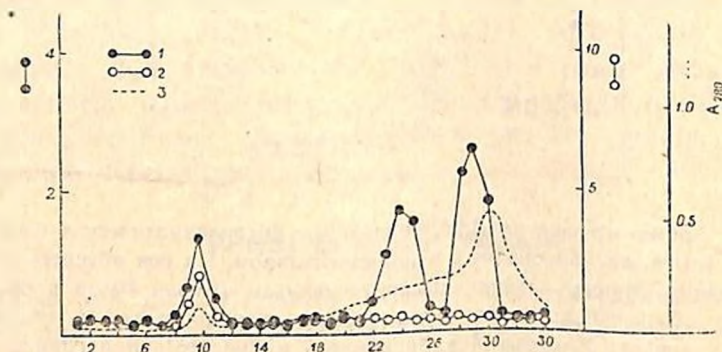


Рис. 3. Гель-фильтрация ядерного экстракта из мозга крысы на сефадексе G-200. На оси абсцисс—номера проб, на оси ординат—активность протенин-киназы (10^{-2} пмоль ^{32}P в пробе), активность РНК-полимеразы ($10^{-3} \times$ имп/мин в пробе). Условные обозначения: 1—активность протенин-киназы, 2—активность РНК-полимеразы, 3—поглощение при 280 нм

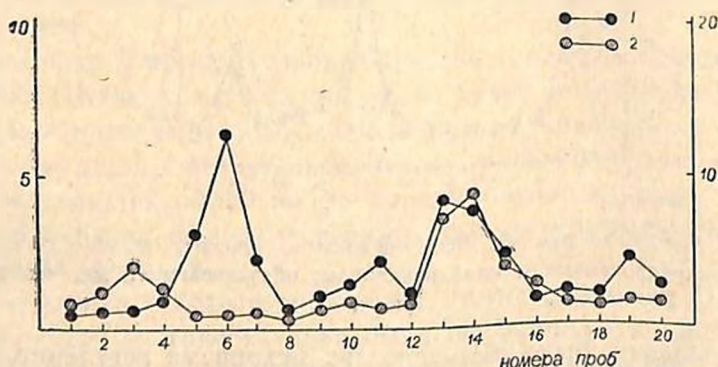


Рис. 4. Разделение фракций белков, фосфорилируемых ядерной протенин-киназой мозга, хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. На оси абсцисс—номера проб, на оси ординат—включение ^{32}P (10^{-3} ^{32}P), активность РНК-полимеразы ($10^{-3} \times$ ^{14}C в пробе). Условные обозначения: 1—включение ^{32}P , 2—активность РНК-полимеразы

ление смеси проводили хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте NaCl . В элюатах из колонки было обнаружено 4 эндогенные фракции белков, фосфорилируемых ядерной ПКазой (рис. 4), одна из которых

(третья по счету) обладала РНК-полимеразной активностью. Эта фракция элюировалась в свободном объеме колонки с сефадексом G-200, что свидетельствовало о ее высокой М; полученные данные согласуются с литературными, так как показано, что М РНК-полимеразы мозга составляет 480—520 кД [24].

Таким образом, удалось установить, что одна из эндогенных фракций белков, фосфорилируемых ядерной ПКазой в нервной ткани, обладает РНК-полимеразной активностью. По всей видимости, РНК-полимераза является эндогенным субстратом ядерной ПКазы мозга. Что же касается остальных трех эндогенных фракций белков, фосфорилируемых ядерной ПКазой мозга, то их природа неизвестна.

На основании полученных данных можно заключить, что эффекты НА на генетический аппарат в нервной ткани могут быть опосредованы циклазной системой. Действие сАМР осуществляется либо через участие собственно ядерных ПКаз, либо транслоцирующих из цитоплазмы ферментов, фосфорилирующих ядерные белки, в том числе и РНК-полимеразу. Это может находить свое выражение и в изменениях функциональной активности ЦНС, в частности в процессе обучения животных. Так, интракраниальное введение крысам структурных аналогов сАМР—ингибиторов активности ПКаз ядер головного мозга сопровождалось ухудшением обучаемости животных [25].

EFFECT OF NOREPINEPHRINE ON THE PHOSPHORYLATION OF BRAIN NUCLEAR PROTEINS

MIKELADZE D. G., FRAIKINA T. Ya.

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi

The effect of norepinephrine (NE) on the nuclear and cytosol protein kinase activity has been studied in rat brain slices. NE increased protein kinase activity (form 1) in nuclei and decreased it in cytosol. NE may affect the phosphorylation of nuclear proteins in nervous tissue by translocation of the cytosol cAMP-dependent protein kinase into nucleus and by direct effect on the nuclear protein kinase. The phosphorylation of endogenous substrates of brain nuclear protein kinase has been studied. One of the four fractions of phosphorylated proteins was shown to possess the RNA polymerase activity. It is concluded that biogenic amines may act on nervous tissue genome via cAMP and nuclear protein kinase activation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Greengard P. Science, 199, 4325, 146—152, 1978.
2. Huttner W. B., De Gennaro L. J., Greengard P. J. Biol. Chem., 256, 1482—1488, 1981.
3. Kurosawa A., Galdotti A., Costa E. Mol. Pharmacol., 15, 115—130, 1979.
4. Costa E., Kurosawa A., Galdotti A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 1058—1062, 1976.

5. Spielvogel A. M., Mednicks M. L., Eppenberger U., Jungmann R. A. Eur. J. Biochem., 73, 199—212, 1977.
6. Jungmann R. A., Kranlas E. G. Int. J. Biochem., 8, 12, 819—830, 1977.
7. Cho-Chung Y. S., Archibald D., Clair T. Science, 205, 1390—1392, 1979.
8. Doskeland S. O., OGREID D. Int. J. Biochem., 13, 1, 1—19, 1981.
9. Greengard P.—In: Cyclic Nucleotides, Phosphorylated Proteins and Neuronal Function, N. Y., Raven Press, 1978.
10. Willtams M. Trends Biochem. Sci., 4, 2, 25—28, 1979.
11. Chuang D. M., Hollenbeck R. A., Costa E. J. Biol. Chem., 252, 8365—8373, 1977.
12. Hirsch J., Martelo O. J. Biol. Chem., 251, 5408—5413, 1976.
13. Willtams M. Brain Res., 109, 190—195, 1976.
14. Reddington M., Rodnight R., Williams M. Biochem. J., 132, 475—482, 1973.
15. Majumder G. C. Biochem. J., 165, 469—477, 1977.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
17. Castagna M., Palmer W. R., Walsh P. A. Eur. J. Biochem., 55, 193—199, 1975.
18. Neumann J. R., O'Meara A. R., Herrmann R. L. Biochem. J., 171, 123—135, 1978.
19. Фрайкина Т. Я., Микеладзе Д. Г. Сообш. АН ГССР, 93, 697—700, 1980.
20. Corbin J. D., Keely S. L., Park C. R. J. Biol. Chem., 250, 218—225, 1975.
21. Hirsch J., Martelo O. Biochem. J., 169, 355—359, 1978.
22. Martelo O., Hirsch J. Biophys. Biochim. Res. Commun., 58, 1008—1015, 1974.
23. Jungmann R. A., Kranlas E. G.—In: Advances in Biochem. Psychopharmac., N. Y., p. 413—428, 1976.
24. Yamamoto H., Takanashi Y. J. Neurochem., 342, 255—260, 1980.
25. Фрайкина Т. Я., Микеладзе Д. Г. Изв. АН ГССР, Сер. Биол., 6, 3, 223—300, 1980.

Институт физиологии им. И. С. Бериташвили
АН ГССР, Тбилиси

Поступила 26. II 1982

УДК 547.962:547.963.3:576.3:591.481.1

БЕЛКИ И РНК В НЕЙРОНАХ И ГЛИОЦИТАХ СУПРАОПТИЧЕСКОГО ЯДРА ПРИ ЛИШЕНИИ СНА

ПАНОВ А. Н., КРИВЕНКО Н. Е.

Исследовали метаболический ответ нейронов и их глиальных клеток-сателлитов супраоптического ядра гипоталамуса крысы на лишение сна в медленно вращающемся цилиндре третбана.

Через 24 ч лишения сна объем нейронов и глиоцитов возрастал (на 56 и 23% соответственно), а через 48 ч объем нейронов не отличался от контрольных величин, тогда как объем глиоцитов оставался повышенным (на 15%). Концентрация РНК в клетках не менялась во все сроки исследования, а концентрация белков была снижена через 24 ч (на 20 и 17% в нейронах и глиоцитах соответственно). В расчете на 1 клетку содержание определяемых веществ в нейронах было увеличено только через 24 ч лишения сна (на 53 и 25% для РНК и белков соответственно); в глиоцитах повышение было отмечено лишь в отношении белков и только через 48 ч бессонницы. Выявлено сходство реагирования супраоптического ядра на лишение сна в третбане с ответом клеток дорзального ядра шва в этих же условиях.

Нарушения цикла бодрствование—сон, в частности селективное лишение парадоксальной фазы сна (ПФС), приводят к различным изменениям метаболических процессов, выявляемых как на уровне всего организма, так и отдельных его органов, особенно в головном мозгу [1—3]. В то же время функциональная специфичность отдельных структур головного мозга и составляющих их клеток требует использования специальных методических приемов, позволяющих анализировать отдельные морфологические структуры, а в них определять биохимические компоненты раздельно в нейронах и глиоцитах. В этом плане наиболее адекватными являются методы цитохимии.

Одним из первых при лишении ПФС цитохимическому исследованию было подвергнуто нейросекреторное супраоптическое ядро (СОЯ) гипоталамуса крысы [4—6]. Оно было избрано, прежде всего, вследствие интенсивного метаболизма белков и РНК в нем. Выявленные фазные изменения содержания этих компонентов показали наличие как сходства, так и различия в метаболическом ответе нейронов и прилегающих к ним глиальных клеток-сателлитов на лишение ПФС.

Было установлено [7—9], что полное лишение сна (ПЛС) при вращении крыс в цилиндре третбана вызывало в клетках ядер стволовой части мозга сдвиги в содержании белков и РНК, направленность которых оказалась противоположной изменениям, обнаруженным в них при селективном лишении ПФС.

В задачу настоящего исследования входило определение метаболического ответа—изменений концентрации и содержания (в расчете на 1 клетку) белков и РНК в нейронах и глиоцитах СОЯ гипоталамуса при ПЛС.

Материалы и методы

Опыты были поставлены на крысах-самцах линии Вистар массой 180—220 г. Животных помещали попарно в отсеки цилиндрического третбана (диаметр—50 см, скорость вращения—2,3 об/мин). Поперечные перекладки внутри цилиндра препятствовали пассивному перекачиванию крыс [10]. В третбане были подвешены поилки и заложен сухой корм. Каждые 12 ч животных на 20—30 мин отсаживали в обычные клетки и давали им мягкий корм. Через 24 или 48 ч после начала опыта крыс декапитировали, головной мозг выделяли, его стволую часть фиксировали в реактиве Бродского, обезвоживали, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 6—8 мкм. После депарафинирования срезы окрашивали на нуклеиновые кислоты галлоцианин-хромовыми красками [11], а на общие белки—амидочерным 10 Б [12].

Оптическую плотность клеток измеряли на двухлучевом микрофотометре МУФ-5 при 595 и 620 нм для нуклеиновых кислот и белков соответственно. Выбирали нейроны, на срезах которых ясно различалось ядрышко. Размер зонда был подобран таким образом, чтобы исследовать отдельные участки цитоплазмы нейрона, тело же глиоцита было меньше величины зонда.

Таким образом, в нейронах определяли цитоплазматическую РНК и белки, а в глиоцитах—суммарные белки ядра и цитоплазмы и сумму РНК и ДНК. Так как содержание ДНК в клетках мозга постоянно, все изменения можно было относить на счет лишь РНК (для удобства в дальнейшем речь будет идти только об РНК).

Размеры клеток измеряли окуляр-микрометром; для вычисления объема использовали формулу эллипсоида вращения. В телах нейронов определяли объем цитоплазмы, у глиоцитов—объем всей клетки. Так как оптическая плотность пропорциональна молекулярной концентрации, то зная ее величину и объем клетки, можно рассчитывать содержание РНК и белков в 1 клетке (в усл. ед.). Детальное описание обработки ткани и ее анализа дано ранее [13]. Каждая группа содержала 5—6 животных, в каждом СОЯ было исследовано 20—25 клеток. СОЯ идентифицировали по атласу Wünscher и соавт. [14]. Во всех опытах забивали равное количество подопытных и контрольных крыс; ткани обеих групп обрабатывали одновременно. Наблюдаемые изменения выражали в процентах от величин, установленных для животных, содержащихся в обычных клетках.

Результаты обрабатывали по тесту Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Изменения объемов цитоплазмы нейронов и тел глиоцитов, концентрации РНК и белков и содержания (в 1 клетке) этих веществ через 24 и 48 ч ПЛС представлены на рисунке.

Было установлено, что через 24 ч нахождения животных в третбане объем цитоплазмы нейронов увеличивался на 56, а глиальных клеток-сателлитов—на 23%. Однако через 48 ч ПЛС объем нейронов не отличался от контрольного уровня, тогда как объем глиоцитов, хотя и несколько уменьшался, но все еще превышал уровень контроля на 15%.

Исследование обоих типов клеток, окрашенных на нуклеиновые кислоты, не выявило каких-либо изменений их оптической плотности, а следовательно, и концентрации изучаемых компонентов в течение всего опыта. Содержание РНК в цитоплазме нейронов резко возросло в 1-е сутки опыта (на 53%), но на 2-е сутки оно не отличалось достоверно от контроля. В глиоцитах повышения содержания РНК не было обнаружено: сдвиги на 9 и 12% через 24 и 48 ч оказались недостоверными.

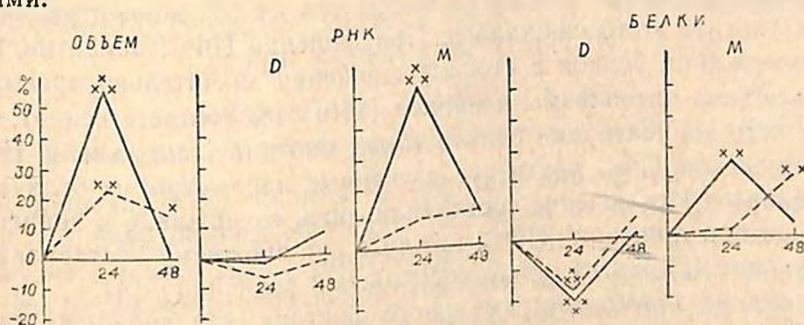


Рис. Изменения объемов нейронов и глиоцитов, концентрации и содержания РНК и белков в них при полном лишении крыс сна в цилиндре вращения при ПЛС (в % к соответствующим величинам у контрольных животных). По оси абсцисс—продолжительность лишения сна в ч, по оси ординат—отклонения в %. Условные обозначения: D—оптическая плотность, M—содержание в расчете на 1 клетку; сплошная линия—нейроны, пунктирная—глиоциты; * $p < 0,02$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Динамика изменений содержания белков в нейронах и глиоцитах СОЯ при ПЛС была близкой к изменениям содержания РНК. Так, количество белков в цитоплазме нейронов было увеличено через 24 ч на 25%, а через 48 ч этот показатель полностью нормализовался. В то же время отсутствие изменений в глиоцитах в 1-е сутки опыта сменялось на значительное увеличение содержания белков в них через 2 суток бессонницы (на 21%). Концентрация белков снижалась в нейронах и глиоцитах (на 20 и 17% соответственно) через 24 ч ПЛС, а затем повышалась до контрольного уровня.

Участие гипоталамических ядер, в том числе СОЯ, в организации циркадных ритмов и связанной с ними периодической бодрствования—сон [15] может быть основой значительных метаболических сдвигов в клетках этого образования при нарушениях сна. Ранее было пока-

зано [5, 6], что избирательное лишение крыс ПФС приводило к значительному снижению содержания РНК, и особенно белков в СОЯ в 1-е сутки опыта (на 36 и 45% соответственно), причем, хотя на 2-е сутки амплитуда этих отклонений и уменьшалась, уровень содержания компонентов все же оставался пониженным (на 13 и 22% для РНК и белков соответственно). Уменьшение объемов нейронов (на 34%) способствовало поддержанию достаточно стабильной концентрации РНК в них, но концентрация белка была снижена (на 16 и 18% через 24 и 48 ч лишения ПФС соответственно) [4].

Таким образом, в 1-е сутки нарушения сна имело место определенное сходство в реагировании нейронов СОЯ на избирательное лишение ПФС и на ПЛС: концентрация РНК не менялась, а белков снижалась, но достигался этот эффект различными путями. При ПЛС значительно (в 1,5 раза) возрастало содержание РНК в клетке, при этом соответственно увеличивался и объем цитоплазмы нейронов. При лишении же одной ПФС содержание снижалось на 1/3 и на столько же уменьшался объем. Содержание белков в нейронах при ПЛС увеличивалось всего на 1/4, тогда как объем возрастал более, чем на 1/2; концентрация белков в результате этого снижалась. При лишении ПФС, напротив, изменение содержания белков в сторону снижения значительно превышало сдвиги в объеме цитоплазмы нейронов (45 и 34% соответственно), в результате чего концентрация белков также оказалась сниженной. На 2-е сутки нарушения ПФС почти все изученные параметры не отличались от нормальных. Исключение составляли лишь содержание и концентрация белков при лишении ПФС, которые по-прежнему оставались на низком уровне (22 и 18% ниже контрольной величины) [4].

В условиях такого экстремального фактора, как продолжительное ПЛС в третбане, метаболический ответ нейроглиальных клеток был, как правило, менее выражен, чем реакция нейронов, особенно в 1-е сутки депривации. Это соответствует картине, характерной для нейроглиальных взаимоотношений при действии и других экстремальных факторов [16].

Противоположная направленность изменений объемов нейронов и содержания в них РНК и белков при двух формах бессонницы была отмечена и при исследовании таких образований ЦНС, как ядра шва и синее пятно (СП) [7—9]. При этом характер ответа СОЯ на лишение сна оказался более сходным с ответом дорзального ядра шва (ДЯШ), которое, по нашему мнению, в большей степени связано с процессом организации сна, чем СП и ядро шва моста (ЯШМ). Действительно, при лишении ПФС содержание РНК и белков в нейронах ДЯШ было снижено в оба срока исследования (24 и 48 ч), тогда, как в ЯШМ и СП эти показатели на 2-е сутки опыта нормализовались. Еще большее сходство было выявлено при ПЛС: в этих условиях, вслед за повышением содержания РНК и белков в 1-е сутки, на 2-е сутки имели место изменения в противоположном направлении, приводившие к нормализации количества РНК и белков в СОЯ и РНК—в ДЯШ, с уменьшением содержания белков в последнем. В то же время в нейронах двух других

ядер содержание РНК и белков на 2-е сутки было увеличено по сравнению с контролем.

Казалось бы, что ПЛС является более сильным воздействием, чем лишение только одной фазы сна. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что нарушение нормальной структуры сна, видимо, вызывает большие метаболические сдвиги, чем полная бессонница. Подтверждается мнение об особой, специфической роли ПФС в восстановительных функциях сна [17, 18]. С другой стороны, организм может реагировать и на использованную нами методику для ПЛС—нахождение животных в непрерывно вращающемся цилиндре третбана.

Возможно, что непосредственной причиной установленных сдвигов является не только полная бессонница, но и указанное вынужденное многочасовое движение, осуществление которого обеспечивается активацией ряда систем ЦНС, в том числе и СОЯ. Для решения этой проблемы требуется разработка новых методических приемов, позволяющих дифференцировать влияние специфических и неспецифических факторов при различных методах ПЛС.

PROTEIN AND RNA CONTENT IN RAT n. SUPRAOPTICUS AFTER SLEEP DEPRIVATION

PANOV A. N., KRIVENKO N. E.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

Protein and RNA content in neurons and gliocytes of n. supra-opticus has been determined in rats subjected to sleep deprivation (the animals were placed into a slowly rotating cylindrical tretbahn).

On 24h of sleep deprivation neurons and gliocytes enlarged for 56% and 23%, respectively; but on the 48h of insomnia the size of neurons dropped to normal and that of gliocytes remained enlarged for 15%. RNA concentrations in the cells didn't change in the course of investigation; protein concentration decreased in a day both in neurons and gliocytes for 20 and 17%, respectively. The amount of RNA and protein per cell in neurons increased only after one-day insomnia for 53% and 25%, respectively; in gliocytes only protein content increased after 48h of insomnia.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Jouvett M. *Ergebn. Physiol.*, 64, 166—307, 1972.
2. Giuditta A.—In: *Biochemical correlates of brain structure and function*, L.—N. Y.—San-Francisco, p. 293—337, 1977.
3. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. Н. *Нейрофизиология и нейрохимия сна*, Л., Наука, 189 с., 1978.
4. Воронка Г. Ш. *Содержание белков в нейронах и нейроглии супраоптического и красного ядер головного мозга крысы при естественном сне, наркозе и бессоннице*. Канд. дис. Л., 1970.
5. Воронка Г. Ш., Демин Н. Н., Певзнер Л. З. *ДАН СССР*, 198, 974—977, 1971.
6. Воронка Г. Ш., Демин Н. Н., Рубинская Н. Л., Соловьева Н. А. *Укр. біохім. ж.*, 44, 712—717, 1972.
7. Маликов У. М., Панов А. Н. *Физиол. ж. СССР*, 66, 923—925, 1980.

8. Маликов У. М., Панов А. Н. Физиол. ж. СССР, 67, 1506—1510, 1981.
9. Панов А. Н., Маликов У. М. Цитология, 23, 1381—1385, 1981.
10. Покровский А. А., Малахов И. Е., Кушманова О. Д. Бюл. exper. биол. и мед., 63, 6, 123—125, 1967.
11. Berube G. R., Powers M. M., Kerkay J., Clark G. Stain Technol., 41, 73—81, 1966.
12. Geyer G. Acta Histochem., 10, 286—292, 1960.
13. Певзнер Л. З. Функциональная биохимия нейроглии, Л., Наука, 180 с., 1972.
14. Wünscher W., Schober W., Werner L. Architektonischer Atlas vom Hirnstamm der Ratte, Leipzig, 1965.
15. Jacobs B. L.—In: Current studies of hypothalamic function, v. 2, p. 138—148, Basel, 1978.
16. Pevzner L. Z. J. Neurochem., 12, 993—1002, 1965.
17. Oswald I. New Scientist, 46, 170—172, 1970.
18. Демин Н. Н.—В кн.: Физиология и патология сна человека, М., Наука, с. 21—33, 1975.

Институт физиологии
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Поступила 8. IV 1982

УДК 612.822.1+612.821.6

МЕТАБОЛИЗМ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ НЕЙРОНОВ И ГЛИОЦИТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ УСЛОВНОГО ПИЩЕВОГО РЕФЛЕКСА (АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ И ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

КЛЕНИКОВА В. А., ГЛУЩЕНКО Т. С.

С помощью количественной автораддиографии и двухволнового метода цитофото- метрии показано, что при воспроизведении условного пищевого рефлекса (через 7 дней после его выработки) отношение содержания белков к интенсивности включения автораддиографической метки было снижено в ядрах нейронов зоны Ca_3 гиппокампа. В клетках перинейрональной глии какие-либо изменения отсутствовали.

Имеющиеся литературные данные [1—4], а также результаты собственных исследований [5, 6] свидетельствуют о том, что в нервных механизмах обучения в той или иной мере участвуют белки нервной ткани. Ранее было показано, что воспроизведение условного пищевого рефлекса у крыс приводило к изменениям количества белков в системе нейрон—нейроглия некоторых отделов головного мозга [7].

Такие сдвиги содержания белков в клеточных структурах ЦНС могли быть связаны с изменением скорости их метаболизма. Поэтому казалось целесообразным провести количественное автораддиографическое определение обновления белков в нейронах и глиоцитах в тех же условиях эксперимента.

Материалы и методы

Опыты были поставлены на взрослых крысах-самцах линии Вистар. Пищевой условный рефлекс вырабатывали ежедневно в течение 4 дней в У-образном лабиринте по несколько измененной схеме Лешли. Условным сигналом служил свет электрической лампочки, безусловным подкреплением—семя подсолнуха. Исследовали группы крыс с выработанным рефлексом, активного (животные, которым условный сигнал подавали с таким же интервалом и в той же последовательности, но корм находился в кормушках постоянно) и пассивного контролей. Спустя неделю после завершения обучения крыс снова помещали в условия лабиринта, предъявляли им те же и в той же последовательности условные сигналы, но без пищевого подкрепления. Исследовали только тех крыс, которые совершали не менее 80% правильных побегов. Детали

эксперимента были описаны ранее [7, 8]. Для определения интенсивности белкового синтеза крысам за 1 ч до окончания эксперимента внутрибрюшинно вводили DL- ^3H -фенилаланин (удельная активность 1,36 K_u /ммоль, «Reanal», Венгрия) в дозе 10 мK_u /г. Животных забивали без наркоза быстрым обезглавливанием. При автордиографическом исследовании нервной ткани этот срок является оптимальным [9]. Головной мозг фиксировали в охлажденной смеси Карнуа, обезживали по общепринятой схеме и заливали в парафин. Объектами исследования служили зона CA_3 гиппокампа, участие которой в механизмах обучения и памяти не вызывает сомнений, и клетки V слоя двигательной и зрительной зон коры больших полушарий для оценки неспецифического активирования ИС. Срезы толщиной 5 мкм после освобождения от парафина покрывали жидкой фотоэмульсией типа «М» и экспонировали 40 дней при 8° . Проявленные автографы окрашивали гематоксилином. Интенсивность включения меченой аминокислоты оценивали по числу зерен восстановленного серебра, измеряемому абсорбционным способом путем фотометрирования автографа широким пучком монохроматического света на двухлучевом микроспектрофотометре «Марш» [10]. Параллельные срезы окрашивали амидочерным 10 Б на суммарные белки [11, 12]. Количество белка (в усл. ед.) в расчете на одно ядро нейрона или глиоцита определяли двухволновым методом цитофотометрии на микрофотометре МЦФУ-1 при 605 и 660 мкм [10, 12]. Весь цифровой материал, по 100—120 клеток от 5—6 животных, обрабатывали статистически; достоверность отличий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У крыс с выработанным рефлексом и группы активного контроля по отношению к пассивному наблюдали усиление включения меченого ^3H -фенилаланина в суммарные белки ядер нейронов зоны CA_3 гиппокампа и V слоя двигательной зоны коры больших полушарий (табл. 1). В других исследованных нами клеточных структурах достоверных изменений интенсивности включения ^3H -фенилаланина в ядерные белки отмечено не было. В обеих группах животных по сравнению с пассивным контролем было выявлено повышение количества ядерных белков в нейронах зоны CA_3 гиппокампа. Можно полагать, что изменения метаболизма белков, наблюдаемые у обученных крыс и животных группы активного контроля по отношению к пассивному, по-видимому, были связаны с неспецифическим активированием ИС: включением световых сигналов, ориентировочной реакцией, ожиданием корма и т. д.

