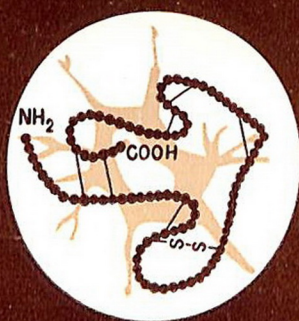


НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ. 2. № 2. 1983

ISSN 0203-493X



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

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. Кометиани, 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. Казарян, Р. И. Кругликов, Б. К. Лишко, В. Г. Мхитарян, В. С. Оганесян, М. И. Прохорова, А. Д. Рева, Д. А. Сахаров, А. А. Симонян, Т. М. Турпаев, А. М. Утевский, Е. М. Хватова, Л. С. Черкасова, Р. Н. Этингф

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 2, ВЫП. 2
Апрель--июнь

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН

1983

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

Сдано в набор 25.02.1983 г. Подписано к печати 9.06.1983 г. ВФ 01870.
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист. 7,63. Усл. печ. лист. 10,68.
Учет.-изд. 8,32. Тираж 700. Заказ 277. Издат. 5931.
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака, 5/1, т. 24-89-00, 24-89-54.
Издательство АН АрмССР, Ереван, 19, пр. Маршала Баграмяна, 24-г.
Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19,
пр. Маршала Баграмяна, 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 нейробиохимии и экспресс-информацию в виде кратких сообщений и писем в редакцию. Особое внимание уделяется работам по функциональной нейробиохимии, 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 в хромаффинных гранулах.

В работе журнала принимают участие ведущие нейробихимики 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 577.175.859+612.82+615.917

О РОЛИ МОНОАМИНОВ МОЗГА В МЕХАНИЗМАХ АЛКОГОЛЬНОГО ВЛЕЧЕНИЯ

ГРОМОВА Е. А., БОБКОВА Н. В., ПЛАХИНАС Л. А., ТОКАРЕВА А. Е.

На крысах линии Вистар, подвергавшихся хронической алкоголизации, изучали зависимость способности к обучению от степени индивидуального пристрастия к алкоголю в сопоставлении с содержанием моноаминов и их метаболитов в разных структурах мозга. Установлено ухудшение обучения на болевом подкреплении у животных с сильным алкогольным влечением. Выявлено повышение уровня норадреналина в коре больших полушарий, стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе у животных со слабым влечением и усиление обмена серотонина в гипоталамусе у животных с высоким влечением к алкоголю. Показано значительное снижение уровня алкогольного влечения под влиянием систематического введения D, L-ДОФА и усиление его у крыс, получавших 5-окситриптофан (5-ОТФ). Полученные данные позволяют сделать вывод о связи алкогольного влечения с повышенной активностью серотонинергических структур мозга.

При экспериментальном анализе нейрохимических основ влечения к алкоголю представляют большой интерес моноаминергические (МА) системы мозга в связи с их активным участием в механизмах эмоциональной памяти, которая играет важную роль в патологических влечениях [1].

Анализу роли этих систем в алкогольной интоксикации посвящено значительное число работ, нашедших свое обобщение в ряде обзоров [2—6]. Знакомство с ними указывает на связь алкогольной интоксикации с обменом катехоламинов (КА) и серотонина (5-ОТ) мозга, характер которой остается пока неясным из-за больших противоречий в данных отдельных авторов.

Настоящее исследование имело целью изучение соотношения индивидуального влечения животных к алкоголю с обменом 5-ОТ и КА мозга в сопоставлении с их способностью к обучению.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 68 крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 180—200 г. Животных содержали в клетках по 3, и они находились на одинаковом рационе питания. Все подопытные животные (за исключением 9 контрольных) подвергались длительной (90—100 дней) принудительной алкоголизации в условиях водной депривации. Они получали жидкость только в виде 10%-ного раствора этано-

ла. Контрольные крысы алкоголя не получали и имели свободный доступ к поилке с водой.

Методика тестирования алкогольного влечения. Тестирование производилось по истечении указанного срока алкоголизации, к концу которого крысы достигали массы в 350—400 г. На время тестирования каждое животное помещали в специальную индивидуальную камеру (размеры—30×15×25 см), разделенную дверцей на два отсека—темный и светлый. Крыса находилась в темном отсеке и при открывании дверцы получала доступ к поилке с этанолом, находившейся в светлом. Животных приучали в камере 3 дня по 20 мин, после чего у них ежедневно проводили 10-кратное тестирование влечения к этанолу в течение 10 дней. Поскольку крысы предпочитают темноту, то преодоление этого явления служит хорошим мериллом степени их влечения к алкоголю, которая оценивалась по показателям вероятности (р) выхода к поилке за 10 последовательных тестирований.

Методика обучения. Обучение проводили в камере с электрифицированным полом, на стенках которой находились полочки, изолированные от действия электрического тока. Его осуществляли по схеме: условный раздражитель—свет в течение 7 с, после чего животное получало болевое раздражение электрическим током через пол камеры, от действия которого могло спастись прыжком на боковую полку. Выработка реакции активного избегания проходила во время одного опыта, включавшего до 35 сочетаний условного и безусловного (болевого) раздражителей. Критерий обученности—5 правильных реакций избегания подряд.

Биохимические методики. После завершения опытов крыс декапировали, и у каждого животного в отдельности проводили определение содержания МА и их метаболитов в пяти отделах мозга—фронтальной коре, стриатуме, гипоталамусе, гиппокампе и каудальном отделе мозгового ствола. Содержание норадреналина (НА), дофамина (ДА) и серотонина (5-ОТ) определяли по модифицированному методу Schlumpf и соавт. [7], 5-оксинидолуксеной кислоты (5-ОИУК)—методом Curson, Green [8], гомованилиновой кислоты (ГВК)—по Hanbrich, Deuzer [9]. Измерения флуоресценции проводили на флуориметре ФМ—ЗМА. Достоверность полученных данных устанавливали с помощью непараметрического метода Вилкоксона [10] и по тесту Стьюдента.

Фармакологические воздействия. При изучении влияния предшественников МА на алкогольное влечение животным внутривенно, за час до тестирования влечения к этанолу, в дозах, указанных в тексте, вводили 5-ОТФ (фирма «Serva», ФРГ) и D, L-ДОФА (фирма «Reanal», ВНР).

Результаты исследований

Наблюдение за поведением животных после длительного потребления раствора этанола выявило индивидуальные различия как в сте-

лении их влечения к алкоголю, так и в способности к обучению. Тестирование влечения к алкоголю показало, что из 28 животных, вошедших в первый раздел исследований, у 10 вероятность выхода к поилке не превышала 0,35. У 14 крыс $p \geq 0,7$, а у остальных четырех животных наблюдался разброс от 0,43 до 0,65. В соответствии с этим в данный раздел исследований были включены три серии опытов—на животных с высоким уровнем алкогольного влечения ($n=14$), с низким влечением ($n=10$) и животных контрольной группы ($n=9$). Результаты биохимического анализа мозга животных этих серий опытов представлены в табл. 1. У всех крыс, подвергавшихся хронической алкоголизации, имело место увеличение НА в большинстве исследуемых структур мозга и ДА в стриатуме, гиппокампе и стволе мозга по сравнению с контрольной группой. Сдвиги уровня 5-ОТ были менее выраженными. Лишь в гипоталамусе наблюдалось значительное повышение уровня 5-ОТ, сопровождавшееся увеличением концентрации его конечного метаболита 5-ОИУК, что свидетельствует об усилении обмена 5-ОТ в этой области мозга под влиянием алкоголизации.

Таблица 1

Содержание моноаминов в структурах мозга у контрольных животных (мкг/г ткани) и у животных с разной степенью влечения к алкоголю (в % относительно концентрации МА у контрольной группы животных, принятой за 100%)

Серии опытов	Структуры мозга	НА	ДА	5-ОТ	5-ОИУК	ГВК
Контрольные животные ($n=9$)	Фронтальная кора	$0,083 \pm 0,023$	$1,140 \pm 0,130$	$0,57 \pm 0,110$	$0,474 \pm 0,091$	$0,361 \pm 0,140$
	Стриатум	$0,292 \pm 0,022$	$2,800 \pm 0,540$	$0,815 \pm 0,240$	$0,579 \pm 0,081$	$0,474 \pm 0,058$
	Гиппокамп	$0,182 \pm 0,003$	$0,600 \pm 0,023$	$0,585 \pm 0,033$	$0,495 \pm 0,062$	$0,301 \pm 0,042$
	Гипоталамус	$0,576 \pm 0,051$	$1,180 \pm 0,150$	$1,140 \pm 0,123$	$0,489 \pm 0,122$	$0,230 \pm 0,045$
	Ствол	$0,478 \pm 0,057$	$0,388 \pm 0,048$	$1,007 \pm 0,134$	$0,485 \pm 0,031$	$0,093 \pm 0,071$
		%	%	%	%	%
Животные с повышенным влечением к алкоголю ($n=14$)	Фронтальная кора	166**	52,2**	78*	73,4	18,2**
	Стриатум	126,5	111,2	132,8*	70,8*	70,6*
	Гиппокамп	183**	133,3*	69,5*	109,1*	85,5*
	Гипоталамус	83,9*	56,8*	135,6*	142**	194,5
	Ствол	106	204**	88,4*	93,6	166**
Животные с низким влечением к алкоголю ($n=10$)	Фронтальная кора	156*	57**	81,5*	65,2*	35,4*
	Стриатум	178,3**	141,8**	118	93,5	67*
	Гиппокамп	193**	144,5**	72,8	108,7	127,8*
	Гипоталамус	137*	68,9	113	121,5*	128*
	Ствол	102,3	165**	106,8	103,2	161,8*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Результаты сравнительного анализа содержания МА и их метаболитов в мозгу животных с высоким и низким алкогольным влечением представлены в табл. 2. Достоверные различия между двумя

группами животных с различной степенью алкогольного влечения имели место в стриатуме, гипоталамусе и каудальном отделе ствола. При этом обращают на себя внимание разнонаправленные изменения уровней 5-ОТ и КА. В стриатуме и гипоталамусе уровень КА у животных с высоким алкогольным влечением оказался ниже, чем у животных с низкой степенью влечения, в то время как содержание 5-ОТ и 5-ОИУК было выше.

Таблица 2

Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс с повышенным ($p \geq 0,7$) влечением к алкоголю в % по сравнению с их уровнем у животных с низким влечением ($p < 0,35$)

Вещества	Кора		Стриатум		Гиппокамп		Гипоталамус		Ствол	
	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p
НА	106,0	—	70,6	**	95,0	—	60,8	*	103,8	—
ДА	91,5	—	78,5	**	91,8	—	82,5	*	123,3	**
5-ОТ	95,6	—	112,1	—	96,0	—	119,8	*	82,7	**
5-ОИУК	112,5	—	75,8	*	99,9	—	117,0	*	91,0	*
ГВК	51,0	*	105,0	—	67,5	**	151,8	*	101,2	—

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Сопоставление степени влечения животных к алкоголю с их способностью к обучению выявило определенную зависимость: у большинства животных с повышенной вероятностью выхода к поилке с этанолом наблюдалось затруднение обучения, выражавшееся в увеличении числа сочетаний условного и безусловного раздражителей, необходимого для достижения критерия обученности. В соответствии с этими показателями из общего числа животных для биохимических исследований были выделены три группы: первую группу составили 5 крыс с низкой степенью влечения к алкоголю ($p < 0,35$) и хорошо обучавшиеся (достигшие критерия обученности в среднем за 14 сочетаний, то есть в те же сроки, что и контрольные животные). Во вторую были включены 5 животных с высокой степенью влечения к алкоголю ($p = 0,79$), обучавшиеся, но не достигшие критерия обученности за 35 сочетаний условного и безусловного раздражителей. К третьей группе были отнесены 6 крыс, обучение которых оказалось невозможным, несмотря на низкое влечение к алкоголю ($p = 0,17$). Животные этой группы характеризовались неадекватным поведением, были крайне агрессивны и не поддавались обучению.

Результаты биохимического анализа мозга животных указанных трех групп представлены на рис. 1. Животные первой группы (1), хорошо обучавшиеся, со слабым алкогольным влечением, характеризовались более высоким уровнем НА почти во всех исследуемых структурах мозга (за исключением ствола) по сравнению с животными второй группы (2), не достигшими критерия обученности, с сильным алкогольным влечением. Достоверные изменения уровня 5-ОТ и 5-ОИУК

у животных обеих групп имели место только в гиппокампе и гипоталамусе. При этом изменения уровня обоих веществ в указанных группах имели противоположный характер: у животных первой группы отмечался сниженный уровень 5-ОТ и 5-ОИУК по сравнению со второй. Особый интерес представляют данные, полученные у животных третьей группы (3), характеризовавшихся почти полным отсутствием алкогольного влечения и неадекватным, типичным для стрессовых состояний поведением, сочетавшимся с агрессией. У них наблюдалось повышенное содержание НА в коре больших полушарий и переднем мозгу, в то время как в остальных структурах его уровень не отличался от контрольных животных.

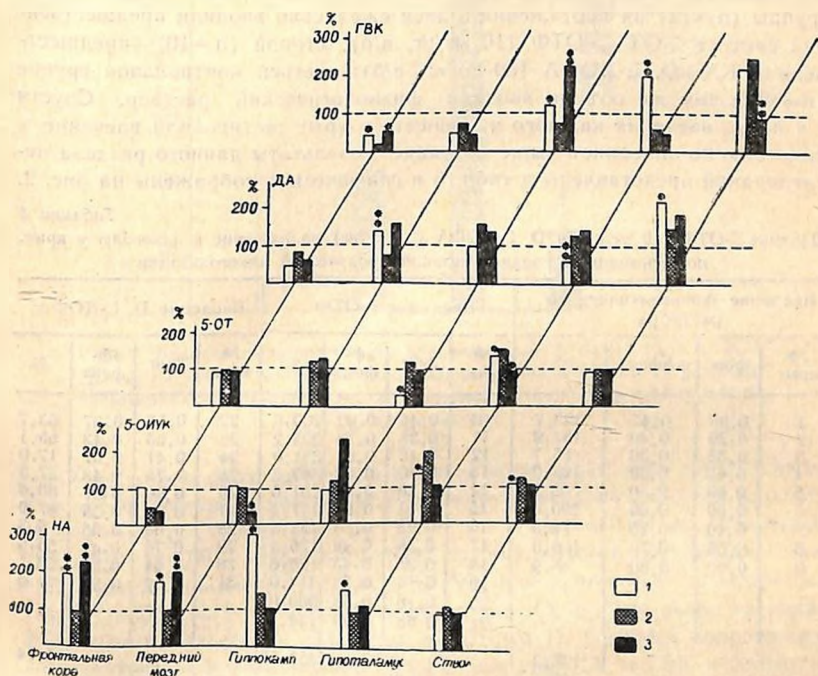


Рис. 1. Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс с различным уровнем влечения к алкоголю и способностью к обучению в % относительно контрольной группы животных (пунктирная линия), не потреблявших алкоголя. 1—животные со слабым влечением к алкоголю; 2—с сильным влечением к алкоголю; 3—без влечения к алкоголю. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ —относительно группы 2

Полученные результаты свидетельствуют, что крысы со слабым влечением к алкоголю характеризуются повышенным содержанием НА в большинстве исследуемых структур мозга. Уровень 5-ОТ у них не отличался от контрольных животных, лишь в неокортексе имело место

статистически значимое его снижение. В отличие от этого у животных с сильным алкогольным влечением наблюдалось повышенное содержание 5-ОТ и 5-ОИУК в гипоталамусе, свидетельствующее об интенсификации обмена 5-ОТ в этой области мозга (табл. 1). Полученные данные послужили стимулом для изучения влияния предшественников этих аминов на алкогольное влечение животных, что составило задачу следующего раздела исследований.

Этот этап работы проведен на 31 крысе, из числа подвергавшихся предварительной алкоголизации. У всех животных в течение 5 дней проводили тестирование исходного (фоновое) влечения к алкоголю. Затем все животные были подразделены на три группы. Животным первой группы ($n=12$) на протяжении 5 дней ежедневно вводили предшественник синтеза 5-ОТ—5-ОТФ (10 мг/кг, в/б); второй ($n=10$)—предшественник КА—D, L-ДОФА (50 мг/кг, в/б); третьей контрольной группе ($n=9$) в том же объеме вводили физиологический раствор. Спустя 1 ч после введения каждого из веществ у крыс тестировали влечение к алкоголю по описанной выше методике. Результаты данного раздела исследований представлены в табл. 3 и графически отображены на рис. 2.

Таблица 3

Влияние 5-ОТФ (10 мг/кг) и D, L-ДОФА (50 мг/кг) на влечение к алкоголю у крыс, подвергавшихся предварительной хронической алкоголизации

Введение физиологического раствора				Введение 5-ОТФ				Введение D, L-ДОФА			
№ крыс	фон	эффект	%	№ крыс	фон	эф-фект	%	№ крыс	фон	эф-фект	%
1	0,38	0,47	123,7	10	0,46	0,92	200,0	22	0,58	0,37	63,7
2	0,29	0,40	137,9	11	0,38	0,78	205,2	23	0,66	0,43	65,1
3	0,35	0,30	85,7	12	0,16	0,61	381,0	24	0,41	0,07	17,0
4	0,40	0,50	125,0	13	0,16	0,62	387,5	25	0,75	0,43	57,3
5	0,60	0,50	83,3	14	0,26	0,42	161,6	26	0,90	0,57	63,6
6	0,60	0,60	100,0	15	0,61	0,96	157,4	27	0,63	0,55	87,0
7	0,40	0,29	72,5	16	0,63	0,84	133,3	28	0,60	0,05	8,3
8	0,66	0,70	106,0	17	0,38	0,48	126,3	29	0,76	0,43	56,6
9	0,92	0,80	86,9	18	0,35	0,45	128,6	30	0,94	0,50	53,1
				19	0,14	0,58	414,0	31	0,56	0,20	76,0
				20	0,10	0,58	580,0				
				21	0,68	0,98	144,1				
			102,3				251,58				54,74

Примечание. В графе % представлено отношение степени алкогольного влечения после введения веществ к исходному (фон) по показателям вероятности выходов животных к поилке с этанолом

В таблице приведены усредненные показатели вероятности выхода к поилке для каждой крысы до (фон), после (эффект) введения предшественников или физиологического раствора и указано в процентах изменение уровня алкогольного влечения под влиянием этих веществ. На рис. 2 приведены средние данные по всем животным. Введение 5-ОТФ сопровождалось возрастанием вероятности выходов животных к поилке с этанолом ($251,53 \pm 73,50\%$), а введение D, L-ДОФА, наоборот, сопро-

вождалось уменьшением числа выходов к поилке, которое в среднем составило $54,74 \pm 28,70\%$ от фонового уровня. Введение физиологического раствора не оказывало достоверного воздействия на степень влечения к алкоголю ($102,3 \pm 23,2\%$).

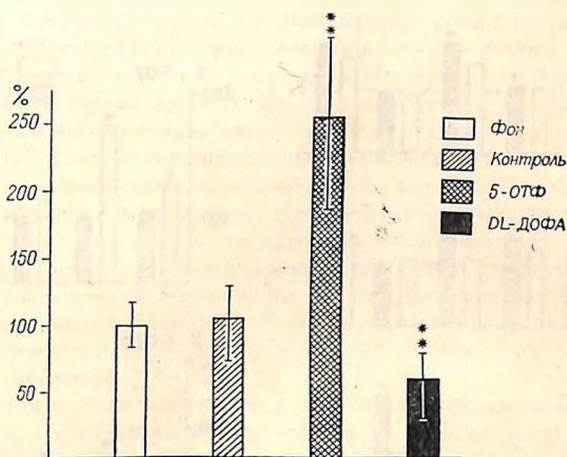


Рис. 2. Влияние систематического введения 5-ОТФ (10 мг/кг) и D, L-ДОФА (50 мг/кг) на степень алкогольного влечения у крыс на фоне хронической алкоголизации (в % от исходного фона). ** $p < 0,001$ относительно контроля

Результаты биохимического анализа мозга этих трех групп животных представлены на рис. 3, где содержание биогенных аминов выражено в процентах относительно их уровня в контрольной группе животных, принятого за 100%. Введение 5-ОТФ сопровождалось достоверным увеличением содержания 5-ОТ и 5-ОИУК в большинстве исследуемых структур. Достоверных изменений в уровне КА и ГВК после введения 5-ОТФ не наблюдалось. Введение животным D, L-ДОФА сопровождалось достоверным увеличением содержания НА, ДА и ГВК в большинстве исследуемых структур. Отсутствие достоверных изменений содержания КА и 5-ОТ в гипоталамусе после введения предшественников, по-видимому, связано с усилением обмена этих веществ, о чем свидетельствует значительный прирост в этой структуре метаболитов: ГВК (252%) и 5-ОИУК (182%). Обращает на себя внимание усиление обмена 5-ОТ в гиппокампе, гипоталамусе и стволе мозга после введения D, L-ДОФА, хотя оно и было выражено в меньшей степени, чем после введения предшественника серотонина 5-ОТФ. Этот интересный факт свидетельствует о взаимосвязи синтеза КА и 5-ОТ.