Вопрос о контролях в исследовании метаболических коррелятов процессов обучения и памяти остается очень существенным и требует использования разных методических подходов и моделей обучения [3, 4].

Ранее было показано, что для начальной стадии выработки условного пищевого рефлекса характерно усиление биосинтеза нейрональных

белков [8]. Обучение же в течение 4-х дней, закрепляющее уже сформированную временную связь, по нашим данным, не сопровождалось таким усилением метаболизма суммарных белков по сравнению с активным контролем. Может быть, последующие этапы консолидации памяти затрагивают лишь ограниченное число клеточных белков, в первую очередь мозгоспецифических. Изменения метаболизма этих белков, составляющих доли процента от общей массы белков мозга, могут лежать за пределами чувствительности примененных методов.

Таблица 1

Включение ^3H -фенилаланина в ядерные белки нейронов и глиоцитов головного мозга крыс при воспроизведении условного пищевого рефлекса

Вид клеток	Пассивный контроль	Активный контроль	4-дневное обучение	Воспроизведение
Гиппокамп CA_3 нейрон	$0,320 \pm 0,010$	$0,370 \pm 0,012^*$	$0,360 \pm 0,012^*$	$0,380 \pm 0,014$
глиоцит	$0,270 \pm 0,013$	$0,280 \pm 0,016$	$0,280 \pm 0,015$	$0,270 \pm 0,013$
Двигательная зона V слой				
нейрон	$0,310 \pm 0,014$	$0,430 \pm 0,012^*$	$0,410 \pm 0,012^*$	$0,400 \pm 0,014$
глиоцит	$0,260 \pm 0,009$	$0,250 \pm 0,015$	$0,270 \pm 0,015$	$0,280 \pm 0,014$
Зрительная зона V слой				
нейрон	$0,450 \pm 0,012$	$0,450 \pm 0,017$	$0,440 \pm 0,016$	$0,480 \pm 0,016$
глиоцит	$0,250 \pm 0,010$	$0,240 \pm 0,015$	$0,250 \pm 0,012$	$0,280 \pm 0,014$

Примечание. Об интенсивности включения ^3H -фенилаланина судили по величине оптической плотности, отражающей концентрацию зерен восстановленного серебра над исследуемыми клетками (число зерен на единицу площади клетки). $*p < 0,05$ (по отношению к пассивному контролю)

При воспроизведении условного пищевого рефлекса в нашей постановке эксперимента отличия во включении ^3H -фенилаланина в суммарные белки ядер нейронов и глиоцитов всех исследованных отделов головного мозга отсутствовали по сравнению с группой обученных животных (табл. 1). Содержание же суммарных ядерных белков в нейронах и глиоцитах зоны CA_3 гиппокампа и V слоя двигательной зоны коры у тех же крыс, по полученным данным, было несколько снижено (табл. 2). В ядрах нейронов и глиоцитов V слоя зрительной зоны коры изменения количества суммарных белков не были выявлены (табл. 2).

Мы рассчитали еще один косвенный показатель метаболизма белков, используя данные цитофотометрии и автордиографии. Комбинирование этих двух методов успешно используют, например, при исследовании клеточного цикла, определяя продолжительность отдельных фаз митоза [13, 14]. Применение такого комплексного подхода для изучения метаболизма белков, углеводов на клеточном уровне встречается значительно реже. Так, было предложено [15] для оценки белкового метаболизма в скелетной мышечной ткани использовать отношение оптической плотности белков к интенсивности автордиографической метки. Действительно, при воспроизведении условного пищевого рефлекса отношение содержания суммарных белков в ядре клетки к интенсивности включения меченого ^3H -фенилаланина в ядерные белки, по на-

шим данным, было достоверно снижено в ядрах нейронов зоны CA₃ гиппокампа по сравнению с обученными животными; в глиоцитах данной зоны какие-либо изменения отсутствовали (табл. 3).

Таблица 2

Содержание суммарных белков в ядрах нейронов и глиоцитов головного мозга при воспроизведении условного пищевого рефлекса

Вид клеток	Пассивный контроль	Активный контроль	4-дневное обучение	Воспроизведение
Гиппокамп CA ₃				
нейрон	0,870±0,015	0,940±0,017*	0,930±0,017*	0,820±0,015**
глиоцит	0,880±0,018	0,890±0,017	0,880±0,016	0,780±0,015**
Двигательная зона V слой				
нейрон	0,930±0,013	0,920±0,013	0,910±0,013	0,840±0,013**
глиоцит	0,910±0,019	0,840±0,017	0,840±0,017	0,770±0,012**
Зрительная зона V слой				
нейрон	0,940±0,013	0,930±0,014	0,910±0,015	0,910±0,011
глиоцит	0,920±0,013	0,910±0,015	0,900±0,014	0,890±0,013

Примечание. * $p < 0,05$ (по отношению к пассивному контролю); ** $p < 0,05$ (по отношению к обучению)

По данным Hydén, Lange [16], воспроизведение ранее полученных навыков через 4 недели после обучения (в отличие от результатов опытов в нашей постановке они применяли дополнительное подкрепление) сопровождалось значительным снижением включения ³H-лейцина в белки ряда отделов головного мозга (гиппокампа, зубчатой фасции и др.). Это, видимо, свидетельствует о том, что при различных видах и

Таблица 3

Отношение содержания суммарных белков в клеточных ядрах к интенсивности включения ³H-фенилаланина в белки при воспроизведении условного пищевого рефлекса

Вид клеток	Пассивный контроль	Активный контроль	4-дневное обучение	Воспроизведение
Гиппокамп CA ₃				
нейрон	2,70±0,11	2,50±0,10	2,60±0,10	2,20±0,09**
глиоцит	3,20±0,16	3,20±0,19	3,10±0,17	2,90±0,15
Двигательная зона V слой				
нейрон	3,00±0,15	2,10±0,07*	2,20±0,07*	2,10±0,03
глиоцит	3,50±0,07	3,40±0,20	3,10±0,18	2,70±0,13
Зрительная зона V слой				
нейрон	2,20±0,07	2,10±0,09	2,10±0,08	1,90±0,06
глиоцит	3,50±0,17	3,70±0,20	3,60±0,18	3,20±0,16

Обозначения те же, что и в табл. 2

стадиях обучения вовлекается белковый метаболизм различных клеточных структур нервной ткани. Для этапа воспроизведения, по-видимому, все-таки важно действие «напоминания» или подкрепления, которое способствует переводу латентного следа обучения в активное состояние [17]. Но и в нашей постановке эксперимента (без дополнительного подкрепления) воспроизведение новой информации приводило к снижению

интенсивности белкового метаболизма гиппокампа. Обращает на себя внимание тот факт, что эти сдвиги наблюдали, главным образом, в нейронах. Полученные данные подтверждают положение о ведущей роли метаболизма нейрона в деятельности единой функциональной системы нейрон—нейроглия.

METABOLISM OF NUCLEAR PROTEINS IN NEURONS AND GLIOCYTES OF RAT BRAIN AFTER THE RETRIEVAL FOOD CONDITIONING (AUTORADIOGRAPHIC AND CYTOPHOTOMETRIC ANALYSIS)

KLENIKOVA V. A., GLUSHCHENKO T. S.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

By means of autoradiography and double wave-length cytophotometry it was revealed that the ratio of the total proteins content to labelled phenylalanine incorporation in the proteins of nuclei decreased in CA₁ hippocampal neurons after the retrieval food conditioning.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Hudén H.* Macromolecules and Behavior. Birmingham, 1972.
2. *Дергачев В. В.* Молекулярные и клеточные механизмы памяти, М., Медицина, с. 256, 1977.
3. *Кометиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. Э.* Нейрохимические аспекты памяти (под ред. Р. И. Кругликова), Тбилиси, с. 198, 1980.
4. *Кругликов Р. И.* Нейрохимические механизмы обучения и памяти (под ред. М. Н. Ливанова), М., Наука, с. 211, 1981.
5. *Glushchenko T. S., Pevzner L. Z., Klenikova V. A.* Pharmac. Biochem. Behav., 11 2, 1979.
6. *Кленикова В. А.* Физиол. ж. СССР, 66, 505—507, 1980.
7. *Кленикова В. А., Кулагин Д. А., Лопатина Н. Г.* Физиол. ж. СССР, 67, 371—374, 1981.
8. *Глущенко Т. С., Кулагин Д. А., Лопатина Н. Г., Певзнер Л. З.* Физиол. ж. СССР, 64, 1386—1390, 1978.
9. *Грачева Н. Д.* Автораддиография синтеза нуклеиновых кислот и белков в нервной системе (под ред. Л. Н. Жинкина), Л., Наука, с. 136—158, 1968.
10. *Агроскин Л. С., Папаян Г. В.* Цитофотометрия (под ред. В. Я. Бродского), Л., Наука, с. 295, 1977.
11. *Geyer G.* Acta histochem., 10, 4, 286—292, 1960.
12. *Klenikova V. A., Pevzner L. Z.* Microsc. Acta, 82, 3, 207—214, 1979.
13. *Mak S.* Exp. Cell Res., 39, 1, 286—289, 1965.
14. *Fujita S.* Exp. Cell Res., 88, 2, 395—401, 1974.
15. *Данилов Р. К.* Цитология, 22, 481—483, 1974.
16. *Hudén H., Lange P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1980—1984, 1972.
17. *Греченко Т. Н.* Нейрофизиологические механизмы памяти, М., Наука, с. 105, 1979.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
АН СССР, Ленинград

Поступила 2. VIII 1982

УДК 612.822.0.015.1:577.152.311.014.46

СИСТЕМА РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МИКРОСОМ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА АЦЕТИЛХОЛИНОМ И ЦИКЛИЧЕСКИМИ НУКЛЕОТИДАМИ

СУДАКОВА Н. М., ЕЛАЕВ Н. Р.

В бесклеточной системе, содержащей изолированные ядра и микросомно-цитоплазматическую фракцию гомогената головного мозга, имело место спонтанное пуромин-чувствительное увеличение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) микросом. В результате преникубации такой системы с ацетилхолином (АХ) в концентрациях 10^{-6} — 10^{-3} М наблюдалось увеличение активности АХЭ микросом с максимумом при концентрации АХ 10^{-5} М (более 20% за 60 мин инкубации). Эффект АХ не проявлялся на фоне актиномицина Д и пуромина. При отсутствии в бесклеточной системе ядер преникубация с АХ вызывала уменьшение активности АХЭ микросом, чувствительное к пуромину. Видимо, АХ является положительным эффектором биосинтеза АХЭ на ядерном уровне и отрицательным—на цитоплазматическом. Эффекты АХ не опосредуются циклическими нуклеотидами. Показано, что сАМР в противоположность АХ тормозил биосинтез АХЭ в ядрах и активировал его в цитоплазме, а сGMP подавлял этот процесс в обоих случаях. На ядерном уровне АХ, сАМР и сGMP оказывали свое влияние совместно с низкомолекулярными факторами, а на цитоплазматическом—без них.

Обсуждается система регуляции биосинтеза АХЭ микросом клеток мозга, в основу которой положено влияние АХ на экспрессию генов АХЭ, а влияние сАМР и сGMP рассматривается как корректирующее звено.

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) клеток нервной ткани является ферментом, изучение биосинтеза которого может помочь выяснению взаимосвязи функциональной нагрузки и количества фермента в клетке, трансформации нервного импульса в метаболические сигналы и т. д. В этом смысле интересным является тот факт, что АХЭ нервной ткани имеет короткий период полужизни [1]. Представление об адаптивном синтезе АХЭ в ответ на увеличение количества субстрата—АХ трудно в настоящее время совместить со многими новыми фактами, в частности, ингибиторным действием сGMP на процессы синтеза белков в клетках нервной ткани [2, 3], так как установлено, что сGMP является метаболическим посредником в ряде процессов АХ. В то же время показано, что АХ регулирует экспрессию, например, таких генов клеток нервной ткани, как Na^+ , K^+ -АТРаза [2, 3], являясь в этом отношении внутриклеточным гормоном. Такого рода сведения относительно АХЭ отсутствуют.

В связи с этим в настоящей работе было изучено влияние АХ, сGMP и сAMP на активность АХЭ микросом клеток ткани мозга в модельной (бесклеточной) системе, разработанной ранее [2, 4] для изучения регуляции экспрессии гена Na^+ , K^+ -АТФазы.

Материалы и методы

Опыты выполнены на белых крысах массой 150—200 г. Животных быстро обезглавливали, головной мозг (исключая мозжечок и каудальную часть продолговатого мозга) гомогенизировали в 2,45 М растворе сахарозы из расчета 7 мл на один мозг. Все процедуры проводили на холоду. Гомогенат центрифугировали 75 мин при 27 000 g. Осадок, содержащий ядра (микроскопический контроль), ресуспендировали в среде А, состоявшей из 0,33 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2 \cdot 10^{-3}$ М MnSO_4 , $5 \cdot 10^{-3}$ М MgCl_2 , 10^{-3} М глутатиона (GSH), 10^{-3} М АТФ, $3 \cdot 10^{-4}$ М GTP, $5 \cdot 10^{-5}$ М UTP, $5 \cdot 10^{-5}$ М CTP, $5 \cdot 10^{-2}$ М трис-HCl (pH 8,0), эквимольной смеси 20 аминокислот (50 мкг/мл). Ядра ресуспендировали из расчета 2,5 мл среды А на один исходный мозг. К аликвотам ядерной суспензии (2,5 мл) добавляли равный объем микросомно-цитоплазматической фракции. Последнюю получали путем центрифугирования гомогената (2,5—3,0 мл 0,3 М сахарозы на мозг) при 8000 g в течение 10 мин. Опытные пробы содержали АХ (10^{-6} — 10^{-3} М), либо сAMP (10^{-6} М), либо сGMP (10^{-6} М), либо пуромидин (25 мкг/мл). В тех случаях, когда действие АХ изучали на фоне пуромидина (50 мкг/мл), ях, когда действие АХ изучали на фоне пуромидина (50 мкг/мл), все пробы—контрольные и опытные—содержали антибиотик или фермент. При отсутствии в системе ядер их суспензию заменяли равным объемом среды А. Когда выясняли влияние низкомолекулярных цитоплазматических факторов на эффекты АХ и циклических нуклеотидов, микросомно-цитоплазматическую фракцию диализовали в течение 20 ч против 20 объемов 0,3 М сахарозы (две смены среды); в других случаях диализ проводили против равного объема среды А, и изолированные ядра ресуспендировали в этой среде, осуществляя таким образом возврат в бесклеточную систему низкомолекулярных цитоплазматических факторов. Пробы инкубировали 60 мин при 37° с периодическим перемешиванием, добавляли равный объем 0,3 М сахарозы и центрифугировали 7 мин при 4000 g. Надосадочную жидкость отбирали и центрифугировали 75 мин при 27000 g. Осадок микросом ресуспендировали в 3 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,8), содержавшего 0,075 М NaCl и 0,04 MgCl_2 .

Активность АХЭ определяли по методу Ellman [5]; содержание белка—по методу Lowry [6]. Результат каждого опыта представлял среднее значение трех параллельных проб. Метод Ellman, простой и быстрый в исполнении, наиболее удобен при работе с большим количеством анализов. Его недостаток—ограниченная точность—был компенсирован в настоящей работе большим количеством повторов.

Контрольный уровень активности АХЭ микросом составлял 3,9—13,1 мкмоль АХ/мг белка/ч; препаратами микросом практически не гидроли-

зовался бутирилтиохолин, что свидетельствовало о присутствии в микросомах мозга преимущественно именно АХЭ. Так как контрольные величины активности фермента варьировали от опыта к опыту, то окончательные результаты в каждом эксперименте выражали в процентах от контроля. Статистическую обработку результатов опытов проводили методом попарно связанных вариантов [7].

Реактивы: нуклеозидтрифосфаты, cGMP, cAMP, GSH, пуромицин, актиномицин Д и рибонуклеаза фирмы «Reanal» (Венгрия); дитио-бис-нитро-бензоат фирмы «Calbiochem» (США); ацетилтиохолин фирмы «Lachema» (ЧССР); остальные реактивы отечественного производства.

Результаты исследований

Было установлено, что в результате преинкубации бесклеточной системы с АХ (10^{-6} — 10^{-3} М) активность АХЭ микросом увеличивалась (таблица). Максимальный прирост наблюдали при концентрации АХ 10^{-5} М (более 20% за 60 мин инкубации). При дальнейшем увеличении концентрации АХ до 10^{-4} — 10^{-3} М эффект не только не возрастал, но и в значительной мере снижался. Аналогичная зависимость от концентрации АХ была обнаружена ранее для синтеза РНК в изолированных ядрах [8]. Если систему преинкубировали с пуромицином без АХ, то выделенные затем из нее микросомы имели более низкую активность АХЭ, чем в контроле. Эффект АХ полностью нивелировался, когда преинкубацию бесклеточной системы с АХ проводили на фоне актиномицина Д или пуромицина—ингибиторов соответственно транскрипции и трансляции. При отсутствии в системе ядер преинкубация с АХ существенно снижала активность фермента в микросомах.

В то же время в противоположность действию АХ преинкубация бесклеточной системы с циклическими нуклеотидами вызывала снижение активности фермента. Этот факт не позволяет рассматривать их в качестве возможных посредников в индукторном действии АХ на активность АХЭ. В случае cAMP при отсутствии в системе ядер наблюдали трансформацию эффекта в противоположный. На фоне рибонуклеазы, использованной в этих опытах вместо пуромицина, эффект cAMP отсутствовал. Действие cGMP, в отличие от АХ и cAMP, в полной и редуцированной системе было односторонним и состояло в угнетении активности АХЭ микросом. Как и в случае cAMP, эффект cGMP снимался рибонуклеазой.

Ранее было показано [4, 8], что действие АХ и cAMP на синтез суммарной ядерной РНК сопряжено с участием в этих процессах растворимых термостабильных цитоплазматических факторов. В настоящей работе также был исследован вопрос об участии такого рода факторов в процессах регуляции биосинтеза АХЭ. Было установлено, что в диализованной микросомно-цитоплазматической фракции (то есть лишенной низкомолекулярных растворимых веществ), действие АХ становилось противоположным—активность АХЭ при добавлении АХ снижалась. По-

следнее свидетельствует об участии в действии АХ совместно с ним и анализируемых цитоплазматических факторов. При изъятии из dialизованной системы ядер эффект АХ в количественном и качественном отношении сохранялся в отличие от аналогичного варианта с использованием недialизованной микросомно-цитоплазматической фракции. На фоне пуromинина в бесклеточной системе с dialизованной микросомно-цитоплазматической фракцией ингибирующий эффект АХ полностью отсутствует.

Таблица

Активность АХЭ микросом, преникубированных в бесклеточной системе с различными добавками (АХ, сАМР и сGMP)

Варианты бесклеточной системы	Активность АХЭ (% от контроля) $M \pm m$
I. Недialизованная микросомно-цитоплазматическая фракция	
Полная система + АХ (10^{-6} М)	111 ± 4 (9)*
" " + АХ (10^{-5} М)	122 ± 4 (39)*
" " + АХ (10^{-4} М)	111 ± 6 (15)
" " + АХ (10^{-3} М)	105 ± 6 (14)
" " + пуromинин (25 мкг/мл)	91 ± 3 (18)*
Полная система + актиномицин Д + АХ (10^{-5} М) (50 мкг/мл)	95 ± 4 (10)
Полная система + пуromинин + АХ (10^{-5}) (25 мкг/мл)	96 ± 5 (17)
Система без ядер + АХ (10^{-5} М)	82 ± 8 (9)*
Полная система + сАМР (10^{-6} М)	81 ± 4 (14)*
" " + сGMP (10^{-6} М)	89 ± 5 (17)**
Система без ядер + сАМР (10^{-6} М)	127 ± 9 (13)*
" " + сGMP (10^{-6} М)	77 ± 4 (7)*
Система без ядер + рибонуклеаза + сАМР (10^{-6} М) (100 мкг/мл)	100 ± 2 (7)
" " + сGMP (10^{-6} М)	95 ± 5 (7)
II. Dialизованная микросомно-цитоплазматическая фракция	
Полная система + АХ (10^{-5} М)	78 ± 3 (14)*
Система без ядер + АХ (10^{-5} М)	78 ± 7 (15)**
Система без ядер + пуromинин + АХ (10^{-5} М) (25 мкг/мл)	112 ± 6 (12)
Полная система + сАМР (10^{-6} М)	95 ± 5 (6)
" " + сGMP (10^{-6} М)	135 ± 8 (6)*
Система без ядер + сGMP (10^{-6} М)	75 ± 5 (6)**
Полная система + dialизуемый цитоплазматический материал + АХ (10^{-5} М)	130 ± 9 (6)*

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; в остальных случаях различия недостоверны. В скобках указано количество опытов

Влияние сАМР в системе с dialизованной микросомно-цитоплазматической фракцией практически не проявлялось. Последнее свидетельствует в пользу того, что в исходной системе сАМР действовал на процессы биосинтеза АХЭ, как и АХ, совместно с низкомолекулярным цитоплазматическим фактором. Преникубация dialизованной системы

с cGMP вызывала значительный прирост активности АХЭ микросом, то есть эффект cGMP в диализованном цитозоле трансформировался в противоположный.

Доказательством существования низкомолекулярного цитоплазматического фактора, совместно с которым АХ регулирует экспрессию гена АХЭ, служат результаты следующих опытов. Диализат с низкомолекулярными диализуемыми веществами добавляли к бесклеточной системе, содержащей ядра и диализованную микросомно-цитоплазматическую жидкость (см. методы), то есть регенерировали систему, и исходный эффект АХ полностью восстанавливался.

Обсуждение результатов

Проведенный анализ свидетельствует о возможном участии АХ в процессах регуляции биосинтеза АХЭ мембран клеток нервной ткани. Снижение активности этого фермента в результате преникубации бесклеточной системы с пуромицином можно рассматривать, очевидно, как ингибирование его спонтанного синтеза. На фоне актиномицина Д и пуромицина—ингибиторов соответственно транскрипции и трансляции, а также в отсутствие аппарата синтеза РНК, то есть ядер, активирующий эффект АХ не проявлялся. Поэтому можно допустить, что АХ ускоряет спонтанный синтез АХЭ, воздействуя на синтез РНК и ДНК генов АХЭ. В пользу настоящего предположения свидетельствуют также те факты, что в данной системе под влиянием АХ активируется включение ^{14}C -аминокислот в белки микросом, чувствительное к актиномицину Д [9], и ускоряется синтез РНК в ядрах [8]. При этом во всех трех случаях обнаружена аналогичная зависимость от концентрации АХ.

При отсутствии в системе ядер преникубация с АХ приводила к снижению активности фермента в микросомах. Так как на фоне пуромицина, то есть в случае заблокированной трансляции, такого эффекта АХ не оказывал, то можно полагать, что он является ингибитором трансляции. На этом основании полученные факты позволяют предложить такую схему регуляторного влияния АХ на биосинтез АХЭ в микросомах: активирующее действие на ядерном уровне экспрессии генов АХЭ и ингибиторное—на цитоплазматическом. Поскольку в полной системе АХ индуцировал увеличение активности фермента в микросомах, то первое влияние, видимо, может быть основным звеном, а второе—корректирующим.

В то же время полученные результаты не позволяют рассматривать циклические нуклеотиды в качестве посредников в индукторном действии АХ на активность АХЭ, так как они оказывали принципиально иное влияние в бесклеточной системе. Эффект cAMP в различных вариантах бесклеточной системы свидетельствует о том, что его регуляторное влияние на биосинтез АХЭ также представляет самокорректирующуюся систему, в основе которой лежит ингибиторное действие на ядерном уровне и активирующее—на цитоплазматическом. Эффект cGMP как в полной,

так и в безъядерной бесклеточной системе, заключался в снижении активности фермента, не проявлявшемся на фоне рибонуклеазы. Сопоставление же эффектов сGMP в системе с недифференцированной и дифференцированной микросомно-цитоплазматической фракцией дает основание предполагать, что этот циклический нуклеотид влияет на ядерное и цитоплазматическое звенья регуляции биосинтеза АХЭ, причем и в том и в другом случае как ингибитор.

В дифференцированной микросомно-цитоплазматической фракции эффекты АХ и сGMP трансформировались в противоположные, а влияние сАМР почти исчезало. При отсутствии в системе при этом ядер эффект во всех случаях оставался аналогичным тому, который имел место с недифференцированной микросомно-цитоплазматической фракцией. Настоящие результаты свидетельствуют о том, что на ядерное звено регуляции АХ, сАМР и сGMP действовали в комплексе с какими-то дифференцируемыми цитоплазматическими факторами. Доказательством этому служит восстановление эффекта АХ при добавлении дифференцируемого материала. Необходимо отметить, что эта реверсия аналогична обнаруженному ранее феномену трансформации эффекта АХ на синтез РНК в ядрах при добавлении цитозоля [8].

Если попытаться экстраполировать результаты, полученные в модельной системе, на цельную клетку, то можно представить систему регуляции биосинтеза АХЭ микросом нервных клеток следующим образом. АХ является положительным эффектором ядерного уровня экспрессии генов АХЭ; сАМР и сGMP служат отрицательными эффекторами—их действие противоположно АХ и, вероятно, является корректирующим. На цитоплазматическом уровне АХ и сGMP выступают как отрицательные эффекторы, а сАМР—как положительный. В основу же всей системы регуляции биосинтеза АХЭ в клетках нервной ткани, вероятно, должно быть положено влияние АХ (в комплексе с цитоплазматическим фактором) на ядерный уровень экспрессии генов АХЭ, так как только АХ проявлял себя как активатор на этом уровне.

Поддержание оптимального количества молекул АХЭ в соответствующих клетках нервной ткани может осуществляться АХ, постоянно присутствующим в цитоплазме холинергических нейронов. Следует заметить, что 20—30% АХ в нервной ткани представляет так называемый «свободный АХ» [10]. Нельзя также исключить, что какая-то часть освобождающегося в синапсах АХ при проведении нервного импульса может поступать в перикариальный постсинаптический клеточный нейрон. Принципиальная возможность поступления внеклеточного АХ в перикариальный нейрон была постулирована в литературе [11, 12].

Таким образом, в настоящей работе было показано регуляторное влияние АХ, сGMP и сАМР на уровень активности АХЭ микросом, которое позволяет предполагать существование сложной системы регуляции экспрессии генов АХЭ с участием этих агентов.

SYSTEM REGULATING ACETYLCHOLINESTERASE BIOSYNTHESIS VIA ACETYLCHOLINE, cAMP AND cGMP IN NERVE CELL MICROSOMES

SUDAKOVA N. M., ELAEV N. R.

Chair of Biochemistry and Organic Chemistry, State University,
Petrozavodsk

A spontaneous puromycin-sensitive increase in microsomal acetylcholinesterase (AChE) activity has been detected in a cell-free system containing isolated nuclei and microsome-cytosol fraction from rat brain. On preincubating this system with acetylcholine (ACh) (10^{-6} – 10^{-3} M) an increase in microsomal AChE activity is registered with maximal value of 20% (10^{-5} M ACh, 60 min incubation). In the presence of actinomycin D and puromycin ACh has no effect on the enzyme activity. Preincubation with cAMP and cGMP produces opposite effect on the activity of microsomal AChE. Without nuclei in this cell-free system ACh induces a decrease in puromycin-sensitive AChE activity.

Data obtained make it possible to regard ACh as a positive effector of AChE gene transcription and a negative effector of the enzyme polypeptide chains assemblage in cytosol. It has been demonstrated that ACh acts in concert with a low molecular weight cytosol factor when directing transcription or posttranscriptional processing and without the latter when directing translation. A system regulating AChE biosynthesis via ACh, cAMP and cGMP in nerve cell microsomes is proposed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Wethold R., Mahler H., Woor W. J. *Neurochem.*, 22, 4, 941–944, 1974.
2. Елаев Н. Р. *Биохимия*, 45, 10, 1749–1754, 1980.
3. Елаев Н. Р.—В кн.: I Всесоюзный семинар. Роль циклических нуклеотидов в метаболизме нервной ткани, Пушينو, Изд-во АН СССР, с. 8–9, 1980.
4. Елаев Н. Р. *Пробл. эндокринолог.*, 27, 1, 58–62, 1981.
5. Ellman A. L., Courtney K. D., Andres V., Teatherstone R. M. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 1, 88–95, 1961.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. *J. Biol. Chem.*, 193, 1, 265–269, 1951.
7. Урбах В. Ю. *Математическая статистика для биологов и медиков*, М., Изд-во АН СССР, 1963.
8. Елаев Н. Р. *Цитология*, 20, 10, 1173–1178, 1978.
9. Елаев Н. Р. *Цитология*, 20, 8, 970–972, 1978.
10. De Robertis E. *Science*, 156, 4046, 907–914, 1967.
11. Polak R. L. *Brit. J. Pharmacol.*, 36, 2, 144–152, 1969.
12. Schuberth V., Sundwall A. *Acta Physiol. Scand.*, 72, 1, 65–71, 1968.

Кафедра биохимии и органической химии
Петрозаводского государственного университета

Поступила 15. II 1982

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.821.6+612.822.3.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОГЕКСИМИДА И ЛИЗИНВАЗОПРЕССИНА
НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ КОРЫ МОЗГА ПРИ
ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОМ ПОВЕДЕНИИ ЖИВОТНЫХ

АНДРИАНОВ В. В.

Разрядная деятельность нервной клетки является одним из показателей ее вовлечения в центральные механизмы формирования целостного поведенческого акта. Однако структура паттерна разряда нейрона далеко не однозначна и может определяться как поступающим к нему синаптическим притоком, так и реализацией информации, хранящейся в аппаратах памяти. Наличие экзогенной и эндогенной информационных составляющих в генезе вызванных потенциалов показано в целом ряде исследований и имеет достаточное экспериментальное обоснование [1].

Если взаимосвязь между ответной реакцией нейрона и характером раздражения его рецептивного поля представляется достаточно изученной, то механизмы извлечения эндогенной информации из памяти нейрона остаются во многом еще не ясными.

Процессы образования следа памяти связаны с деятельностью белок-синтезирующего аппарата клетки. В частности, торможение трансляции циклогексимидом (ЦГ) заметно снижало скорость обучения, а иногда и полностью блокировало его [2]. Значительное место в процессах обучения и памяти отводится в настоящее время олигопептидам [3, 4]. Например, такой олигопептид, как лизинвазопрессин (ЛВП), уменьшал, а в некоторых случаях купировал амнестический эффект, вызванный применением блокатора белкового синтеза [5]. Можно предположить, что блокаторы трансляции влияют на синтез мобильных клеточных белков, а защитный эффект некоторых олигопептидов связан с их многосторонним влиянием на процессы метаболизма. В связи с этим представляется интересным установить особенности взаимоотношения данных веществ на отдельных нейронах ЦНС в условиях целостного поведения.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияний ЦГ и ЛВП на нейроны зрительной области коры больших полушарий головного мозга кошек при выполнении животным последовательных этапов поведенческой деятельности. Выбор именно зрительной области коры был продиктован тем соображением, что у кошек зрительная афферен-

тация является ведущей при формировании поведенческой деятельности. Для решения задачи была использована разработанная нами методика регистрации и микроионофоретического подведения биологически активных веществ к корковым нейронам в условиях свободного поведения животных [6]. Эксперименты были проведены на трех кошках, предварительно обученных выполнению инструментальной реакции, что приводило к подаче порции молока в 1 мл спустя 2 с от момента нажатия животным на педаль. Для опыта брали животных после суточного голодания.

Регистрацию импульсной активности осуществляли с помощью канала многоствольного электрода. Остальные каналы заполняли растворами ЦГ (2×10^{-3} М) и ЛВП (2×10^{-4} М). Величина форетического тока составляла 30—40 нА положительной полярности. Импульсную активность одного и того же нейрона записывали на магнетоде фирмы «Амрех» (США) при выполнении животным автоматизированного инструментального пищедобывательного акта без ионофореза (серия I) и на фоне подведения к нейрону либо ЦГ (серия II), либо ЛВП (серия III). При этом порядок проведения серий был различен. В первой группе (20 клеток) последовательно шли серии I, II, III, во второй группе (18 клеток)—I, III, II серии. Длительность фореза каждого из веществ к одному нейрону составляла 1—3 мин. Одновременного подведения двух веществ к одному нейрону не применяли. Запись активности каждого из 38 нейронов зрительной коры проводили на различных этапах поведенческой реакции: перед выполнением животным поведенческого акта; во время нажатия на педаль; на протяжении 2-секундного периода ожидания подкрепления; в момент появления молока в кормушке и в процессе лакания. Анализ разрядной деятельности нейронов выполняли путем построения пре- и постстимульных гистограмм методом прямого и обратного усреднения с шириной канала 50 мс по пяти реализациям инструментальной пищедобывательной реакции в каждой из серий эксперимента. Достоверность различий реакций нейронов оценивали по критерию (t) Стьюдента.

На рис. 1 приведены данные, полученные на нейроне, микроионофоретическое подведение ЦГ к которому увеличивало частоту разрядов перед выполнением животным поведенческого акта и во время лакания. Подведенный ЛВП вызывал активацию при нажатии на педаль, в периоде ожидания подкрепления, в момент появления молока в кормушке и значительно снижал разрядную деятельность во время лакания животным молока. У другого нейрона (рис. 2), увеличивавшего свою частоту разрядов во время лакания животным молока, ЦГ повышал активность и в момент выполнения нажатия на педаль. ЛВП, который снижал общий уровень импульсной активности того же нейрона, изменял паттерн разрядов в сторону нерегулярности на завершающем этапе поведения—лакания молока.

Проведенный анализ показал, что ЦГ и ЛВП могли либо не влиять, либо увеличивать или устранять имевшуюся частоту разрядов

и паттерн на том или ином этапе поведения. При этом ЛВП в большей степени, чем ЦГ, активировал нейроны перед выполнением животным поведенческого акта (36,8%), а также в момент появления молока в кормушке (42,1%) и устранял характерную структуру разряда в процессе лакания (15,5%). В то же время ЦГ в большей степени, чем ЛВП, снижал импульсную активность тех же нейронов перед выполнением

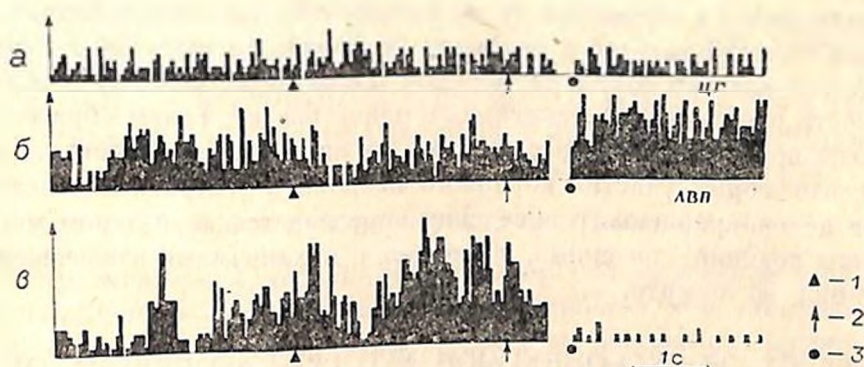


Рис. 1. Суммарные гистограммы импульсной активности одного и того же нейрона зрительной коры на этапах поведенческого акта в трех сериях эксперимента: *а*—без ионофореза, *б*—на фоне подведения ЦГ, *в*—на фоне подведения ЛВП; ширина канала 50 мс; 1—нажатие на педаль, 2—момент появления молока в кормушке, 3—начало лакания; отрезок времени—1 с

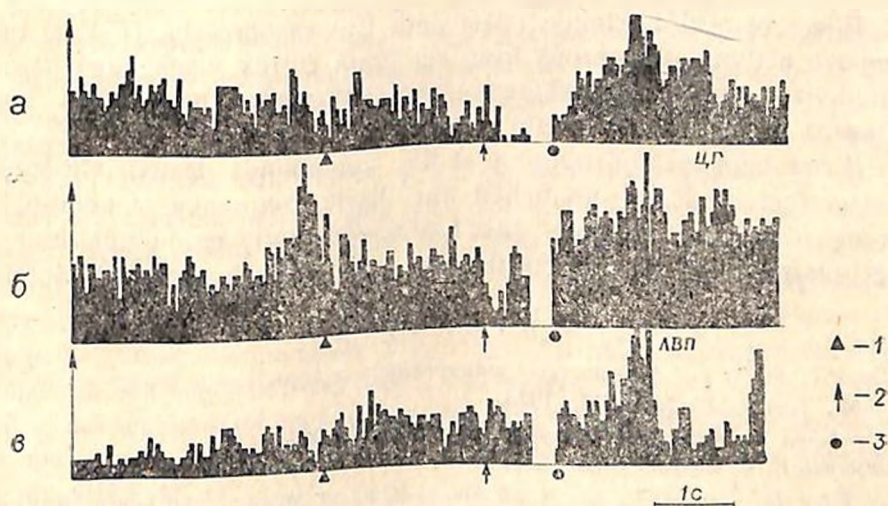


Рис. 2. Суммарные гистограммы импульсной активности другого нейрона зрительной коры на разных этапах поведенческого акта в трех сериях эксперимента: *а*—без ионофореза, *б*—на фоне подведения ЦГ, *в*—на фоне подведения ЛВП. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

животными инструментальной реакции (36,8%), в периоде ожидания подкрепления (36,8%) и приводил к более заметным активационным (42,1%) и тормозным (42,1%) перестройкам на стадии получения конечного полезного результата—лактания молока.

Принимая во внимание различный характер изменения импульсной активности одних и тех же нейронов на последовательных этапах поведенческого акта при подведении к ним ЦГ и ЛВП, можно предполагать, что особенности влияния исследованных веществ на интегративную деятельность нейрона были обусловлены спецификой нейрoхимических механизмов их действия. Так, эффекты ЛВП, вероятно, основываются на его модулирующем влиянии на синаптические процессы, а действие ЦГ заключается в изменении путей метаболизма клеточных белков. Отсутствие четких различий в реакциях нейронов первой (20 клеток) и второй (18 клеток) групп на порядок подводимых веществ говорит о сложности процессов, протекающих в одной клетке. Таким образом, результаты проведенных экспериментов, на наш взгляд, свидетельствуют о том, что форма участия коркового нейрона в построении отдельных этапов целенаправленного поведения определяется характером метаболических реакций, связанных, возможно, с механизмами извлечения информации из памяти.

EFFECT OF CYCLOHEXIMIDE AND LYS-VASOPRESSIN ON BRAIN NEURONAL ACTIVITY IN ANIMALS WITH GOAL-SEEKING BEHAVIOUR

ANDRIANOV V. V.

P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology, USSR Academy of Medical
Sciences, Moscow

Effect of cycloheximide (CH) and Lys-vasopressin (L-Vas) on the impulsive activity of neurons from cat brain cortex visual area has been studied in food-procuring animals. Both substances have been applied by means of microionophoretic technique.

It has been demonstrated that the compounds tested either didn't affect or increased and abolished the basic frequency of neuronal discharges. It may be suggested that L-Vas apparently modulates the synaptic processes while CH affects the metabolic pathways of cell proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Джонс Е. Р.—В кн.: Механизмы формирования и торможения условных рефлексов, М., Наука, с. 183—213, 1973.
2. Hayakawa M. Acta med. Okayama, 31, 161—175, 1977.
3. Ашмарин Н. П. Ж. эвол. биол. и физиол., 13, 570—578, 1977.
4. De Wied D., Bohus B.—In: Brain Mechanisms in Memory and Learning: From the single Neuron to Man. Ed. by M. A. Brazier. Raven Press, N. Y., p. 139—146, 1979.
5. Flexner J. B., Flexner L. B., Hoffman P. L., Walter R. Brain Res., 139, 139—143, 1977.
6. Андрианов В. В., Захаров Н. Д., Фадеев Ю. А. Физиол. ж. СССР, 63, 602—606, 1977.

НИИ нормальной физиологии
им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва

Поступила 21.XII 1981

УДК 577.151+577.153

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ИОНА ФТОРА НА ФОСФОДИЭСТЕРАЗУ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ

ФУРАЕВ В. В., КАЛИНИНА С. Н., ЭТИНГОФ Р. Н.

Фоторецепторный нейрон—палочка сетчатки—является пока единственным примером, когда рецепторный компонент функционально связан не с аденилатциклазой (АЦ), а с другим ферментом системы циклических нуклеотидов—фосфодиэстеразой (ФДЭ). ФДЭ играет ключевую роль в регуляции содержания циклических нуклеотидов в наружных сегментах палочек (НСП) сетчатки в ответ на поступающий извне стимул. При поглощении фоторецепторами квантов света, то есть освещении, активность ФДЭ НСП резко увеличивается, при этом активность гуанилатциклазы остается неизменной [1, 2].

В ряде работ отмечено подобие механизмов сопряжения АЦ и ФДЭ с соответствующими рецепторами [3, 4]. В обоих случаях для активации ферментов в ответ на поступающий стимул необходимы GTP или его негидролизуемый аналог—гуанилилимидодифосфат ($Gpp(NH)p$), связывающиеся с так называемыми G-белками, в комплекс которых входит и GTPаза. G-белки выполняют функцию непосредственных передатчиков сигнала с рецептора на фермент. Свойства G-белков АЦ системы изучены относительно подробно; так, показана возможность их рибоэпиглирования холерным токсином в присутствии NAD, что приводит к необратимой активации АЦ благодаря ингибированию GTPазы, обеспечивающей обычно обращение активации АЦ. АЦ активируется и NaF , который также воздействует на G-белки [5, 6].

С целью сравнения свойств систем сопряжения ФДЭ и АЦ со своими рецепторами в данной работе изучали влияние холерного токсина и NaF на ФДЭ НСП.

Вся работа выполнена на освещенных препаратах НСП сетчатки быка [7]. Из НСП, несколько модифицируя метод Купп [8], были получены и частично очищены два типа экстрактов: один, содержащий преимущественно ФДЭ (препарат 1), другой—G-белки (препарат 2). Мбелков этих экстрактов по данным диск-электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [9] соответствовали литературным данным [8, 10]. Опыты с холерным токсином проводили, как описано в работе Enomoto, Gill [11]. Активность ФДЭ P_i определяли, как и ранее, варьируя время инкубации и температуру [7].

В первой серии опытов изучали влияние ГТР (10^{-5} М), холерного токсина и NaF (10^{-2} М) на ФДЭ изолированных препаратов НСП.

Очевидно, что ГТР обуславливал существенную активацию ФДЭ (рис. 1, а). В том случае, если ГТР преникубировали с препаратами НСП 10—30 мин при 37°, активирующий эффект нуклеотида резко уменьшался с увеличением времени преникубации. Этот факт, скорее всего, связан с тем, что ГТРаза НСП обуславливала гидролиз ГТР до GDP и Pi, а GDP таким активирующим действием на ФДЭ в отличие от ГТР не обладает.

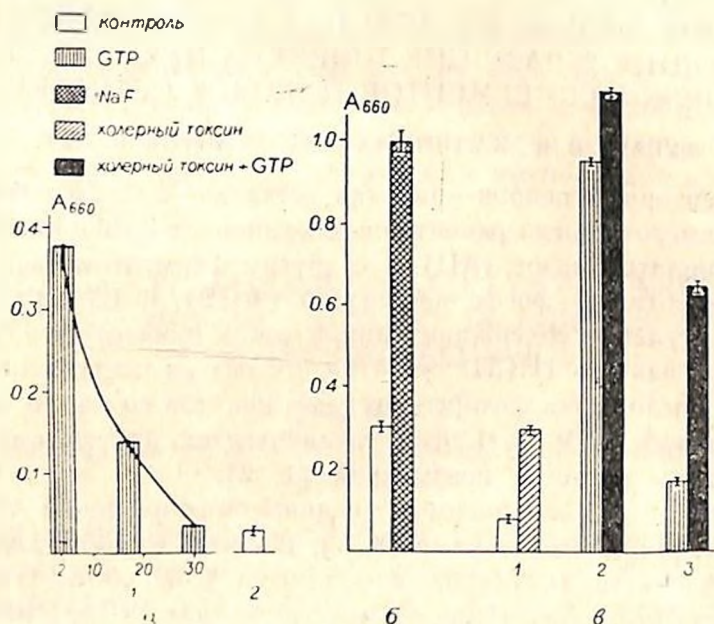


Рис. 1. Влияние ГТР (а), NaF (б) и холерного токсина (в) на ФДЭ в НСП. Ось абсцисс: 1, а—время преникубации ГТР в мин с препаратами НСП; 2, а—активность ФДЭ без ГТР; б—активность ФДЭ в присутствии NaF; 1, в—активность ФДЭ в контроле и опыте; 2, в и 3, в—активность ФДЭ в контроле и опыте в присутствии ГТР (преникубация ГТР с НСП—2 мин и 30 мин соответственно). Ось ординат—активность ФДЭ в единицах оптической плотности при 660 нм. Средние данные из 5—6 опытов

Из данных, представленных на рис. 1, б и в, видно, что как NaF, так и холерный токсин активировали ФДЭ НСП. Косвенным доказательством воздействия холерного токсина именно на ГТРаза НСП являются данные опытов с преникубацией ГТР с НСП (рис. 1, в; 2, 3 в). Очевидно, что в то время как в контрольных пробах активирующее действие ГТР на ФДЭ уменьшалось в 5,9 раза (ГТР гидролизует), в опытных это уменьшение составляло всего 1,6 раза. Наиболее возможная причина этого—ингибирование активности ГТРаза за счет ее рибозилирования.

Таким образом, результаты, полученные в первой серии экспериментов, свидетельствуют о том, что NaF и холерный токсин влияют на ФДЭ в НСП так же, как и на АЦ.

В случае АЦ системы отделение G-белков приводило к потере чувствительности АЦ к F^- [5, 6]. Исходя из полученных нами данных, очевидно, что активация ФДЭ (препарат 1) $Gpp(NH)p(10^{-5}M)$ имеет место лишь при добавлении препарата 2, то есть G-белков (рис. 2, а), и действие фторида обусловлено его влиянием (как и в случае АЦ) на G-белки (рис. 2, б). Незначительная активация препарата ФДЭ фторидом объясняется примесью G-белков в последнем.

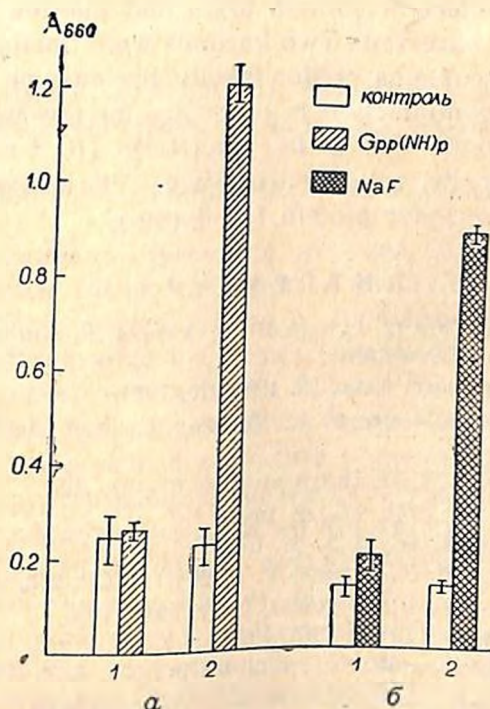


Рис. 2. Влияние $Gpp(NH)p$ (а) и NaF (б) на ФДЭ в реконструированных системах. Ось абсцисс: 1—активность ФДЭ (препарат 1), 2—активность ФДЭ (препарат 1+препарат 2). Ось ординат—активность ФДЭ в единицах оптической плотности при 660 нм. Средние данные из 5—6 опытов

Таким образом, и по характеру влияния, и по направлению действия фторида и холерного токсина на ФДЭ систему подобно действию этих агентов на АЦ систему.

Следует отметить, что в отличие от результатов других исследований [12, 13], нам удалось активировать ФДЭ в реконструированных системах без добавления рецептора, то есть НСП, что требует дальнейшего изучения.

EFFECT OF CHOLERA TOXIN AND FLUORIDE ON CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE FROM RETINAL RODS OUTER SEGMENTS

FURAEV V. V., KALININA S. N., ETINGOF R. N.

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

The activatory effect of cholera toxin and fluoride (10 mM) on the phosphodiesterase is observed. Two fractions were obtained from the rods outer segments: one contains predominantly the enzyme and the other—G-proteins. The G-protein fraction is necessary for the activation of phosphodiesterase by fluoride ions or by Gpp(NH)p (10^{-2} mM). The cholera toxin effect is due to its action on GTPase. The activation takes place without addition of receptor protein (rhodopsin).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bitensky M. W., Wheeler G. L., Aloni B., Vetury S., Matuo Y. Adv. in Cyclic Nucl. Res., 9, 553—572, 1978.
2. Этингоф Р. Н. Успехи совр. биол., 92, 198—213, 1981.
3. Shinozawa T., Sen Y., Wheeler G. L., Bitensky M. W. Y. Supramolec. Struct., 10, 185—190, 1979.
4. Этингоф Р. Н., Думлер И. Л. Нейрохимия, 1, 87—98, 1982.
5. Rodbell M. Nature, 284, 3751, 17—22, 1980.
6. Ткачук В. А. Укр. биохим. ж., 53, 5—27, 1981.
7. Думлер И. Л., Фураев В. В., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 253, 1504—1508, 1980.
8. Kuhn H. Neurochemistry International, 1, 269—285, 1980.
9. Laemmli V. K. Nature, 227, 680—685, 1970.
10. Godchaux W., Zimmerman W. F. J. Biol. Chem., 254, 7874—7884, 1979.
11. Enomoto K., Gill D. M. J. Biol Chem., 255, 1252—1358, 1980.
12. Hurley Y. B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 505—510, 1980.
13. Fung B. R., Hurley Y. B., Stryer L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 152—156, 1981.

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

Поступила 7. VII 1982

УДК 612.8.015:547.953

ОБ ИНТЕНСИВНОСТИ ОБМЕНА ФОСФОРА ФОСФОЛИПИДОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ТКАНИ МОЗГА

РАЙЗЕ Т. Е., ШАРАГИНА Л. М., ТЮЛЬКОВА Е. И.

В настоящее время становится все более очевидным, что большинство фосфолипидов (ФЛ), являющихся обязательными компонентами любых биомембран, синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме, а затем транспортируются к другим субцеллюлярным структурам. Это подтверждено достаточно большим количеством исследований, подавляющая часть которых выполнена на ткани печени [1—5].

Вследствие гетерогенности объекта и сложности получения чистых субклеточных структур работ по переносу ФЛ между органеллами ткани головного мозга довольно мало, но это явление продемонстрировано и на нервной ткани [6, 7]. Однако данные, полученные на субцеллюлярных образованиях ткани мозга, вызывают особый интерес, так как по метаболизму ФЛ ткани мозга и печени резко различаются. Ткань печени обеспечивает ФЛ не только свои собственные мембраны, но и является источником плазменных липопротеидов, а также секретирует ФЛ в желчь. В отличие от этого метаболические взаимоотношения субцеллюлярных структур в ткани мозга направлены исключительно на обеспечение жизнедеятельности и поддержание структурных элементов в клетках самой нервной ткани.

В работе, опубликованной ранее [8], исследовались содержание и обмен ФЛ в цитозоле и микросомной фракции ткани мозга крыс. Для выяснения метаболических взаимоотношений субцеллюлярных структур представляет интерес изучение обмена ФЛ и в других фракциях.

Одновременное исследование метаболизма ФЛ в различных по скорости их обновления структурах требует изучения динамики процесса включения меченого предшественника во времени. Нам известна лишь одна такая работа на ткани мозга [9], причем в ней были исследованы очень большие интервалы времени после введения изотопа и не все субклеточные фракции.

Задачей нашей работы явилось изучение содержания и скорости обмена фосфора ФЛ в субцеллюлярных структурах ткани больших полушарий головного мозга крыс в различные сроки после введения изотопа. Исследования проводили на взрослых белых крысах-самках линии Вистар. За меру интенсивности обмена ФЛ принимали скорость

включения ^{32}P -ортофосфата, который вводили внутривенно за 0,5, 1, 2, 3, 6 и 12 ч до декапитации. После чего извлекали большие полушария головного мозга, тщательно отмывали их от крови, очищали от сосудистых сплетений и оболочек. Все операции проводили на льду. Ткань взвешивали, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Готовили 10% тканевой гомогенат в 0,32 М растворе сахарозы на 0,01 М трис-буфере, pH 7,4. Субклеточные фракции получали по общепринятым методам [10, 11]. Исследовали митохондрии, синапсомы и миелин, получаемые при центрифугировании общей митохондриальной фракции в градиенте плотности сахарозы (2 ч, 53 700 g), микросомную фракцию (1 ч, 100 000 g) и надосадочную (цитозоль). Экстракцию липидов из гомогената ткани и отдельных субклеточных фракций, отмывку их от P_i и других нелипидных примесей проводили по методу Bligh, Dyer [12]. Верхнюю водно-метаноловую фазу после первой отмывки брали на определение содержания и радиоактивности P_i . В отмытом липидном экстракте определяли (после минерализации) количество липидного фосфора по методу Bartlett, [13], его радиоактивность (сцинтилляционный счетчик «Изокап-300») и вычисляли удельную радиоактивность (УР) липидного фосфора. Мерой интенсивности обмена фосфора ФЛ (или, точнее, мерой скорости их синтеза) являлась величина относительной удельной радиоактивности (ОУР), которую вычисляли как отношение УР фосфора ФЛ к УР P_i гомогената, умноженное на 100. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [14].