Результаты данного раздела исследований свидетельствуют о регулирующем влиянии 5-ОТ и КА систем мозга на алкогольное влече-

ние животных, обусловленное хронической интоксикацией этанолом, ч указывают на значение баланса активности этих систем в формировании алкогольной зависимости животных.

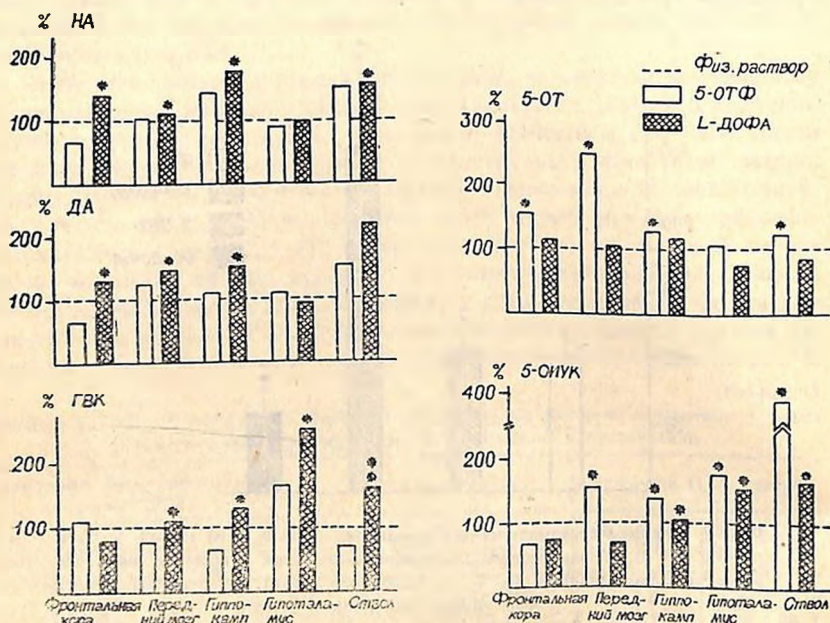


Рис. 3. Влияние введения 5-ОТФ и D, L-ДОФА на уровень моноаминов мозга (в % от их содержания у контрольных животных, получавших физиологический раствор). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ относительно контроля

Обсуждение результатов

Результаты проведенных исследований вскрывают противоположный характер сдвигов уровней НА и 5-ОТ в ряде структур мозга, возникающих в процессе хронической алкоголизации у животных с различной степенью алкогольного влечения. У крыс с низким алкогольным влечением наблюдается повышение уровня НА в большинстве исследуемых структур мозга, в том числе и гипоталамусе, в то время как у животных с высоким уровнем влечения в этой области мозга наблюдается активация обмена 5-ОТ. Это указывает на преимущественную связь алкогольного влечения с повышенной активностью 5-ОТ системы мозга, что нашло подтверждение во втором разделе исследования с фармакологическими воздействиями на обмен МА. Результаты наших исследований согласуются с данными Ahtee, Eriksson, обнаружившими повышенное содержание 5-ОТ в мозгу крыс, селекционированных генетически на высокое потребление алкоголя [11], а также с наблюдениями других авторов, отмечавших снижение потребления алкоголя крысами под влиянием блокаторов синтеза 5-ОТ [12, 13]. В то

же время они противоречат представлению о ведущем значении КА в формировании пристрастия к алкоголю. Однако следует отметить, что это представление сложилось на основании изучения влияния этанола на обмен КА без должного учета функциональных взаимоотношений 5-ОТ и НА систем мозга.

Исследованиями нашей лаборатории показано, что эти взаимоотношения являются реципрокными и играют важную роль в регуляции эмоциональной памяти. Установлена преимущественная связь 5-ОТ структур мозга с гипоталамической зоной положительного подкрепления, а НА—с системой отрицательного, чем определяется их роль в механизмах памяти на эмоционально положительные и отрицательные состояния [1, 14, 15]. Рассматривая влечение к алкоголю как патологическую форму эмоциональной памяти, можно думать, что она связана главным образом с механизмами эмоционально положительных состояний. В пользу такого предположения свидетельствуют наблюдения на людях, страдающих пристрастием к алкоголю, потребление которого в период становления физической зависимости от него сопровождается субъективными ощущениями физического комфорта, раскованности, веселости и другими проявлениями эмоционально положительного состояния, граничащего с эйфорией [16—18].

Опыты также показывают, что у животных с врожденной предрасположенностью к алкоголю этанол вызывает транквилизирующий эффект, в то время как у неприспособленных его введение сопровождается агрессией [19]. Поэтому результаты исследований, указывающие на связь влечения к алкоголю с повышенной активностью 5-ОТ структур мозга, вполне соответствуют представлению об их ведущем значении в механизмах памяти на эмоционально положительные состояния, а положение о реципрокности отношений 5-ОТ и НА систем мозга находит свое подтверждение в том, что повышение в мозгу уровня НА сопровождается снижением алкогольного влечения.

В свете этих данных становится понятным несовершенство метода лечения больных хроническим алкоголизмом с помощью антабуса (дисульфирама). Основу его терапевтического действия составляет токсический эффект ацетальдегида, уровень которого резко повышается при приеме алкоголя на фоне действия антабуса [20]. Считается, что условнорефлекторная память о последствиях действия алкоголя удерживает лечащихся больных от дальнейшего его употребления. Однако надо иметь в виду, что, помимо вмешательства в обмен этанола, дисульфирам снижает уровень НА мозга благодаря ингибирующему влиянию на дофамин- β -гидроксилазу, обеспечивающую превращение ДА в НА. Возможно, что именно это обстоятельство снижает эффективность лечения алкоголизма антабусом, что следует учитывать при его назначении*.

* Прием антабуса обуславливает невозможность употребления алкоголя в связи с вероятностью смертельного исхода. Лечение антабусом проводится посредством ряда проб (то есть прием алкоголя и токсические реакции ацетальдегида — гиперемия кожи лица и верхней половины туловища, ощущение жара, удушье, рвота, судороги).

BRAIN MONOAMINES AND THE EFFECT OF ALCOHOL ON RAT BEHAVIOUR —

GROMOVA E. A., BOBKOVA N. V., PLAKHINAS L. A., TOKAREVA A. E.

Laboratory of Brain Neurotransmitter Systems, Institute of Biophysics,
USSR Academy of Sciences, Poustchino

Involvement of biogenic amines and their metabolites in the effect of chronically excessive ethanol consumption on the learning ability has been studied in rat brain different areas. The animals with high attraction to alcohol learned worse than the control ones. Significantly higher level of NA has been detected in frontal cortex, striatum, hippocampus and hypothalamus of rats with low attraction to alcohol and high learning ability. Elevated content of 5-HT and 5-HiAA has been detected in the hypothalamus of rats with high attraction to alcohol. Daily injections of DL-DOPA essentially decreased the ethanol ingestive behaviour of rats. In contrast, excessive ethanol intake has been observed in 5-HT treated animals. Data obtained point to the involvement of brain serotonergic structures in rats alcohol ingestive behaviour.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Громова Е. А. Эмоциональная память и ее механизмы, М., Наука, 1980.
2. Борисов М. М. Ж. невропат. и психиатр., 81, 1094—1099, 1981.
3. Feldstein A.—In: The Biology of Alcoholism, 1, Biochemistry ed. Kissin B., Begleiter H., New York, London, Plenum-Press, p. 127—159, 1971.
4. Hunt W. A., Majchrowicz E.—In: Biochemistry and Pharmacology of ethanol. Ed. by E. Majchrowicz and E. P. Noble. New York, London, Plenum Press, 2, p. 167—185, 1979.
5. Lahti R. A.—In: Biochemical Pharmacology of ethanol. Ed. Majchrowicz E., New York, London, Plenum Press, p. 239—253, 1975.
6. Wajda I. J.—In: Biochemistry and Pharmacology of ethanol, 2, ed. by E. Majchrowicz and E. P. Noble, p. 187—205, 1979.
7. Schlumpf M., Lichtenstetger W., Langemann H., Waser P. G. Biochem. Pharmacol., 23, 2437, 1974.
8. Curson G., Green A. R. J. Pharmacol., 39, 653—655, 1970.
9. Hanbrich D. R., Deuser T. S. Analytical Biochemistry, 55, 306—312, 1973.
10. Рунион Р. Справочник по непараметрической статистике. Москва, Финансы и статистика, 1982.

роги, коллапс). Следовательно, введение антабуса создает так называемую химическую изоляцию, а воздержание от приема алкоголя связано со страхом смерти у пациента, но алкогольное влечение у него не исчезает. Слабая эффективность антабуса зависит от его выведения организмом в течение 3 суток. В связи с этим дозы антабуса ниже 0,15 г/сутки не вызывают проявления сенсibilизации. Подшивка же препарата (эспераль) должна обеспечивать поддержание определенной его концентрации в крови больного. Однако в крови при этом обнаруживается, как правило, не очень высокая концентрация антабуса, что позволяет осуществить прием алкоголя без проявления вегетативно-сосудистой реакции. Приведенный в статье материал может помочь наркологам в совершенствовании разработанной ими схемы лечения больных хроническим алкоголизмом (ред.)

11. *Ahtee L., Eriksson K.* *Physiol. Behav.*, **8**, 123—126, 1972.
12. *Veale W. L., Myers R. D.* *Neuropharmacology*, **9**, 317—326, 1970.
13. *Frey H. H., Magnussen M. P., Nielsen C. K.* *Arch. int. Pharmacodyn.*, **183**, 165—172, 1970.
14. Громова Е. А., Семенова Т. П., Векшина Н. Л. *ДАН СССР*, **227**, 3, 766—768, 1976.
15. *Gromova E. A., Semenova T. P., Vorobyov V. V., Nesterova I. V.* Li O. N. XXVIII Intern. Congres of Physiological Sciences, 14, Budapest, 1633, 1980.
16. Волюнкина Г. Ю., Рыбина Л. А., Тадтаев А. Р. *Ж. невропат. и психиатр.*, **82**, 240—244, 1982.
17. *Pohorecky L. A. A.* Review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **5**, 209—229 1981.
18. Анохина Н. П., Козан Б. М., Христолюбова Н. А. *Ж. невропат. и психиатр.*, **79** 751—758, 1979.
19. Борисенко С. А., Кампов-Полевой А. Б. *Ж. высш. нервн. деят.*, **3**, 513—516, 1980.
20. Машковский М. Д. *Лекарственные средства*, М., Медицина, ч. II, с. 134—136, 1977.

Лаборатория нейромедиаторных систем
Института биофизики АН СССР, Пушкино

Поступила 24. IV 1982

УДК 612.453.018+612.822.1

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДА ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ И КАТАБОЛИЗМ ^3H -ДОФАМИНА В ХВОСТАТОМ ЯДРЕ КРЫСЫ

ХАЙДАРЛИУ С. Х., ГОДУХИН О. В., БУДАНЦЕВ А. Ю.

Изучено влияние дексаметазона (Д) на высвобождение ^3H -дофамина и количество его метаболитов при локальной перфузии неостриатума *in vivo*. В головку хвостатого ядра стереотаксически вводили 4 мкл раствора, содержащего 4 мкКл ^3H -дофамина, а затем перфузировали ее посредством «пуш-пул»-каноды. Добавление в перфузионную жидкость Д в концентрации 10^{-4} или 10^{-5} М оказало дозозависимое действие на высвобождение ^3H -дофамина в головке хвостатого ядра. Д в концентрации 10^{-5} М повышал фоновое и угнетал вызванное калием (60 мМ) возрастание высвобождения ^3H -дофамина. Эффект Д был отставленным и длительным, с максимальным проявлением через 5–25 мин после прекращения поступления Д к неостриатуму. Предполагается, что повышение уровня содержания глюкокортикоидов при стрессе может играть существенную роль в регуляции медиаторных систем и состояния неспецифических механизмов адаптации.

В осуществлении приспособительных реакций организма ведущая роль принадлежит ЦНС, которая обеспечивает активацию как специфических, так и неспецифических механизмов адаптации. Важнейшим проявлением неспецифической реакции является активация гипоталамо-гипофизарно-кортикоадреналовой системы, ведущая к значительному возрастанию концентрации глюкокортикоидов в крови и различных органах. Существенная роль в вовлечении в реакцию неспецифических механизмов адаптации принадлежит нейрональным системам, имеющим разную медиаторную специфичность [1], в частности холин- и моноаминергическим [2].

Ряд нарушений моторной функции у человека (паркинсонизм и др.) и патологических реакций на действие стрессовых факторов у человека и животных (злокачественная гипертермия, аффективные состояния и т. д.) тесно связаны с функцией катехоламинергических структур, в частности дофаминергических нейронов [3–5]. Оказалось, что низкое содержание дофамина в неостриатуме и сниженное его выделение с мочой коррелируют с высокой восприимчивостью к стрессу [6, 7].

Чрезмерная активация неспецифических механизмов адаптации может вести к возникновению ряда расстройств в организме, рассматриваемых как вредные последствия стресса (язвы желудка и кишечника, гипертензия, злокачественная гипертермия и др.). Поэтому представляет интерес выяснить, какие авторегуляторные механизмы могут обеспе-

чить регуляцию уровня активации неспецифических механизмов. Одним из таких механизмов может явиться взаимодействие глюкокортикоидов с определенными образованиями мозга, свидетельствующее о том, что в головном мозгу содержатся рецепторы глюкокортикоидов [8, 9]. При нонофоретическом подведении глюкокортикоидов к определенным областям ЦНС или их добавлении в перфузионный раствор при перфузии срезов головного мозга частота спайковых разрядов значительного числа нейронов изменяется [10, 11]. Есть данные и об участии глюкокортикоидов в специфической регуляции активности некоторых ферментов в ЦНС [12].

Поэтому представляет интерес выяснить, какое влияние оказывают глюкокортикоиды на высвобождение и метаболизм дофамина, который может оказывать регулирующее влияние на активность других медиаторных систем неостригума.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на беспородных белых крысах-самцах массой 260—300 г. Для локальной перфузии головного мозга *in vivo* была использована система нагнетательно-отсасывающей канюли [13]. Животным предварительно стереотаксически (по атласу Фифкова и Маршала) вживляли и фиксировали к черепу самотвердеющим пластиком направляющую трубку ($AP = -1,5$; $L = 2,5$) таким образом, чтобы нижний ее конец прилегал к твердой мозговой оболочке. Во время опыта крысы находились под нембуталовым наркозом (40 мг/кг). Через направляющую трубку микрошприцем в неостригум на глубину 4,3 мм вводили 4 мкК_и ³H-дофамина («Amersham», Англия; удельная радиоактивность 48 К_и ммоль) в 4 мкл раствора равномерно в течение 5 мин. После 30-минутного периода, необходимого для захвата клеточными структурами экзогенно введенного ³H-дофамина, через направляющую трубку в головной мозг на ту же глубину погружали нагнетательно-отсасывающую канюлю и начинали перфузию, для которой использовали искусственную СМЖ следующего состава (в мМ): NaCl—126,5; NaHCO₃—27,5; KCl—2,4; KH₂PO₄—0,5; CaCl₂—1,1; MgCl₂—1,1; Na₂SO₄—0,5; глюкоза—5,9. Для ингибирования MAO использовали иналамид (12,5 мкМ). В случае K⁺-деполяризации концентрацию KCl в перфузируемой жидкости увеличивали до 60 мМ и эквимолярно уменьшали концентрацию NaCl. Непосредственно перед перфузией перфузионную жидкость насыщали карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂), доводя ее pH до 7,3. Скорость тока перфузионной жидкости составляла 35 мкл/мин, общее время перфузии—около 3,5 ч.

Через 1 ч 50 мин после начала перфузии производили сбор 4 последовательных 25-минутных фракций перфузата, которые подвергали хроматографическому анализу. Перфузат, собранный в течение 1 ч 50 мин от начала перфузии, не анализировали, так как в начальном периоде перфузии ³H-дофамин в перфузате содержится в относительно высоких

концентрациях, что обусловлено его вымыванием преимущественно из внеклеточной среды.

После получения фракций их доводили до pH 6,8 и наносили по 0,5 мл перфузата на колонки ($0,8 \times 12$ см), содержавшие ионообменные смолы Dowex ($50w \times 4$, 100—200 меш и $50w \times 10$, 20—50 меш). Собирали две последовательные фракции, получаемые в результате промывания колонок с нанесенными перфузатами 10 мл деионизированной водой и следующей за этим элюции 10 мл HCl. Первая фракция содержала метаболиты ^3H -дофамина, к числу которых относят ^3H -3,4-диоксибензилуксусную кислоту, ^3H -гомованилиновую кислоту и ^3H -3-метокситирамин [14], а вторая— ^3H -дофамин. Элюаты собирали в счетные флаконы и высушивали. После добавления 1 мл абсолютного этанола и 10 мл сцинтилляционной жидкости определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике «Intertechnique, SL-30» (Франция). Уровень высвобождения ^3H -дофамина и его метаболитов в первой 25-минутной фракции принимали за 100% и относительно этого уровня оценивали радиоактивность следующих за ней фракций перфузата.

Для выявления влияния глюкокортикоидов на фоновое и вызванное деполяризацией ($60 \text{ мМ } \text{K}^+$) высвобождение дофамина в перфузируемую жидкость добавляли Д в концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} М («Galenika», Югославия).

Достоверность различий, выявляемых при сравнении результатов исследования различных групп животных и анализе изменений радиоактивности во фракциях перфузата, определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Данные о влиянии Д на фоновое высвобождение ^3H -дофамина и количество его метаболитов представлены на рис. 1. При добавлении в перфузируемую жидкость Д в концентрации 10^{-5} во 2-м периоде перфузии наблюдали статистически достоверное повышение высвобождения ^3H -дофамина. В 3-м периоде (рис. 1, а, 3) во время отмывки в течение 25 мин было выявлено еще более выраженное возрастание высвобождения метки. В 4-м периоде добавление Д в более высокой концентрации (10^{-4} М) не вело к дальнейшему возрастанию высвобождения ^3H -дофамина, хотя уровень его высвобождения значительно превышал фоновый. Подобным же образом изменялась и динамика выхода метаболитов ^3H -дофамина (рис. 1, б).

Стимулирующий эффект применения Д в более высокой концентрации (10^{-4} М) во 2-м периоде перфузии оказался значительно менее выраженным (рис. 1, в, 2).

K^+ -деполяризация во 2-м периоде перфузии вызвала возрастание высвобождения ^3H -дофамина на $\sim 140\%$, в то время как количество его метаболитов не отличалось от величины, выявленной в 1-м периоде перфузии (рис. 2, а, б, светлые столбики). Повторная K^+ -деполяризация в 4-м периоде сопровождалась незначительным увеличением вы-

свобождения медиатора. На выход метаболитов ^3H -дофамина K^+ -деполяризация почти не влияла. Если на фоне K^+ -деполяризации во 2-м периоде вводили Д (10^{-5} М), то наблюдали угнетение вызванного каллем высвобождения ^3H -дофамина (рис. 2, а, 2). Следовательно, эффект Д зависел от величины мембранного потенциала дофаминергических нервных окончаний.