Таблица

Содержание и ОУР фосфора фосфолипидов субцеллюлярных структур ткани мозга крыс (через 2 ч после введения ^{32}P -ортофосфата)

Тканевой препарат	Содержание фосфора ФЛ, мкг	Содержание ФЛ, мг	О У Р
	мг белка	мг белка	
Гомогенат	$18,6 \pm 0,9$ (17)	$0,46 \pm 0,02$ (17)	$2,26 \pm 0,10$ (15)
Микросомы	$28,6 \pm 1,1$ (11)	$0,71 \pm 0,03$ (11)	$2,44 \pm 0,17$ (9)
Цитозоль	$3,64 \pm 0,51$ (10)	$0,09 \pm 0,01$ (10)	$4,18 \pm 0,34$ (8)
Миелин	$49,7 \pm 1,6$ (11)	$1,24 \pm 0,04$ (11)	$0,99 \pm 0,10$ (8)
Синапсомы	$18,8 \pm 0,7$ (10)	$0,47 \pm 0,02$ (10)	$1,93 \pm 0,17$ (6)
Митохондрии	$15,8 \pm 0,8$ (11)	$0,40 \pm 0,02$ (11)	$4,28 \pm 0,42$ (8)

Как видно из таблицы, самой богатой по содержанию ФЛ на единицу белка субклеточной фракцией являлся миелин, в котором отношение ФЛ/белок составляло приблизительно 1,24. В микросомах это отношение равно 0,71, во фракциях митохондрий и синапсом составляло соответственно 0,40 и 0,47. Надосадочная фракция—самая бедная по относительному содержанию ФЛ, в ней отношение ФЛ/белок равно 0,09.

Кривые нарастания ОУР фосфора ФЛ во времени в течение 12 ч после введения изотопа (рис.) носили сходный характер во всех исследованных фракциях. В течение первых 2 ч после введения изотопа происходило прямолинейное нарастание ОУР фосфора ФЛ, свидетельствующее о том, что 2-часовой интервал времени, при котором и были проведены, в основном, наши эксперименты, является вполне удовлетворительным при изучении метаболизма ФЛ одновременно во всех исследованных субклеточных фракциях. После 2 ч во всех из них (кроме миеллина) наблюдали некоторое снижение интенсивности включения меченого ^{32}P -ортофосфата в ФЛ, однако соотношение ОУР ФЛ различных фракций оставалось постоянным при всех изученных временных интервалах. По интенсивности обмена субклеточные фракции всегда располагались в следующем порядке: миеллин, синапсомы, микросомы, митохондрии; надсодочная фракция.

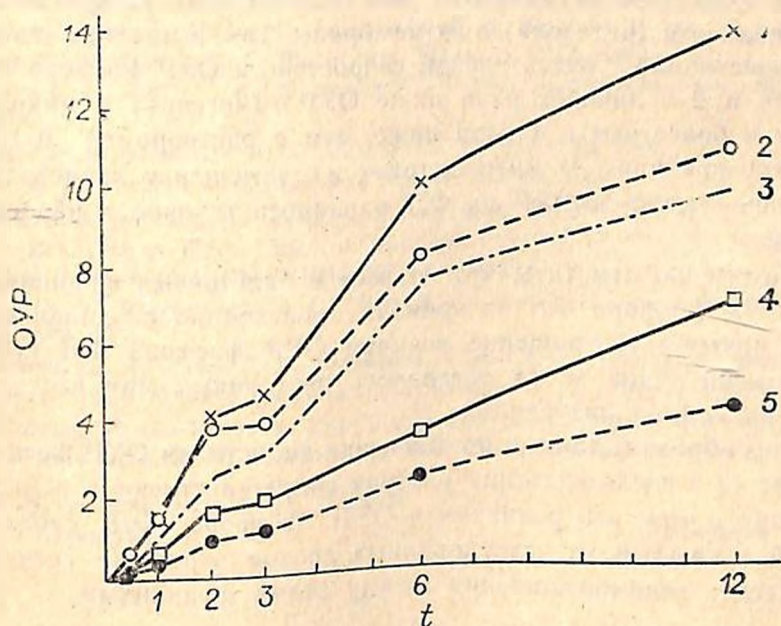


Рис. Динамика нарастания ОУР фосфора ФЛ субклеточных структур ткани мозга крыс во времени: 1—цитозоль, 2—митохондрии, 3—микросомы, 4—синапсомы, 5—миеллин

Через 2 ч после введения изотопа (табл.) ОУР ФЛ в миеллине была в 2 с лишним раза ниже, чем в гомогенате и микросомной фракции. ОУР ФЛ цитозоля и митохондриальной фракции в 1,7 раза выше, чем ОУР ФЛ гомогената и микросом.

Указанные различия в величинах ОУР определяемых суммарных ФЛ субклеточных фракций можно было бы объяснить разным набором индивидуальных ФЛ в них. Однако было показано [8, 15], что распределение отдельных ФЛ и соотношение величин их ОУР в гомогенате и исследованных субклеточных фракциях было приблизительно одинаково, что соответствует имеющимся литературным данным [10, 16].

Таким образом, различия в ОУР ФЛ субклеточных фракций не могут быть объяснены разным набором индивидуальных ФЛ в них.

Как было указано, основным местом синтеза ФЛ в клетках является эндоплазматический ретикулум. В этом отношении интересным может показаться тот факт, что ОУР ФЛ микросомной фракции значительно ниже, чем цитозоля. Можно предположить, что одной из причин этих различий является в основном то, что в эндоплазматическом ретикулуме синтезируются два пула ФЛ: один с более низкой ОУР— для обновления собственно мембран эндоплазматического ретикулума; другой—с более высокой ОУР фосфора ФЛ. Эти быстро метаболизирующие ФЛ транспортируются затем к другим мембранным структурам через цитозоль. Различия в ОУР фосфора ФЛ в митохондриях, синапсосомах и миелине можно, с этой точки зрения, трактовать как различия в скорости встраивания уже готовых молекул ФЛ из надсинаптической жидкости (цитозоля) в их мембраны. Так, в миелине это встраивание происходило с очень низкой скоростью, и ОУР фосфора ФЛ там оказалось в 2 с лишним раза ниже ОУР гомогената и микросомной фракции и более чем в 4 раза ниже, чем в растворимой и митохондриальной фракциях. В митохондриях же замещение происходило относительно быстро, и ОУР их ФЛ равнялось таковой в надсинаптической фракции.

Существенно отметить, что во всех субклеточных фракциях нарастание ОУР фосфора ФЛ во времени происходило с одинаковой скоростью, поэтому соотношение величин ОУР фосфора ФЛ субклеточных фракций ткани мозга оставалось постоянным при всех исследованных временных интервалах.

Таким образом, данные по динамике нарастания ОУР фосфора ФЛ в течение 12 ч после введения изотопа свидетельствуют в пользу предположения о том, что различия в ОУР фосфора ФЛ субклеточных фракций в каждый из исследованных сроков отражали истинные метаболические взаимоотношения между этими фракциями.

ON THE INTENSIVITY OF THE PHOSPHOLIPIDS PHOSPHOROUS METABOLISM IN BRAIN TISSUE SUBCELLULAR FRACTIONS

RAIZE T. E., SHARAGINA L. M., TUILKOVA E. I.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The content $\left(\frac{\mu\text{g P PhL}}{\text{mg protein}} \text{ or } \frac{\text{mg PhL}}{\text{mg protein}} \right)$ and turnover rate (relative specific activity, RSA) of phosphorus in phospholipids (PhL) have been studied in mitochondria, synaptosomes, myelin, microsomes and cytosol of rat brain hemispheres. The analyses were carried out at different time intervals after administration of ^{32}P -orthophosphate.

The data on RSA of PhL in subcellular fractions studied indicate that 2 pools of PhL are synthesized in endoplasmic reticulum of central

nervous system cells: one, with lower RSA, for the renewal of its own membranes, another, with higher RSA, transported through cytosol, for the renewal of membranes of other subcellular fractions. Data on the time course of RSA of PhL after ^{32}P injection indicate that the differences detected in RSA of PhL of subcellular fractions at each time interval reflect the metabolic relationship between the subcellular fractions tested.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дятловицкая Э. В., Тимофеева И. Г., Горькова Н. П., Бергельсон Л. Д. Биохимия, 41, 1235—1240, 1976.
2. Тимофеева И. Г., Сорокина И. Б., Дятловицкая Э. В. Биохимия, 46, 11—15, 1981.
3. Mc Murray W. C., Dawson R. M. C. Biochem. J., 112, 91—108, 1969.
4. Wirtz K. W. A. Biochim. Biophys. Acta, 344, 95—117, 1974.
5. Stuhne-Sekalec L., Stanacev N. Z. Can. J. Biochem., 58, 1082—1090, 1980.
6. Dawson R. M. C., Miller E., Jungalwala F. B. Biochem. J., 128, 18, 1972.
7. Carey E. M., Foster P. C. Bioch. Soc. Trans., 5, 1412—1414, 1977.
8. Гасцева С. В., Райзе Т. Е., Шарагина Л. М. Бюл. exper. биол. мед., 86, 533—535, 1978.
9. Mandel P., Nussbaum J. L. J. Neurochem., 13, 629—642, 1966.
10. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 1981.
11. Whittaker V. P. Progress. Biophys. Molec. Biol., 15, 39—96, 1965.
12. Bligh E. G., Dyer W. J. Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 911—917, 1959.
13. Bartlett G. R. J. Biol. Chem., 234, 466—468, 1959.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. F., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
15. Четвериков Д. А., Райзе Т. Е., Шарагина Л. М.—В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ (под ред. С. Е. Северина), М., Наука, с. 155—166, 1981.
16. Mc Murray W. C.—In: Form and function of phospholipids, (eds: G. B. Ansell, J. N. Hawthorn, R. M. C. Dawson). BBA Library, 3, 205—251, 1973.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
АН СССР, Ленинград

Поступила 16. I 1982

МЕТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ
И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

СОКОЛОВА Г. П., ПРОХОРОВА М. И.

В статье приводятся современные данные о составе жирных кислот в липидах головного мозга и их метаболизме. Подчеркивается важность для нормальной жизнедеятельности мозга определенного жирнокислотного состава в каждой фракции липидов мозга. Обсуждаются механизмы, регулирующие жирнокислотный состав в липидах на разных стадиях биосинтеза и в процессе их метаболизма, а также возможное участие жирных кислот в функциональной деятельности мозга.

Во всех моделях в молекулярной организации биомембран жирным кислотам (ЖК) отводится большая роль. Особенности строения углеводородных цепей ЖК могут определять способ и плотность упаковки липидов в мембранах, форму и степень образования полостей, характер взаимодействия с другими мембранными компонентами, а также температуру фазового перехода. Такое важнейшее свойство мембран, как жидкость, также обусловлено структурными особенностями ЖК липидов [1—5].

В многочисленных модельных экспериментах показано, что гидрофобные компоненты молекулы липидов оказывают большое влияние на их физико-химические свойства [6]. В составе липидов животного организма встречается около 50 разнообразных ЖК. В зависимости от того, какие именно ЖК входят в состав липидных молекул, физико-химические свойства последних могут варьировать. Поэтому разнообразие ЖК создает предпосылки для существования широкого спектра липидных молекул с различающимися физико-химическими и функциональными свойствами. Накапливаются данные о том, что от жирнокислотного состава липидов зависят многие фундаментальные биохимические процессы, причем особенно важным профиль ЖК оказался для регуляции активности множества мембраносвязанных ферментов и мембранного транспорта [7—10]. В ряде исследований доказана особая зависимость большинства ферментов от присутствия в глицерофосфолипиде ненасыщенных ЖК, которые присоединены обычно ко 2-му углеродному атому глицерина. Отсюда был сделан вывод, что необходимость ЖК для проявления ферментативной активности объясняется тем, что они, во-первых, придают мембранам высокую степень жидкости и, во-вторых, создают ферментному белку необ-

ходимое микроокружение для полного проявления ферментативной активности [11, 12]. Предполагают, что жидкость гидрофобного матрикса мембраны обеспечивает необходимую свободу движения, позволяющую мембранным белкам-ферментам подвергаться конформационным и трансляционным изменениям, связанным с их функциями. Если это так, то жидкость мембран и, следовательно, жирнокислотный состав могут иметь отношение к таким функциям, как мембранное слияние, контроль клеточного роста, латеральная диффузия поверхностных антигенов в спавленных клетках, образование головок антигенов и т. д. [3].

Исключительно большой интерес вызывают ЖК головного мозга. Содержание их в нем гораздо выше, чем в других органах, и составляет примерно 20—25% в расчете на сухой вес ткани. Поразительно разнообразие ЖК в этом органе [13]. Применение ГЖХ позволило продемонстрировать наличие в головном мозгу нескольких десятков ЖК с длиной цепи от 12 до 26 углеродных атомов, среди которых найдены насыщенные и ненасыщенные, нормальные и гидроксизамещенные кислоты с нечетным числом атомов углерода и др. Ненасыщенные кислоты мозга могут содержать от 1 до 6 двойных связей. Особенностью мозга является относительно большое содержание длинноцепочечных полиеновых кислот—20:4, 22:5, 22:6. Отдельные классы и фракции липидов мозга отличаются своим собственным характерным профилем ЖК. Имеет место также определенная специфичность жирнокислотного состава и в липидах разных отделов головного мозга, разных типов его клеток, субклеточных структур [14—17]. Иллюстрацией этого могут служить данные табл. 1, где приведен жирнокислотный состав синапсом и миелина—двух разных типов мембранных структур ЦНС, резко различающихся по своему происхождению и функциям [18—21]. Синапсомные мембраны происходят из плазматических мембран перикария нейронов, в то время как миелин формируется из плазматических мембран олигодендроглиальных клеток.

Соотношение ЖК в фосфолипидах (ФЛ), выделенных из синапсом и миелина, различно (табл. 1). Особенно большие различия наблюдаются в содержании ненасыщенных кислот. Например, содержание докозагексаеновой кислоты (22:6) в синапсомах в несколько раз выше, чем в миелине. В то же время миелин богаче моноеновыми кислотами (20:1, 18:1). Наблюдаемые различия в жирнокислотном составе липидов являются, видимо, отражением различий в функциях мембран. Высокое содержание докозагексаеновой кислоты в синапсомах, по-видимому, необходимо для активного ионного транспорта. Так, имеются данные о том, что активность Na^+ , K^+ -АТразы в синаптических мембранах зависит от присутствия полиеновых кислот в ФЛ [12]. Функциональная роль докозагексаеновой кислоты в этом ферменте не выяснена, но предполагают, что ее присутствие необходимо для обеспечения его молекулярной конфигурации и создания гидрофобного окружения. Преобладание в миелиновых ФЛ моноеновых и длинноцепочечных кислот, которых

много также в других миелиновых липидах (цереброзидах, сульфатидах), рассматривают как фактор, придающий миелиновой мембране необходимую структурную стабильность, обусловленную плотной упаковкой углеводородных цепей и их метаболической инертностью [22].

Таблица 1

Состав жирных кислот в глицерофосфолипидах синаптических и миелиновых мембран коры больших полушарий мозга обезьяны (% от суммы жирных кислот)

Количество углеродных атомов и двойных связей в кислоте (шифр)	Фосфатидилхолин		Фосфатидилэтноламин		Фосфатидилсерин + монофосфоэтиноиды	
	синаптические	миелин	синаптические	миелин	синаптические	миелин
16:0	50,0	33,1	7,4	4,9	3,5	2,6
18:0	12,4	17,0	25,5	15,9	44,3	43,0
18:1	27,2	42,3	12,1	33,2	11,4	38,5
20:1	0,7	0,9	1,6	9,3	—	2,5
20:4	3,8	3,2	10,1	11,6	8,3	6,3
22:4	0,8	0,6	6,4	11,1	3,5	3,7
22:6	3,0	2,3	34,9	10,6	26,9	2,9

Одной из особенностей жирнокислотного состава головного мозга является его относительная стабильность, устойчивость к внешним влияниям. В отличие от других органов, в которых происходят существенные сдвиги жирнокислотного состава при изменении количества и состава пищи, гормонального статуса, под влиянием различных фармакологических веществ, в головном мозгу зрелых животных жирнокислотный состав липидов не подвергается значительным изменениям [23—27], или эти изменения сильно растянуты во времени [28, 29]. При этом сохраняются специфические черты жирнокислотного состава в липидных фракциях и клеточных типах. Однако стабильность жирнокислотного состава в мозгу нельзя считать абсолютной. Например, в ответ на недостаточность существенных ЖК в ФЛ мозга появляются некоторые нетипичные ЖК (20:3) и уменьшается доля тетраеновых и гексаеновых кислот [29, 30], но при этом степень ненасыщенности липидов остается неизменной. Это значит, что во взрослом мозгу имеет место замена одних ЖК на другие, что свидетельствует о динамическом состоянии этих компонентов, но одновременно действуют регуляторные механизмы, ответственные за поддержание определенной степени ненасыщенности, или, иными словами, за сохранение физико-химических характеристик мембранных компонентов [24, 31]. Это говорит о защищенности ЦНС взрослых животных от различных внешних влияний. Однако при некоторых изменениях условий среды наблюдаются сдвиги как у холонокровных, так и у теплокровных животных [32], причем все же иногда удается установить прямую связь между морфологическими и функциональными нарушениями в мозгу и жирнокислотным измененным составом. Примером является болезнь Рефсема (Refsum), при которой причиной многочисленных нарушений является накопление в липидах мозга нетипичной для них фитановой (тетраметилгексадекановой) кислоты [33].

В то же время в мозгу растущих и новорожденных животных жирнокислотный состав липидов чувствителен к внешним воздействиям, особенно к недоеданию или к неполноценной по составу ЖК диете [34—36]. Наиболее сильным изменениям подвержена фракция плазмалогеновых фосфатидилэтаноламинов (ФЭА) [29]. Так как плазмалогены составляют треть миелиновых липидов, изменение их ацильных групп может оказывать большое влияние на формирование и функцию миелиновой мембраны. Особенно уязвимым мозг становится в период его бурного развития, когда происходит рост нейронов, глияльный митоз, аксо-дендритная пролиферация, формирование синаптических связей и, наконец, миелинизация [34, 35]. Продолжительная неполноценная диета в этот период часто приводит к необратимым функциональным нарушениям, в том числе и к расстройству психической деятельности [25, 37].

Данные о нарушении функциональной деятельности мозга при сдвигах жирнокислотного состава ярко свидетельствуют о том, что определенный профиль ЖК в липидах является необходимым условием нормального функционирования ЦНС и одновременно указывают на наличие в мозгу особых регуляторных механизмов, поддерживающих специфический состав ЖК в различных липидах. Расшифровка этих механизмов представляет собой одну из важнейших задач, так как является ключом для решения более сложной проблемы, а именно—регулирования мембранных свойств клетки.

В отношении мозга эти механизмы изучены слабо. В принципе, регуляция жирнокислотного состава может осуществляться на различных стадиях биосинтеза липидов и разными путями (рис. 1). Уже на этапе биосинтеза фосфатидной кислоты (рис. 1, а) благодаря специфичности ацилирующих ферментов 1- и 2-й углеродные атомы глицерина ацилируются различными ЖК. В печени, например, 1-е положение эстерифицируется преимущественно пальмитиновой кислотой (16:0), и это приводит к образованию фосфатидных кислот, сильно обогащенных этой кислотой [4]. В мозгу же 1-й углеродный атом глицерина ацилируется одинаково интенсивно пальмитиновой и стеариновой кислотами (16:0, 18:0) [38]. Далее присоединяется вторая ЖК, причем в печени ацилирование 2-го углеродного атома глицерина идет лучше всего олеиновой (18:1) и линолевой (18:2) кислотами, а в мозгу—арахидоновой (20:4) и частично олеиновой и линолевой [39]. На следующей стадии биосинтеза фосфатидная кислота превращается в диглицерид (рис. 1, б), который используется для биосинтеза фосфатидилхолина (ФХ) и ФЭА. Жирнокислотный состав этих ФЛ может дополнительно регулироваться специфичностью ферментов, присоединяющих азотистое основание. Например, для синтеза ФХ могут преимущественно использоваться молекулярные виды диглицеридов, содержащие пальмитиновую и олеиновую кислоты (рис. 1, в), пальмитиновую и линолеовую, пальмитиновую и арахидоновую [39]. В то же время для образования ФЭА предпочтительно отбираются молекулы диглицеридов со стеариновой и докозагексаеиновой кислотами (рис. 1, г), причем фермент, присоединяющий этаноламин,

оказывается особенно специфичным к ЖК во втором положении, то есть к ненасыщенной. Таким образом, при биосинтезе ФХ и ФЭА благодаря специфичности ферментов формируются ФЛ, обогащенные теми или иными кислотами, то есть с характерным профилем ЖК.

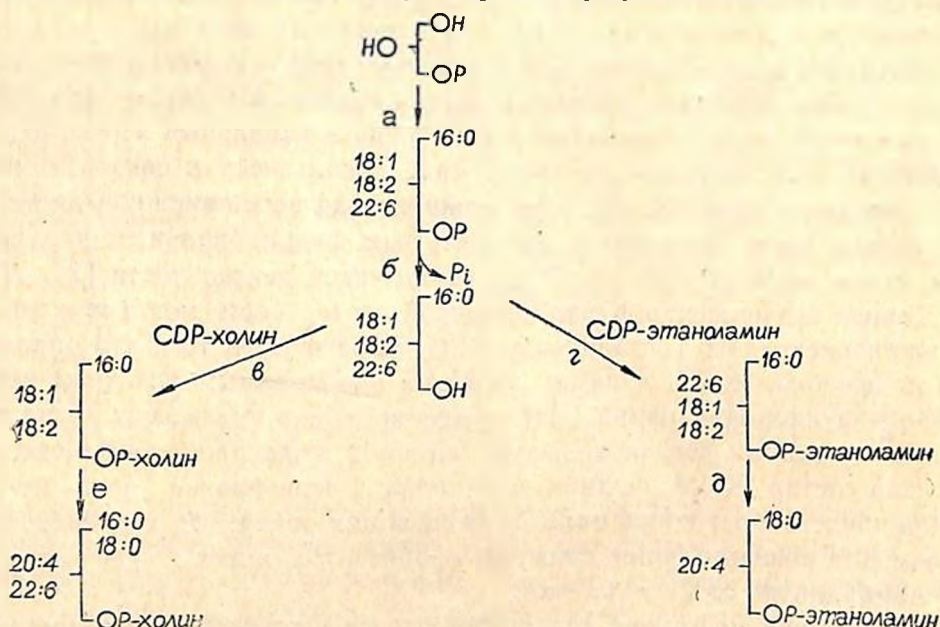


Рис. 1. Регуляция жирнокислотного состава в процессе биосинтеза глицеролипидов [39]

Однако только этими механизмами нельзя объяснить все особенности жирнокислотного состава отдельных липидов, наблюдаемые *in vivo*. В мозгу и других органах было замечено отсутствие полного соответствия между жирнокислотными составами ФЛ и их предшественников—фосфатидных кислот и диглицеридов. Работами Lands [40, 41] было впервые показано, что существует так называемый цикл деацилирование—реацилирование, при котором происходит замена ЖК в молекуле ФЛ, но не затрагиваются другие ее компоненты. Предпосылкой для этого цикла является наличие фосфолипаз, отщепляющих ЖК от ФЛ и образующих лизосоединение, и ацилтрансфераз, которые присоединяют новую ЖК вместо отщепленной. Показано, что полиеновые кислоты предпочтительно ацилируют 2-е положение, а насыщенные—1-е (рис. 1, д, е). Видимо, ацилобменный механизм является особенно важным для контроля ЖК во втором положении. Поскольку азотистые основания тоже могут заменяться независимо от других компонентов ФЛ [42], можно заключить, что липиды, помимо синтеза *de novo*, могут быть обновлены при помощи метаболически более экономного механизма. Точная скорость и соотношение этих реакций неизвестны, но их примерный вклад в обновление липидов отражен на рис. 2, где толщина стрелок соответствует удельному весу данного процесса [42]. Можно видеть, что ацилобменные реакции, особенно замена ненасыщенной кис-

лоты во втором положении, сильно преобладают над обменом азотистых оснований.

Приведенная схема отражает интенсивность процессов в печени, но и в ткани мозга, по-видимому, имеет место аналогичная картина. Так, по данным ряда авторов [43], обмен азотистых оснований в мозгу происходит очень слабо, и в основном в нейронах. В то же время ацил-обменные реакции широко распространены в головном мозгу [38, 44—46]. Эти реакции, как и обмен азотистых оснований, можно рассматривать как средство локального изменения физических, а следовательно, и функциональных свойств мембран и как один из регуляторных механизмов, с помощью которых эти свойства контролируются [7].

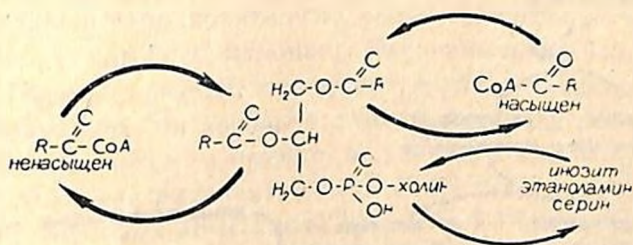


Рис. 2. Примерная скорость обмена разных компонентов липидной молекулы (отражена толщиной стрелок) [42]

Изменение гидрофобных областей мембраны при переходе диацильных форм ФЛ в моноацильные и обратно может оказать влияние на различные мембранные процессы, в том числе на проницаемость для различных веществ, транспорт ионов и т. д. Недавно была показана зависимость активности Na^+ , K^+ -АТФазы в синапсосамах от присутствия полиеновых кислот в глицерофосфолипидах [12]. При их отщеплении активность фермента резко снижалась. В то же время удаление полярных групп в молекуле ФЛ сказывалось на активности фермента значительно слабее. Авторы предполагают, что ингибирующий эффект, наблюдаемый после отщепления ненасыщенных ЖК, связан с изменением жидкостности, то есть вязкости мембраны. Показана также зависимость транспорта кальция в синапсосамах от присутствия полиеновых кислот [12].

Ацилобменные реакции могут иметь прямое отношение и ко многим другим процессам, влияя на активность ряда ферментов (аденилатциклазы, GTP-фосфорилхолинцитидилтрансферазы, синтетазы ЖК), на синтез простагландинов, чувствительность фоторецепторов и т. д. [47, 48]. Некоторые авторы связывают ферментативное деацилирование—реацилирование с эффектом синаптической передачи [46, 49]. Согласно их данным, под влиянием норадреналина в синапсосамах происходит активирование фосфолипазы A_2 , отщепляющей ЖК во втором положении глицерофосфолипида, и это активирование опосредовано cAMP. Таким образом, нейромедиатор модифицирует обмен ФЛ в синаптических мембранах путем вовлечения в этот процесс реакций деацилирования. Ва-

донного интрацеребрально, включалась в ФЛ уже через 5 с [59]. Понятно, что результаты, полученные при использовании в качестве предшественника длинноцепочечных ЖК или глицерина, свидетельствуют скорее о скорости биосинтеза целой молекулы липидов и ацилирования, нежели об интенсивности биосинтеза ЖК. Более информативными в этом отношении являются опыты с применением простых предшественников ЖК, главным образом, ацетата. В экспериментах с применением этого предшественника, а также глюкозы, некоторым авторам удалось показать быстрое включение метки в ацильные группы липидов [50].

Мы в течение ряда лет также проводили изучение состава и метаболизма ЖК глицерофосфолипидов головного мозга. При этом были применены различные радиоактивные предшественники ($2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат, $1\text{-}^{14}\text{C}$ -пропионат, 1- или $2\text{-}^{14}\text{C}$ -малонат). Эксперименты были поставлены на животных (крысах) разных возрастных групп. Большинство исследований было проведено при довольно длительной экспозиции с радиоактивным предшественником, а именно, в течение 1 ч. В табл. 2 приведены данные по удельной радиоактивности (УР) исследованных фракций ФЛ и их ЖК у взрослых крыс после введения $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата. Фракции ФЛ выделяли из мозга, печени и почек; для их получения использовали метод ТСХ. Радиоактивность проб измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика типа СБС-1.

Таблица 2

Удельная радиоактивность глицерофосфолипидов и их жирных кислот в мозгу, печени и почках взрослых крыс после введения ^{14}C -ацетата (имп/мин·мг $^{-1}$)

Фракции фосфолипидов	М о з г		П е ч е н ь		П о ч к и	
	фосфолипиды	ЖК	фосфолипиды	ЖК	фосфолипиды	ЖК
Фосфатидилсерин	482 ± 50	657 ± 45	4680 ± 1200	1746 ± 250	3793 ± 1150	1781 ± 210
Фосфатидилхолин	847 ± 190	1036 ± 193	4160 ± 1200	2132 ± 291	6862 ± 1227	4721 ± 1050
Фосфатидилэтаноламин	500 ± 92	574 ± 170	3413 ± 410	2386 ± 920	2995 ± 303	2195 ± 160

Как видно из табл. 2, УР ЖК в глицерофосфолипидах головного мозга ниже, чем в других органах. Однако в мозгу, в отличие от других органов, величина УР ЖК во всех ФЛ превосходит величину УР соответствующих фракций ФЛ. Если рассчитать относительную УР (ОУР) ЖК, то есть ту долю радиоактивности, которая сосредоточена в ЖК части молекулы ФЛ*, то разница между органами проявляется особен-

* ОУР ЖК рассчитывалась следующим образом (на примере фосфатидилсерина—ФС): УР ФС—483 имп/мин·мг $^{-1}$ (табл. 2); УР ЖК ФС—657 имп/мин·мг $^{-1}$; содержание ЖК в ФС—68% (рассчитано по данным ГЖХ).

$$\text{ОУР ЖК} = \frac{657 \times 68}{483 \times 100} = 92\%$$

но отчетливо (рис. 4). Из рис. 4 видно, что ОУР ЖК в головном мозгу значительно выше, чем в печени и почках, следовательно, обмен ацильных групп в мозгу происходит более интенсивно, чем в других исследованных органах. Аналогичные данные получены нами и при использовании другого предшественника—пропионата. В этом случае в ацильных группах ФЛ головного мозга содержится от 33 до 53% от общей радиоактивности молекулы, то есть значительно меньше, чем в опытах с ацетатом (рис. 4). Это указывает на то, что эффективность утилизации пропионата для биосинтеза ЖК слабее, чем эффективность ацетата. В печени и почках в составе ЖК ФЛ было обнаружено всего от 8 до 30% от общей радиоактивности молекулы ФЛ, то есть меньше, чем в мозгу. Следовательно, несмотря на сравнительно слабую утилизацию пропионата для биосинтеза ЖК, при использовании этого предшественника наиболее высокая интенсивность обмена ацильных групп имеет место в головном мозгу. Такая же закономерность обнаружена и в экспериментах, в которых предшественником служил малонат [60], и не только у взрослых, но и у растущих животных.

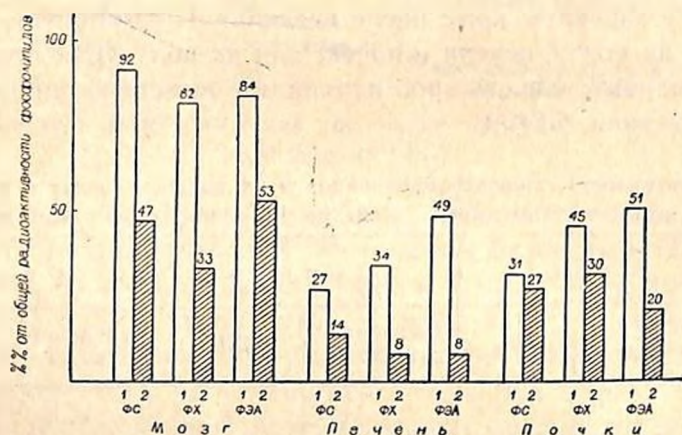


Рис. 4. Радиоактивность жирных кислот глицерофосфолипидов в разных органах крыс после введения ацетата и пропионата (в % от общей радиоактивности фосфолипидной фракции). 1—ацетат; 2—пропионат. ФС—фосфатидилсерин, ФХ—фосфатидилхолин, ФЗА—фосфатидилэтаноламин

Исходя из литературных данных о быстром обновлении липидов и их ЖК в головном мозгу [12, 50 и др.], мы предприняли серию экспериментов, где срок экспозиции с радиоактивным предшественником был минимальным. В этих опытах $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат вводили интракаротидно, и через 15—20 с после его введения крыс декапитировали. На извлечение мозга из черепной коробки, обработку ткани, взятие навески до фиксации ее в хлороформ-метаноловой смеси уходило еще 40—60 с. Таким образом, продолжительность экспозиции была 1—1,5 мин.

Из табл. 3 видно, что все исследованные фракции липидов, несмотря на короткую экспозицию, обладали значительной радиоактивностью, особенно фракции нейтральных липидов и свободных ЖК. При этом радиоактивность была не только в самих липидах, но и в их ЖК. Поскольку мы вводили простейший предшественник ЖК—ацетат, а в состав ли-

пидов входят только длинноцепочечные ЖК, обнаружение радиоактивности в жирнокислотной части липидов свидетельствует о том, что за короткое время эксперимента осуществился синтез ЖК с длинной цепью и синтезированные кислоты включились в сложные липиды.

Таблица 3

Удельная радиоактивность глицеролипидов и их жирных кислот в головном мозгу при кратковременной экспозиции с ацетатом (нмг/мин. мг⁻¹)

Фракции липидов	Липиды	ЖК
Фосфатидилсерин	79±11	34±6
Фосфатидилхолин	121±15	35±4
Фосфатидилэтанол-амин	70±7	24±6
Моноглицериды	234±18	144±14
Диглицериды	283±40	136±7
Триглицериды	201±60	127±31
Свободные ЖК	820±160	

Полученные данные свидетельствуют о том, что обмен липидов и их ЖК в головном мозгу является, по-видимому, гораздо более динамичным процессом, чем это принято считать. Для объяснения полученных результатов и выяснения механизмов, обеспечивающих быстрый синтез липидов, несомненно, необходимы дальнейшие эксперименты.

METABOLISM OF BRAIN FATTY ACIDS AND ITS REGULATION

SOKOLOVA G. P., PROKHOROVA M. I.

Institute of Physiology of Leningrad State University

The current data on the composition of fatty acids in brain lipids and their metabolism have been reviewed. The significance of the constant fatty acid composition of each lipid fraction of brain for its normal functioning is emphasized. The mechanisms regulating fatty acids composition of brain lipids and possible participation of fatty acids in the functional activity of brain are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malhotra S. K.—In: Membrane and ion transport. Ed. by Bittar E. E. N. Y. Wiley-Sons, 1, 1—21, 1970.
2. Bishop D. G.—In: Biochemistry and methodology of lipids. Ed. by Johnson A. R. Davenport J. B., N. Y., Wiley, Sons. p. 391—425, 1971.
3. Jain M. K., White H. B. Adv. Lipid Res., 15, 1—60, 1977.
4. Holub B. J., Kuksis A. Adv. Lipid Res., 16, 1—20, 1978.
5. Klausner R. D., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., Karnovsky M. J. J. Biol. Chem., 255, 1286—1295, 1980.
6. Chapman D.—In: Lipids, malnutrition and developing brain. Ed. by Elliot K., p. 31—42. Ciba found. symp., 1971.
7. Van Deenen L. L. M., Van den Bosch H., Van Golde L. M. G., Scherphof G. L., Walte B. M.—In: Cellular compartmentalization and control of fatty acid metabolism. Ed. by Gran F. C., Universitetsforlaget, Oslo. Acad. Press, N. Y.—L., p. 1—24, 1968.

8. Fourcans B., Jain M. K. *Adv. Lipid Res.*, 12, 147—226, 1974.
9. Helmkamp G. M. *Biochemistry*, 19, 2050—2056, 1980.
10. Yasuda M., Fujita T., Higashio T., Okahara T., Abe Y., Yamamoto K. *Pflüger Arch.*, 385, 111—116, 1980.
11. Janki R. M., Aithal H. N., Tustanoff E. R., Ball A. I. S.—In: *Biomembranes*. Ed. by L. Packer. N. Y., Acad. Press, p. 74—79, 1974.
12. Sun A. Y., Sun G. Y.—In: *Function and metabolism of phospholipids in the central and peripheral nervous system*. Ed. by Porcellati G., Amaducci L., Galli C. 72, N. Y.—L., Plenum Press, p. 149—197, 1976.
13. Соколова Г. П.—В сб.: *Нервная система*, Изд-во ЛГУ, 15, 35—59, 1975.
14. O'Brien J. S., Sampson E. L. J. *Lipid Res.*, 6, 537—544, 1965.
15. Помазанская Л. Ф., Фрайз Л., Мандель П. Ж. *эвол. биох. и физиол.*, 5, 523—530, 1969.
16. Соколова Г. П., Золотова Л. А., Блюдзин Ю. А. (Sokolova, Zolotova, Bljudzin)—XI IUB Congress, Hamburg, 12—7—071, 1976.
17. Блюдзин Ю. А., Соколова Г. П., Прохорова М. И. II Всесоюз. симп. по структуре, биосинтезу и превращению липидов в организме. Тезисы докл., Л., с. 131, 1975.
18. Sun G. Y., Sun A. Y. *Biochim. Biophys. Acta*, 280, 306—315, 1972.
19. Peters A., Vaughn E.—In: *Myelination*. Ed. by Davison A. M., Peters A., N. Y., p. 3—79, Springf., 111, Thomas, 1970.
20. Davison A. N.—In: *Myelination*. Ed. by Davison A. N., Peters A., p. 80—161, Springf., 111, Thomas, 1970.
21. Agrawal H. C., Davison A. N.—In: *Biochemistry of the developing brain*. Ed. Himwich W. I, 144—174, N. Y. Decker, 1973.
22. Burton R. M.—In: *Handbook of neurochem.* Ed. by Lajtha A. 5, part A, 199—216, N. Y., Plenum Press, 1971.
23. Hansen J. B., Clausen J. *Zeitschr. Ernährungswiss.*, 9, 278—289, 1969.
24. Galli G., White H. B., Paoletti R.—In: *Chemistry and brain development*. Ed. by Paoletti R., Davison A. N. p. 425—441, N. Y.—L., Plenum Press, 1971.
25. Ramsey R. B., Nicholas H. J. *Adv. Lipid Res.*, 10, 144—232, 1972.
26. Joel C. D., Ellis C. A., Luce J. K., Joel P. B., Swanson M. R., Stroemer J. R. J. *Neurochem.*, 23, 23—28, 1974.
27. Krpec E. M. *Липиды клеточных мембран*, Л., Наука, 1981.
28. Walker B. L. *Lipids*, 2, 497—503, 1967.
29. Sun G. Y., Sun A. Y. *Lipids*, 9, 450—454, 1974.
30. Alling C., Bruce A., Carlsson J., Svennerholm L. J. *Neurochem.*, 23, 1263—1270, 1974.
31. Montfoort A., Van Golde L. M. G., Van Deenen L. L. M. *Biochem. Biophys. Acta*, 231, 333—342, 1971.
32. Pilz H., Jatzkewitz H. J. *Neurochem.*, 11, 603—611, 1964.
33. Mc Brinn M. C., O'Brien J. G. J. *Lipid Res.*, 9, 552—561, 1968.
34. Dobbing J.—In: *Chemistry and Brain Development*. Ed. by Paoletti R., Davison A. N., N. Y.—L., Plenum Press, p. 399—413, 1971.
35. Ghittoni N. E., Farina de Raveglia J. J. *Neurochem.*, 21, 983—987, 1973.
36. Montamat E. E. A., Aeberhard E., Heuen de Bronta D. *Acta physiol. latinoamer.*, 24, 57—64, 1974.
37. Rydzynski Z.—In: *Chemistry and brain development*. Ed. by Paoletti R., Davison A. N., N. Y.—L., Plenum Press, p. 437—439, 1971.
38. Baker R. R., Thompson W. *Biochim. Biophys. Acta*, 270, 489—503, 1972.
39. McMurray W. C., Magee W. L. *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 129—161, 1972.
40. Lands W. E. M. J. *Biol. Chem.*, 235, 2233—2237, 1960.
41. Lands W. E. M., Merkl J. J. *Biol. Chem.*, 238, 898—904, 1963.
42. Thompson G. A.—In: *Form and function of phospholipids*. Ed. by Ansell G. B.

- Hawthorne J. N., Dawson R. M. C., Amsterdam—London. Elsevier Scientific Publishing Company, p. 67, 1973.
43. Brunetti M., Galli A., Orlando P., Porcellati G.—In: Function and metabolism of phospholipids in the central and peripheral nervous system. Ed. by Porcellati G., Amaducci L., Galli C. N. Y.—L., Plenum Press, 72, 63—78, 1976.
 44. Webster G. R. Biochem. J., 102, 373—376, 1967.
 45. Bräuning C., Gercken G. J. Neurochem., 26, 1257—1261, 1976.
 46. Bažan N. G.—In: Function and metabolism of phospholipids in the central and nervous system. Ed. by Porcellati G., Amaducci L., Galli C. N. Y.—L., Plenum Press, 72, 63—78, 1976.
 47. Galli G., Spagnuolo C., Rodriguez M., Cenedella R. J.—In: Function and metabolism of phospholipids in the central and peripheral nervous system. Ed. by Porcellati G., Amaducci L., Galli C. N. Y.—L., Plenum Press, 72, 337—346, 1976.
 48. Orlando P., Cerrito F., Porcellati G.—In: Function and metabolism of phospholipids in the central and peripheral nervous system. Ed. by Porcellati G., Amaducci L., Galli C. N. Y.—L., Plenum Press, 72, 79—94, 1976.
 49. Rowe C. E., Gullis R. J.—In: Function and metabolism of phospholipids in the central and peripheral nervous system. Ed. by Porcellati G., Amaducci L., Galli C., N. Y.—L., Plenum Press, 72, 211—225, 1976.
 50. Dhopeshwarkar J. F., Mead G. A. Adv. Lipid Res., 11, 109—142, 1973.
 51. Pardridge W. M., Mletus L. J. J. Neurochem., 34, 463—466, 1980.
 52. D'Adamo A. F.—In: Handbook of neurochem., vol. 111, Ed. by Lajtha A. N. Y.—L., Plenum Press, p. 525—568, 1970.
 53. Wykle P. L.—In: Lipid metabolism in mammals. Ed. by Snyder F., N. Y.—L., Plenum Press, p. 317—366, 1977.
 54. Volpe J. J., Kishimoto Y. J. Neurochem., 19, 737—753, 1972.
 55. Cook H. W., Spense M. W. J. Biol. Chem., 248, 1786—1793, 1973.
 56. Yau T. M., Sun G. Y. J. Neurochem., 23, 99—104, 1974.
 57. Sun G. Y., Yau T. M., J. Neurochem., 27, 87—95, 1976.
 58. Gozlan-Devillierre N., Baumann N., Bourre J. M. Biochem. Biophys. Acta, 528, 490—496, 1978.
 59. Porcellati G., Binaglia L.—In: Lipids. Ed. by Paoletti R., Paoletti G., Jacini G., N. Y., Raven Press, 1, 76—87, 1976.
 60. Соколова Г. П., Григорьев Н. П. Вестн. ЛГУ, 15, 94—98, 1978.

Физиологический институт
Ленинградского государственного университета

Поступила 16. XI 1981

УДК 66.094.53:577.122

РЕГУЛЯЦИЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

ПАРСАДАНЯН Г. К.

Ряд нейротрансмиттеров, гормонов и других регуляторных агентов влияет на уровень фосфорилирования специфических белков в НС. Эти многоэтапные каскадные системы могут включать в качестве вторых мессенджеров cAMP, cGMP и Ca^{2+} . Обсуждается роль фосфопротеинов в синаптической передаче, равно как и в мобилизации запасных углеводов и липидов и в других метаболических процессах, происходящих в нервной ткани. Описываются свойства эндогенных фосфопротеинфосфатаз, занимающих важное место в сохранении динамического равновесия указанных каскадных систем.

Посттрансляционная ковалентная модификация белков занимает ведущее место в молекулярных механизмах биологической регуляции. По существующим оценкам установлено не менее 125 разных видов такой модификации белков, включая изменение их аминокислотных остатков [1]. Из них лишь небольшое число процессов можно считать легкообратимыми: а) фосфорилирование—дефосфорилирование, впервые показанное для гликоген-фосфоорилазы [2, 3]; б) ацетилирование—деацетилирование [4]; в) аденилирование—деаденилирование [5]; г) уридилирование—деуридилирование [6]; д) метилирование—деметиличрование [7] и е) переходы типа $SS \rightleftharpoons SH$.

Обратимая модификация белков предполагает наличие двух ферментов, один из которых ее вызывает, а другой возвращает видоизмененный белок в его исходное состояние «покоя». Поскольку ковалентные модификации часто приводят к изменению активности взаимопревращающихся ферментных белков, их рассматривали как «метаболические выключатели» для включения или выключения метаболических процессов в ответ на аллостерические стимулы. В настоящее время это рассматривается как процесс, приводящий к установлению динамического равновесия, которое может колебаться в широких пределах при изменении концентрации эффекторов, регулирующих активность ферментов, ответственных за данные взаимопревращения. Исключительную роль в этих каскадных системах как по своей распространенности, так и по значению модифицируемых ферментных и неферментных белков играют реакции фосфорилирования—дефосфорилирования.

В настоящем обзоре подвергнуто рассмотрению значение процессов фосфорилирования белков для функционирования ЦНС. Ввиду полифункциональности фосфопротеинов (ФП) нервной ткани соответствующее внимание в нем уделено как регуляции уровня фосфорилированности различных ферментов клеточного сока (контролирующих энергетический обмен) и ядерных гистонов (контролирующих синтез новых белков), так и изменению состояния фосфорилирования мембранных белков, участвующих в регуляции проницаемости и реализации синаптической передачи.

Вопросы, связанные с гормональной и клеточной регуляцией каскадных систем, участвующих в регуляции уровня фосфорилированности ФП в тканях, а также описание структуры и функции отдельных ФП рассмотрены в ряде обзоров, опубликованных за последние годы [8—12]. Многочисленные физиологические и биологические реакции организма регулируются ферментами, участвующими в метаболизме ФП, активность которых находится под контролем соответствующих гормонов или нейромедиаторов (рис. 1). Центральное место в этих процессах занимает сАМР, играющая роль посредника и усилителя поступающих сигналов. Стимуляция специфической аденилатциклазы, присутствующей в ткани-мишени, гормонами и нейромедиаторами приводит к интен-

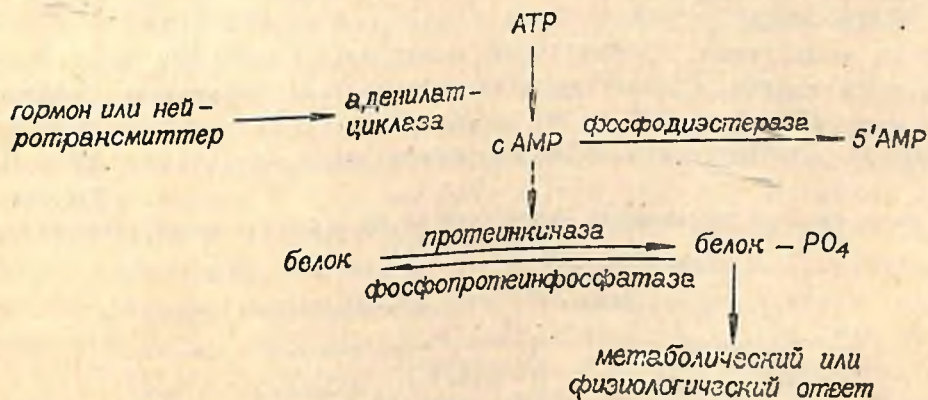


Рис. 1. Участие фосфорилирования белков в реализации биологических эффектов гормонов или нейромедиаторов, действующих через сАМР [36]

сивному превращению АТР в сАМР. Вновь образованный сАМР либо гидролизуетсЯ фосфодиэстеразой в 5'-АМР, либо активирует протеинкиназы (ПКазы), приводя к фосфорилированию субстратных белков. В свою очередь эти белки контролируют скорость определенных метаболических процессов. Список ферментов—ФП постоянно пополняется и ныне превышает 25 [10]. Значительная часть этих ферментов участвует в регуляции обмена углеводов и липидов ЦНС, требуемых для покрытия необходимых затрат энергии в клетке.

Фосфорилирование ядерных белков имеет решающее значение для регуляции функций генома эукариотов: фосфорилирование негистоновых ядерных белков стимулирует генетическую активность и изменяет схему транскрипции [13], а включение фосфатных групп в гистоны сни-

жает их репрессорный эффект в отношении матричной активности ДНК [14].

Субклеточная локализация ключевых ферментов, связанных с системой циклических нуклеотидов, сама по себе говорит о тесной связи между циклическими нуклеотидами и функцией нейромедиаторов. В опытах на коре больших полушарий головного мозга крыс показано, что, будучи тесно связанной с синаптическими мембранами, аденилатциклаза локализована преимущественно во фракции синапсом [15]. Там же локализована большая часть активности с-нуклеотид-зависимых ПКаз и фосфопротеинфосфатазы (ФПФазы) [16—18]. Таким образом, к настоящему времени в синаптической области обнаружен полный молекулярный аппарат, необходимый для функционирования сАМР в качестве второго мессенджера. Свойства специфических ФП нервной ткани, а также участие системы фосфорилирования—дефосфорилирования белков в синаптической передаче будут рассмотрены отдельно.

Во всех перечисленных выше процессах внимание исследователей было привлечено больше к ПКазам и вопросам их регуляции, чем к ФПФазам. Это можно объяснить тем, что выделение и очистка киназ вызывают меньше затруднений и динамический контроль этих систем проявляется в первую очередь на киназном этапе.

Классификация протеинкиназ. Регуляция многих ПКаз осуществляется веществами, являющимися медиаторами сигналов, поступающих извне клетки, и существующая система классификации основывается на специфической чувствительности ПКаз к этим агентам (табл. 1). сАМР-зависимая ПКаз, охарактеризованная как явно по-

Таблица 1

Классификация протеинкиназ, основанная на их регуляции специфическими агентами [10]

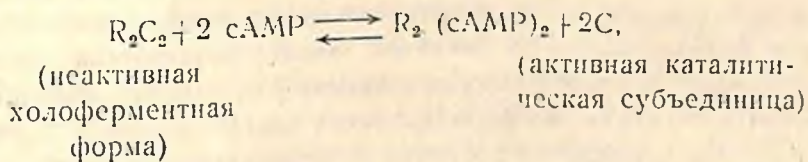
Формы протеинкиназ	Установленные разновидности
сАМР-зависимые	Типы I и II, отличающиеся природой регуляторных субъединиц, но имеющие сходные каталитические субъединицы
сGMP-зависимые	Одна
Ca ²⁺ -зависимые	Киназа фосфоорилазы и киназа легких цепей миозина
Зависимая от двухспиральной РНК	Одна
Неспецифические или "мессенджер-зависимые"	Множество

лифункциональный фермент [19], была первой из ПКаз, классифицированных по этому свойству. За ней последовала сGMP-зависимая ПКаз, обнаруженная в некоторых тканях, а том числе и в цитозоле клеток мозжечка [20]. В третью группу ферментов, классифицированных этим способом, входят Ca²⁺-зависимые ПКазы [21]. К ним, по-видимому, относится ПКаз мембран мозга, изученная Schulman,

Greengard [22]. Наиболее новой ПКазой, отнесенной к семейству ферментов, регулируемых специфическими агентами, является ПКаз, зависящая от двухнитевой РНК [10]. Неспецифические или мессенджер-независимые ПКазы образуют группу ферментов, для которых пока не обнаружены непосредственные эффекторы. Эти ПКазы называются по субстратам, на которые они воздействуют.

сАМР-зависимые ПКазы. Рис. 1 дает схематическое представление о механизме, с помощью которого сАМР может модифицировать или модулировать разнообразие биологических реакций.

Специфичность реакций на сАМР объясняется природой ПКаз в разных тканях. К настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о том, что сАМР-зависимые ПКазы нервной ткани могут вовлекаться в такие функциональные процессы, как регуляция биосинтеза нейромедиаторов в пресинаптических окончаниях [23, 24], реализация постсинаптического действия определенных НТ [25] и регуляция функции микротрубочек [26, 27]. Активация сАМР-зависимых киназ типов I и II происходит следующим образом:



где R—регуляторная, а C—каталитическая субъединицы. Отличие между двумя типами сАМР-зависимых ПКаз заключается в том, что ПКазы II способна к автофосфорилированию. Механизм этого процесса подробно изучен Е. С. Севериным и сотр. [28, 29]. Показано, что фосфорилирование каталитической субъединицы ПКазы II мозга свиньи по гистидину является промежуточным этапом в фосфотрансферной реакции, протекающей по типу «пинг-понг», после чего происходит перенос фосфата на регуляторную субъединицу. Этот процесс облегчает диссоциацию фермента под действием сАМР. Пока не выяснен смысл существования двух типов сАМР-зависимых ПКаз. Из-за отсутствия отличий в субстратной специфичности значение их, по-видимому, заключается в соответствующей локализации в клетке и (или) различной чувствительности к сАМР.

В тканях имеются термостабильные белковые ингибиторы сАМР-зависимых ПКаз, один из которых, так называемый «ингибитор типа II», обнаружен в мозгу [30]. Большое разнообразие природных субстратов сАМР-зависимых ПКаз внесло затруднения в критерии специфичности этих ферментов. Считалось, что субстраты этих ПКаз должны обладать определенной специфической трехмерной конфигурацией [31, 32]. Однако опыты с фосфорилированием малых пептидов [33] и денатурированными белками [34, 35] привели к выводу, что главную роль при определении специфичности играет первичная структура белковых субстратов. Для природных ферментных субстратов ПК характерны две аминокислотные последовательности: Lys-Arg-x-Ser(P) и Arg-Arg-x-Ser(P) [10]. В обеих последовательностях бросается в гла-

за наличие в ближайшем окружении Ser(P) пары основных аминокислот.