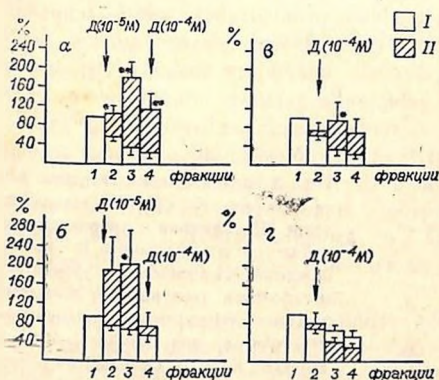


Рис. 1. Влияние дексаметазона (Д) на фоновое высвобождение ^3H -дофамина и уровней его метаболитов. I, 2, 3 и 4 — последовательные 25-минутные фракции; а, б — динамика высвобождения ^3H -дофамина; в, г — динамика уровней метаболитов ^3H -дофамина; I — фоновое высвобождение ^3H -дофамина и уровни его метаболитов у контрольной группы животных (контроль-1); II — изменение высвобождения ^3H -дофамина и уровней его метаболитов при действии Д

* $0.01 \leq p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

Если K^+ -деполяризацию в 4-м периоде проводили после воздействия Д во 2-м, то наблюдали значительное возрастание высвобождения ^3H -дофамина (на $\sim 150\%$). Выход метаболитов ^3H -дофамина во время и после воздействия Д (10^{-5} М) во 2-м периоде перфузии на фоне K^+ -деполяризации практически не изменялся (рис. 2, б).

Возрастание концентрации глюкокортикоидов в крови и их проникновение в головной мозг сопровождают любую стрессовую реакцию. Прогрессирующее развитие стрессовой реакции и появление сопутствующих ей вредных последствий в большей мере зависят, по-видимому, от срабатывания механизмов обратной связи, среди которых важную роль может играть взаимодействие глюкокортикоидов с их рецепторами в ЦНС.

Моделируя локально условия стресса путем подведения глюкокортикоидов, важным моментом было обеспечение их постоянной и воспроизводимой концентрации в перфузируемой области ЦНС. Поскольку кортизол и кортикостерон взаимодействуют как с цитоплазматическими рецепторными белками, так и с кортикоидсвязывающими глобулинами, которые выходят из крови в область перфузии, то нами и был избран синтетический глюкокортикоид Д, связывающийся исключительно с рецепторами в цитоплазме [15]. О правомерности использования Д для имитирования механизма обратной связи при стрессе свидетельствует тот факт, что предварительное его системное введение блокирует механизмы активации гипоталамо-гипофизарной системы и

полностью предотвращает повышение концентрации АКТГ [16], а также пролактина [17] в крови. Использование же «пуш-пул»-канюли с последующим определением содержания катехоламиннов и их метаболитов во фракциях перфузата является, таким образом, перспективным для раскрытия местных механизмов взаимодействия адантивных гормонов с медиаторными системами.

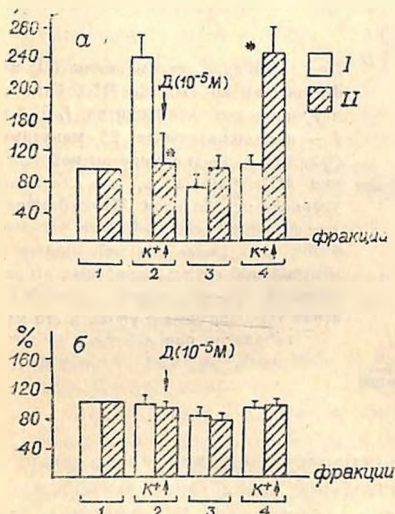


Рис. 2. Влияние дексаметазона (Д) на вызванное K^+ (60 мМ) высвобождение ^3H -дофамина и уровни его метаболитов: а — вызванное K^+ высвобождение ^3H -дофамина и уровни его метаболитов (контроль-2); б — высвобождение ^3H -дофамина и уровни его метаболитов при комбинированном действии K^+ и Д. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Об участии катехоламинергических образований в механизмах обратной связи при стрессе свидетельствует тот факт, что как АКТГ, так и кортикостеронды обладают способностью активировать тирозингидроксилазу в стриатуме и других подкорковых структурах [18]. Эксперименты с применением K^+ или вератридина в высоких концентрациях [19] свидетельствуют о том, что в основе повышения высвобождения дофамина лежит эффект деполяризации. Такой же вывод можно сделать и из данных, полученных при воздействии гидрокортизона и Д на электрическую активность нейронов срезов гиппокампа: через 2,5 с после начала воздействия гормонов возрастала частота спайковой активности на фоне отчетливой деполяризации [10]. При повышении концентрации гормонов развивался деполяризационный блок, длившийся от 15 с до нескольких минут.

Таким образом, можно предположить, что в основе повышения высвобождения ^3H -дофамина из нервных терминалей неостриатума под влиянием локально вводимого Д также лежит эффект деполяризации.

Однако данные, полученные в настоящей работе, не полностью согласуются с этими представлениями. Если при действии K^+ или вератридина эффект наступал немедленно и возрастание высвобождения дофамина было отмечено лишь на протяжении действия деполяри-

зующего агента, то при действии Д эффект был отставленным и продолжительным: максимальная стимуляция высвобождения ^3H -дофамина была зарегистрирована на протяжении 5—25 мин после прекращения действия Д, следовательно, для его проявления необходимо некоторое время.

Механизм действия глюкокортикоидов, по-видимому, сходен с действием других стероидных гормонов [8, 9], о чем свидетельствует тот факт, что эффект Д зависел от дозы: при возрастании концентрации Д с 10^{-5} до 10^{-4} М эффект значительно ослаблялся. Это можно объяснить либо значительным уменьшением числа рецепторов вследствие интернализации гормон-рецепторных комплексов [20], либо развитаем при избытке стероидов субчувствительности рецепторов, как это имеет место при избытке норадреналина при стрессе [21].

Эти результаты свидетельствуют о том, что Д оказывает дозозависимое действие на высвобождение ^3H -дофамина из головки хвостатого ядра головного мозга крыс. Д в концентрации 10^{-5} М повышает фоновое и угнетает вызванное K^+ возрастание высвобождения ^3H -дофамина. Эффект Д отставленный и длительный, с максимальным проявлением через 5—25 мин после прекращения доступа Д в неостриатум.

При анализе полученных данных необходимо иметь в виду, что хвостатое ядро отличается сложностью взаимоотношений между дофамин-, ацетилхолин-, серотонин- и ГАМКергическими нейронами [22, 23]. В частности, в регуляции высвобождения и обновления дофамина в дофаминергических терминалях стриатума могут принимать участие пресинаптические рецепторы мускаринового типа, которые располагаются в этих терминалях [24]. Об участии холинергической системы в регуляции метаболизма и медиаторной функции при стрессе может свидетельствовать изменение активности ацетилхолинэстеразы и Na^+ , K^+ -АТФазы головного мозга при введении глюкокортикоидов [12].

Снижение тонуса дофаминергических структур в хвостатом ядре может лежать в основе возникновения ряда патологических явлений. Ингибиторные дофаминергические структуры в хвостатом ядре противодействуют возбуждению холинергических структур, ответственных за стимуляцию скелетных мышц [25, 26]. Хвостатое ядро и связанные с ним базальные ядра головного мозга могут влиять на тремор и ригидность скелетных мышц путем регулирования функционального баланса между стриатными дофамин- и холинергическими структурами [27]. Эффективность тонуса тормозящих влияний дофаминергических нейронов в неостриатуме может также возрастать за счет наличия синаптических окончаний, не имеющих прямых синаптических контактов с другими структурами и способных модулировать активность нескольких нейронов одновременно [28]. В условиях экспериментального паркинсонического синдрома холинергические нейроны хвостатого ядра могут выступать в роли генератора патологически усиленного возбуждения [29].

Таким образом, при локальном введении в головной мозг глюкокортикоиды могут оказывать длительное, причем отсроченное, влияние на высвобождение дофамина и процессы его деградации. Этот эффект является результатом взаимодействия глюкокортикоидов с пресинаптическими рецепторами и, по-видимому, не обусловлен непосредственно деполяризацией синаптических мембран. Повышение концентрации внеклеточного K^+ оказывает тормозящее влияние на способность Д повышать высвобождение дофамина из дофаминергических терминалей. Повышение количества глюкокортикоидов в организме при стрессовых реакциях может играть существенную роль в регуляции нейротрансмиссии и уровня функциональной активности неспецифических механизмов адаптации.

EFFECTS OF DEXAMETHASONE ON 3H -DOPAMINE RELEASE AND CATABOLISM IN RAT N. CAUDATUS

HAIDARLIU S. H., GODUKHIN O. V., BUDANTSEV A. Ju.

Institute of Zoology and Physiology, Moldavian Academy of Sciences, Kishinev, and Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Poustchino

Effects of dexamethasone (D) on 3H -dopamine release and its metabolites levels have been studied after local perfusion of neostriatum in vivo. 4 μCi of 3H -dopamine in 4 μl of artificial CSF were stereotactically injected in n. caudatus with subsequent perfusion using „push-pull“ cannula. D (10^{-1} and 10^{-5} M) exhibited a dose-dependent effect on 3H -dopamine release from n. caudatus. D (10^{-5} M) enhanced basic and inhibited K^+ -stimulated (60 mM) 3H -dopamine release. D effects were delayed and longlasting with maximal values during 5—25 min after administration. It is supposed that elevated glucocorticoid level during stress reaction may be essential in the regulation of neurotransmitter's metabolism and activity of nonspecific adaptation mechanisms.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хайдарлиу С. Х.—В кн.: Нервные и эндокринные механизмы стресса (под ред. акад. О. Г. Газенко и Ф. И. Фурдуй), Кишинев, Штиинца, с. 221—235, 1980.
2. Буданцев А. Ю. Моноаминергические системы мозга (под ред. Н. А. Смиттен и А. К. Черкашина), М., Наука, 1976.
3. Ehringer H., Hornykiewicz O. Klin. Wochensh., 33, 1236—1239, 1950.
4. Barbeau A., Sourkes T. L. Rev. canad. biol., 20, 197—203, 1961.
5. Schultz W., Ungerstedt U. Exp. Brain Res., 33, 159—171, 1978.
6. Ohye C., Bouchard R., Bouche R. J. Pharmacol. exp. Ther., 175, 700—703, 1970.
7. Altrogge D. M., Topel D. G., Cooper M. A. J. Animal Sci., 51, 1, 74—77, 1980.
8. Greenstein B. D. Tands in Neurosci., 1, 4—6, 1978.
9. Липман М.—В кн.: Взаимодействие гормонов с рецепторами (под ред. Дж. Леви), М., Мир, с. 213—234, 1979.
10. Воробьев В. С., Захаров Н. Д., Скребицкий В. Г., Осиповский С. А. Бюл. экспер. биол. и мед., 91, 132—133, 1981.

11. *Papir-Kritcheli D., Feldman S.* Exptl. Neurol., **73**, 801—811, 1981.
12. *Štastný F., Lodin Z., Panov A. M., Lisý V.*—In: Ontog. Brain, **3**, p. 167—174, Praha, 1980.
13. *Годухин О. В., Жарикова А. Д.* Физиол. ж. СССР, **65**, 10, 141—143, 1979.
14. *McGeer P. L., Eccles J. C., McGeer E. G.* Molecular neurobiology of the mammalian brain. New York, London, Plenum Press, 1978.
15. *Lippman M. E., Wiggert B. O., Chader G. J., Thompson E. B.* J. Biol. Chem., **49**, 5916—5917, 1974.
16. *Berkenbosch F., Vermes I., Binnekade R., Tilders F. J. H.* Life Sci., **29**, 2249—2256, 1981.
17. *Rosslar J., French E., Rivier C., Shibasaki J., Guillemin R., Bloom F. E.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 666—669, 1980.
18. *Nyakas C., Viltsek J., Endröczl E.*—In: Catecholamines and stress: recent advances, Developments in Neuroscience, **8**, p. 375—380, New York, Amsterdam, Oxford, 1980.
19. *Patrick R. L., Barchas J. D.* Fed. Proc., **35**, 406, 1107A, 1976.
20. *Carpenter J.-L.*—In: Hormones and cell regulation (Elsevier/North Holland Biomedical Press), **5**, p. 97—105, 1981.
21. *Nomura S., Watanabe M., Ueki N., Nakozawa T.* Brain Res., **224**, 199—203, 1981.
22. *Отеллин В. А.* ДАН СССР, **205**, 1, 254—256, 1972.
23. *Katya H., Kreutzberg G. W., Namba M.* Brain Res., **187**, 369—382, 1980.
24. *Kapoor V. J.* Physiol. (Gr. Brit.), **322**, 51, 1982.
25. *Sethy V. H., Van Woert M. H.* Nature, **251**, 529—530, 1974.
26. *Stiggins G. R., Hoffer B. J., Bloom F. E.*—In: The Basal Ganglia (ed. by M. D. Yahr), New York, p. 227—248, 1976.
27. *Agid Y., Guyenet P., Glowinski J., Beaujouan J. C., Javoy F.* Brain Res., **86**, 488—492, 1975.
28. *Groves P. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 6923—6929, 1980.
29. *Алиев М. Н., Игонькина С. Н., Крыжановский Г. Н.* Бюл. экпер. биол. и мед., **42**, 657—659, 1981.

Институт зоологии и физиологии
 АН Молдавской ССР, Кишинев
 Институт биологической физики
 АН СССР, Пущино

Поступила 14. IX 1982

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗ, АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДВИГАТЕЛЬНЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА

ДОВЕДОВА Е. Л., ПОПОВА Н. С., КАЧАЛОВА Л. М.

Исследовали кору больших полушарий, хвостатое ядро и вентро-латеральные ядра таламуса головного мозга. Биоэлектрическую активность исследовали у собак. Активность ферментов определяли во фракциях синаптических мембран, легких и тяжелых синапсом, клеточных митохондрий мозга кролика. При воздействии «пептида дельта-сна» (ПДС) (30 мкг/кг массы тела) показана активация МАО А (субстрат—серотонин) в митохондриях таламуса и соматосенсорной области коры мозга. Это подтверждено и опытами *in vitro* (концентрация ПДС 10^{-6} — 10^{-3} М). В опытах *in vivo* активность МАО Б (субстрат—*p*-нитрофенилэтиламин) и ацетилхолинэстеразы у подопытных животных оказалась ингибированной в некоторых субклеточных фракциях, причем в неодинаковой степени в различных образованиях мозга. *In vitro* ПДС на активность указанных ферментных систем воздействия не оказывал. Под влиянием ПДС было четко выражено замедление ритмов ЭЭГ-реакций на фото-стимуляцию.

Можно допустить, что ПДС способен осуществлять модуляторную или регуляторную функцию в определенных синапсах, вызывая, в частности, изменения метаболизма нейромедиаторов — субстратов исследованных ферментов.

Для изучения центральных механизмов двигательных реакций перспективным является выяснение закономерностей метаболизма нейромедиаторов в различных отделах ЦНС, относящихся к моторной системе, под влиянием некоторых нейропептидов, в частности тех, которые обладают гипногенным действием [1—3]. К таким пептидам относится и так называемый «пептид дельта-сна» (ПДС), который, вызывая гипногенный эффект, в то же время подавляет парадоксальную фазу сна и специфически модулирует механизм его медленноволновой фазы с активированием «дельта-сна» [4, 5]. Физиологическое действие ПДС при изучении на различных объектах оказалось неоднозначным и требует дальнейшего выяснения. В отношении биохимических механизмов действия ПДС информация крайне ограничена. Было показано [6], что при субокципитальном введении ПДС происходили изменения лишь концентрации белка и РНК в нейронах и глимальных клетках-сателлитах супраоптического ядра гипоталамуса, но без сдвигов содержания этих микромолекул в расчете на одну клетку, характерных для естественного сна.

В работе была поставлена задача выяснить влияние ПДС, синтезированного в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР [7], на активность ферментов метаболизма некоторых нейромедиаторов на субклеточном уровне с параллельным контролем биоэлектрической активности в тех же структурах головного мозга.

Материалы и методы

Исследованию подлежали корковые и подкорковые образования двигательной системы головного мозга (моторная и соматосенсорная области коры больших полушарий, хвостатое ядро и вентро-латеральные ядра таламуса). Животным (кролики, собаки) ПДС вводили в дозе 30 мкг/кг массы тела. Для выяснения механизма действия ПДС в опытах *in vitro* его использовали в концентрации 10^{-8} — 10^{-5} М. Для биохимических исследований у кроликов при помощи последовательно дифференциального и градиентного центрифугирования из гомогенатов исследуемых образований мозга изолировали митохондриальную фракцию (Мх.) и субфракции сингаптических мембран (В), легких (С) и тяжелых (D) синапсом и митохондрий тел нейронов (Е). В субфракциях (1—5 мг белка/мл пробы) спектрофотометрически определяли содержание белка по Lowry и соавт. [8], активность АХЭ по Hestrin [9], МАО А (субстрат—серотонин) по Popov [10], МАО В (субстрат—п-нитрофенилэтиламин) по Горкину и соавт. [11].

Физиологические опыты были проведены на двух собаках с хронически вживленными электродами в указанные выше образования мозга. За 2 дня до введения ПДС ставили контрольный опыт, в котором проводили регистрацию ЭЭГ от соответствующих структур в течение 1,5—2,0 ч. В опытах с ПДС регистрацию начинали сразу после его введения и продолжали в течение того же времени. Ее осуществляли на 16-канальном чернильнопишущем энцефалографе «Альвар». Использовали би- и монополярный способы отведения. Параллельно производили регистрацию ЭМГ передних конечностей животного. Во время эксперимента собаки находились в станке в затемненной изолированной камере.

Как в контрольном опыте, так и в опыте с введенным ПДС применяли ритмическую фотостимуляцию (световые вспышки с частотой 2 в 1 с, длительность серии—3 с).

Результаты и обсуждение

При регистрации ЭЭГ до введения ПДС животные находились в бодрствующем состоянии; каких-либо существенных изменений амплитудных и частотных характеристик ЭЭГ у них не наблюдалось (рис. 1, а). Под влиянием же ПДС было четко выражено замедление ритмов ЭЭГ во всех структурах мозга (рис. 1, б).

В контрольном опыте периодически также отмечалось одновременное преобладание во всех отведениях медленных ритмов, но эти измене-

ния ЭЭГ имели место в течение сравнительно коротких отрезков времени. Если в контрольном опыте на фоне преобладания ЭЭГ медленных ритмов проводилась фотостимуляция, медленные ритмы исчезали (рис. 2, а). После введения ПДС такая же фотостимуляция не изменяла медленноволнового характера ЭЭГ (рис. 2, б). При длительной регистрации ЭЭГ периодически отмечали спонтанно двигательную активность животного, влияние которой на характер ЭЭГ оказалось сходным как в контрольном опыте, так и после введения ПДС: в обоих случаях совпадение движения с периодами преобладания в ЭЭГ медленных волн приводило к их исчезновению (рис. 3, а, б).

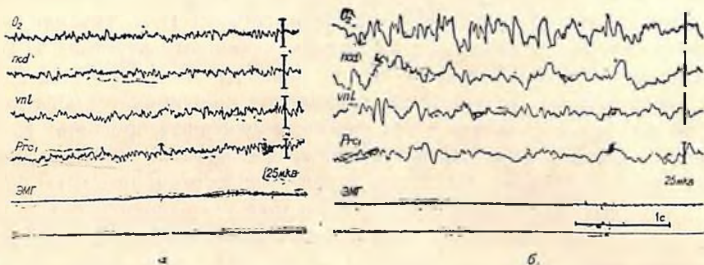


Рис. 1. Различные частотных характеристик ЭЭГ до введения ПДС (а) и через 45 мин после его введения (б). Отведения ЭЭГ: O_2 —зрительная ассоциативная область коры, ncd —хвостатое ядро, vnl —вентро-латеральное ядро таламуса, $Pr c_1$ —моторное поле коры

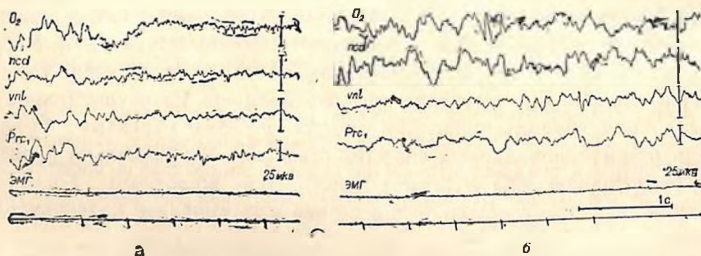


Рис. 2. Различный эффект фотостимуляции, подаваемой в момент преобладания в ЭЭГ медленных ритмов: а—контроль, б—на фоне действия ПДС

Уровень активности МАО обоих типов у контрольных животных был неодинаков в различных образованиях мозга и отдельных субклеточных структурах данного образования (табл. 1—3). АХЭ была представлена исключительно в субфракциях синаптических мембран и синапсом. При действии ПДС *in vitro* в концентрации 10^{-6} и 10^{-5} М (табл. 1—3) не наблюдали изменения активности АХЭ ни в одной из субклеточных фракций коры мозга. Активность МАО Б также практически не изменялась во всех исследованных фракциях, в то время как активность МАО А значительно повышалась в разных фракциях до

170—395% от нормы (считая последнюю за 100%), хотя и неодинаково во всех образованиях мозга в их субклеточных фракциях, причем наибольший эффект наблюдали в митохондриях (до 278—395%).