сGMP-зависимая ПКазы. О биологической роли сGMP известно гораздо меньше, чем о сАМР, однако имеющиеся данные свидетельствуют о важности его как межклеточного регулирующего вещества [36, 37]. По аналогии с сАМР-зависимой ПКазой было высказано предположение о существовании сGMP-зависимой киназы, способной реализовать биологические эффекты сGMP. Она была обнаружена в ряде тканей позвоночных, в том числе и в цитозоле клеток мозжечка [20], где позднее был обнаружен и специфический эндогенный субстрат для этой сGMP-зависимой ПКазы, оказавшийся цитоплазматическим белком с М 23 кД. [38]. сGMP-зависимый фермент катализирует фосфорилирование всех фракций гистонов [39]. Кроме того, как и сАМР-зависимый фермент, он может фосфорилировать ряд ферментов, участвующих в метаболизме гликогена и липидов [10]. Из внешних сегментов палочек сетчатки также выделена растворимая фракция, обладающая активностью сGMP-зависимой ПКазы [40]. Работы с синтетическими пептидами позволили предположить, что сАМР- и сGMP-зависимые ПКазы обладают сходной, но не идентичной субстратной специфичностью, что может быть опознано по линейной последовательности аминокислот, включающей участок фосфорилирования [41, 42]. Эти пептиды, соответствующие участкам фосфорилирования вокруг серина-32 и серина-36 в гистоне H_{2В} проявляли различия в предпочтении к сGMP- и сАМР-зависимым ПКазам.

Таблица 2

Нейромедиаторы, связанные с системой сАМР [38]

Нейротрансмиттер	Антагонист
Дофамин	Хлорпромазин
Серотонин	ЛСД
Норадреналин (3)	Пропранолол
Гистамин (H ₂)	Метамид
Октопамин	Фентоламин

Ca²⁺-зависимые киназы. Кальций является регуляторным агентом исключительной важности. Деполяризация мембран в пресинаптических нервных окончаниях (и в других секреторных структурах) вызывает приток внеклеточного кальция через специфические кальциевые каналы [43]. Биосинтез нейромедиаторов [44] и их высвобождение [45] из окончаний относятся к числу физиологических процессов, регулируемых Ca²⁺. По-видимому, некоторые из эффектов Ca²⁺ в пресинаптических нервных окончаниях могут осуществляться или модулироваться посредством фосфорилирования специфических белков вследствие активирования Ca²⁺-чувствительной ПКазы [36, 46]. Было установлено, что агенты, способствующие транспорту кальция через плазматические мембраны нервных окончаний, изменяют фосфорилирование специфических эндогенных белков в интактных синапсосах мозга крыс [47]. Однако в отмытых от цитоплазмы синапсосах такого фос-

фосфорилирования не наблюдали [48]. Выяснилось, что клеточный сок содержит термостабильный фактор, восстанавливающий Ca^{2+} -зависимое фосфорилирование в промытых мембранах.

Этот термостабильный Ca^{2+} -связывающий белок, кальмодулин [49], играет основную роль в модулировании эффектов Ca^{2+} на синаптическую передачу [50—52]. Кальмодулиновая гипотеза нейромедиации [50, 51] утверждает, что Ca^{2+} входит в пресинаптические нервные окончания в ходе деполяризации, связывается с кальмодулином и инициирует определенные биохимические процессы, модулирующие синаптическую активность. Ca^{2+} -рецепторный белок обнаружен не только в цитоплазме синапсом [50], но и в препаратах постсинаптических уплотнений и синаптических везикулах [53, 54].

Связанный с деполяризацией захват Ca^{2+} интактными синапсами стимулирует фосфорилирование белков DPH-L и DPH-M (м соответственно 50—52 кД и 60—64 кД) [55], а также белка с М 80 кД, служащего субстратом и для сАМР-зависимой ПКазы [47].

Ряд препаратов, ингибирующих Ca^{2+} -зависимое фосфорилирование синаптических белков (трифлюоперазин, фенитоин и диазепам), одновременно подавляет высвобождение нейромедиаторов [51, 56, 57]. Инактивирование лабильной кальмодулин-киназной системы синаптических везикул приводит к потере ими способности к высвобождению нейромедиаторов [58]. Активирование Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования в синаптических везикулах и синаптических мембранах при проникновении Ca^{2+} в нервные окончания приводит к аллостерическим изменениям в специфических мембранных белках, что облегчает последующее взаимодействие синаптических везикул с синаптической мембраной [50]. В настоящее время установлено, что белки DPH-L и DPH-M, участвующие в высвобождении нейромедиаторов, идентичны тубулинам α и β . Ca^{2+} -стимулируемая тубулинкиназа отличается от сАМР-зависимых ПКаз [55].

Тубулин, главный цитоскелетный белок, может участвовать в модуляции взаимодействия между везикулами и мембранами. Это происходит за счет изменений в физико-химических свойствах тубулина при его фосфорилировании, приводящих к образованию нитевидных структур, четко отличающихся от микротрубочек [52, 55]. Таким образом, агрегация тубулина может образовывать важную биологическую систему для преобразования сигнала Ca^{2+} в структурные изменения, способствующие взаимодействию между мембранами и везикулами. Если мембранный тубулин подвергается столь же существенным изменениям при фосфорилировании, как и синаптоплазматический, это должно отразиться на структуре и проницаемости мембран.

Биосинтез нейромедиаторов также находится под контролем Ca^{2+} . В цитозоле клеток коры и ствола мозга обнаружена специфическая ПКаз, стимулируемая кальмодулином, которая фосфорилирует триптофан-5-монооксигеназу, участвующую в регуляции биосинтеза серотонина и катехоламинов [59]. Стимулируемая Ca^{2+} (15 мкМ) эндоген-

ная ПКазы осуществляет фосфорилирование миеллина в периферическом нерве [60].

Недавно описан также Ca^{2+} - и кальмодулин-связывающий белок, специфичный для нервной ткани [61]. Этот белок, кальциневрин, ингибирует процесс стимулирования кальмодулином некоторых ферментативных систем. Кальциневрин состоит из 2 субъединиц с М 61 кД (субъединица А) и 15 кД (субъединица В). Субъединица В, хотя и не идентичная кальмодулину, связывает 4 иона Са на молекулу. Таким образом, кальциневрин А взаимодействует с двумя Ca^{2+} -связывающими факторами: кальмодулином и субъединицей В. Из этих данных следует, что кальциневрин участвует в регуляции концентрации свободного Ca^{2+} в ЦНС [61].

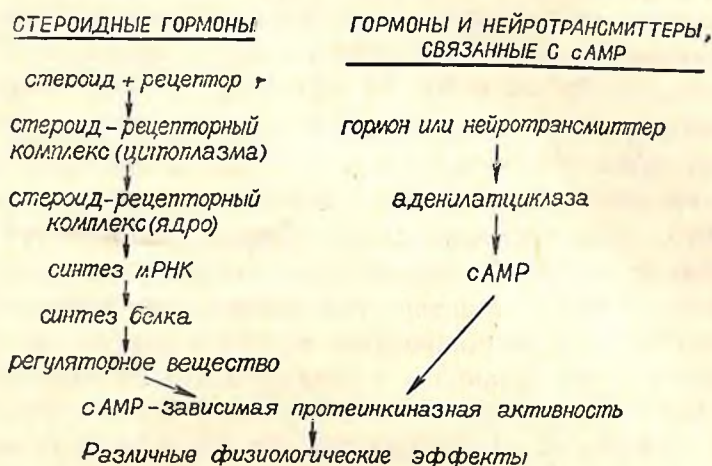


Рис. 2. Предполагаемая молекулярная основа биологического взаимодействия стероидных гормонов с гормонами и нейромедиаторами, эффект которых реализуется через cAMP [36]

Регуляция ПКазы стероидными гормонами. Множественные эффекты стероидных гормонов на ткани-мишени либо синергичны, либо антагонистичны действиям тех гормонов, чье участие в регуляции метаболизма реализуется через cAMP (рис. 2), но лишь в немногих случаях могут объясняться непосредственным влиянием этих гормонов на уровне cAMP [61]. Этот аспект особенно интересен, так как представители всех основных классов стероидных гормонов влияют на системы фосфорилирования белков в тканях-мишенях [62]. В любом случае введение соответствующего стероидного гормона влияло на аутофосфорилирование регуляторной субъединицы cAMP-зависимой ПКазы каталитической субъединицей этого фермента. Эффект специфичен в отношении соответствующей ткани, имеет место при малых дозах стероидных гормонов, проявляется в течение 1 ч после введения гормона и связан с изменениями в уровне активности cAMP-ПКазы [62]. Детальный механизм участия стероидных гормонов в аутофосфорилировании регуляторной субъединицы cAMP-зависимой ПКазы пока не ясен. Однако эф-

фekt этот опосредован и связан с индукцией синтеза белка *de novo* в противоположность прямому воздействию сАМР на ПКазу. Приведенные данные свидетельствуют, что фосфорилированные белки служат для медиации не только эффектов сАМР и тех регуляторов, которые действуют через сАМР, но управляются и рядом других альтернативных систем.

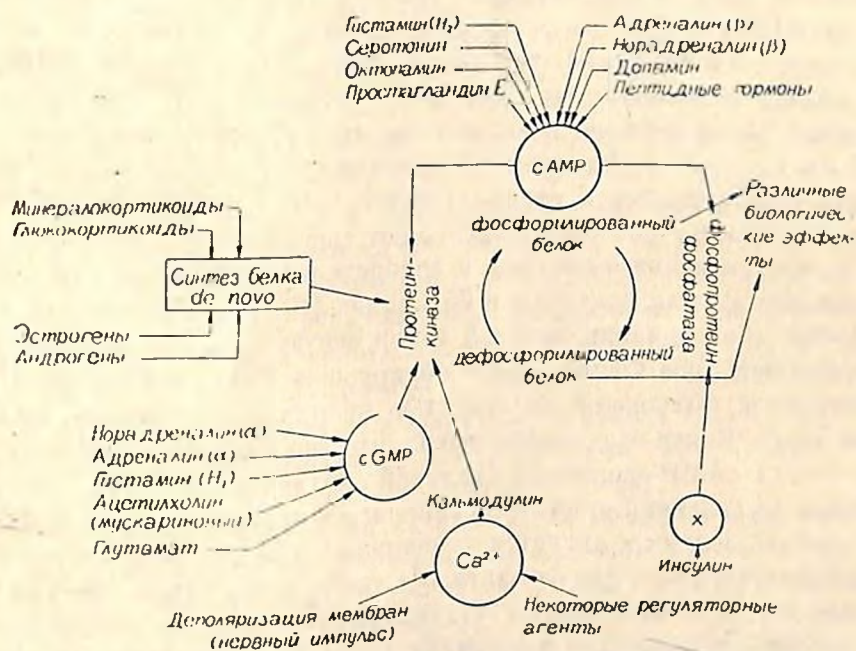


Рис. 3. Участие фосфорилирования белков в реализации биологических эффектов ряда регуляторных агентов [36]. В схеме приведены примеры эффектов ряда регуляторных агентов, ряд эффектов которых может опосредоваться через регуляцию фосфорилирования специфических белков. Не указаны некоторые регуляторы, эффект которых реализуется через сАМР, равно как и ряд регуляторных агентов, действующих, по-видимому, посредством транслокации

Таким образом, фосфорилирование белков является универсальным механизмом реализации эффектов многих биологических регуляторов. Концепция эта схематически представлена на рис. 3.

Классификация ФПФаз. Интенсивность и продолжительность периферического действия многих гормонов и нейромедиаторов, проявляющегося в фосфорилировании белков в тканях-мишенях, в значительной мере зависят от эндогенных ФПФаз, играющих важную роль в сохранении динамического равновесия многих каскадных систем. Противоречивость и фрагментарность сведений о ФПФазах не позволили пока создать общепринятой классификации этих ферментов. Поскольку аминокислотная последовательность, особенности трех- и четырехмерной конформации этих ферментов пока не изучены, сведения о количестве их изоформ в той или иной ткани основываются на таких признаках, как разная электрофоретическая подвижность, величина M , субстратная

специфичность. К середине 70-х годов стала преобладать точка зрения о существовании мультифункциональной ФПФазы, которая при осаждении этанолом переходит из высокомолекулярной формы в форму с M_{35} кД [63]. Позднее было высказано предположение о существовании холоферментной формы этого фермента, обозначенной как ФПФаза-Н, и ее каталитической субъединицы С, которая образует холофермент, соединяясь с ингибиторной субъединицей [64].

Многие данные противоречат, однако, гипотезе о мультифункциональной ФПФазе. Antoniw и др. [65] нашли, что активность мультифункциональной ФПФазы составляет лишь 75% от общей ФПФазной активности, остальная же ее часть принадлежит специфическим ФПФазам. Не исключена возможность, что субстрат-специфичные фосфатазы могут быть составлены из неспецифичной каталитической субъединицы, сочетающейся в разных комбинациях с регуляторными, которые тем или иным способом определяют специфичность фермента [66].

Первые сведения о наличии и распределении ФПФазы в различных отделах мозга были получены в 60-х годах [67, 68]. Присутствие в субклеточных образованиях нервной ткани фосфатазы, специфичной к дефосфорилированию ФПФаз, было обнаружено Маено и Greengard [17]. Значительной ФПФазной активностью обладала мембранная фракция ткани мозга. Ранее было установлено, что фракция синаптических мембран богата сАМР-зависимой ПКазной активностью [16]. Сочетание ФПФазы с указанной киназой предполагает активный обмен фосфата в мембранных белках и является уникальным для мозговой ткани. Наличие множественных форм фосфатазы в ткани мозга также впервые установлено Маено и Greengard [17]. В опытах на клетках нейробластомы и нейроглии, выращенных в тканевых культурах, доказано, что наличие 4-х форм ФПФазы свойственно клеткам одного типа, а не является следствием гетерогенности клеток коры. Наличие множественных форм ФПФаз (и ПКаз) в одной клетке обретает вполне определенный биологический смысл, если принять во внимание множественные функции, которые сАМР выполняет в любой клетке. Сведения о существовании отдельных фракций ФПФазы в нервной ткани содержатся также в сообщении Albin и Newburg [69]. С помощью ИОХ нам удалось изолировать 5 пиков ФПФазы из экстракта мозга крыс [70], отличавшихся по удельной активности, субстратной специфичности, термостабильности, рН оптимуму действия.

Регуляция активности ФПФаз. Согласно [10], активность ФПФаз управляется конкуренцией между разнообразными ФП-субстратами этого фермента, неконкурентным взаимодействием белкового модулятора (или модуляторов) с ФПФазой и специфическим взаимодействием лигандов с ФП-субстратами фермента, то есть эффектами, направленными на субстрат. Следует упомянуть также о модуляции активности ФПФазы низкомолекулярными лигандами и гормональным контроле процессов дефосфорилирования. В качестве примера первого типа регуляции можно указать на ингибиторное действие фосфорилазы *a* на реакцию дефосфорилирования гликогенсинтетазы [71]. Второй тип регу-

ляции осуществляется термостабильными белковыми ингибиторами, обнаруженными впервые в мышечной ткани [72]. Позднее нами [73] и другими авторами [74] было показано, что регуляторный эффект одного из белковых ингибиторов зависит от фосфорилирования его сАМР-зависимой ПКазой. Наличие подобных ингибиторов было установлено и в нервной ткани [75]. С помощью ИОХ удалось изолировать 4 пика этих белков, элюирующихся с колонки при различной ионной силе. Термообработка при 95° по-разному влияла на активность указанных ингибиторов из мозга крыс, один из которых оказался термостабильным белком. Имелись также существенные различия в эффективности этих модуляторов относительно отдельных молекулярных форм ФПФазы мозга. По-видимому, отдельные ФПФазы регулируются индивидуальными белками, чем обеспечивается оперативное и гибкое управление теми или иными клеточными процессами, находящимися под контролем ФПФаз. Интерес к подобному типу постсинтетической регуляции ФПФазной активности (белок - белковые взаимодействия) особенно возрастает в свете последних сообщений о существовании в некоторых тканях множественных форм ее белковых деингибиторов и активаторов [76, 77]. Возможно, что эти модуляторы связаны в тканях с каталитической субъединицей ФПФазы, составляя холоэнзимный комплекс (см. с. 92).

Регуляция ФПФаз факторами, направленными на субстрат (третий тип контроля), в нервной ткани пока не изучена.

При обсуждении модуляции активности ФПФазы низкомолекулярными лигандами особый интерес вызывают сведения о прямом эффекте сАМР на этот фермент. Было показано, что сАМР способен ингибировать активность фосфатазы фосфорилазы в некоторых тканях позвоночных [78]. Как было установлено [75], большинство молекулярных форм ФПФазы мозга также ингибируются сАМР в диапазоне концентраций 10^{-6} — 10^{-5} М. Этот процесс способствует, по-видимому, поддержанию высокого уровня фосфорилированных белков при повышении концентрации сАМР в нервной ткани (рис. 1). Из двухвалентных катионов Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} слабо активируют [17, 69, 78, 79], а Cd^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} ингибируют [17, 79] ФПФазу мозга. Сильное ингибирование фермента наблюдается в присутствии 10^{-3} М NaF [17, 69], 10^{-1} М п-ХМБ [69] и $2,5 \cdot 10^{-3}$ М Fe^{3+} [17, 69]. Низкомолекулярные фосфатные соединения—АТР, АДР, глюкозо-6-фосфат, β -глицерофосфат в физиологических концентрациях не влияли на активность ФПФазы мозга, тогда как ортофосфат (10^{-2} М) ингибировал этот фермент [17]. Транквилизаторы (фенотиазин и его производные) несколько снижали активность цитоплазматической ФПФазы из мозга крыс [80].

Небольшие по объему сведения относительно роли гормонов в процессах дефосфорилирования ФП сводятся, в основном, к предполагаемому эффекту инсулина. Согласно существующей гипотезе, действие инсулина начинается с продуцирования предполагаемого медиатора «х», который подавляет киназную систему и (или) активирует фосфатазную, в результате чего повышается образование дефосфорилирован-

ной или активной 1-формы гликоген-синтетазы [81]. По-видимому, системы сАМР или сGMP не вовлекаются в механизм прямого действия инсулина, хотя и могут косвенно регулироваться через второй медиатор «х».

Все предварительные данные, на которых основана эта модель, получены не на нервной ткани [81]. В отношении последней имеется лишь сообщение о том, что аллоксан (10^{-3} М) ингибирует активность ФПФазы в цитоплазме клеток мозга [80].

Специфические ФП нервной ткани. За последнее десятилетие накоплен значительный материал, свидетельствующий о наличии ФП практически во всех отделах ЦНС и субклеточных образованиях мозга. Хотя функциональное значение событий, связанных с фосфорилированием белков ЦНС, в большинстве случаев выяснено пока недостаточно, за последние годы был идентифицирован ряд белковых компонентов, являющихся субстратами различных ПКаз. Установлена активация гликогенфосфорилза, классического субстрата для действия сАМР, в ответ на вызванное нейромедиатором повышение содержания сАМР в мозгу у птиц и млекопитающих [82]. К числу других идентифицированных ФП ЦНС, роль которых в клеточной функции установлена, относятся пируватдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатаза, тубулин, миелин, актомиозин, рибосомные и ядерные белки [82]. Основным белком миелина головного мозга крысы является лучшим природным субстратом эндогенной ФПФазы [83]. Несколько белков миелина периферического нерва с М от 16 до 28 кД также являются ФП [60]. К числу ФП относится также целый ряд конституционных белков рибосом коры больших полушарий мозга крыс [84]. Кроме того, некоторые структурные белки мозга с неустановленной пока функцией также подвергаются сАМР-модулируемым изменениям при фосфорилировании. Наиболее охарактеризованным из них является белок S-100, сведения об остальных пока ограничиваются их ролью в качестве субстратов для фосфорилирования [82].

Еще в 1957 г. было высказано предположение, что изменения в фосфорилировании белка, происходящие в ответ на электрическую стимуляцию срезов коры головного мозга морской свинки, могут вовлекаться в регуляцию прохождения ионов через клеточные мембраны [85, 86]. Trevor и Rodnight [87] показали, что фосфосерильные группы белка, реагирующие на электрическую стимуляцию, находятся, несомненно, в мембранной фракции. Использование более современных подходов позволило установить, что синаптическое потенцирование Шефферовских коллатералей в срезах гиппокампа крыс приводит к подавлению Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования белка с М 40 кД, связанного с фракцией синаптоплазматических мембран (СПМ) [88, 89]. По-видимому, это изменение не связано с механизмом, включающим сАМР, поскольку *in vitro* инкубация с сАМР не влияет на фосфорилирование полосы белка с М 40 кД [90]. Три других белка гиппокампа подвергаются, однако, в этих условиях усиленному фосфорилированию. Электри-

ческая стимуляция приводила к повышению фосфорилирования, главным образом, одного мембранного белка гинпокампа с M 50 кД [91].

Обнаружено фосфорилирование биологически активных пептидов β -липотропина, β -эндорфина, АКТГ, паратгормона и секретина сАМР-зависимыми и независимыми ПКазами мозга [92], в то время как люлиберин и ряд его фрагментов не являются субстратами для сАМР-зависимой ПКазы [93]. Субстратами для фосфорилирования могут также служить рецепторы нейромедиаторов. Ацетилхолиновый рецептор дисков электрического органа (electroplax) имеет свою сАМР-независимую ПКазу, связанную с ним, и изменения в степени фосфорилирования рецептора модифицируют его электрофоретические свойства [94].

В работах Greengard и сотр. [95, 96] было сообщено о локализации нескольких ФП во фракции синаптических мембран. Один из этих ФП—«протени I» является эндогенным субстратом сАМР и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых ПКаз, а второй—«G-субстрат» фосфорилируется сGMP-зависимой ПКазой. G-субстрат встречается практически только в клетках Пуркинне мозжечка млекопитающих. Протени I присутствует в окончаниях аксонов во всей НС, особенно в мембранах синаптических везикул и постсинаптических уплотнениях. Появление протени I в мозгу развивающихся крыс и морских свинок совпадает с формированием синаптических структур [97], что свидетельствует о его участии в синаптических процессах. Важным может оказаться тот факт, что фосфорилирование протени I является Ca^{2+} -зависимым. Появились сведения о наличии в нем двух разных участков фосфорилирования, один из которых находится под контролем сАМР, а другой— Ca^{2+} /кальмодулина [98]. Пока трудно объяснить функциональное значение такого регуляторного механизма посредством двух вторых мессенджеров.

Роль циклических нуклеотидов и фосфорилирования белков в функции нейрона. Накоплены доказательства, что сАМР, а также сGMP могут функционировать как внутриклеточные мессенджеры при действии определенных нейромедиаторов на клетки нервной ткани [38, 99, 100]. Молекулы нейромедиатора, высвобождаясь с окончаний пресинаптических нейронов, вызывают изменения в проницаемости мембран постсинаптического нейрона путем взаимодействия со специфическими рецепторами, расположенными на поверхности клеток. Молекулярная природа событий, при которых присоединение нейромедиаторов к их рецепторам сопрягается с изменением в ионных свойствах постсинаптической клеточной мембраны, пока еще не совсем понятна. Вырисовываются два основных направления, по которым могут протекать эти процессы [38].

Модель «рецептор—ионофор»: здесь предполагается, что одиотипные рецепторы нейромедиаторов прямо сопряжены с ионофором так, что присоединение НТ к рецептору вызывает конформационное изменение в ионофоре, приводя к изменению проницаемости мембран для специфических ионов.

Модель «рецептор—второй мессенджер»—второй основной тип механизмов, с помощью которых НТ могут влиять на электрические свойства постсинаптических нейронов посредством процесса, в котором связывание нейромедиатора со своим рецептором на внешней поверхности клеточной мембраны приводит к продукции другой молекулы, второго мессенджера, как, например, сАМР, на внутренней стенке клетки. Этот второй мессенджер может затем запустить последовательность биохимических реакций, которые обязательно приведут к изменению электрофизиологических свойств нейрональной мембраны. Такие изменения могут быть вызваны ковалентной модификацией мембранных белков, участвующих в регуляции проницаемости мембран для специфических ионов.

Можно предположить, что физиологические ответы, вызванные активацией двух классов рецепторов, должны носить разный характер. В первом случае, когда связывание нейромедиатора с рецептором вызывает конформационные сдвиги в ионофоре, изменение проницаемости, происходящее в результате этого одноэтапного неферментативного процесса, должно иметь очень краткий латентный период и длительность порядка нескольких миллисекунд. В противоположность этому эффект циклических нуклеотидов на проницаемость нейрональных мембран осуществляется, по-видимому, посредством последовательности ряда биохимических реакций; вследствие этого изменения в проницаемости, вызванные в ответ на циклические нуклеотиды, должны иметь гораздо большие латентность и длительность.

Обнаружение чувствительных к нейромедиаторам аденилатциклаз в нервной ткани, их региональное и субклеточное распределение, равно как и свойства этих ферментов, указывают на важную роль сАМР в физиологии синаптической передачи. Для каждого из НТ, перечисленных в табл. 2, в нервной ткани была обнаружена соответствующая аденилатциклаза, активируемая лишь определенным нейромедиатором. Большое сходство между свойствами рецепторов нейромедиаторов, выявляемыми в физиологическом эксперименте, и свойствами чувствительных к ним аденилатциклаз, установленных с использованием ряда физиологических и фармакологических агонистов и антагонистов, свидетельствует о тесном взаимодействии между молекулами рецепторов нейромедиаторов и аденилатциклазой. В литературе имеются сведения о том, что сGMP также участвует в медиации или модуляции некоторых эффектов нейромедиаторов на постсинаптических клетках [38].

Исследование циклических нуклеотидов в некоторых препаратах нейронов верхнего шейного ганглия [38] и мозжечка млекопитающих [101] позволило заключить, что в физиологических условиях синаптическая передача может приводить к повышению количества циклических нуклеотидов в определенных постсинаптических нейронах. От уровня сАМР в мозгу зависит активность мембранной и цитозольной ПКАз. Считают, что ПКАзы участвуют в синтезе белков транспортной

системы, что работа Na^+ -насоса, по-видимому, связана с фосфорилированием мембранных белков, и существует зависимость между степенью фосфорилирования этих белков и транспортом Ca^{2+} [85, 88]. Учитывая, что процессы дефосфорилирования способны влиять на проницаемость мембран и что дефосфорилирование, вероятно, требует меньшего числа участников реакции, высказывается предположение о важной роли ФПФаз в процессе синаптической передачи [190]. В постсинаптических клетках физиологическая роль циклических нуклеотидов может заключаться (но не ограничиваться) в генерации определенных медленных постсинаптических потенциалов [25], в регуляции функции микротрубочек и биосинтезе нейромедиаторов [38]. Увеличение уровня сАМР в ходе быстрого прохождения импульса может также служить для мобилизации резервов углеводов и липидов [102], компенсируя тем самым дополнительные затраты энергии, связанные с повышенной функциональной активностью нервной ткани. Примечательно, что в различных модельных системах сАМР может действовать на уровне транскрипции, регулируя синтез *de novo* ряда белков, обладающих специфическим функциональным значением [38]. Еще в 1974 г. П. А. Коменгани выдвинул тезис о том, что увеличение содержания сАМР в постсинаптических клетках в ответ на повышенное прохождение постсинаптического импульса может также приводить к изменению уровня синтеза определенных белков, играющих специфическую функциональную роль в синапсах, связанную с длительным хранением информации (обучением) или ее восстановлением (память) [99]. Позднее сочетание *in vivo* и *in vitro* подходов было использовано для сопоставления изменений в фосфорилировании белков мозга и различных поведенческих тестов. В этих исследованиях рассматривали фосфорилирование белков в условиях утраты навыков [103], электроконвульсивного шока [104] и вызванной АКТГ поведенческой реакции «груминга» (комфортное поведение) [105]. Последующие поведенческие исследования показали, что повышенное фосфорилирование синапсомных белков происходит при выработке навыков, поскольку у мышей, которых только экспонировали к условному и безусловному стимулу или у которых происходило отвыкание после предварительного обучения, не наблюдали подобного прироста количества ФП [106].