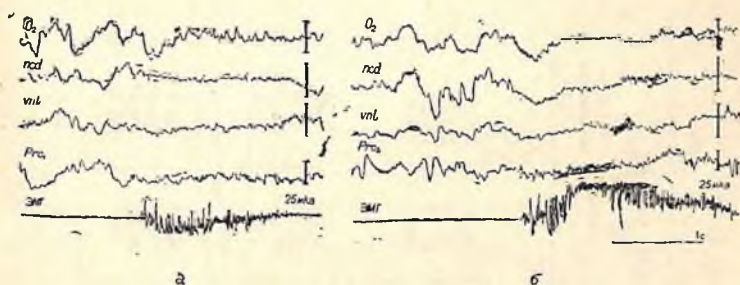


Рис. 3. Влияние спонтанной двигательной активности на частотные характеристики ЭЭГ: а — контроль, б — на фоне действия ПДС

Следует заметить, что этот эффект проявлялся уже при использовании пептида в концентрации 10^{-5} М и лишь немного возрастал при его действии в концентрации 10^{-6} М (табл. 1—3).

Под действием ПДС *in vivo* через 30 мин после субокипитального введения пептида была установлена активация МАО А в митохондриях соматосенсорной области коры больших полушарий, и особенно в митохондриях таламуса, тогда как в случае МАО Б и АХЭ ПДС ингибировал эти ферменты в некоторых субклеточных фракциях, причем в неодинаковой степени в различных структурах мозга (рис. 4).

Таким образом, воздействие ПДС при введении животному на активность МАО А и Б и АХЭ оказалось специфичным как в случае отдельных ферментных систем в одном образовании, так и в различных структурах мозга и их субклеточных фракциях. Так, в частности, активность АХЭ под влиянием ПДС при неизменности в субфракциях хвостатого ядра достоверно уменьшалась на 20—25% в легких синапсомах и мембранах соматосенсорной области коры, особенно во фракции мембран таламуса (на 39%). В случае МАО Б ПДС свое тормозящее действие наиболее четко проявлял в субфракции митохондрий (Е).

При введении ПДС активность МАО типа А нарастала по сравнению с контролем, что было наиболее выражено в митохондриях таламуса и статистически достоверно проявлялась в клеточных митохондриях этого образования (16%). В субфракции клеточных митохондрий кожно-двигательной области коры мозга активация МАО А под влиянием ПДС составляла 141%.

Возвращаясь к данным, полученным в физиологических экспериментах, следует подчеркнуть, что при введении ПДС проявлялись изменения характера ЭЭГ, аналогичные ЭЭГ-показателям развития именно медленноволновой фазы сна. Они имели достаточно постоянный времен-

Таблица 1

Влияние пептида дельта-сна (ПДС) на активность МАО А в субклеточных фракциях
in vitro различных образований мозга кролика

Контроль		ПДС 10^{-6} М			ПДС 10^{-5} М			
активность ($E_{250}/г$ ткани/ч)	% распре- деления	активность ($E_{250}/г$ ткани/ч)	% распре- деления	изменение активности (%)	активность ($E_{250}/г$ ткани/ч)	% распре- деления	изменение активности (%)	
Двигательная кора								
С.	20,63 $\pm$ 3,50	43,74	42,12 $\pm$ 7,30	42,42	205,5*	44,88 $\pm$ 6,70	39,20	217,0*
Д.	16,61 $\pm$ 1,00	35,00	34,56 $\pm$ 4,90	27,31	208,0*	43,83 $\pm$ 4,20	37,37	265,0*
Е.	10,03 $\pm$ 0,90	21,6	27,65 $\pm$ 2,90	29,24	269,0*	28,81 $\pm$ 1,70	24,43	287,0*
Σ	47,27	100	103,67	100	262,0	117,52	100	219,0
Хвостатое ядро								
С.	28,70 $\pm$ 2,50	45,08	135,92 $\pm$ 4,80	35,67	125,0	17,80 $\pm$ 7,00	39,00	166,0*
Д.	22,86 $\pm$ 3,10	35,90	23,12 $\pm$ 1,80	21,53	100,0	46,72 $\pm$ 8,50	22,00	201,0*
Е.	12,10 $\pm$ 1,10	19,02	13,57 $\pm$ 2,90	42,80	360,0*	47,68 $\pm$ 7,40	39,00	395,0*
Σ	63,66	100	102,61	100	159,0	122,20	100	191,0
Таламус								
С.	20,28 $\pm$ 2,90	32,51	34,50 $\pm$ 2,90	42,46	167,0	14,36 $\pm$ 4,20	30,50	218,0*
Д.	28,02 $\pm$ 3,50	36,56	47,70 $\pm$ 3,50	27,63	207,0*	49,45 $\pm$ 6,40	33,50	214,0*
Е.	19,26 $\pm$ 1,70	30,93	50,3 $\pm$ 6,50	29,91	262,0*	53,64 $\pm$ 4,70	36,00	278,0*
Σ	62,56	100	132,55	100	275,0	117,35	100	243,0

* $p < 0,005$

Таблица 2

Влияние пептида дельта-сна (ПДС) *in vitro* на активность МАО Б в субклеточных фракциях различных образований мозга кроликов

Контроль			ПДС 10^{-6} М			ПДС 10^{-5} М		
активность (E_{450} /г ткани, ч)	% распре- деления		активность (E_{450} /г ткань, ч)	% распре- деления	изменение активности (%)	активность (E_{450} /г ткань, ч)	% распре- деления	изменение активности (%)
Двигательная кора								
Мх.	$11,53 \pm 1,55$	98,3	$12,60 \pm 1,20$	101	109,3	—	—	—
С.	$4,25 \pm 0,18$	37,30	$5,20 \pm 0,50$	41,54	121,0	$5,75 \pm 0,51$	44,40	134,0
Д.	$5,38 \pm 0,35$	47,40	$5,60 \pm 0,44$	42,64	104,0	$4,70 \pm 0,45$	36,30	87,0
Е.	$1,70 \pm 0,30$	15,30	$2,06 \pm 0,30$	15,82	119,0	$2,50 \pm 0,28$	19,30	147,0
Σ	11,34	100	12,86	100	113,0	12,95	100	114,0
Хвостатое ядро								
С.	$5,25 \pm 0,52$	54,06	$6,35 \pm 0,52$	56,14	120,0	$3,85 \pm 0,31$	41,76	73,00
Д.	$3,40 \pm 0,39$	35,02	$3,90 \pm 0,39$	34,48	114,0	$2,35 \pm 0,12$	27,32	69,00
Е.	$1,06 \pm 0,10$	10,92	$1,06 \pm 0,10$	9,38	100,0	$2,40 \pm 0,15$	27,92	126,0
Σ	9,71	100	11,31	100	116,0	8,60	100	88,0
Таламус								
С.	$4,98 \pm 0,33$	53,33	$4,78 \pm 0,50$	47,60	95,0	$6,16 \pm 0,50$	53,83	123,0
Д.	$3,20 \pm 0,35$	34,47	$4,00 \pm 0,45$	39,82	123,9	$3,80 \pm 0,26$	33,24	118,0
Е.	$1,14 \pm 0,15$	12,20	$1,26 \pm 0,36$	12,58	110,0	$1,48 \pm 0,11$	12,93	129,0
Σ	9,32	100	10,02	100	107,0	11,44	100	122,0

Таблица 3

Влияние пептида дельта-сна (ПДС) *in vitro* на активность АХЭ в субклеточных фракциях различных образований мозга кролика

Контроль		ПДС 10^{-6} М			ПДС 10^{-5} М			
мкМ АХ/г ткани/ч	% распре- деления	мкМ АХ/г ткани/ч	% распре- деления	изменение активности (%)	мкМ АХ/г ткани/ч	% рас- преде- ния	изменение активности (%)	
Двигательная кора								
Мх.	222,0 $\pm$ 34,0	91,00	216,0 $\pm$ 16,6	91,00	97,50	225,00 $\pm$ 24,40	84,33	98,33
В.	94,2 $\pm$ 8,8	46,67	91,00 $\pm$ 7,80	45,73	96,86	89,50 $\pm$ 9,70	47,16	95,56
С.	80,0 $\pm$ 5,4	39,60	76,5 $\pm$ 7,8	38,69	93,76	72,50 $\pm$ 10,50	38,22	89,73
Д.	27,75 $\pm$ 4,30	13,73	30,75 $\pm$ 2,00	15,58	121,0	27,75 $\pm$ 4,00	14,62	106,95
Σ	202,0	100	198,25	100	97,0	189,75	100	93,2
Хвостатое ядро								
Мх.	454,0 $\pm$ 53,0	100	373,0 $\pm$ 20,2	105,0	100,5	375,0 $\pm$ 33,3	109,0	102,5
В.	203,0 $\pm$ 4,5	44,60	152,5 $\pm$ 9,6	38,65	99,00	152,4 $\pm$ 12,8	37,04	99,8
С.	146,5 $\pm$ 2,8	32,17	124,5 $\pm$ 9,6	32,48	100,0	151,10 $\pm$ 0,10	36,70	94,3
Д.	105,8 $\pm$ 2,8	23,23	114,0 $\pm$ 12,5	28,87	104,0	108,50 $\pm$ 8,00	26,26	97,7
Σ	455,3	100	394,0	100	78,0	412,0	100	82,0
Таламус								
Мх.	280,0 $\pm$ 12,9	106,0	208,5 $\pm$ 38,2	138,0	110,0	199,5 $\pm$ 26,5	135,0	106,5
В.	83,0 $\pm$ 4,5	27,94	88,0 $\pm$ 4,6	30,30	94,2	85,66 $\pm$ 4,60	31,62	103,0
С.	140,0 $\pm$ 2,8	47,09	125,25 $\pm$ 11,00	43,25	95,4	129,0 $\pm$ 16,2	47,62	94,75
Д.	74,3 $\pm$ 3,1	24,97	76,50 $\pm$ 8,70	26,44	119,0	56,25 $\pm$ 3,90	20,76	81,05
Σ	297,3	100	289,75	100	97,1	270,91	100	91,0

ной цикл развития: через 40—50 мин после введения ПДС по всем отведениям в той или иной степени возникало преобладание медленных ритмов 3—4, 6—7 Гц, при увеличении их амплитуды (рис. 1, б) восстанавливался фоновый характер ЭЭГ через 65—70 мин после введения ПДС.

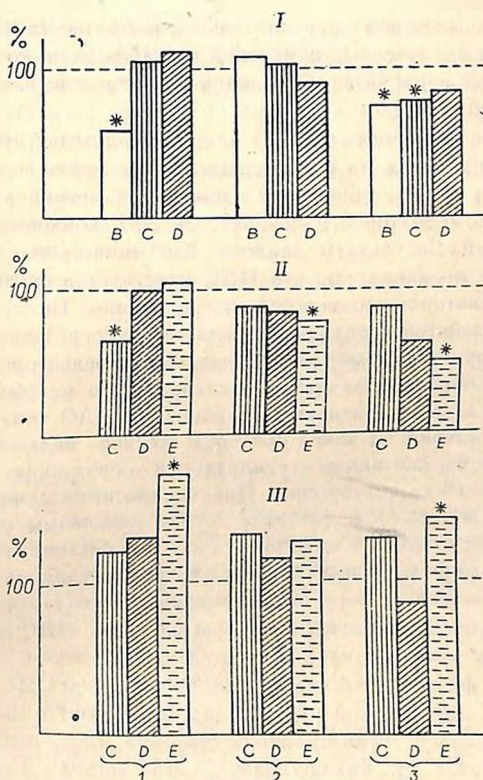


Рис. 4. Влияние ПДС на ферментативную активность в субклеточных фракциях различных образований мозга *in vivo*: I—ацетилхолинэстераза; II—MAO типа B; III—MAO типа A; субфракции из вентро-латеральных ядер таламуса (I), из хвостатого ядра (2), из соматосенсорной области коры (3). Субфракции мембран (B), легких синапсом (C), тяжелых синапсом (D), свободных митохондрий (E)

Как было уже сказано, обнаружилось различное влияние фотостимуляции на медленные ритмы в контрольном опыте и на фоне действия ПДС: в первом случае при фотостимуляции медленные ритмы исчезали (рис. 2, а), во втором, напротив, фотостимуляция не приводила к изменениям характера ЭЭГ, то есть сохранялось преобладание в частотной характеристике ЭЭГ медленных ритмов (рис. 2, б).

Однако, судя по поведенческим показателям, этим изменениям характера ЭЭГ не соответствовало развитие состояния нормального сна у животного; на протяжении всего периода регистрации ЭЭГ уровень бодрствования животного не менялся: сохранялась ориентировочная реакция на обстановку, тонус мышц конечностей оставался без существенных изменений.

В контрольных опытах при длительной регистрации ЭЭГ без введения ПДС таких выраженных изменений не наблюдали, хотя и отмечали кратковременные периоды преобладания по всем отведениям медленно-волновой активности.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ПДС оказывает влияние на функциональное состояние головного мозга, что проявлялось в наших опытах в вероятных изменениях метаболизма некоторых нейромедиаторов и показателей ЭЭГ корковых и подкорковых образований. Результаты данного биохимического исследования дают основание предполагать, что ПДС участвует в превращениях исследуемых медиаторов, возможно, опосредованно. Не исключено, что регулирующее действие пептида проявляется непосредственно на липопротендную структуру мембраны определенных рецепторов, что может отражаться на обратном захвате медиатора и его метаболизме. Полученные данные *in vitro* в отношении активации МАО типа А под влиянием ПДС указывают на такое непосредственное включение данного пептида в реакции, связанные с утилизацией серотонина и поддержанием его нормального содержания. Полученные нами данные подтверждают гипотезу Jouvet [12], который, изучая механизмы сна, предположил, что сон регулируется антагонистическими системами, влияющими на различные его фазы, а именно: серотонинергическая система индуцирует медленноволновую фазу сна, норадренергическая и холинергическая системы влияют на парадоксальную фазу сна; ПДС не может вмешиваться в активность этих нейромедиаторных систем.

Некоторые физиологические данные по действию ПДС и его аналогов на нейроны виноградной улитки свидетельствуют о высокой структурной специфичности нейротропного действия этого пептида. Можно сделать заключение, что это объясняется его участием в регуляции активности ферментов метаболизма медиаторов [13, 14]. Наблюдавшееся в наших опытах небольшое снижение активности АХЭ при действии ПДС, отражающее нарушение катаболизма ацетилхолина, не выявлялось по показателям ЭЭГ и реакции животных на проприоцептивные раздражения.

Авторы выражают искреннюю благодарность акад. АМН СССР И. П. Ашмарину за постоянную консультативную помощь в осуществлении данной работы.

EFFECT OF DSIP ON THE MONOAMINOXYDASE AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY AND ON THE BIOELECTRIC ACTIVITY OF BRAIN MOTOR STRUCTURES

DOWEDOVA E. L., POPOVA N. S., KACHALOVA L. M.

Institute of Brain, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The administration of Delta-Sleep Inducing Peptide—DSIP (30 mcg/kg bw) leads to activation of MAO type A (with serotonin as a substrate) in the mitochondrial fraction of brain cortical and subcortical motor structures. These data were justified in experiments in vitro with 10^{-6} – 10^{-5} M DSIP. On the contrary, the activities of MAO type B (with p-nitrophenylamine as a substrate) and acetylcholine esterase decrease slightly differing among various brain subcellular fractions (in vivo). DSIP has no effect on the activity of these enzymes in vitro.

The administration of DSIP markedly slows down electroencephalographic (EEG) rhythms in all structures tested and leads to disappearance of EEG response to light stimulus.

Data obtained point to the possible modulatory or regulatory effect of DSIP on synapses inducing a number of processes involved in serotonin metabolism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monnier M., Dubler L., Mater P., Gächter R., Tobler H., Schoenenberger G. *Experientia*, **33**, 548–552, 1976.
2. Schoenenberger G., Monnier M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1282–1286, 1977.
3. Monnier M., Dubler L., Gächter R., Schoenenberger G. *Neurosci. Letters*, **6**, 9, 1977.
4. Богословский М. М., Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Альбертин С. В. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **15**, 430–432, 1979.
5. Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Воронов И. Б., Богословский М. М., Демин Н. Н., Рубинская Н. Л., Альбертин С. В. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **15**, 583–589, 1979.
6. Демин Н. Н., Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Рубинская Н. Л. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **16**, 257–260, 1980.
7. Michaleva I. I., Sargsyan A. V., Sumskaya L. V., Balashova T. A., Deshko T. N., Efremov E. S., Ivanov V. T.—In: *Peptides, Structure and Biological Function*. Press Chemical Company, Rockford, Illinois, p. 901–904, 1979.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. *Biol. Chem.*, **193**, 256–275, 1951.
9. Hestrin S. J. *Biol. Chem.*, **180**, 249–261, 1949.
10. Popov V., Rosler V., Thiemann C., Motthen H. *Acta biol. med. Germ.*, **26**, 239–245, 1971.
11. Горкин В. Э., Вережкина И. В., Гриднева Л. И.—В кн.: *Современные методы в биохимии*, М., Медицина, **2**, с. 155–162, 1967.
12. Jouvet M.—In: *Brain and Sleep*. Erven Bohn. Amst., p. 22–38, 1974.
13. Сарсисян А. С., Сумская Л. В., Александрова И. Ю., Безруков М. В., Михалева И. И., Иванов В. Т., Балабан П. М. *Биоорганическая химия*, **8**, 1125–1149, 1981.
14. Zimmerman E. G. *Fed. Proc.*, **38**, 2286–2287, 1979.

Институт мозга АМН СССР, Москва

Поступила 20. XII 1981

УДК 612.821.7

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАКЦИИ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ СЕРОТОНИНА И БЕНЗИЛАМИНА В МИТОХОНДРИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ЗИМОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ

ВОИТЕНКО Н. Н., ПОПОВА Н. К.

Изучали дезаминирование серотонина и бензиламина в неочищенной фракции митохондрий ствола головного мозга у бодрствовавших, засыпавших и находившихся в зимней спячке сусликов, в также влияние этих физиологических состояний на зависимость скорости дезаминирования от концентрации субстрата. Обнаружено дезаминирование серотонина и бензиламина МАО митохондрий в стволе головного мозга у бодрствующих, засыпающих и спящих сусликов. Интенсивность дезаминирования серотонина и кинетические характеристики этой реакции претерпевали изменения в период засыпания, когда дезаминирование бензиламина еще существенно не отличалось от периода бодрствования. Во время зимней спячки подавлялись оба процесса, однако дезаминирование серотонина и $V_{\text{макс}}$ превращения МАО-серотонин комплекса снижались более резко, чем дезаминирование бензиламина и $V_{\text{макс}}$. МАО-бензиламин комплекса. При этом установлено увеличение сродства МАО как к серотонину, так и к бензиламину. Предполагается, что в экстремальных условиях зимней спячки изменяется механизм действия МАО.

Известно, что зимоспящие животные в условиях низких температур и пониженного содержания кислорода в организме сохраняют достаточно высокий уровень дезаминирования серотонина [1, 2]. На основании этого возникло предположение о том, что у зимоспящих животных по сравнению с незимоспящими МАО (оксидоредуктаза, дезаминирующая, флавиносодержащая, КФ 1. 4. 3. 4) обладает отличающимися свойствами, обеспечивающими дезаминирование жизненно важных биогенных аминов в экстремальных условиях зимней спячки.

МАО животного организма представлена двумя формами фермента: МАО А и МАО Б, отличающихся субстратной специфичностью и различной чувствительностью к ингибиторам [3] и выполняющих, как предполагают, разные физиологические функции [4]. Активность МАО и кинетические характеристики реакции дезаминирования серотонина и бензиламина, как известно, зависят от температурных условий проведения эксперимента [5], фосфолипидного окружения, целостности мембран, в которые вмонтирована МАО [6].

В литературе нет данных ни о формах МАО у зимоспящих животных, ни об изменениях активности различных форм МАО в условиях спячки. Цель настоящей работы заключалась в изучении активности

МАО и кинетических характеристик реакции дезаминирования серотонина и бензиламина в митохондриях ствола головного мозга зимоспящих сусликов в состоянии бодрствования, засыпания, спячки.

Материалы и методы

Работа выполнена на самцах краснощеких сусликов (*Citellus erythrogenus*), отловленных летом в Новосибирской области. Осенью животных помещали в подвал, где температура поддерживалась в пределах 2—6°. В опытах использовали бодрствующих сусликов с ректальной температурой 37°, сусликов в переходный период от бодрствования к спячке, когда животные уже не реагировали на взятие их в руки, с ректальной температурой 11—15°, и спящих сусликов, находящихся в течение 4 месяцев в состоянии глубокого зимнего оцепенения, с ректальной температурой 2—6°.

Животных декапировали и отделяли ствол головного мозга. Фракцию митохондрий, полученную центрифугированием 10%-ного гомогената ствола головного мозга в 0,32 М сахарозе [7], хранили при —20°. Для определения дезаминирования серотонина митохондрии суспендировали в фосфатном буфере, pH 8,5 [8], для определения дезаминирования бензиламина использовали боратный буфер, pH 9,2 [9]. В качестве специфических субстратов использовали серотонин-креатининсульфат (МАО А) и бензиламин-гидрохлорид (МАО В) [3, 10, 11]. Величины удельной активности МАО рассчитаны по начальным скоростям реакции, так как при используемых серотонине и бензилаmine в течение 30 мин инкубации накопление аммиака во времени протекало линейно. Графики строили, используя метод двойных обратных величин Лайнуивера-Бэрка, K_m и V_{max} определяли по Корнлиш-Боудену [12]. Инкубацию митохондрий (30 мин) проводили при температуре, соответствующей температуре тела животных, то есть 37° у бодрствующих, 11° у засыпающих, 7° у спящих. Активность МАО выражали в нмоль аммиака/мг белка. Аммиак определяли методом изотермической отгонки [13] с последующим применением реактива Несслера, а белок по Lowry и соавт. [14, 15].

Результаты и обсуждение

Как видно из приведенных в таблице данных, у краснощеких сусликов при всех изучавшихся физиологических состояниях под влиянием МАО в митохондриальной фракции ствола головного мозга дезаминировались как серотонин, так и бензиламин. Изучение реакции дезаминирования серотонина и бензиламина показало, что у бодрствующих сусликов при температуре инкубации, соответствующей температуре тела (37°), дезаминирование серотонина протекает значительно интенсивнее, чем дезаминирование бензиламина, максимальная скорость превращения МАО-серотонин комплекса выше скорости превращения МАО-бензиламин комплекса, и сродство МАО к серотонину несколько более выражено, чем сродство МАО к бензиламину.

У находившихся в глубокой зимней спячке сусликов при инкубации препарата митохондрий при 7° дезаминирование серотонина и бензиламина по сравнению с бодрствующими животными было снижено. Уровень дезаминирования серотонина снизился более чем в 10 раз, а бензиламина — только в 3 раза. В период спячки уменьшалась скорость превращения МАО-серотонин комплекса, при этом скорость превращения МАО-бензиламин комплекса также понижалась и резко возросло сродство МАО к бензиламину (табл.).

При впадении в зимнюю спячку, когда температура тела снижалась до 11—15° и животные становились неподвижными, дезаминирование серотонина и бензиламина протекало неодинаково. Дезаминирование серотонина уже в первый день оцепенения снижалось до тех значений, которые наблюдались у спящих животных. Дезаминирование бензиламина существенно не отличалось от такового у бодрствующих сусликов. При этом скорость превращения МАО-серотонин комплекса понижалась почти до той, которая наблюдалась у спящих сусликов, при почти неизменной величине сродства фермента к серотонину. Скорость превращения МАО-бензиламин комплекса оставалась еще на уровне бодрствующих животных, хотя сродство МАО к бензиламину заметно снижалось.

Построенные по методу двойных обратных величин Лайнувер-Бэрка графики зависимости скорости дезаминирования серотонина и бензиламина МАО митохондрий замороженной-оттаявшей фракции ствола головного мозга бодрствующих, засыпающих, спящих сусликов от концентрации этих субстратов подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен, как это было отмечено на замороженных-оттаявших митохондриях крыс [5]. Прямые, характеризующие зависимость скорости дезаминирования от концентрации субстрата в обратных величинах, построенные для бодрствующих, засыпающих, спящих сусликов как в случае дезаминирования серотонина, так и в случае дезаминирования бензиламина, не пересекаются и не накладываются друг на друга (рис. 1, 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что у краснощеких сусликов, в каком бы физиологическом состоянии они не находились, в митохондриальной фракции ствола головного мозга происходит дезаминирование серотонина и бензиламина. Можно полагать, что у сусликов, как и у крыс, в дезаминировании серотонина участвует МАО типа А, а бензиламина—МАО типа В, поскольку при примененных нами низких концентрациях этих субстратов серотонин специфически дезаминируется МАО А [16], а бензиламин—МАО В [17]. Так как активность МАО А у бодрствующих сусликов выше активности МАО В, вполне вероятно, что у бодрствующих сусликов функциональная активность МАО А, связанная с митохондриями синапсом [8, 10], превалирует над функциональной активностью МАО В, связанной с митохондриями перикарионов [18]. У бодрствующих сусликов дезаминирование серотонина превышает дезаминирование бензилами-

Таблица
Влияние зимней спячки на активность МАО (нмоль аммиака/мг белка/мин), K_M и $V_{\text{макс}}$ реакции дезаминирования серотонина и бензиламина во фракции митохондрий ствола головного мозга сусликов

Субстраты	Бодрствование, температура инкубации 37°		Засыпание, температура инкубации 11°		Спячка, температура инкубации 7°	
	серотонин	бензиламин	серотонин	бензиламин	серотонин	бензиламин
Активность фермента	$5,21 \pm 0,41$ (4)	$1,72 \pm 0,19$ (4)	$0,69 \pm 0,07^*$ (4)	$1,41 \pm 0,18$ (4)	$0,49 \pm 0,02^*$ (4)	$0,57 \pm 0,15^*$ (4)
K_M	$161,3 \pm 12,2$	$221,7 \pm 17,3$	$141,0 \pm 6,7$	$543,3 \pm 70,3^*$	$54,02 \pm 15,50^*$	$8,88 \pm 5,50^*$
$V_{\text{макс}}$	$5,67 \pm 0,09$	$2,26 \pm 0,08$	$0,77 \pm 0,01^*$	$2,96 \pm 0,24$	$0,58 \pm 0,02^*$	$0,68 \pm 0,03$

Примечание. Серотонин и бензиламин применяли как субстраты МАО в концентрации 1 мкмоль/мл. K_M выражено в нмоль/мл, $V_{\text{макс}}$ в нмоль аммиака/мг белка/мин. В скобках указано количество животных. В каждом опыте поставлены две повторные пробы. * $p < 0,01$ по сравнению с бодрствующими животными

на, по-видимому, за счет более высокой максимальной скорости превращения МАО А-серотонин комплекса. Более высокое сродство МАО к серотонину способствует увеличению максимальной скорости превращения МАО-серотонин комплекса при более низких концентрациях субстрата по сравнению с бензиламином.

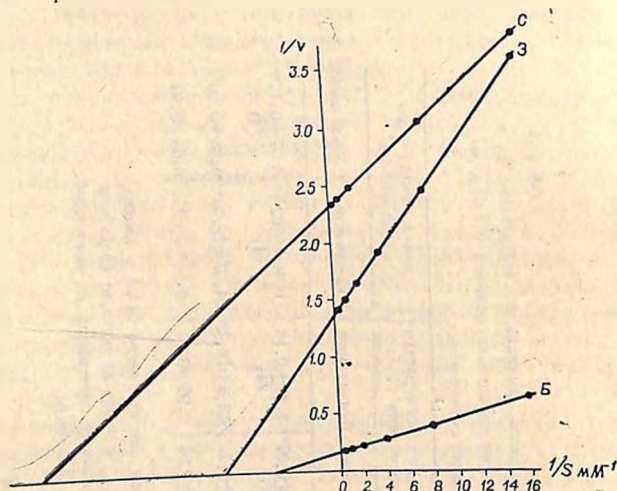


Рис. 1. Влияние различных физиологических состояний зимоспящих сусликов на зависимость скорости дезаминирования от концентрации серотонина в обратных величинах по Лайнуиверу-Бэрку во фракции митохондрий ствола головного мозга. Б—бодрствующие, температура тела 37°; З—засыпающие, температура тела 11—15°; С—спящие, температура тела 2—6°

У спящих сусликов обнаружено более резкое понижение дезаминирования серотонина по сравнению с бензиламином (табл.). Это свидетельствует об относительно высокой активности МАО Б, сохраняющейся во время зимней спячки, хотя функциональная значимость ее не вполне ясна. Повышение сродства МАО к обоим субстратам у спящих сусликов, вероятно, является существенным моментом в механизмах спячки, поскольку максимальная скорость дезаминирования аминов у них может быть обеспечена при очень низких концентрациях субстрата. В проведенном нами ранее исследовании [2] на гомогенатах ствола головного мозга сусликов было показано, что активность МАО по отношению к серотонину у спящих сусликов снижается гораздо меньше, чем в неразделенной митохондриальной фракции. Можно предположить, что во время спячки дезаминирование серотонина разными фракциями изменяется в неодинаковой степени и в неразделенную митохондриальную фракцию переходит значительно меньше МАО А, а большая часть ее остается в отброшенных более тяжелых или более легких по сравнению с ней фракциях [7, 10, 16].

Приведенные графики зависимости скорости дезаминирования серотонина и бензиламина от концентрации этих субстратов, построенные по методу двойных обратных величин Лайнуивера-Берка, показывают, что как в случае дезаминирования серотонина, так и в случае бензиламина график, полученный для бодрствующих сусликов (1, Б; 2, Б), не пересекается с графиками, полученными для спящих (1, С; 2, С) или для засыпающих (1, З; 2, З), как следовало ожидать при наличии ингибиторов, снижающих активность фермента. Прямые, характеризующие зависимость скорости дезаминирования от концентрации субстратов в обратных величинах, не накладываются друг на друга, что можно было бы ожидать от последствий только прямого воздействия низких температур, вызывающих снижение количества активных молекул и числа активных соударений [19]. Наши предыдущие исследования [2], показавшие более высокие значения Q_{10} в пределах температур (22—7°) у спящих сусликов по сравнению с бодрствующими, дают еще одно основание для заключения об изменении каталитических свойств МАО при спячке.

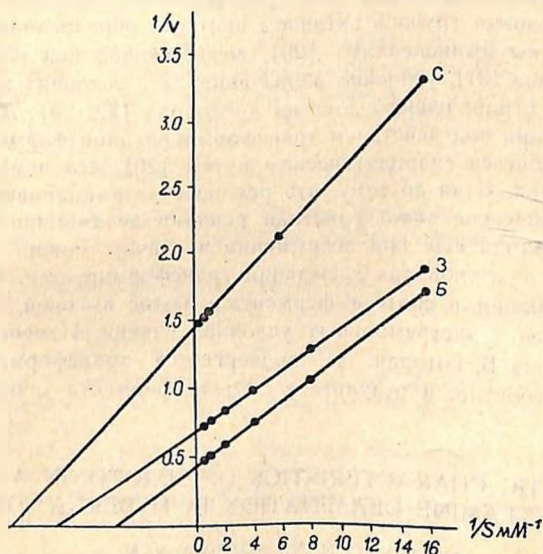


Рис. 2. Влияние различных физиологических состояний зимоспящих сусликов на зависимость скорости дезаминирования от концентрации бензиламина в обратных величинах по Лайнуиверу-Берку во фракции митохондрией ствола головного мозга. Обозначения те же, что и на рис. 1

Следует полагать, что активность МАО у засыпающих и спящих сусликов снижается не под влиянием ингибиторов или прямого воздействия низких температур, а в силу изменения механизма действия МАО под влиянием условий спячки.

Необходимо заметить, что экстремальные условия спячки неодинаково влияют на активность А и Б форм МАО. В особенности эти различия проявляются при погружении в спячку, когда температура тела еще не достигла той, которая характерна для спящих животных. Дезаминирование серотонина и максимальная скорость превращения МАО-серотонин комплекса снижается уже в переходный период до тех значений, которые наблюдались у спящих животных, длительное время находившихся в глубокой зимней спячке. Дезаминирование бензиламина и максимальная скорость превращения МАО-бензиламин комплекса при погружении в спячку остаются еще на уровне бодрствующих сусликов и снижаются, по-видимому, позднее, так как у спящих животных дезаминирование бензиламина и максимальная скорость превращения МАО-бензиламин комплекса снижены. Эти факты дают основание предположить, что роль МАО А и МАО Б в механизмах спячки неодинакова, как неодинаковы и изменения в механизме действия МАО А и МАО Б под влиянием условий спячки.

Известно, что каталитические свойства МАО А могут подвергаться качественным изменениям или трансформации вследствие мягкого окисления тиоловых групп в активном центре и образования сульфено-вокислой формы аминноксидазы [20], возникающей под влиянием перекисей липидов [21], усиленно образующихся в условиях пониженных температур и ограниченного доступа кислорода [22, 23]. Дезаминирование серотонина под действием трансформированной формы МАО может осуществляться гидролитическим путем [20], что немаловажно в условиях спячки. Судя по тому, что реальное дезаминирование серотонина и кинетические характеристики реакции дезаминирования серотонина изменяются еще при погружении в спячку, можно допустить, что МАО А у сусликов при засыпании трансформируется, хотя не исключена возможность синтеза фермента с более высокой субстратной специфичностью в экстремальных условиях спячки. Изменение активности МАО типа Б, которая не подвергается трансформации [24], происходит, вероятно, в результате синтеза фермента с измененными свойствами.

KINETIC CHARACTERISTICS OF SEROTONIN AND BENZYLAMINE DEAMINATION IN HYBERNATION

VOITENKO N. N., POPOVA N. K.

Laboratory of Behavioural Phenogenetics, Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of USSR Academy of Sciences, Novosibirsk

The activity of monoamine oxydase has been studied in brain stem mitochondrial freeze-leavage undivided fraction of active, falling asleep and hibernating ground squirrels. The effect of these physiological states on deamination of serotonin and benzylamine has been also investigated. During hibernation, deamination of serotonin and conversion of МАО-serotonin complex decreased more drastically than benzylamine dea-

mination and MAO-benzylamine complex conversion. An increase in MAO affinity both to serotonin and benzylamine has been found. These changes in MAO-serotonin activity and in kinetic characteristics of serotonin deamination started at the period of falling asleep, when benzylamine deamination did not change significantly. The supposition is made that in natural hibernation the mode of MAO action is altered.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Novotna R., Janski L., Drahota L. Gen. Pharmacol., 6, 23—26, 1975.
2. Войтенко Н. Н. Физиол. ж. СССР, 65, 3, 359—364, 1977.
3. Johnston J. P. Biochem. Pharmacol., 17, 1285—1297, 1968.
4. Гурьянова А. Д., Буданцев А. Ю. Успехи совр. биол., 79, 2, 184—205, 1975.
5. Васильевых Л. Г., Горкин В. З., Каган З. С. Биохимия, 44, 9, 1542—1550, 1979.
6. Naot M., Yagi K. Archiv Biochem. Biophys., 202, 1, 18—26, 1980.
7. Gray E. G., Whittaker V. P. J. of Anatomy, 96, 1, 79—87, 1962.
8. Tabakoff B., Meyerson L., Alluisatos S. G. A. Brain Res., 66, 491—503, 1974.
9. Minamiura N., Yasunoby K. T. Biochem. Pharmacol., 27, 2737—2743, 1978.
10. Yang H.-Y. T., Neff N. H. J. of Pharmac. and Exper. Ther., 187, 2, 365—371, 1973.
11. Hauslay M. D., Tipton K. F. Biochem. J., 193, 645—652, 1974.
12. Корниш-Бойден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, с. 249—251, 1979.
13. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, с. 538—545, 1962.
14. Кочетов А. Г. Практическое руководство по энзимологии, М., Высшая школа, с. 314—315, 1971.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 256—261, 1951.
16. Suzuel O. Biochem. Pharmacol., 3, 11, 1353—1358, 1981.
17. Lewinsonhn R., Glover V., Sandler M. Biochem. Pharmacol., 29, 9, 1221—1230, 1980.
18. Sekimoto S. Nipon Univ. J. Med., 16, 303—313, 1974.
19. Хаскин В. В.—В кн.: Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций, Новосибирск, Наука, с. 165—170, 1971.
20. Горкин В. З. Мол. биол., 10, 4, 717—736, 1976.
21. Рапава Э. А., Кляшторин Л. Б., Горкин В. З. Биохимия, 31, 6, 1216—1224, 1966.
22. Кебедмагомедова Х. А., Мельников Ю. Л., Владимиров Ю. А. Биофизика, 15, 1022—1028, 1970.
23. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, с. 206, 1972.
24. Шатемирова К. К., Вережкина И. В., Горкин В. З. Бюл. exper. биол. и мед., 6, 669—670, 1977.

Лаборатория фенотипетики поведения
Института цитологии и генетики
СО АН СССР, Новосибирск

Поступила 13. V 1982

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА КАТЕПСИНА S ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

БАРХУДАРЯН Н. А., АЗАРЯН А. В.

Используя осаждение сульфатом аммония (20—80%), фракционирование на колонке с сефадексом G-100 и ионообменную хроматографию на CM-сефадексе С-50, из головного мозга крупного рогатого скота была выделена цистениновая протеиназа, идентифицированная как катепсин S. Фермент был очищен приблизительно в 600 раз. Его активность определяли флуорометрически при pH 3,7 в присутствии пепстатина. В качестве субстрата был использован пиридоксилгемоглобин. Изоэлектрическое фокусирование очищенного препарата показало, что катепсин S существует в мозгу крупного рогатого скота в виде множественных форм с pI 6,1 и 6,9. Изучены их некоторые физико-химические свойства. Множественные формы высокочувствительны к лейпептину с K_i $1,2 \times 10^{-8}$ М и $1,4 \times 10^{-8}$ М, K_m относительно пиридоксилгемоглобина $2,2 \times 10^{-5}$ М и $2,5 \times 10^{-5}$ М. Фермент имеет широкий оптимум pH (3,7—5,2), $M=25$ кД, и обладает узкой субстратной специфичностью: не расщепляет азоказенин, γ -глобулин, альбумин, протамин, а также BANA / α -N-бензил-DL-аргинил- β -нафтиламид/, ANA /аргинил- β -нафтиламид/, ди- и трипептиды.

Катепсин S (К. Ф. 3. 4. 22-), являющийся лизосомной цистениновой протеиназой, расщепляющей гемоглобин при кислых значениях pH в присутствии пепстатина, впервые был выделен из лимфатических узлов телят [1], затем из бычьей селезенки [2]. Несмотря на то, что имеются данные об участии других цистениновых протеиназ (катепсинов В, L, Н) во внутриклеточном распаде белков [3], роль катепсина S в этом процессе не исследована. Для выяснения возможной роли этого фермента в метаболизме белков, специфичных для нервной ткани, и в процессе образования нейропептидов из предшественников был очищен катепсин S из головного мозга крупного рогатого скота и изучены некоторые его свойства.

Материалы и методы

В экспериментах использовали кору больших полушарий головного мозга крупного рогатого скота, которую извлекали сразу после забоя животных и хранили при -20° .