Синаптические и постсинаптические эффекты сАМР, по-видимому, предпочтительнее рассматривать не в изоляции, а как часть интегральной системы. Возможно, что синаптическая стимуляция не только повышает содержание сАМР до степени, достаточной для изменения проницаемости нейронов, но также инициирует последовательность событий, осуществляемых циклическими нуклеотидами. Эта последовательность может включать повышение или понижение синтеза или высвобождения НТ в ответ на синаптическую стимуляцию, инициацию внутриклеточного транспорта с целью перемещения вновь синтезированных продуктов, активацию обмена углеводов для покрытия необходимых затрат энергии в клетке и прямое воздействие на генетический ма-

тернал в ядре клетки, приводя к длительным изменениям в поведении [38].

Гипотеза о медировании эффектов нейромедиаторов через каскад запускаемых сАМР-реакций, приводящих к изменению проницаемости постсинаптических мембран, встречает и определенные возражения. Therien [107], которой удалось изолировать фракции синаптических мембран синаптических контактов, не обнаружила ФПФазной активности в последней фракции, в то время, как присутствие этого фермента необходимо для обращения сдвигов в притоке ионов, запускаемом при фосфорилировании белков. Неудача с выявлением ФПФаз могла быть, однако, следствием потери или инактивации ферментов в ходе очистки. Другим серьезным фактом является медленное фосфорилирование белков синаптических мембран в опытах *in vitro*, когда насыщение всех акцепторных участков для фосфорилирования достигается лишь через несколько минут [108, 109]. Не исключается, что процесс фосфорилирования может затрудняться вследствие потребления субстрата (АТР) конкурентной к ПКазе АТРазной активностью.

Нейропептиды и фосфорилирование белков синаптических мембран. За последние два десятилетия показано, что АКТГ, меланоцит-стимулирующий гормон (МСГ) и родственные пептиды влияют на адаптивное поведение животных и человека [110]. Позднее было открыто новое семейство нейропептидов (эндорфины), обладающих опиатоподобным действием. Установлено, что эндорфины, как и АКТГ, модулируют процессы обучения и памяти [111]. Принимают, что пептидные гормоны оказывают влияние на клетки-мишени, не проникая в них, а посредством системы вторых мессенджеров (сАМР, сGMP, Ca^{2+}). Специфичность их физиологических реакций определяется степенью фосфорилирования отдельных ФП.

По данным гель-электрофореза инкубация СПМ в присутствии АКТГ₁₋₂₄ приводила к понижению фосфорилирования по меньшей мере 5-ти индивидуальных белков [112]. М у этих белков был ниже, чем у тех ФП мозга, которые находились под контролем сАМР-зависимых ПКаз. Вовлечение разных белков и разнонаправленность эффектов пептидов и циклических нуклеотидов исключают реализацию эффектов пептидов через сАМР. Из синаптических мембран мозга крыс удалось выделить АКТГ-чувствительную ПКазу и один из её эндогенных субстратов: белок В-50 (М 48 кД). Выявлены ИЭТ для этой ПКазы (5,5) и её белка В-50 (4,5) [113]. Привлекает внимание то, что АКТГ и те его фрагменты, которые влияют на фосфорилирование белка В-50, одновременно индуцируют чрезмерный груминг [114].

Используя приемы, сходные с теми, что были предприняты в отношении индуцированных АКТГ изменений в мембранных ФП, Davis и Ehrlich [115] сообщили, что как Met⁵-энкефалин, так и Leu⁵-энкефалин ингибировали эндогенное фосфорилирование специфических мембранных белков F (М 47 кД) и H (М 15—20 кД). Ранее эти авторы по-

казали, что хроническая обработка крыс морфином приводила к изменениям в посмертном *in vitro* фосфорилировании этих белковых полос.

В концентрации 10 нМ β -эндорфин также ингибировал фосфорилирование белков F и H [116]; вызванное этим пептидом ингибирование происходит посредством взаимодействия со стереоспецифичными опиа́т-связывающими участками, причем полоса белка F является частью опиа́т-рецепторного комплекса [116]. Авторы постулируют, что ФП могут контролировать опознавание или (и) средство опиа́т-связывающих участков.

Эффекты АКТГ и опиа́дных пептидов не идентичны, поскольку ПКАза белка В-50 очень слабо изменяется под действием β -эндорфина. Единственным опиа́дным пептидом, ингибирующим фосфорилирование этой киназы, является динорфин₁₋₁₃ [117].

По-видимому, главной особенностью динорфина₁₋₁₃ и АКТГ является их решающее участие в ингибировании ПКАзы белка В-50 и в способности этих пептидов вызывать чрезмерный груминг.

Механизм, при помощи которого реализуется участие АКТГ как нейрогормона, в синаптической передаче связывается в настоящее время с его влиянием на мембранные фосфолипиды—(поли)фосфоинозитиды [113]. Через специфические рецепторы на постсинаптических мембранах АКТГ осуществляет прямую регуляцию (ингибирование) мембранных ПКАз, не регулируемых сАМР. Понижение фосфорилирования ряда мембранных белков, в том числе белка В-50, определяет характер реакции клетки. Активирование мембранной липидкиназы зависит от степени фосфорилирования белка В-50. Понижение фосфорилирования В-50 приводит к активации липидкиназы и увеличению синтеза мембранных полифосфоинозитидов [118], чем и регулируется приток Ca^{2+} в клетку. Сдвиги в концентрации клеточного кальция приводят к изменениям в активности ПКАз и других ферментов. Если же АКТГ действует как нейромедиаторы, активируя через их рецепторы аденилатциклазу, то происходит повышение активности цитоплазматических ПКАз и синтез ФП [113].

В обоих случаях ФП выступают как спецификаторы (определители) конечной реакции клетки на её взаимодействие с этим пептидом.

Таким образом, информация, закодированная в АКТГ, переносится в клетки мозга скорее не через одну систему рецептор—второй мессенджер, а через несколько каналов. Из этого следует, что в основе поведенческих эффектов АКТГ лежат две различные системы мессенджеров в мозгу—одна, включающая сАМР, а другая— Ca^{2+} в качестве второго мессенджера.

Данные, приведенные в настоящем и некоторых других [10, 36, 38] обзорах, свидетельствуют о том, что фосфорилирование белков является универсальным терминальным механизмом регуляции многих звеньев метаболизма. Ряд регуляторных агентов, включая циклические нуклеотиды, Ca^{2+} и стероидные гормоны, ответствен за уровень фосфорилирования специфических белков в нервной и других

тканях. В дальнейших исследованиях предстоит ещё выяснить многие детали регуляции обмена ФП и их участие в поддержании клеточного гомеостаза.

REGULATION OF PROTEIN PHOSPHORYLATION AND DEPHOSPHORYLATION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

PARSADANIAN H. K.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Arm. SSR, Yerevan

A number of neurotransmitters, hormones and other regulatory agents affect the level of phosphorylation of specific proteins in nervous system. These multicyclic cascade systems may include as second messengers cAMP, cGMP and Ca^{2+} . The role that protein phosphorylation may play in synaptic transmission as well as in the mobilization of reserve carbohydrates and lipids and in other metabolic processes in nervous tissue are discussed. The properties of endogenous phosphoprotein phosphatases that occupy an important place in the mentioned cascade systems supporting their dynamic equilibrium are also described.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lodish H. F. Enzyme and microbial technol., 3, 177—183, 1981.
2. Fisher E. H., Krebs E. G. J. Biol. Chem., 216, 121—132, 1955.
3. Sutherland E. W., Jr., Wosilait W. D. Nature, 175, 169—171, 1955.
4. Gershey E. L., Vidaly G., Allfrey V. G. J. Biol. Chem., 243, 5018—5022, 1968.
5. Holzer H., Mecke D., Wulff K., Liess K., Hellmeyer L. Adv. Enzyme Regul., 5, 211—225, 1967.
6. Adler S. P., Mangum J. H., Magni G., Stadtman E. R.—In: Metabolic interconversion of Enzymes, Berlin, Springer, p. 399—424, 1974.
7. Kort E. N., Goy M. F., Larsen S. H., Adler J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3939—3943, 1975.
8. Chock P. B., Rhee S. G., Stadtman E. R. Ann. Rev. Biochem., 49, 813—843, 1980.
9. Taborsky G. Adv. Prot. Chem., 28, 1—187, 1974.
10. Krebs E. G., Beavo J. A. Ann. Rev. Biochem., 48, 923—959, 1979.
11. Killilea S. D., Brand H., Lee E. Y. C. TIBS, 1, 30—33, 1976.
12. Hofmann F., Schultz G. Arznei.—Forsch., 30, 1991—1995, 1980.
13. Stein G. S., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. J. Science, 183, 817—824, 1974.
14. Kamiyama M., Dastigie B., Defer N., Kruh J. Biochim. Biophys. Acta, 277, 576—583, 1972.
15. De Robertis E., Rodriguez de Lores Arnal G., Alberti M. J. Biol. Chem., 242, 3478—3493, 1967.
16. Maeno H., Johnson E. M., Greengard P. J. Biol. Chem., 246, 134—142, 1971.
17. Maeno H., Greengard P. J. Biol. Chem., 247, 3269—3277, 1972.
18. Gaballah S., Popoff C. J. Neurochem., 18, 1795—1797, 1971.
19. Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G. J. Biol. Chem., 243, 3763—3765, 1968.
20. Schlichter D. J., Casnelli J. E., Greengard P. Nature, 273, 61—62, 1978.
21. Krebs E. G., Stull J. T., England P. J., Huang T. S., Brostrom C. O., Vandenhede J. R.—In: Protein Phosphorylation in Control Mechanisms, Miami Winter Symp., 5, 31—45, 1973.
22. Schulman H., Greengard P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5432—5436, 1978.
23. Morgenroth V. H., Hegstrand L. R., Roth R. H., Greengard P. J. Biol. Chem., 250, 1946—1951, 1975.

24. Lovenberg W., Bruckwick L., Hanbauer J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2955—2960, 1975.
25. Greengard P. Nature, 260, 101—102, 1976.
26. Sloboda R. D., Rudolph S. A., Rosenbaum J. L., Greengard P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 177—184, 1975.
27. Soifer D. J. Gen. Physiol., 61, 265—276, 1973.
28. Nesterova M. V., Ulmasov K. A., Shlyapnikov S. V., Severin E. S. Biochim. Biophys. Acta, 660, 110—116, 1981.
29. Ульмасов Х. А., Нестерова М. В., Северин Е. С. Биохимия, 45, 5, 835—844, 1980.
30. Szamltelski A., Guidotti A., Costa E. J. Biol. Chem., 252, 3848—3853, 1977.
31. Rubin C. S., Rosen O. M. Ann. Rev. Biochem., 14, 831—887, 1975.
32. Cohen P., Watson D. C., Dixon G. H. Eur. J. Biochem., 51, 79—92, 1975.
33. Daile P., Carnegie P. R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 852—858, 1974.
34. Bylund D. B., Krebs E. G. Biol. Chem., 250, 6355—6361, 1975.
35. Humble E., Berglund L., Titanji V., Ljungström O., Edlund B., Zetterqvist O., Engström L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 66, 614—621, 1975.
36. Greengard P. Science, 199, 146—152, 1978.
37. Goldberg N. D., O'Dea R. G., Haddox M. K. Adv. Cycl. Nucl. Res., 3, 155—184, 1973.
38. Greengard P.—In: Proc. 7th Int. Congr. Pharmacol., Paris, 1978, p. 231—250, 1979.
39. Yamamoto M., Takai Y., Hashimoto E., Nishida Y. J. Biochem., 81, 1857—1862, 1977.
40. Lolley R. N., Brown B. M., Farber D. B. Biochem. Biophys. Res. Commun., 78, 572—578, 1977.
41. Lincoln T. M., Corbin J. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3239—3243, 1977.
42. Glass D. B., Krebs E. G. Feder. Proc., 37, 1329, 1978.
43. Baker P. F., Hodkin A. L., Ridgway A. J. Physiol., 218, 709—719, 1971.
44. Partick R. J., Barchas J. D. Nature, 250, 737—739, 1974.
45. Katz B., Milbdt R. J. Physiol., 192, 407—412, 1967.
46. Sieghart W., Schulman H., Greengard P. J. Neurochem., 34, 548—553, 1980.
47. Krueger B. K., Forn J., Greengard P. J. Biol. Chem., 252, 2764—2769, 1977.
48. Shulman H., Greengard P. Nature, 271, 478—479, 1978.
49. Cheung W. Y. Science, 207, 19—27, 1980.
50. DeLorenzo R. J.—In: Antiepileptic Drugs: Mechanisms of Action, G. H. Glaser, D. Woodbury and K. Penry, ed., Raven Press, New York, p. 399—414, 1980.
51. DeLorenzo R. J. Ann. New York Acad. Sci., 355, 92—109, 1980.
52. Burke B., DeLorenzo R. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 991—995, 1981.
53. Grab D. J., Carlin R. K., Siekevitz P. Ann. New York Acad. Sci., 356, 55—72, 1980.
54. Grab D. J., Berzins K., Cohen R. S., Siekevitz P. J. Biol. Chem., 254, 8690—8696, 1979.
55. DeLorenzo R. J. Cell Calcium, 2, 365—385, 1981.
56. Weiss B., Proxaleck W., Cimino M., Barnette M. S., Wallace T. L. Ann. New York Acad. Sci., 356, 319—343, 1980.
57. DeLorenzo R. J., Burdette S., Holderness J. Science, in press.
58. DeLorenzo R. J., Freedman S. D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 183—192, 1978.
59. Yamauchi T., Fujisawa H. FEBS Lett., 129, 117—119, 1981.
60. Petrati E. H., Sulakhe P. V. Can. J. Physiol. Pharmacol., 57, 1200—1204, 1979.
61. Thomson E. B., Greengard P. Metabolism 23, 159—113, 1974.
62. Liu A. Y.-C., Greangard P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 568—573, 1976.
63. Brandt H., Capulong Z. L., Lee E. Y. C. J. Biol. Chem., 250, 8038—8044, 1975.
64. Lee E. Y. C., Mellgren R. L., Killilea S. D., Aylward J. H.—In: Regulatory, Mechanisms of Carbohydrate Metabolism, Oxford, New York, Pergamon, 42, p. 327—346, 1978.

65. *Antoniw J. F., Nimmo H. G., Yeaman S. J., Cohen P.* Biochem. J., 162, 423—433, 1977.
66. *Imaoka T., Imazu M., Ishida N., Takeda M.* Biochim. Biophys. Acta, 523, 109—120, 1978.
67. *Rose S. P. R.* Nature, 194, 1280—1282, 1962.
68. *Rodnight R.*—In: Protides of Biol. Fluids, Amsterdam, p. 39—49, 1966.
69. *Albin E., Newburg R. W.* Biochim. Biophys. Acta, 377, 381—388, 1975.
70. *Парсаданян Г. К., Бунятян Г. Х.* ДАН СССР, 257, 1258—1261, 1981.
71. *Hers H.* Ann. Rev. Biochem., 45, 167—189, 1979.
72. *Huang F. L., Glinzman W. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3004—3008, 1975.
73. *Toth G., Gergely P., Parsadanian H. K., Bot G.* Biochim. Biophys. Acta Acad. Sci. Hung., 12, 389—398, 1977.
74. *Burchell A., Foulkes J. G., Cohen P. T. W., Condon G. D., Cohen P.* FEBS Lett 92, 68—72, 1978.
75. *Parsadanian H. K., Ter-Tatevosian L. P., Buniatian H. Ch.* Brain Res., 246, 249—256, 1982.
76. *Deflein G., Goris J., Merlevede W.*—In: XI FEBS Meeting Abstr., A1—9102, Copenhagen, 1977.
77. *Khandelwall R. L., Zinman S. M.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 1340—1347, 1978.
78. *Hattori T.* Gifu Daigaku Igakubu Kiyo, 18, 280—291, 1970.
79. *Wu N. C., Martinez J. J., Ahmad F.* FEBS Lett., 116, 157—163, 1981.
80. *Hattori T.* Gifu Daigaku Igakubu Kiyo, 18, 325—332, 1970.
81. *Larner J., Roach P. J., Huang L. C., Brooker G., Murad F., Hazen R.*—In: Hormones and Energy Metabolism. Proceed. 12th Midwest Conf. Endocr., Metabol., 103—123, 1979.
82. *Williams M.* TIBS, 4, 2, 25—28, 1979.
83. *Miyamoto E., Kakiuchi S.* Biochim. Biophys. Acta, 384, 458—455, 1975.
84. *Roberts S., Morelos B. S.* Biochem. J., 184, 233—244, 1979.
85. *Heald P. J.* Biochem. J., 66, 659—663, 1957.
86. *Heald P. J.* Nature, 193, 451—454, 1962.
87. *Trevor A. J., Rodnight R.* Biochem. J., 95, 889—896, 1965.
88. *Browning M., Dunwiddie T., Gispen W. H., Lynch G.* Neuroscience Abstr., 3, 1341, 1977.
89. *Browning M., Dunwiddie T., Bennett W., Gispen W. H., Lynch G.* Science, 203, 60—62, 1979.
90. *Lynch G., Browning M., Bennett W. F.* Fed. Proc., 38, 2117—2122, 1979.
91. *Bar P. R., Schotman P., Gispen W. H.* Eur. J. Pharmacol., 65, 165—175, 1980.
92. *Raese J. D., Boarder M. R., Makk G., Barchas J. D.*—In: Endog. and Exogen Opiate Agonists and Antagonists. Proceed. Ind. Narcotic Res., North Falmout, Mass., 1979, New York e. a., p. 243—246, 1980.
93. *Сарибекян Г. А.* ДАН АрмССР, 71, 4, 238—242, 1980.
94. *Gordon A. S., Davis C. G., Diamond I.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 263—267, 1977.
95. *Greengard P.* Feder Proc., 40, 1654, 1981.
96. *Sleghart W., Forn I., Greengard P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 2475—2479, 1979.
97. *Lohmann S. M., Ueda T., Greengard P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4037—4041, 1978.
98. *Huttner W. B., Greengard P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5402—5406, 1979.
99. *Кометиани П. А.* О механизмах действия цАМФ, Тбилиси, Мецниереба, 1408, 1974.
100. *Кондратьев В. Е., Щипакина Т. Г.*—В кн: Катехоламинергические нейроны. М., Наука, с. 174—183, 1979.
101. *Bloom F. E.*—In: Reviews of Physiol. Biochem. and Exptl. Pharmacol., Berlin, Springer, 1975.

102. *Edwards C., Nahorski S. R., Rogers K. J. J. Neurochem.*, 22, 565—569, 1974.
103. *Routtenberg A. Progress in Neurobiol.*, 12, 85—113, 1979.
104. *Ehrlich Y. H., Reddy M. V., Keen P., Davis L. G., Daugherty J., Brunngraber E. G. J. Neurochem.*, 34, 1327—1330, 1980.
105. *Zwiers H., Wiegant V. M., Schotman P., Gispen W. H.*—In: *Mechanism, Regulation and Special Function of Protein Synthesis in the Brain*, p. 267—272, Elsevier, Amsterdam, 1977.
106. *Gispen W. H., Perumal R., Wilson J. E., Glassman E. Behav. Biol.*, 21, 358—363, 1977.
107. *Thérien H.-M., Mushynski W. E. Biochim. Biophys. Acta*, 585, 188—200, 1979.
108. *Ng M., Matus A. Neuroscience*, 4, 1265—1274, 1979.
109. *Weller M. Mol. Cell. Biochem.*, 27, 2, 71—78, 1979.
110. *De Wied D.*—In: *Frontiers in Neuroendocrinology*, Oxford Univ. Press, New York, p. 97—140, 1969.
111. *De Wied D., Bohus B., van Ree J. M., Urban I. J. Pharm. Exp. Ther.*, 204, 570—580, 1978.
112. *Zwiers H., Veldhuis D., Schotman P., Gispen W. H. Neurochem. Res.*, 1, 669—677, 1976.
113. *Wiegant V. M., Zwiers H., Gispen W. H. Pharmac. Ter.*, 12, 463—490, 1981.
114. *Gispen W. H., Isaacson R. L., Pharmac. Ter.*, 12, 209—246, 1980.
115. *Davis L. G., Ehrlich Y. H.*—In: *Modulators. Mediators and Specifiers in Brain Function. Adv. Expil. Med. Biol.*, 116, Plenum Press, New York, p. 233—244, 1979.
116. *Ehrlich Y. H., Davis L. G., Keen P., Brunngraber E. G.*—In: *Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists*, Pergamon Press, p. 229—232, 1980.
117. *Goldstein A., Tachibana S., Lowney L. I., Hunkapiller M., Hood L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 6666—6670, 1979.
118. *Jolles J., Zwiers H., van Dongen C., Schotman P., Wirtz K. W. A., Gispen W. H. Nature*, 286, 623—625, 1980.

Институт биохимии
АН АрмССР, Ереван

Поступила 12. V 1982

ХРОНИКА

О ЗАСЕДАНИИ КОМИССИИ
ПО ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НЕЙРОХИМИИ

18—20 мая 1982 г. в отделе проблем памяти Института биологической физики АН СССР состоялось заседание комиссии по функциональной нейрохимии секции нейрохимии научного совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека совместно с VIII пленумом Проблемной комиссии «Механизмы памяти и принципы их регуляции в норме и при патологии». Наряду с докладами, посвященными нейробиологии памяти, были заслушаны и обсуждены сообщения, касавшиеся нейрохимических основ влечения к алкоголю.

В докладе Ю. В. Бузова (Институт фармакологии АМН СССР, Москва) были рассмотрены нейрохимические особенности головного мозга животных, предрасположенных к потреблению алкоголя. Изучение особенностей психоэмоционального поведения и его нейрохимических и эндокринных механизмов предрасположенных и не предрасположенных к добровольному потреблению алкоголя беспородных крыс выявило целый ряд существенных фактов. С помощью специальных тестов было установлено, что конкурентоспособность предрасположенных к потреблению алкоголя крыс значительно ниже, чем у не предрасположенных. Введение этанола (0,5 г/кг) предрасположенным животным повышало их конкурентоспособность, у них была обнаружена большая склонность к развитию депрессивноподобного состояния в условиях неизбежного принудительного плавания. Введение 0,5 мг/кг этанола сокращало время пребывания предрасположенных крыс в депрессивном состоянии, концентрация Leu-энкефалина в коре головного мозга у них оказалась в 2 раза выше, чем у не предрасположенных; в то же время концентрация Met-энкефалина в стриатуме была выше, а в продолговатом мозгу—ниже у предрасположенных животных по сравнению с не предрасположенными. Концентрация дельта-гиппогенного пептида в коре больших полушарий и стриатуме предрасположенных крыс была значительно ниже, чем у не предрасположенных. Своеобразные изменения биогенных моноаминов отмечены при введении животным этанола в количестве 2,5 г/кг. У предрасположенных животных в этих условиях снижалось содержание серотонина и норадреналина в гипоталамусе, у не предрасположенных же содержание норадреналина не изменялось, а серотонина—повышалось. Содержание АКТГ, пролактина и β -эндорфина в плазме крови у предрасположенных крыс в 2—3 раза выше, чем у не предрасположенных. Анализ ряда физиологических и нейрохимических показателей привел к общему заключению о том, что у предрасположенных к потреблению алкоголя крыс компенсаторные возможности ЦНС резко снижены. Вероятно, потребление алкоголя такими животными связано с тем, что под его влиянием у них за счет изменений функционального состояния эндокринного аппарата, соответствующих изменений метаболизма компенсаторные возможности ЦНС возрастают, в результате чего поведение становится более адекватным.

В докладе Е. А. Громовой (Отдел проблем памяти Института биологической физики АН СССР, Пушкино-на-Оке) «Влечение к алкоголю как патологическая форма эмоциональной памяти и его связь с метаболизмом моноаминов мозга» были представлены результаты исследований, свидетельствующие о преимущественной связи этого влечения с региональным повышением интенсивности метаболизма серотонина (5-ОТ) в области гипоталамуса. На крысах линии Вистар, подвергнутых длительной

хронической алкоголизации в условиях водной депривации, исследовали способность животных к обучению в сопоставлении с результатами анализа содержания серотонина, норадреналина и их метаболитов в разных структурах мозга. Результаты опытов показали снижение способности к выработке реакции активного избегания у животных с повышенным уровнем алкогольного влечения. Наряду с этим было выявлено различие метаболизма серотонина и норадреналина в структурах мозга животных с высоким влечением к алкоголю по сравнению с животными, отвергавшими его и характеризовавшимися агрессивным поведением. В экспериментах с введенным животным предшественником указанных моноаминов было обнаружено резкое усиление алкогольного влечения под влиянием 5-гидрокситриптофана и его снижение при введении ДОФА. Эти наблюдения были дополнены исследованием влияния этанола на нейроны ядер шва в культуре ткани, результаты которых выявили резкое усиление нейронной активности при его введении в культуральную среду во время опытов. Совокупность всех данных позволила выдвинуть оригинальное предположение, согласно которому в патогенезе хронического алкоголизма существенную роль играет повышение активности нейронов ядер шва под влиянием этанола, сопровождающееся усиленным выделением серотонина в терминалях аксонов этих нейронов на уровне гипоталамуса. В этой области мозга серотонин оказывает свое обычное влияние, характеризующееся формированием эмоционально-положительного состояния, закрепление в памяти которого играет важную роль в становлении психической и физической зависимости от алкоголя.