Определение активности катепсина S осуществляли методом, описанным ранее [4]. В качестве субстрата был применен гемоглобин, ковалентно связанный с пиридоксаль-5'-фосфатом. Измерение активности фермента проводили в пробе объемом 0,6 мл, содержащей 0,05 М цн-

тратный буфер, pH 3, 7, 200 мкг пиридоксилгемоглобина, 100 нг пепстатина и определенное количество фермента. Инкубация длилась 3 ч при 37°. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 30%-ной ТХУ. После центрифугирования при 5000 g pH надосадочной жидкости доводили до 5,5 добавлением 0,3 мл 1 М натрий-цитратного буфера, pH 7,2. Количество кислоторастворимых пептидов определяли флуорометрически на спектрофлуориметре фирмы «Farrand Optical Co. Inc.» (США) при 410 нм (возбуждение 330 нм). Контролем служили субстрат и фермент, инкубированные отдельно. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое вызывало в течение 3 ч при 37° образование фосфопиридоксилпептида, соответствующего по флуоресценции 1 нмоль пиридоксамина.

Электрофорез в ПААГ (10%) проводили по методу Davis [5] при 4° в 0,025 М трис-глициновом буфере, pH 8,3. Электрофоретическое разделение вели 2 ч при силе тока 5 мА на трубку, затем гели фиксировали в 20%-ной ТХУ, красили 1%-ным раствором амидочерного 10 В в 7%-ной уксусной кислоте и отмывали до обесцвечивания фона.

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [6], используя в качестве стандарта сывороточный альбумин быка, или на фотометре «Uvicord 2» (LKB, Швеция) при 280 нм.

Величину M находили по методу Andrews [7]. Колонку с сепадексом G-100 (5×55 см), уравновешенную 0,05 М ацетатным буфером, pH 4,8, калибровали с помощью голубого декстрана (M 2000 кД), сывороточного альбумина быка (M 67 кД), катепсина D (M 50 кД), овальбумина (M 45 кД), химотрипсина А (M 25 кД), миоглобина (M 17,8 кД).

Действие фермента на 1%-ные растворы субстратов как белковой, так и пептидной природы—гемоглобин, γ -глобулин, протамин, азоказени, Leu-Gly, Gly-Leu-Tyr, Leu-Tyr, Leu-Gly-Tyr—определяли с помощью о-фталдигальдегида при pH 5,2 [8].

Для исследования действия фермента на азоказени использовали также метод Langner и др. [9]. Пробы объемом 1 мл содержали 2,5% азоказени, 0,05 М фосфатный буфер, pH 5,6, 5×10^{-3} М ЭДТА, 10^{-3} М дитиотрейтола и 15 мкг фермента. Инкубацию проводили при 37° в течение 3 ч. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 1 мл 10%-ной ТХУ. После центрифугирования определяли поглощение супернатанта при 366 нм против контроля, не содержащего фермента.

BANA- и ANA-гидролизующую активность определяли в пробе объемом 0,6 мл, содержавшей 5×10^{-3} М BANA или ANA, 0,05 М фосфатный буфер, pH 5,2, 10^{-3} М дитиотрейтола, 5×10^{-3} М ЭДТА и фермент. Инкубация протекала 1 ч при 37°. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 30%-ной перхлорной кислоты, затем добавляли 0,4 мл 0,8 М боратного буфера, pH 9,7 и 2 мл дистиллированной воды; количество высвободившегося β -нафтиламина определяли флуорометрически на спектрофлуориметре фирмы «Farrand Optical Co. Inc.» (США) при 410 нм (возбуждение 275 нм).

Изоэлектрическое фокусирование проводили на колонке фирмы I.K.B. (Швеция) объемом 110 мл, используя амфолины (1%), обеспечивающие градиент pH 3—10 или 4—8 (смесь амфолинов с pH 4—6 и 6—8) и градиент концентрации сахарозы (40%—0). Образец белка наносили на колонку в виде компонента легкого раствора. Электрофокусирование проводили 24 ч при 4° и напряжении 500 В. Эксперимент заканчивали, когда ток, проходивший через колонку, достигал постоянной величины. По окончании электрофокусирования содержимое колонки собирали фракциями по 1,25 мл, в которых измеряли pH и ферментативную активность.

Результаты и обсуждение

Очистка фермента. Все стадии очистки вели при 4°. 150 г коры больших полушарий головного мозга крупного рогатого скота промывали и гомогенизировали в 300 мл 0,05 М ацетатного буфера, pH 4,0, содержащего 0,2% тритона X-100, 0,3 М NaCl и 10^{-3} М литиотрейтола. Полученный гомогенат центрифугировали при $100000\times g$. Белки надоса-

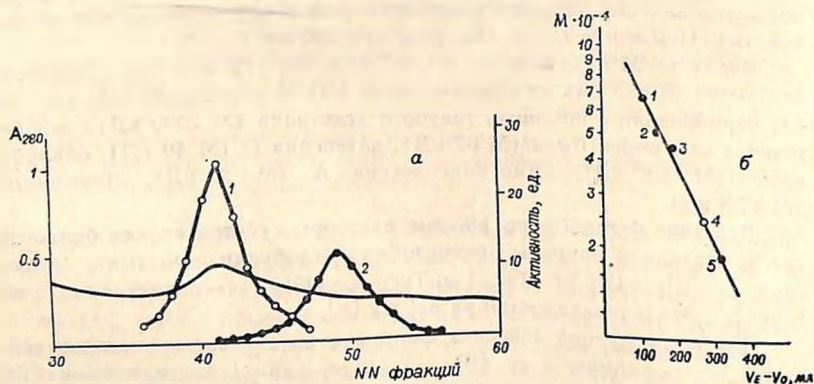


Рис. 1. Хроматография белков, полученных после высаливания сульфатом аммония (20—80%), на колонке с сефадексом G-100: а—профиль элюции гидролизата пиридоксилгемоглобина при pH 3,7. 1—пепстатинчувствительная протеолитическая активность; 2—пепстатиннечувствительная протеолитическая активность; б—определение М катепсина S на колонке с сефадексом G-100, уравновешенной 0,05 М ацетатным буфером, pH 4,8; 1—бычий сывороточный альбумин, 2—катепсин Д, 3—овальбумин, 4—химотрипсиноген А и катепсин S, 5—миоглобин. V_e —элюционный объем, V_0 —свободный объем.

дочной жидкости подвергали осаждению сульфатом аммония (20—80%). Полученный после центрифугирования осадок растворяли в 30 мл 0,05 М ацетатного буфера, pH 4,8 и наносили на колонку с сефадексом G-100 (5×55 см), уравновешенную 0,05 М ацетатным буфером, pH 4,8. Элюцию проводили тем же буфером (рис. 1, а). Собранные с ко-

лонки фракции с пепстатиннечувствительной протеолитической активностью объединяли и наносили на колонку с СМ-сефадексом С-50 (2,5×9 см), уравновешенную 0,05 М Na-фосфатным буфером, pH 6,2. Элюцию проводили тем же буфером с линейным градиентом

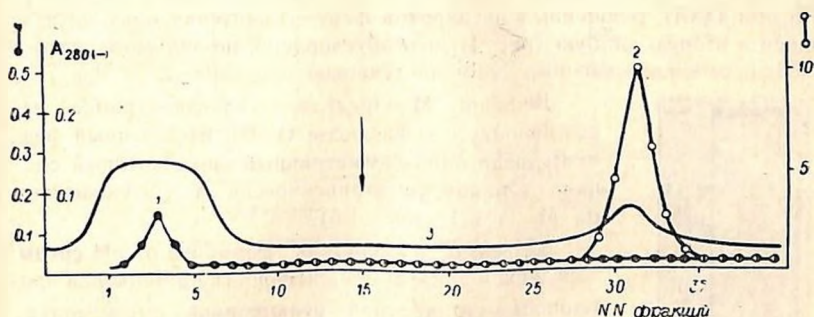


Рис. 2. Ионообменная хроматография на СМ-сефадексе С-50. Колонку (2,5×9 см) уравнивали 0,05 М Na-фосфатным буфером, pH 6,2. Элюцию проводили тем же буфером с линейным градиентом NaCl 0—0,3 М (300 мл) со скоростью 20 мл/ч. Собирали фракции по 6 мл. Стрелка показывает дачу градиента. 1—BANA-гидролизующая активность, 2—протеолитическая пепстатиннечувствительная активность, 3—содержание белка

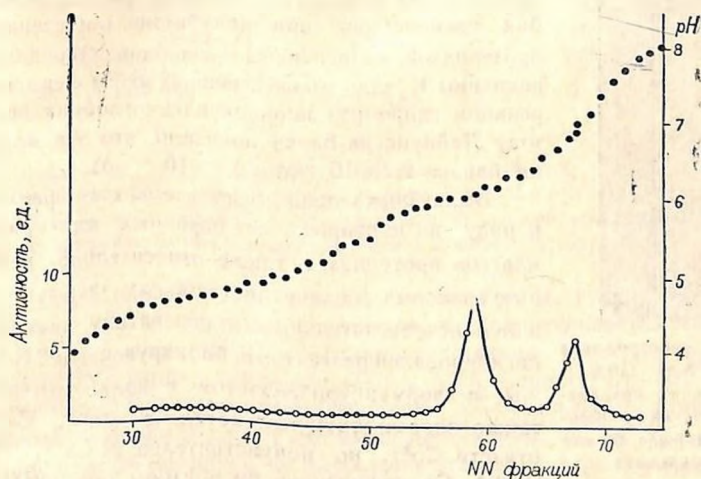


Рис. 3. Электрофокусирование очищенного препарата катепсина S

NaCl 0—0,3 М. На рис. 2 видно появление двух пиков: 1-й пик, который не адсорбировался на колонке, обладал способностью гидролизовать BANA; 2-й пик—первоначально сорбировавшийся на колонке, а затем элюируемый приблизительно 0,1 М NaCl, обладал пепстатиннечувствительной протеолитической активностью. Фракции, образующие 2-й пик.

объединили и диализовали против дистиллированной воды. Как видно из табл. 1, фермент был очищен в 607 раз.

Характеристика препаратов фермента. Изоэлектрическое фокусирование очищенного препарата цистеиновой протениазы показало наличие множественных форм с pI 6,1 и 6,9 (рис. 3). Электрофорез в 10%-ном ПААГ очищенных препаратов фермента выявил одну четкую полосу и вторую слабую (рис. 4), что обусловлено, по-видимому, существованием множественных форм цистеиновой протениазы.



Рис. 4. Электрофорез в ПААГ (10%) очищенного препарата катепсина S. Образец содержал 60 мкг фермента

Величину M определяли гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-100. Выделенный фермент давал один симметричный пик, который совпадал с пиком химотрипсина А, что указывает на M 25 кД (рис. 1,6).

Зависимость действия фермента от pH среды определяли измерением активности цистеиновой протениазы в стандартной реакционной смеси, содержащей 0,05 М цитрат-фосфатные буферы с pH в интервале—2,6—7,0. Очищенный фермент имел широкий оптимум pH активности—3,7—5,2; его субстратная специфичность была тестирована относительно ряда веществ как белковой, так и пептидной природы. Из белковых субстратов только гемоглобин расщеплялся при инкубации с цистеиновой протениазой, из пептидных—ни один. Определение величины K_m для множественных форм фермента в реакции гидролиза пиридоксильного гемоглобина по методу Лайнуивера-Берка показало, что эти величины близки $2,2 \times 10^{-5}$ М и $2,5 \times 10^{-5}$ М.

Была определена чувствительность фермента к ряду ингибиторов, специфичных для разных классов протениаз, а также относительно некоторых тиоловых соединений (табл. 2). Фермент оказался нечувствительным к пепстатину, полностью ингибировался реагентами, блокирующими SH-группы— β -хлормеркурибензоатом и йодацетамидом, а также ионами тяжелых металлов— Zn^{2+} , Cu^{2+} и отчасти Co^{2+} , но нечувствителен к Ca^{2+} , Mg^{2+} , ЭДТА. Специфические ингибиторы тиоловых протениаз—лейпептин и антипаин—при низких концентрациях полностью ингибировали активность фермента. Были определены величины K_i для множественных форм цистеиновой протениазы относительно лейпептина по методу Диксона; они оказались равными $1,2 \times 10^{-8}$ и $1,4 \times 10^{-8}$ М. Фермент активировался в значительной степени тиоловыми соединениями— β -меркаптоэтанолом, дитиотрейтолом и цистеином.

Таблица 1

Очистка катепсина S из коры полушарий мозга крупного рогатого скота

Фракция	Объем, мл	Белок, мг/мл	Общий белок	Общая активность	Удельная активность	Выход, %	Очистка
Гомогенат	580	5,8	3364	12180	3,62	100	—
Супернатант 100000×g	220	3,2	704	4340	6,8	39,7	1,8
Сефадекс G-100	40	0,12	4,8	2920	608	23,9	167,9
СМ-сефадекс С-50	20	0,05	1	2200	2200	18	607

Таблица 2

Влияние некоторых соединений на активность катепсина S

Соединения	Концентрация	Относительная активность, %
Пепстатин	100 мкг	100
Лейпептин	" "	0
Ангипаин	" "	0
п-хлормеркурибензоат	10 ⁻³ М	0
Йодацетамид	" "	0
ЭДТА	" "	100
CoCl ₂	" "	62
ZnSO ₄	" "	0
CuSO ₄	" "	0
CaCl ₂	" "	100
MgCl ₂	" "	100
Бестатин	" "	100
Динизопропилфторфосфат	" "	100
Дитиотрейтол	" "	280
β-Меркаптоэтанол	" "	272
Цистеин	" "	256

Примечание. За 100% принимали активность, полученную при инкубировании 15 мкг фермента с 200 мкг пиридоксилгемоглобина в 0,05 М цитратном буфере, pH 3,7. При тестировании ряда соединений их инкубировали 10 мин при комнатной температуре с 15 мкг катепсина S, затем добавляли 200 мкг субстрата и инкубировали 3 ч при 37°

Таким образом, показано, что в головном мозгу крупного рогатого скота есть цистеиновая протеиназа, гидролизующая гемоглобин при кислых значениях pH в присутствии пепстатина и не расщепляющая низкомолекулярные субстраты BANA, ANA, Leu-Gly, Leu-Gly-Tyr и др. и такие белки, как азоказеин, протамин, альбумин, γ-глобулин. Классическим субстратом для цистеиновой протеиназы, как и для катепсина D, является гемоглобин, но разделение этих двух ферментов происходит на стадии гель-фильтрации через сефадекс G-100; кроме того, фермент не ингибируется пепстатином—специфическим ингибитором аспарагиновых протеиназ.

Для того, чтобы идентифицировать выделенный фермент, необходимо было сравнить его с другими тиоловыми протеиназами—катепсинами B, H, L, S, T.

В отличие от катепсина В (преобладающей цистеиновой протеиназы) фермент не расщепляет BANA—классический субстрат для катепсина В—и низкомолекулярные пептиды. Кроме того, гомогенный препарат катепсина В из мозга телят не расщепляет гемоглобин [10]. Отделение катепсина В от выделенной нами цистеиновой протеиназы происходило на стадии хроматографии на СМ-сефадексе С-50 (катепсин В не сорбировался на колонке).

Тот факт, что фермент не расщепляет ариламидные субстраты BANA и не обладал аминопептидазной активностью—не гидролизует аргинил-2-нафтиламид и не ингибировался бестатином (табл. 2), позволяет исключить его принадлежность к катепсину Н. Фермент не способен к гидролизу азоказеина—классического субстрата для катепсинов L и Т [11, 12]. Тиолзависимые катепсины В₂ и С имеют М 50 и 210 кД соответственно и практически не обладают эндопептидазной активностью.

Все это свидетельствует о том, что выделенная нами из мозга крупного рогатого скота цистеиновая протеиназа является катепсином S. Получение в чистом виде этого фермента способствует изучению его роли в метаболизме белков, специфичных для нервной ткани, и в образовании нейропептидов из предшественников.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF BRAIN CATHEPSIN S

BARKHUDARYAN N. A., AZARYAN A. V.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

Cathepsin S (E. C. 3.4.22—) was isolated from cattle brain by a procedure involving fractionation with ammonium sulfate (20—80%), gel filtration on Sephadex G-100 and CM-Sephadex C-50 ion-exchange chromatography. The enzyme was purified 600-fold. It was assayed fluorometrically at pH 3,7 in the presence of pepstatin, the substrate used was haemoglobin, modified with pyridoxal-5'-phosphate. Isoelectric focusing of the purified enzyme indicates that it exists in cattle brain in two multiple forms with pI 6,1 and 6,9. Some of their properties have been studied. They are highly sensitive to leupeptin with K_i $1,2 \times 10^{-8}$ M and $1,4 \times 10^{-8}$ M, K_m of pyridoxylhaemoglobin is determined to be $2,2 \times 10^{-5}$ M and $2,5 \times 10^{-5}$ M. Cathepsin S has a broad pH optimum 3,7—5,2 and M about 25 kDa. It hydrolyses neither albumin, γ -globulin, azocasein, protamin nor benzoyl-arginyl- β -naphthylamide, arginyl- β -naphthylamide, di- and tripeptides. The availability of the purified preparation of cathepsin S from brain will facilitate studies on the role of this lysosomal cysteine endopeptidase in the turnover of proteins and in the processing of neuropeptides.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Turnsek T., Kregar I., Lebez D.* Biochim. Biophys. Acta, 403, 514—520, 1975.
2. *Turk V., Kregar I., Gubensek F., Popovic T., Locnicar P., Lah T.* FEBS, 60, 317—330, 1980.
3. *Болей П., Кирике Х., Лангнер Ю., Райман С., Салама З. и др.* Структура и функция лизосом (под ред. Дебова С. С.), Новосибирск, с. 3—4, 1980.
4. *Акопян Т. Н., Карабацян Л. В., Арутюнян А. А., Галоян А. А.* Биол. ж. Армении, 31, 6, 612—615, 1978.
5. *Davis B. J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427, 1964.
6. *Lowry D. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
7. *Andrews P.* Biochem. J., 96, 595—606, 1965.
8. *Акопян Т. Н., Оганисян А. И., Арутюнян А. А., Арзуманян А. М., Галоян А. А.* Биол. ж. Армении, 30, 11, 57—61, 1977.
9. *Langner J., Wakil A., Zimmerman M., Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Wiederanders B.* Acta Biol. Med. Germ., 31, 1—18, 1973.
10. *Suhar A., Marks N.* Eur. J. Biochem., 101, 23—30, 1979.
11. *Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Ansorge S., Bohley P.* Eur. J. Biochem. 74, 293—301, 1977.
12. *Gohda E., Pitot H. C.* J. Biol. Chem., 256, 5, 2561—2572, 1981.

Институт биохимии
АН АрмССР, Ереван

Поступила 21.XII 1982

УДК 547.963.3:575.312.31

БЕЛКИ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

ТЕРПИЛОВСКАЯ О. Н., ИВАНОВ В. А., АБРАМОВА З. И., БЕЛОВА М. М.

Методом градиентного электрофореза в ПААГ обнаружены качественные и количественные изменения ядерных белков клеток головного мозга крыс в процессе постнатального онтогенеза. Процесс развития мозга сопровождается появлением дополнительных пиков в зоне высокомолекулярных белков. В результате анализа индивидуальных белков показано, что сыворотка кроликов, иммунизированных нейтральной ДНКазой из ядер печени крыс, реагирует с ядрами нейронов и нейроглии головного мозга этих животных. В некоторых фракциях, полученных гелем-фильтрацией негистоновых белков, обнаружена ДНКазная активность с двухцепочечной ДНК при pH 7—8.

Совокупным использованием различных методов установлено, что белковые компоненты хроматина обладают высокой структурной и функциональной гетерогенностью, которая обусловлена в значительной мере наличием кислых (негистоновых) белков [1], функциональное разнообразие которых свидетельствует о наличии среди них сложных ферментных систем, участвующих в процессах метаболизма и регуляторных модификациях нуклеиновых кислот и белков [2]. Поэтому изучение кислых хроматиновых белков, функцию которых прежде всего следует рассматривать в генетическом аспекте, является, по-видимому, одним из необходимых путей в области исследования функциональной активности ткани и органа. Иммунологический анализ функциональных белков в составе негистонов специфические для НС белки, некоторые из них выделены и охарактеризованы биохимическими методами [3]. На основании экспериментов по выработке условного рефлекса предполагают, что негистоновые нейроспецифические белки вовлекаются в приобретение навыка [4].

Несмотря на довольно большое количество экспериментальных данных, крайне мало представлен в литературе анализ белков головного мозга в процессе онтогенеза. В данной работе приводятся результаты электрофоретического исследования белков головного мозга крыс разных возрастов, их биохимический анализ свидетельствует о локализации ДНКазы в хроматине.

Материалы и методы

Работу проводили на беспородных крысах-самцах и кроликах-самцах (массой 2 кг) породы шиншилла. Для электрофоретического

анализа белков использовали крыс различного возраста: 1-дневных, 1-месячных и взрослых (3-месячных). Исследовали различные фракции: исходный гомогенат, цитоплазматическую фракцию и ядра клеток.

Получение гомогената и цитоплазматической фракции. Крыс перфузировали охлажденным 0,14 М NaCl, декапитировали, быстро извлекали мозг и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в 1,9 М сахарозе (рН 6,5) при 1—4°. Все последующие операции также проводили на холоду. Гомогенат разбавляли 1 мМ фосфатом калия (рН 6,5), содержащим 1 мМ MgCl₂. В качестве детергента использовали тритон X-100 в концентрации 0,125%. Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 3 000 g. Надосадочную жидкость отбирали для анализа.

Выделение ядер. Ядерную фракцию получали согласно описанному ранее методу [5]. Осадок ресуспендировали в 0,6 М сахарозе и насланвали на непрерывный сахарозный градиент 0,6 М—1,6 М с «подушкой» из 2,2 М сахарозы. Ядерную фракцию получали в осадке центрифугированием в течение 60 мин при 105 000 g.

Электрофорез. Исходный гомогенат, надосадочную жидкость и ядра обрабатывали 2—3-минутным кипячением в солюбилизирующем растворе, содержащем 0,075 М трис-сульфат, 5%-ный β-меркаптоэтанол (β-МЭ), 2,5%-ный SDS, рН 9,0, который приготавливали на 50%-ной сахарозе [6].

Электрофорез белков проводили в градиентном ПААГ в диапазоне концентрации от 4 до 20%. В систему добавляли 0,1% SDS. Приготовление градиентных микрогелей проводили по методу Daines, Mauger [7] на гелевых столбиках диаметром 2,5 мм и длиной 10 см. Трубочки изготавливали из молибденового стекла и перед употреблением силиконировали, используя для этого 0,03%-ный силикон-эластомер E-301, растворенный в эфире, и высушивали при 120° 1 ч. В пробы добавляли бром-феноловый синий и об окончании электрофореза судили по прохождению зоны красителя. На каждую трубочку наносили по 10 мкг белка. Электрофорез проводили в течение 7 ч при 0—2°, при силе тока 0,46 мА на одну трубочку. Первые 40 мин сила тока составляла половину указанной величины.

Гели извлекали, фиксировали 12 ч 12,5%-ной ТХУ, отмывали от ТХУ 7%-ной уксусной кислотой 30 мин на водяной бане при 40—45°, окрашивали 0,2%-ным раствором Кумасси бриллиантовым синим в течение 45 мин при 40—45° и отмывали от излишков красителя уксусной кислотой до обесцвечивания фона. Прямую денситометрию гелей проводили на денситометре оригинальной конструкции [8]. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [9]. Для анализа индивидуального ядерного белка (ДНКазы) использовали иммунолюминесцентный метод [10] и методы фракционирования негистоновых белков [11].

Локализацию нейтральной ДНКазы ядер мозга крыс изучали, используя специфические иммунные сыворотки [10]. Нейтральная

ДНКазы была выделена из ядер печени крыс [12]. Полученные препараты применяли для иммунизации кроликов, состоявшей из четырех введений с интервалами в 7 дней. Фермент вводили в возрастающих дозах от 0,5 до 4,0 мг белка в смеси с адьювантом Фрейнда. Реимунизацию проводили через 40 дней с момента последнего введения, при этом фермент вводили без адьюванта. Кровь брали через 7 дней после окончания цикла.

На микротоме-криостате (МК-25) получали срезы мозговой ткани, проходящие через область гиппокампа толщиной 5—7 мкм. Срезы фиксировали в камере криостата 96%-ным этанолом в течение 10 мин. Промывали физраствором, содержащим 10 мМ фосфат натрия. На срезы наносили специальную иммунную сыворотку, инкубировали 30—40 мин при 22° во влажной камере. После тщательной отмывки препараты инкубировали в тех же условиях с меченой антиглобулиновой сывороткой, смешанной с родамином.

Фракционирование негистоновых белков хроматина. Из очищенных клеточных ядер выделяли хроматин, который с помощью солевой экстракции диссоциировал на комплексе ДНК с гистонами и негистоновою фракцию белков. Для этого использовали методы, описанные ранее [11]. Негистоновые белки наносили на колонку с сефадексом G-200 и проводили гель-фильтрацию. Фракции негистоновых белков, полученные в результате гель-фильтрации, обессоливали и концентрировали диализом против 5 мМ фосфата калия (рН 7,1), содержащего 5 мМ β -МЭ и 10% глицерина. ДНКазную активность определяли спектрофотометрически, регистрируя кислоторастворимые продукты реакции, которую проводили с двухцепочечной ДНК в качестве субстрата. Условия диализа и состав реакционной смеси опубликованы в статье Иванова и соавт. [13].

Результаты и обсуждение

Созревание мозга крыс характеризуется не только увеличением его веса, но и изменением содержания белков на единицу массы. Установлено, что мозг новорожденных крыс содержал около 10% белка, а у взрослых—15%. Увеличение содержания общего белка в процессе развития мозга наблюдали также и другие авторы [14]. Но наибольший интерес представляют исследования онтогенетического спектра, поскольку именно они, по-видимому, отражают функционально значимые стадии процесса развития. Подобные данные представлены крайне недостаточно и противоречиво [15, 16]. В связи с этим нами был проведен электрофоретический анализ белков головного мозга крыс разного возраста: 1-дневных, 1-месячных и взрослых (3-месячных). На рис. 1 приведены денситограммы общих белковых фракций. В результате сравнения денситограмм было идентифицировано свыше 60 четко разделяющихся белков и установлено, что процесс постнатального развития сопровождается увеличением количественных раз-

личий между ними. Небольшие различия обнаружены в области низкомолекулярных белков (пики 1—4). С увеличением возраста наблюдалось усложнение электрофореграмм, в зонах быстро и медленно мигрирующих белков появлялись более интенсивные пики, отражающие процессы созревания мозга, его миелинизацию (пики 9—10, 15—23). В области со средней электрофоретической подвижностью (пики 30—45) у взрослых по сравнению с новорожденными можно заметить появление новых пиков. Подобное обогащение белкового спектра и увеличение концентрации отдельных белков происходило и среди высокомолекулярных медленно мигрирующих белков (пики 45—67).

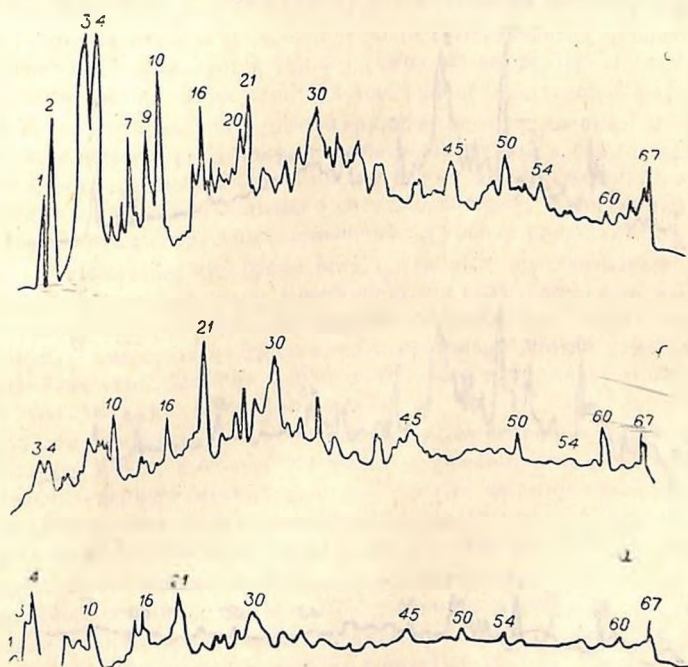


Рис. 1. Денситограммы образцов ПААГ после диск-электрофореза тотальных белков гомогената головного мозга крыс: а—однодневных, б—месячных, в—взрослых

Белковый спектр цитоплазматической фракции отличался менее выраженным разнообразием (рис. 2). Сравнивая денситограммы исходного гомогената и цитоплазматической фракции, можно сделать важное заключение о том, что возрастные изменения белков становятся выраженными уже к месячному возрасту и незначительно отличаются у взрослых крыс.

Наибольший интерес представляет анализ ядерных белков. Данные литературы показывают, что хромосомные белки, в составе которых на-

ходятся и нейроспецифические, играют важную роль в контроле состояния ДНК и регуляции генной активности—процессах, управляющих дифференциацией клеток и созреванием ткани. В ядерной фракции, в отличие от других исследованных фракций, отмечалось обогащение некоторых групп белков во всех изученных возрастных группах животных (рис. 3). У 1-дневных крыс ядерная фракция имела более сложный спектр белков по сравнению с цитоплазматической. Особенно большие отличия наблюдались в области высокомолекулярных белков. Эта группа белков (пики 45—67) имеет больше четко выраженных пиков, и идентичные белки (пики 45, 50, 54) содержались в более высокой концентрации в ядерной фракции. Аналогичная картина прослеживалась у

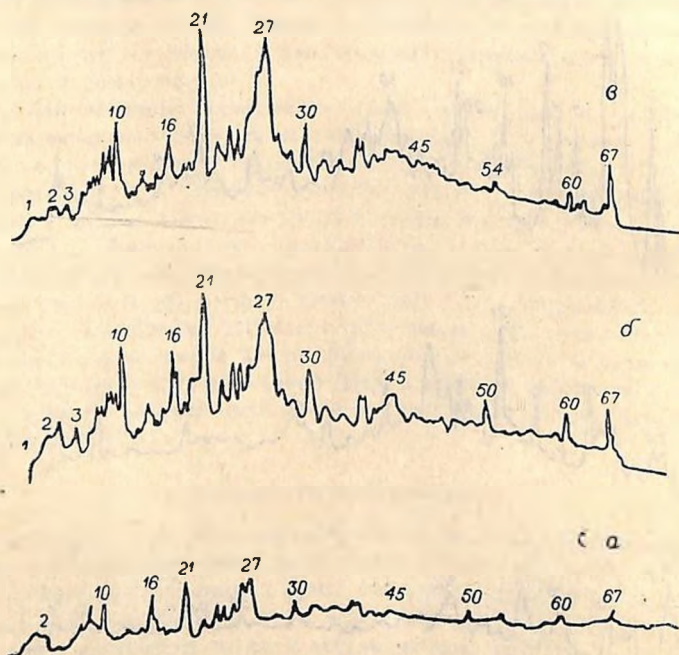


Рис. 2. Денситограммы образцов ПААГ после диск-электрофореза белков цитоплазматической фракции. Обозначения те же, что и на рис. 1

месячных и взрослых животных. Важно отметить, что именно в этой области спектра находятся специфические белки мозга. На основании электрофоретической подвижности белок 14-3-2 соответствует промежуточной зоне (пики 45—54), а белок S-100 — зоне, дальше отстоящей от старта [17].

При сравнении электрофореграмм ядерной фракции животных разных возрастов можно отметить, что гистоновые белки (пики 2—4) в процессе развития животных практически не изменялись. Содержание этих белков у новорожденных было такое же, как у взрослых. Таким

образом, наши исследования подтверждают известные данные Kelly [15]. Некоторые белки (пикки 5—21) присутствовали во всех возрастных группах и изменялись лишь в относительной концентрации в процессе развития (пикки 20—21). Белки со средней электрофоретической подвижностью (пикки 22—45) с возрастом приобретали более выраженную гетерогенность, те же изменения имелись и в области высокомолекулярных белков. При этом происходит как усложнение белкового спектра, так и повышение содержания этих белков в онтогенезе. Изменения спектра ядерных белков не завершаются к месячному возрасту: 30-дневные и взрослые крысы имеют выраженные различия (рис. 3).

Данные литературы свидетельствуют о том, что в течение постнатального развития мозг млекопитающих подвергается характерным изменениям: 1) образуется такое количество нейронов, которое присуще взрослому мозгу; 2) осуществляется период ускоренного роста, в течение которого происходит интенсивная дифференцировка; 3) наступает окончательный период консолидации, приводящий к формированию зрелого головного мозга [18]. Наряду с этими преобразованиями были обнаружены изменения белкового спектра, которые, по-видимому, являются отражением возрастных изменений на уровне процессов метаболизма белков. Показано, что белки всех изученных субклеточных фракций подвергаются в онтогенезе качественным и количественным изменениям. Но только при исследовании ядерных белков имели место изменения у взрослых животных по сравнению с месячными, тогда как белки цитоплазматической фракции и исходного гомогената, как уже было сказано выше, эти различия утрачивают.

Несмотря на то, что образование числа нейронов, характерное для взрослого мозга, и морфологическое созревание органа заканчиваются в течение первого месяца развития крысы, формирование макромолекулярной основы мозгоспецифических процессов продолжается, отражаясь на метаболизме ядерных белков клеток мозга. Полученные нами данные были положены в основу дальнейшего исследования ядерных клеточных белковых компонентов головного мозга с целью выявления индивидуальных функционально активных белков, для чего применялся непрямой метод люминесцирующих антител. На рис. 4 представлена иммуофлуоресцентная картина взаимодействия иммунной сыворотки со срезом, проходящим через область гиппокампа крыс. Отчетливо видно интенсивное специфическое свечение в ядрах нейронов и нейроглии. Результаты экспериментов свидетельствуют о наличии в клеточных ядрах головного мозга белков, иммунологически подобных ядерной ДНКазе печени, что находится в соответствии с полученными ранее данными [19]. Так, в общих белковых фракциях ядер нейронов и глии была обнаружена ДНКазная активность методом регистрации кислотонерастворимых продуктов гидролиза ДНК, собранных на мембранных фильтрах.

Для более подробной характеристики ядерных белков в данном ис-

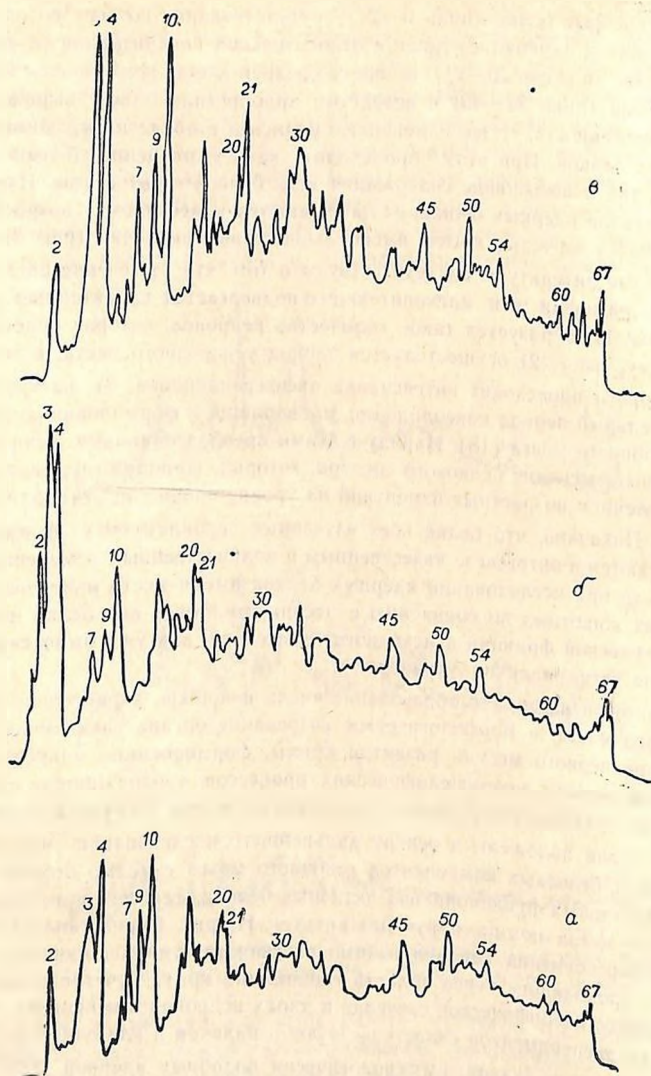


Рис. 3. Денситограммы образцов ПААГ после диск-электрофореза белков ядерной фракции. Обозначения те же, что и на рис. 1

следовании использовали методы фракционирования хроматина. Фракцию негистоновых белков наносили на колонку с сефадексом и проводили гель-фильтрацию. Как видно из рис. 5, кислые белки хроматина проявляют ДНКазную активность, которая обнаруживается спектрофо-

тометрически по кислоторастворимым продуктам гидролиза двухцепочечной тимусной ДНК. При этом показано, что негистоновые белки головного мозга содержат несколько активных ДНКазных фракций, различающихся величиной M . Данные литературы также свидетельствуют

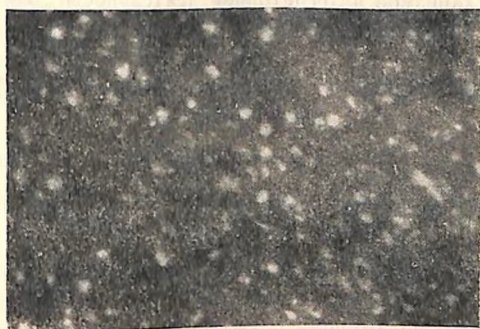


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание среза гиппокампа головного мозга крысы. Ок. 5, об. 20 $\times$ 100. Антиглобулиновая сыворотка получена от кроликов, иммунизированных ядерной нейтральной ДНКазой хроматина печени крысы

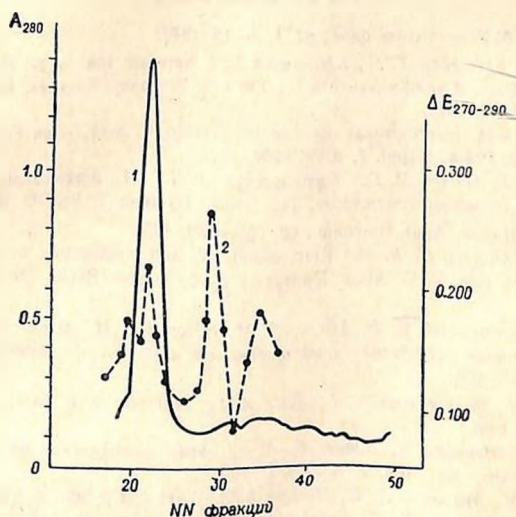


Рис. 5. Гель-фильтрация (сефадекс G-200) негистоновых белков хроматина клеток мозга. 1—белок (A_{280}), 2—активность ДНКазы ($\Delta E = E_{270} - E_{290}$)

о гетерогенности ядерных ДНКаз других тканей млекопитающих, например, в составе негистоновой фракции белков хроматина клеток Hela были обнаружены 4 различных эндо-ДНКазы [20].

Подробное исследование функционально активных белков головного мозга, ассоциированных с хроматином, по-видимому, позволит выявить некоторые закономерности нейроспецифической регуляции активности генов и определить функциональный подход к исследованию биохимических механизмов интегративной деятельности мозга на уровне генетического аппарата клетки.

NUCLEAR PROTEINS FROM RAT BRAIN IN POSTNATAL ONTOGENESIS

TERPILOVSKAJA O. N., IVANOV V. A., ABRAMOVA Z. I., BELOVA M. M.