Интересные данные привел в своем сообщении А. В. Котов (НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва). В экспериментах, проведенных на крысах линии Август, Вистар и беспородных, показано, что длительная алкоголизация животных 20% этанолом в условиях водной депривации (до 30 суток) приводила к формированию алкогольной мотивации. Обнаружено, что электростимуляция и специфическая диссогенная хемостимуляция (0,51 осм. NaCl, ацетилхолин, карбохол) «центров жажды» перифорникальных отделов латерального гипоталамуса у крыс-«алкоголиков» приводили к активному поиску и приему 20% этанола в условиях свободного выбора алкоголя и воды. Показано отсутствие диссогенных и антидиссогенных эффектов при интратрижелудочковых микроинъекциях ангиотензина II и диссогенных эффектов при интратрижелудочковых микроинъекциях ангиотензина II и брадикинина у крыс, предпочитающих этанол. Выявлено подавляющее действие этих веществ на реализацию алкогольной мотивации у крыс (до 3—4 недель наблюдения). Обнаружено резкое изменение чувствительности отдельных нейронов «центров жажды» перифорникальной области латерального гипоталамуса к микроинъекциям ацетилхолина, ангиотензина II и брадикинина у крыс, предпочитающих этанол, по сравнению с интактными животными, а также крысами, проявившими устойчивость к развитию алкогольной мотивации. Показано, что сАМР восстанавливал извращенные реакции нейронов «центров жажды» гипоталамуса к микроинъекциям ангиотензина II.

Выявлена возможность формирования алкогольной мотивации у крыс в условиях неизбежного позицитивного раздражения, подаваемого в течение нескольких суток в стохастическом режиме. Показано, что электростимуляция «центров избегания» вентромедиального ядра гипоталамуса у животных, предпочитающих этанол, привела к активному поиску и приему алкоголя, а стимуляция других мотивационных зон гипоталамуса у таких крыс не способствует этим реакциям. Интратрижелудочковые микроинъекции ангиотензина II у таких животных вели к выраженному увеличению потребления этанола (до 7 суток наблюдения).

Высказано предположение о возможности формирования алкогольной мотивации на структурно-функциональной основе естественных биологических мотиваций. Выдвинута гипотеза о гетерохимическом обеспечении механизмов алкогольной мотивации.

Доклад *М. Я. Майзелиса* (НИИ психиатрии, Москва) был посвящен функциональным и метаболическим особенностям мозга животных, подвергнутых воздействию этанола в пренатальном периоде. Масса таких животных при рождении была меньше, чем в контроле, среди них была отмечена высокая перинатальная смертность. При исследовании условнорефлекторной деятельности у подопытных крыс были выявлены весьма своеобразные нарушения: глубокие изменения выработки и сохранения условных рефлексов активного избегания (У-образный лабиринт, двустороннее избегание) при неизменной способности к выработке и сохранению условных рефлексов пассивного избегания. Примечательно, что нарушения условнорефлекторной деятельности были в большей мере выражены у подопытных самцов, чем у самок. Установлен определенный параллелизм между особенностями выработки и сохранения условных рефлексов и угнетением синтеза белка в церебральных структурах, которые были наиболее четко выражены во фракции водонерастворимых белков глинокампа. Выявлены существенные различия между подопытными и контрольными животными по реакции белоксинтезирующего аппарата мозга на функциональные нагрузки (стресс), по содержанию циклических АМР и GMP, а также β -эндорфина. У подопытных животных обнаружены изменения обратного захвата ^3H -норадреналина синаптическими коры больших полушарий в условиях калиевой деполяризации, указывающие на снижение эффективности норадренергической синаптической передачи.

Заслушанные доклады вызвали большой интерес участников заседания. Представленные в них материалы, полученные с помощью современных тонких методических приемов, позволили раскрыть новые стороны и звенья нейрохимических механизмов влечения к алкоголю, что вносит определенный вклад в разработку чрезвычайно актуальной проблемы—биологических основ алкоголизма и найдет свое место в решении вопросов его профилактики и лечения.

КРУГЛИКОВ Р. И.

О IV ВСЕСОЮЗНОМ СИМПОЗИУМЕ «ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ»

С 9 по 14 сентября 1982 г. в Минске под руководством академика *С. Е. Северина* был проведен IV Всесоюзный симпозиум «Циклические нуклеотиды», на котором были обсуждены как фундаментальные аспекты проблемы циклических нуклеотидов (ЦН)—система передачи сигнала с рецептора на аденилатциклазу (АЦ), характеристика ферментов метаболизма ЦН, биологические эффекты ЦН и т. д., так и практические, в частности изменения и роль ЦН при различных заболеваниях.

Из общего числа докладов (около 150) значительное число сообщений (около 1/5), а также дискуссии за круглым столом были посвящены специально роли ЦН в НС и, в частности, в сенсорных нейронах. В нейрохимических работах нашли свое отражение также новые тенденции, характерные для всей проблемы в целом (например, особый интерес к GTP-связывающим белкам, обеспечивающим передачу сигнала с рецептора на фермент), и были выявлены некоторые аспекты, специфические для нервной ткани. Интерес представляет тот факт, что механизм действия некоторых нейропептидов может быть связан с ЦН. Так, например, под влиянием *Leu-энкефалина* наблюдали изменения в содержании сАМР и сGMP в коре больших полушарий (*М. Я. Майзелис* и др.). *Г. Н. Балденковым* и др. установлено, что опиаты снижали базальную активность АЦ мембран стриарной системы мозга и стимуляцию этого фермента дофамином и простагландином Е. Показано, что при введении некоторых олигопептидов имели место селективные изменения активности АЦ и фосфодиэстеразы (ФДЭ) в клетках нейроглии и синаптических головных мозга (*Р. Г. Ахилкаци* и др.). Было обосновано предположение, что регуляторное действие пептидов гипоталамуса на секрецию гормонов аденогипофиза опосредовано сАМР и Ca^{2+} (*Н. А. Юдаев* и др.).

Выявлены и определенные взаимоотношения между ЦН и рядом нейротропных

Доклад М. Я. Майзелюса (НИИ психиатрии, Москва) был посвящен функциональным и метаболическим особенностям мозга животных, подвергнутых воздействию этанола в пренатальном периоде. Масса таких животных при рождении была меньше, чем в контроле, среди них была отмечена высокая перинатальная смертность. При исследовании условнорефлекторной деятельности у подопытных крыс были выявлены весьма своеобразные нарушения: глубокие изменения выработки и сохранения условных рефлексов активного избегания (У-образный лабиринт, двустороннее избегание) при неизменной способности к выработке и сохранению условных рефлексов пассивного избегания. Примечательно, что нарушения условнорефлекторной деятельности были в большей мере выражены у подопытных самцов, чем у самок. Установлен определенный параллелизм между особенностями выработки и сохранения условных рефлексов и угнетением синтеза белка в церебральных структурах, которые были наиболее четко выражены во фракции водонерастворимых белков глинокампа. Выявлены существенные различия между подопытными и контрольными животными по реакции белоксинтезирующего аппарата мозга на функциональные нагрузки (стресс), по содержанию циклических АМР и GMP, а также β -эндорфина. У подопытных животных обнаружены изменения обратного захвата ^3H -норадреналина синаптическими коры больших полушарий в условиях калиевой деполяризации, указывающие на снижение эффективности норадренергической синаптической передачи.

Заслушанные доклады вызвали большой интерес участников заседания. Представленные в них материалы, полученные с помощью современных тонких методических приемов, позволили раскрыть новые стороны и звенья нейрохимических механизмов влечения к алкоголю, что вносит определенный вклад в разработку чрезвычайно актуальной проблемы—биологических основ алкоголизма и найдет свое место в решении вопросов его профилактики и лечения.

КРУГЛИКОВ Р. И.

О IV ВСЕСОЮЗНОМ СИМПОЗИУМЕ «ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ»

С 9 по 14 сентября 1982 г. в Минске под руководством академика С. Е. Северина был проведен IV Всесоюзный симпозиум «Циклические нуклеотиды», на котором были обсуждены как фундаментальные аспекты проблемы циклических нуклеотидов (ЦН)—система передачи сигнала с рецептора на аденилатциклазу (АЦ), характеристика ферментов метаболизма ЦН, биологические эффекты ЦН и т. д., так и практические, в частности изменения и роль ЦН при различных заболеваниях.

Из общего числа докладов (около 150) значительное число сообщений (около 1/5), а также дискуссии за круглым столом были посвящены специально роли ЦН в НС и, в частности, в сенсорных нейронах. В нейрохимических работах нашли свое отражение также новые тенденции, характерные для всей проблемы в целом (например, особый интерес к GTP-связывающим белкам, обеспечивающим передачу сигнала с рецептора на фермент), и были выявлены некоторые аспекты, специфические для нервной ткани. Интерес представляет тот факт, что механизм действия некоторых нейропептидов может быть связан с ЦН. Так, например, под влиянием Leu -энкефалина наблюдали изменения в содержании сАМР и сGMP в коре больших полушарий (М. Я. Майзелюс и др.). Г. Н. Балденковым и др. установлено, что опиаты снижали базальную активность АЦ мембран стриарной системы мозга и стимуляцию этого фермента дофамином и простагландином Е. Показано, что при введении некоторых олигопептидов имели место селективные изменения активности АЦ и фосфодиэстеразы (ФДЭ) в клетках нейроглии и синаптических головных мозга (Р. Г. Ахилкаци и др.). Было обосновано предположение, что регуляторное действие пептидов гипоталамуса на секрецию гормонов аденогипофиза опосредовано сАМР и Ca^{2+} (Н. А. Юдаев и др.).

Выявлены и определенные взаимоотношения между ЦН и рядом нейротропных

агентов; например, показаны реципрокные изменения в содержании сАМР и сГМР в базальных ганглиях мозга и гипоталамусе после введения активаторов и блокаторов М-холино-, ГАМК- и дофаминно-рецепторов (А. И. Балаклеевский и др.); введение каннатовой кислоты в базальные ганглии мозга обуславливало связанное с дегенерацией тел нейронов уменьшение содержания сГМР в этих структурах (П. М. Суриков и др.); под влиянием введенных внутримозгово в мозг пуриносодержащих ЦН и нуклеозидов наблюдали сдвиги в содержании серотонина и катехоламинов в ткани мозга (Л. А. Степанян и др.). Эти феноменологические характеристики свидетельствуют, с одной стороны, о расширении круга агентов, в действие которых могут включаться ЦН, и, с другой, о сложных взаимоотношениях между ЦН и некоторыми нейротропными регуляторами.

При рассмотрении связи рецепторов с системой ЦН в нервной ткани подробному обсуждению был подвергнут вопрос об уникальной ситуации, имеющей место в фоторецепторном нейроне сетчатки, представляющей собой дериват мозга. В данном случае рецептор оказался сопряженным не с АЦ, а с ФДЭ, активность которой увеличивается после поступления специфического стимула, то есть освещения. Была проанализирована система этой необычной связи, выявлены ее сходные и отличные черты по сравнению с системой рецептор—АЦ (Р. Н. Этингер). Было показано, что GTP-связывающие белки в фоторецепторном нейроне по своим свойствам (влияние холерного токсина, фторида) подобны соответствующим белкам, связанным с гормональными рецепторами (С. Н. Калинина и др.); активность ФДЭ ткани мозга (и сердца) изменялась и под влиянием кардиоактивного нейрогормона «С» (А. А. Галоян и др.); активность ФДЭ гипоталамуса и базальных ганглиев мозга увеличивалась после введения животным агонистов рецепторов к дофамину (А. И. Балаклеевский и др.), что может служить свидетельством о наличии связи между рецепторами и ФДЭ, помимо сетчатки, и в других случаях.

Вопросы об отдельных компонентах сопрягающих систем (рецептор, GTP-связывающие белки, АЦ, ФДЭ) и отдельно о ферментах метаболизма ЦН и ферментах, обеспечивающих реализацию их эффектов в нервной ткани, были рассмотрены в ряде сообщений. При изучении сопрягающего фактора системы АЦ хвостатого ядра мозга было выявлено существенное значение для процесса активации фермента терминального фосфата активирующего нуклеотида в регуляторном центре GTP-связывающего белка (Е. А. Перфильева и др.). В активирующем ФДЭ комплексе фоторецепторного нейрона обнаружена нуклеозидифосфаткиназная активность и установлено, что связанный GDP фосфорилируется до GTP (В. Г. Тищенко и др.).

Что касается отдельных ферментов метаболизма ЦН, то показано, что АЦ и ФДЭ находятся не только в нервных окончаниях, но и в нейроглии (Т. А. Джалишивили); установлена крайне высокая активность АЦ в нервных волокнах (что позволяет судить о морфологических особенностях иннервации в различных участках мозга), показано наличие АЦ в пре- и постсинаптических областях мембран (М. А. Рогова и др.). Выявлены возрастные особенности активации АЦ отдельными стимуляторами синаптических мембран мозга, что может быть связано с возрастными изменениями микровязкости мембран (К. Я. Буланова и др.). В мозгу крыс показано наличие своеобразного белкового стимулятора АЦ, особенно активного в присутствии фторида (А. Н. Васильев и др.). Изучен активный центр АЦ плазматических мембран хвостатого ядра и предположено наличие остатков цистеина и гистидина в этом центре (А. В. Скурат и др.).

ФДЭ фоторецепторного нейрона была очищена до гомогенного состояния (М каталитической субъединицы—40 кД); показано, что эта ФДЭ является диссоциирующей системой, находящейся в различной степени агрегированности (И. Л. Думлер). Выявлены определенные отличия (по чувствительности, влиянию АТР, GTP) в свойствах Ca^{2+} -кальмодулина и резистентной к Ca^{2+} форме ФДЭ серого вещества в мозгу (А. Н. Васильев и др.); подробно исследован механизм регуляции (под влиянием субстрата, кальмодулина и др.) ФДЭ мозга быка и, что особенно важно, человека; выявлена взаимосвязь между действием на ФДЭ некоторых нейропептидов,

токсикозов и кальмодулина (С. М. Дудкин, С. Е. Северич и др.). Показано также внутриклеточное перераспределение кальмодулина в клетках нервной ткани в ответ на действие нейромедиаторов, что приводит к изменению свойств синаптических мембран и ядерных белков (Д. Г. Микеладзе). Установлены как наличие Ca^{2+} -зависимой протеникиназной активности в ядерной фракции коры больших полушарий, так и роль кальмодулина в регуляции активности фермента (Т. Я. Фрайкина и др.). Изучен механизм влияния нейрогормона «С» на протеникиназу мозга и выяснено, что он препятствует восстановлению субъединиц фермента в холофермент (А. А. Галоян и др.). Показано также, что активность фосфопротеинфосфатаз мозга регулируется сАМР (Г. К. Парсаданян).

Отмечены и непосредственные эффекты ЦН на ряд функциональных параметров клетки и ее мембран. Продемонстрировано влияние ЦН на проницаемость фоторецепторных мембран (А. Л. Берман и др.), на структурные перестройки этих мембран (Л. А. Баранова и др.). Проанализирована роль ЦН и Ca^{2+} в реализации ответа обонятельной клетки на адекватный стимул (А. В. Минор) и участие этих агентов в синаптической передаче (Т. А. Джалиашвили).

В ряде работ медицинского аспекта были представлены данные об изменении содержания сАМР в различных тканях и, в частности, в гипоталамусе при развитии нейродистрофического процесса (Я. И. Ажипа и др.), выявлена односторонность изменений холинергической активности и концентрации сАМР в плазме людей при ряде наследственных экстрапирамидных заболеваний и показаны сдвиги в содержании ЦН (β -эндорфина и Met-энкефалина) в СМЖ у больных с различными заболеваниями ЦНС (Т. С. Коршунова и др.). Отмечены сдвиги в содержании сАМР в опухолях головного мозга и увеличение в них сродства протеникиназы к этому нуклеотиду (Л. И. Левченко и др.).

Совокупность представленных сообщений свидетельствует о широком изучении проблемы ЦН в области нейробиологии, и в частности в сенсорных системах. Привлекает большое внимание выявленная универсальность роли ЦН в обработке сигналов различного типа.

ЭТИНГОФ Р. Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

Ala*—аланин	Ile—изолейцин
AMP, ADP, АТР**—аденозин-5'-мо- но-, ди- и трифосфаты	IMP, IDP, ITP — инозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
cAMP — циклический аденозинмоно- фосфат	Leu—лейцин
Ara*—арабиноза	Lys—лизин
Arg—аргинин	Man—манноза
Asp—аспарагин	Met—метионин
Asp—аспарагиновая кислота	NAD, NADH— никотинамидаденин- динуклеотид и его восст. форма
Asx—аспарагиновая кислота или ас- парагин	NADP, NADPH — никотинамидаде- ниндинуклеотидфосфат и его восст. форма
CMP, CDP, CTP—цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	NMN—никотинамидмононуклеотид
CoA—коэнзим А	Orn—орнитин
CoASAc—ацетилкоэнзим А	Phe—фенилаланин
Cys—цистеин	P _i —неорганический фосфат
FAD, FADH ₂ — флавинадениндину- клеотид и его восст. форма	PP _i —неорганический пиродфосфат
FMN, FMNH ₂ — флавиномононуклео- тид и его восст. форма	Pro—пролин
Fuc—фукоза	Q, QH ₂ —убихинон, убихинол
Fru—фруктоза	Rib, dRib — рибоза, 2-дезоксиприбоза
Gal—галактоза	Ser—серин
Glc—глюкоза	Thr—треонин
GlcA —глюкуроновая кислота (ана- логично другие уроновые к-ты)	TMP, TDP, TTP —рибозилтимин-5'- моно-, ди- и трифосфаты
GlcN—глюкозамин	Trp—триптофан
GlcNAc —ацетилглюкозамин (анало- гично другие дезоксисахара и их ацетилпроизводные)	Tyr—тирозин
Gln—глутамин	UMP, UDP, UTP—уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
Glu—глутаминовая кислота	Val—валин
Glx—глутамин или глутаминовая кислота	AX—ацетилхолин
Gly—глицин	ГАМК—гамма-аминомасляная кисло- та
GMP, GDP, GTP — гуанозин-5'-мо- но-, ди- и трифосфаты	ДОФА—диоксифенилаланин
GSH, GSSG—глутатион и его окис- ленная форма	ДНК —дезоксирибонуклеиновая кис- лота
His—гистидин	РНК—рибонуклеиновая кислота
Hyl—оксипролин	rРНК—рибосомная РНК
Hyp—оксипролин	mРНК—матричная (информационная, ядерная РНК)
	tРНК—транспортная РНК
	Glu-tРНК и т. п.—аминоацилпроиз- водные РНК

* стандартные обозначения аминокислот и моносахаридов допустимо употребле-
лять в сокращенном виде при написании структур, а также в таблицах и на рисун-
ках

** соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются путем добавления ла-
тинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом

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

ГЖХ —газожидкостная хроматография
ГЭБ—гемато-энцефалический барьер
ДЭАЭ —целлюлоза — диэтиламино-этилцеллюлоза
ИКС —инфракрасная спектроскопия
ИОХ—понообменная хроматография
ИЭФ—изоэлектрическое фокусирование
КМ-целлюлоза — О-карбоксиметил-целлюлоза
АХЭ—ацетилхолинэстераза
МАО—моноаминоксидаза
М. Е.—международная единица
М—молекулярная масса (вес)
м-, о-, п.—мета-, орто-, пара-
н.—нормальный (раствор)
НС—нервная система
ПААГ—полнакриламидный гель
СМЖ—спинномозговая жидкость
т. кип.—температура кипения
т. пл.—температура плавления
трис—трис (оксиметил)-аминометан
ТСХ—тонкослойная хроматография
У. А.—удельная активность
УФ-спектр—ультрафиолетовый спектр
ЦНС—центральная нервная система
ЭГТА—этиленгликольтетраацетат
ЭДТА—этилендиаминтетраацетат
ЭПР —электронный парамагнитный резонанс
ЭСР— электронный спиновый резонанс

ЯМР—ядерный магнитный резонанс
А—абсорбция (поглощение)
г—константа скорости реакции
 K_d —константа диссоциации
 K_i —константа ингибирования
 K_m —константа Михаэлиса
 K_s —субстратная константа
 n —коэффициент Хилла
V—максимальная скорость реакции
 K_h —кюри
 mK_u —милликюри
Р—рентген
имп/мин—импульсы за минуту
Д—дальтон
кД—килодальтон
ч—час
мин—минута
с—секунда
мкм—микрометр
мл—миллилитр
мкл—микролитр
мг—миллиграмм
мкг—микрограмм
нг—нанограмм
нм—нанометр
пг—пикограмм
мкатом—микроатом
ммоль—миллимоль
мкмоль—микромоль
нмоль—наномоль
пмоль—пикомоль

Примечание. Сокращения для названий ферментов, как, например, ГДГ, ГДК, ГФБДГ и т. д., не допускаются. Однако нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например: АТРаза, РНКаза, NADHдегидрогеназа и т. п. Химические элементы следует обозначать символами, а простые неорганические соединения—формулами, например: $MgCl_2$. Символы ионов следует писать так: Mg^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} .

СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Кругликов Р. И., Орлова Н. В., Гецова В. М., Мац В. Н.</i> Зависимость влияния Met-энкефалина на процессы обучения и памяти от состояния моноаминергических систем головного мозга	3
<i>Анохин К. В., Коган Б. М., Христолюбова Н. А.</i> Избирательное увеличение холинэстеразного метаболизма дофамина в мезолимбической системе	11
<i>Армянян А. Р., Чифликян М. Д., Бунятян Г. Х.</i> Участие Ca^{2+} и Cl^- в действии ГАМК и пикротоксина на вызванное K^+ высвобождение 3H -норадреналина из синапсом мезодienceфальной области мозга крысы	18
<i>Каприлов А. А., Смерчинская Л. С., Белик Я. В., Тюленев В. И.</i> Внутриядерное распределение нейроспецифического белка S-100 в мозжечке быка	26
<i>Микеладзе Д. Г., Фрайкина Т. Я.</i> Действие норадреналина на фосфорилирование ядерных белков головного мозга	34
<i>Панов А. И., Кривенко Н. Е.</i> Белки и РНК в нейронах и глиоцитах супраоптического ядра при лишении сна	41
<i>Кленикова В. А., Глуценко Т. С.</i> Метаболизм ядерных белков нейронов и глиоцитов головного мозга при воспроизведении условного пищевого рефлекса (автордиографическое и цитофотометрическое исследование)	47
<i>Судакова Н. М., Елаев Н. Р.</i> Система регуляции биосинтеза ацетилхолинэстеразы микросом клеток головного мозга ацетилхолином и циклическими нуклеотидами	52

Краткие сообщения

<i>Андреев В. В.</i> Влияние циклогексимида и лизинвазопрессина на активность нейронов коры мозга при целенаправленном поведении животных	59
<i>Фурсов В. В., Калинина С. Н., Этингер Р. Н.</i> Влияние холерного токсина и норадреналина на фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов наружных сегментов палочек сетчатки	63
<i>Райзе Т. Е., Шарагина Л. М., Тюлькова Е. И.</i> Об интенсивности обмена фосфолипидов в субклеточных фракциях ткани мозга	67

Обзоры

<i>Соколова Г. П., Прохорова М. И.</i> Метаболизм жирных кислот в головном мозгу и его регуляция	72
<i>Парсаданян Г. К.</i> Регуляция фосфорилирования и дефосфорилирования белков в центральной нервной системе	84

Хроника

<i>Кругликов Р. И.</i> О заседании комиссии по функциональной нейрохимии	104
<i>Этингер Р. Н.</i> О IV Всесоюзном симпозиуме «Циклические нуклеотиды»	106

CONTENTS

<i>Kruglikov R. I., Orlova N. V., Getzova V. M., Maz V. N.</i> Involvement of brain monoaminergic system in the effect of Met-enkephalin on the learning and memory	3
<i>Anokhin K. V., Kogan B. M., Christolubova N. A.</i> Cholecystokinin selectively increases dopamine turnover in mesolimbic system	11
<i>Armenian A. R., Chiflikian M. D., [Bunatian H. Ch.]</i> Involvement of Ca^{2+} and Cl^{-} ions in the effects of GABA and picrotoxin on the K^{+} -evoked release of 3H -NA from rat brain mesodiencephalic synaptosomes	18
<i>Kapralov A. A., Smerchinskaya L. S., Belik Ya. V., Tjulenev V. I.</i> Intracellular distribution of neurospecific protein S-100 in bovine cerebellum	26
<i>Mikeladze D. G., Fraikina T. Ya.</i> Effect of norepinephrine on the phosphorylation of brain nuclear proteins	34
<i>Panov A. N., Krivenko N. E.</i> Protein and RNA content in rat n. supraopticus after sleep deprivation	41
<i>Klenikova V. A., Glushchenko T. S.</i> Metabolism of nuclear proteins in neurons and gliocytes of rat brain after the retrieval food conditioning (autoradiographic and cytophotometric analysis)	47
<i>Sudakova N. M., Elaeu N. R.</i> System regulating acetylcholinesterase biosynthesis via acetylcholine, cAMP and cGMP in nerve cell microsomes . .	52

Short communications

<i>Andrianov V. V.</i> Effect of cyclheximide and Lys-vasopressin on brain neuronal activity in animals with goal-seeking behaviour	59
<i>Furaev V. V., Kalitina S. N., Etingof R. N.</i> Effect of cholera toxin and fluoride on cyclic nucleotide phosphodiesterase from retinal rods outer segments	63
<i>Raize T. E., Sharagina L. M., Tulkova E. I.</i> On the intensivity of the phospholipids phosphorous metabolism in brain tissue subcellular fractions .	67

Reviews

<i>Sokolova G. P., Prokhorova M. I.</i> Metabolism of brain fatty acids and its regulation	72
<i>Parsadantian H. K.</i> Regulation of protein phosphorylation and dephosphorylation in the central nervous system	84

Chronicles

<i>Kruglikov R. I.</i> Session of the Committee on Functional Neurochemistry . .	104
<i>Etingof R. N.</i> IVth All-Union Symposium "Cyclic Nucleotides"	106

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются оригинальные статьи, содержащие ранее не опубликованные результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной 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 должен превышать 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроники—4 с., а писем в редакцию—2 с.

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

2. Ко всем статьям и сообщениям прилагается на отдельном листе резюме на английском языке, которое должно быть озаглавлено, в нем указываются авторы и название учреждения, в котором выполнена работа. Резюме на русском языке составляется для экспериментальных статей и обзоров, оно должно быть напечатано на машинке через 1,5 интервала и расположено в начале статьи, непосредственно под заголовком.

Экспериментальные статьи, являющиеся основным публикуемым материалом в журнале, должны быть построены по следующему плану: резюме на русском языке, краткое введение с указанием цели работы, материалы и методы, результаты и обсуждение, резюме на английском языке, литература. Вверху справа от названия статьи указывается индекс универсальной десятичной классификации (УДК), а в конце статьи внизу слева приводится полное название учреждения, в котором выполнена работа.

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

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

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

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

6. Названия ферментов и коферментов, символы кинетики ферментов и единиц активности, написание соединений, меченых изотопами, и т. п. должны соответствовать требованиям Международного биохимического союза. Разрешаются лишь общепринятые современные сокращения слов, различных единиц измерения, физических и химических величин, терминов и т. п. В приложении к правилам для авторов, которое будет публиковаться в каждом первом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, разрешаемых применять без специальной расшифровки.

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

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

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

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

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

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

10. Редакция высылает авторам бесплатно 15 оттисков опубликованной статьи.

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

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

13. Корректуру авторам редакция не высылает.