Institute of Biophysics, USSR Academy of Sciences, Poustchino
Ulyanov-Lenin's State University, Kazan

Both quantitative and qualitative changes have been detected in rat brain nuclear proteins in the course of postnatal ontogenesis by means of gradient electrophoresis technique. A new peak in the zone of high molecular weight proteins was detected. The blood serum of rabbits, immunized by neutral DNA-ase from rat liver nuclei, crossreacted with rat brain neuron and neuroglia nuclei.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ельцина Н. В. Успехи совр. биол., 87, 1, 3—15, 1979.
2. Stein G. S., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. J. Science, 183, 4127, 817—824, 1974.
3. Magandos P. I., Zomzely-Neurath C., York C. Biochem. Biophys. Res. Comm., 68, 4, 1309—1316, 1975.
4. Livett B. G.—In: International Review of Cytology. N. Y.—San Francisco—London: Acad. Press, Suppl. 7, p. 53—237, 1978.
5. Третьяк Т. М., Ткачук М. Г., Терпиловская О. Н. III Всесоюзная конференция «Память и следовые процессы». Тез. докл., Пушкино, с. 91—93, 1974.
6. Stephen J. Mayor. Anal. Biochem., 69, 350—360, 1975.
7. Dames W., Maurer H. R.—In: Electrophoresis and isoelectric focusing in polyamide gel. Eds. R. C. Allen, Maurer H. R. de Gryter, Berlin—N. I., p. 221—231, 1974.
8. Ларин В. Т., Санталов Б. Ф., Хохлов А. М., Розанов С. И.—В кн.: Описание научных принципов устройства новых приборов и методики пользования ими, Пушкино, с. 7—13, 1981.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 1, 265—275, 1951.
10. Хофман Р., Штраубе В., Клауш Б.—В кн.: Иммунологические методы (под ред. Х. Фримеля). М., Мир, с. 435—441, 1979.
11. Третьяк Т. М., Архипова Л. В., Иванов В. А. ДАН СССР, 257, 5, 1262—1264, 1981.
12. Винтер В. Г., Зоткина Н. Л., Гайнулина Ф. Х. Биохимия, 41, 1, 119—123, 1976.
13. Иванов В. А., Третьяк Т. М., Газиев А. И., Санталов Б. Ф. Биохимия, 45, 5, 912—922, 1980.
14. Хиден Х.—В кн.: Функциональная морфология клетки. М., ИЛ, с. 185—260, 1963.
15. Kelly P. T., Luttges M. W. J. of Neurochemistry, 27, 1163—1172, 1976.
16. Griffith A. L., Arthur La Velle, Ca'sim: rdi s N Brain Res., 21, 537—540, 1970.
17. Певзнер Л. З., Венков Л., Черешаров Л. Укр. биохим. ж., 1, 50, 20—24, 1978.

18. Осборн Н. Н. Микрохимический анализ нервной ткани. М., Медицина, с. 184—253, 1978.
19. Третьяк Т. М., Иванов В. А., Терпиловская О. Н. Укр. биохим. ж., 51, 6, 624—628. 1979.
20. Fischman G. I., Lambert M. W., Studzincky G. P. Biochem. et Biophys. Acta, 567, 2, 464—471, 1979.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино
Казанский государственный университет
им. В. И. Ульянова-Ленина

Поступила 31.V 1982

УДК 547.962:612.8.015

ОЧИСТКА НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА 14-3-2

НАЗАРЯН К. Б., КАРАПЕТЯН Н. Г., КАЗАРЯН Б. А.

Методами проявительной хроматографии, гель-фильтрации и препаративного электрофореза из мозга быка выделен нейроспецифический белок 14-3-2.

При электрофорезе в 10%-ном ПААГ белок мигрирует в виде гомогенной зоны, идентичной основной фракции белка 14-3-2, полученного от Б. Мура. Показана полная иммунологическая идентичность этих белковых препаратов, а также наличие у них кросс-реакции при двойной иммунодиффузии с антителом к антигену Д.

Нейроспецифический белок 14-3-2 был обнаружен при сравнении «белковых карт» экстрактов мозга и печени быка [1]. Рядом авторов было описано несколько белков со сходными характеристиками. Это α -антиген [2], белок SPR [3], антиген Д [4] и нейроспецифическая енолаза — NSE [5].

Сравнение их иммунологических и физико-химических свойств было затруднено из-за методических сложностей при воспроизведении оригинальных методик и отсутствия надежных тестов определения этих белков в процессе очистки. После энзим-электрофоретического обнаружения енолазной активности в белковой фракции с подвижностью белка 14-3-2 [6] и открытия нейроспецифической формы енолазы [7] многие авторы стали их отождествлять [8, 9], хотя, на наш взгляд, окончательно утверждать это несколько преждевременно, так как не во всех подобных исследованиях белок 14-3-2 отделялся от белка 14-2-3, имеющего очень близкие физико-химические характеристики [10]. С этой точки зрения приводимые доказательства идентичности 14-3-2 и NSE нельзя считать окончательными.

Задачей настоящей работы было выделение и очистка гомогенного препарата белка 14-3-2, сравнение с препаратами, полученными в других лабораториях, для изучения в дальнейшем их ферментативных свойств.

Материалы и методы

Для выделения белка использовали свежий бычий мозг (1—1,5 кг, который гомогенизировали в 10 мМ трис-фосфатном буфере, pH 7,5 (буфер А). Гомогенат центрифугировали 60 мин при 8000 g, и к супернатанту добавляли сухой сульфат аммония до 10% насыщения, отдел

ли осадок центрифугированием (30 мин, 8000 g) и к супернатанту добавляли сульфат аммония до 60% насыщения. После центрифугирования при тех же условиях осадок (фракция Р60) растворяли в минимальном объеме буфера А, диализовали против этого буфера и сгущали ультрафильтрацией на фильтре Diaflo UM-10 («Amicon», США) [11]. 35—40 мл сконцентрированного белкового раствора (30 мг/мл) подавали на колонку 3,3×60 см с ДЕАЕ-целлюлозой ДЕ—52 («Serva», ФРГ). Белок с колонки элюировали 0—0,35 моль линейным градиентом NaCl со скоростью 40 мл/ч. Фракции, содержащие белок 14-3-2, диализовали против буфера А, сгущали до 3 мл (конечная концентрация белка 20 мг/мл) и подавали на колонку (1,5×90 см) с сефадексом G-150, уравновешенную буфером А. Элюирование осуществляли тем же буфером со скоростью 3 мл/ч. После гель-фильтрации фракции, содержащие 14-3-2, диализовали против воды и лиофилизировали. Дальнейшую очистку проводили препаративным электрофорезом в ПААГ при pH 8. Белок определяли по Lowry и соавт. [12], аналитический электрофорез проводили по Davis [13], а реакцию двойной иммунодиффузии по Гусеву [14] в геле 1%-го агара.

Результаты исследований

Выход белка после высаливания в 60%-ном сульфате аммония экстракта 1 кг мозга составлял около 1 г, а выход очищенного продукта—1—3 мг, что несколько ниже результата, полученного Marangos и соавт. [11]. Это объясняется тем, что в настоящей работе использовали более низкие ускорения при центрифугировании и не применяли в ходе очистки каких-либо детергентов.

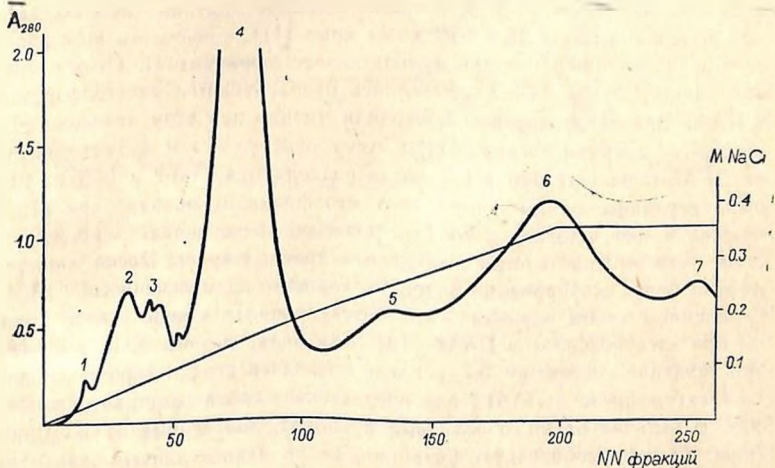


Рис. 1. Белковый профиль фракции Р60 после разделения на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой. По оси абсцисс—поглощение при 280 нм; по оси ординат—номера фракций объемом по 5 мл; I—VII—белковые пики, разделяемые в ПААГ

Характерная картина, получаемая после фракционирования на ДЕАЕ-целлюлозе, приведена на рис. 1. Цифрами на нем обозначены 7 основных пиков. Полученные после электрофореза в ПААГ белковые спектры этих пиков показаны на рис. 2. По данным ряда исследователей [11, 15], белок 14-3-2 при электрофорезе в ПААГ по Davis равен 0,7. Такой подвижностью обладает основной компонент полученной нами фракции VI, исходя из чего она и была использована для дальнейшей очистки. Типичный белковый профиль этой фракции после гель-фильтрации на сефадексе G-150 показан на рис. 3. Видно, что при

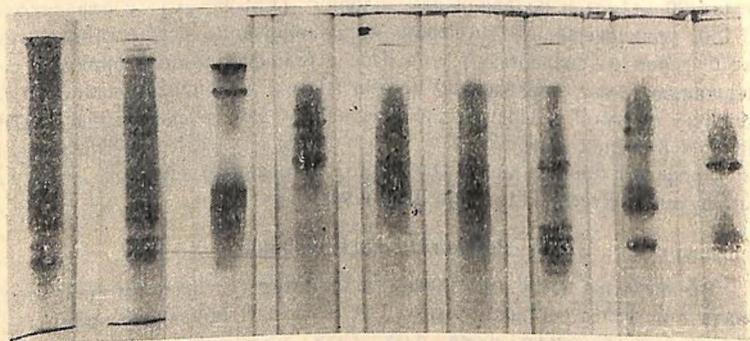


Рис. 2. Электрофорез белковых фракций. Слева направо: гомогенат, P60 и пики, полученные после разделения на ДЕАЕ-целлюлозе (I—VII)

этом она разделяется на 3 фракции. Сходная картина наблюдалась при выделении белка 14-3-2 из мозга крыс [11], причем и в этой работе для дальнейшей очистки использовалась фракция II. Окончательная очистка белка 14-3-2 достигалась препаративным электрофорезом в ПААГ при pH 8, который проводили именно при этом значении pH, поскольку попытки воспроизвести схему очистки путем хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе при pH 5, когда разделяются 14-3-2 и 14-3-3 [10], были неудачны, видимо, из-за того, что фракционирование при pH 5 ведется в зоне, близкой к изоэлектрической точке белка 14-3-2, вследствие чего он практически необратимо преципитирует. После электрофореза белок элюировали водой из хорошо размельченного ПААГ. Очищенный таким образом белок детектировался в виде четкой полосы при электрофорезе в ПААГ [13]. Как видно из рис. 4, Rf выделяемой фракции составляет 0,7, и после последней стадии (препаративного электрофореза в ПААГ) она представляет собой гомогенный препарат. В отличие от этого белковый препарат, полученный от Б. Мура, образует одну добавочную фракцию как по нашим данным, так и по данным Grasso и соавт. [10]. Одна из двух основных фракций этого препарата и очищенный нами белок полностью идентичны при электрофорезе в ПААГ (рис. 5). Важным дополнительным критерием иден-

тичности этих белков являются результаты иммунологического анализа. Белок 14-3-2, очищенный нами, и белковый препарат, полученный от Б. Мура, дает реакцию полной иммунологической идентичности в кросс-реакции с антисывороткой к антигену Д (рис. 6).

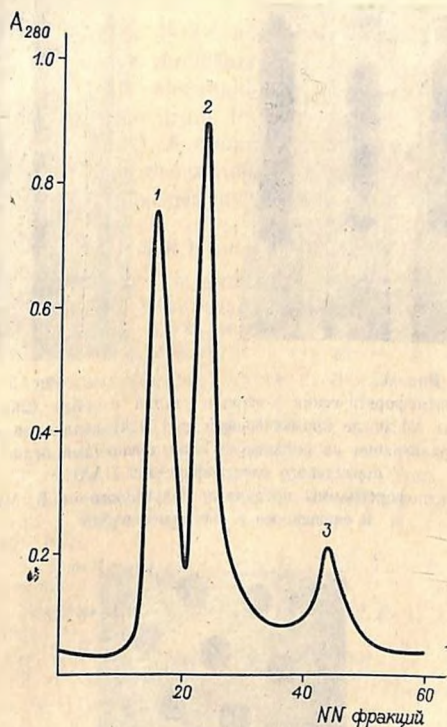


Рис. 3. Белковый профиль фракции VI после гель-фильтрации на сефадексе G-150. Объем фракций—2 мл

Вопрос о природе енолазной активности белка 14-3-2 требует дополнительных исследований. Необходимо очень точно разделять 14-3-2 и 14-3-3, что нечетко показано в предыдущих работах [16]. Отсюда и не совсем убедительные, на наш взгляд, доказательства идентичности 14-3-2 и NSE некоторыми исследователями [17]. В связи с этим нет единого мнения о минимальной величине M нативной молекулы. Так, по данным ряда авторов, она варьирует от 25 до 73 кД [2, 3, 10]. Не следует, однако, исключать возможности, что при иммунологическом контроле этапов очистки белка реагировать с антителами к 14-3-2 могут несколько фракций, и он может оказаться гетерогенным *in vivo*, как это показано для S-100 [18]. Это вполне объяснило бы разноречивость результатов в определении величины M и некоторых других физико-химических свойств белка. Возможно, что гетерогенность вызвана существ-

ванием олигомерных форм 14-3-2, сохраняющих иммунореактивность. Неоднократные указания на тенденцию к агрегации 14-3-2 *in vitro* [5, 10] делают более вероятным это предположение.

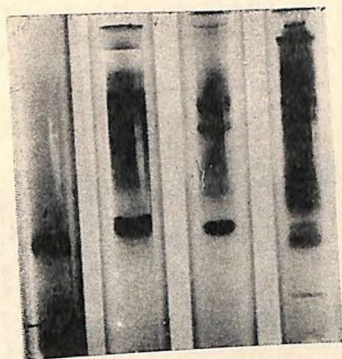


Рис. 4

Рис. 4. Электрофоретический контроль стадий очистки. Слева направо: Р60, фракция VI после хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе, фракция II после гель-фильтрации на сефадексе G-150, очищенный белок после сравнительного электрофореза в ПААГ

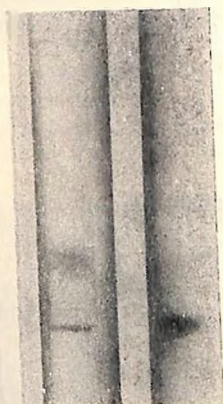


Рис. 5

Рис. 5. Электрофореграммы препарата, полученного от Б. Мура (слева) и очищенного в настоящей работе

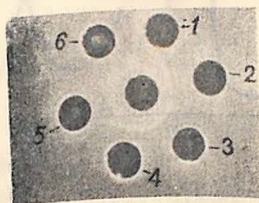


Рис. 6. Реакция двойной иммунодиффузии в агаровом геле. В центре—антисыворотка к антигену Д: 1—экстракт мышц; 2—белок 14-3-2, полученный от Б. Мура; 3—препарат, очищенный в настоящей работе; 4—экстракт мозга; 5—экстракт печени; 6—экстракт сердца

Отсюда вытекает необходимость уточнения ряда данных о содержании 14-3-2 в различных органах и тканях, что может существенно влиять на точку зрения о ценности его определения в биологических жидкостях с диагностической целью в клинической практике.

Авторы выражают глубокую признательность Б. Муру (Вашингтонский университет, Сент-Луис, США) и А. Грассо (Институт биологии клетки, Рим, Италия), Я. В. Белику и Г. А. Бережному (Институт биохимии им. А. В. Палладина, Киев) за предоставление препарата белка 14-3-2, антигена Д и антисыворотки к антигену Д.

PURIFICATION OF NEUROSPECIFIC PROTEIN 14-3-2

NAZARYAN K. B., KARAPETYAN N. H., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

Neurospecific protein 14-3-2 has been purified from bovine brain by means of ion-exchange chromatography, gel-filtration and preparative electrophoresis. On PAG electrophoresis (10%) it produced a single band comigrating with the main fraction of protein 14-3-2, received from prof. B. Moore (USA). A complete immunological identity of these two preparations has been demonstrated. Both of them crossreacted with antiserum to antigen D (Ouchterlony immunodiffusion technique).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Moore B. W., McGregor D. J. *Biol. Chem.*, **240**, 1647—1653, 1965.
2. Bennett S. G., Edelman G. M. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6234—6241, 1968.
3. Kawakita H. *J. Neurochem.*, **19**, 87—90, 1972.
4. Бережной Г. А., Белик Я. В., Горбань В. А. *Укр. биохим. ж.*, **47**, 411—416, 1975.
5. Marangos P. J., Zomzely-Neurath C., York C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **68**, 1309—1316, 1976.
6. Bock E., Dissing J. *Scand. J. Immunol.*, **4**, 31—36, 2, 1975.
7. Rider C. C., Taylor C. B. *Biochem. Biophys. Acta*, **405**, 175—187, 1975.
8. Marangos P. J., Parma A. M., Goodwin F. K. *J. Neurochem.*, **31**, 727—732, 1979.
9. Thompson R. J. *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 489—491, 1980.
10. Grasso A., Roda G., Hogue-Angelletti R. A., Moore B. W., Perez V. *J. Brain Res.*, **124**, 497—507, 1977.
11. Marangos P. J., Zomzely-Neurath C., Luk D. C. M., York C. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1884—1891, 1975.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
13. Davis B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427, 1964.
14. Гусев А. И.—В кн.: Иммунохимический анализ (под ред. Л. А. Зильбера), М., Медицина, с. 99—119, 1968.
15. Boston P., Jackson P. *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 617—618, 1980.
16. Sakimura K., Yoshida Y., Nabeshima Y., Takahashi Y. *Proc. Jap. Acad. B55*, 323—328, 1979.
17. Bock E., Lynne F., Rider C., Taylor C. *J. Neurochem.*, **30**, 161—186, 1978.
18. Полежаев А. Б., Куприяненко Т. И. *Биохимия*, **45**, 2153—2157, 1980.

Институт экспериментальной
биологии АН АрмССР, Ереван

Поступила 1. IX 1982

УДК 612.8.015:612.84:577.95:577.158.4

ОСОБЕННОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФОРМ ГАМК-ТРАНСАМИНАЗЫ ЗРИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗАТОРА СОБАК В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

АГАЕВ Т. М., ПИГАРЕВА З. Д.

Установлено, что во фракциях митохондрий отдельных образований зрительного анализатора мозга собак в постнатальном онтогенезе как активность ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т-азы), так и интенсивность образования продуктов ее реакции—глутамонатах исследуемых тканей к 45-дневному возрасту не регистрируется такое снижение активности ГАМК-Т-азы, как во фракции митохондрий. Напротив, в ткани переднего двухолмия (ПД) и наружных коленчатых тел (НКТ) она даже возрастает. К 90-му дню активность ГАМК-Т-азы во фракции митохондрий ПД увеличивается, тогда как в ткани уменьшается, отсюда следует, что перестройки ГАМК-Т-азы во фракции митохондрий более значительны, чем на уровне всей ткани. Интенсивность образования ГК в митохондриях структур зрительного анализатора неодинакова на отдельных этапах постнатального развития в каждом из его образований, тогда как уровень АК в периоде прозревания практически одинаков.

В тканях и митохондриях структур зрительной системы при световой депривации отмечается достоверное уменьшение удельной активности ГАМК-Т-азы, которое наиболее ярко выражено в НКТ. Все три образования зрительного анализатора в этот период почти в равной мере отличаются по этому показателю от контроля. Интенсивность образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции, как правило, достоверно меньше, чем в митохондриях контрольных животных.

Ранее были опубликованы данные, свидетельствующие о том, что онтогенетическое формирование ферментной системы ГАМК-Т-азы (4-аминобутират-2-оксиглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.19) в ткани отдельных образований зрительного анализатора мозга собак, а также в функционально сопряженных с этим анализатором двигательной и пульсов и существенно изменяется при развитии животного в темноте [1, 2].

Из литературы известно наличие в мозгу нескольких форм ГАМК-Т-азы. В митохондриях сосредоточены в основном катионные формы фермента; его анионные формы локализованы вне митохондрий [3]. Учитывая эти данные и исходя из результатов проведенных ранее исследований, в работе была поставлена задача изучить возрастную динамику активности ГАМК-Т-азы во фракциях митохондрий отдельных образований зрительного анализатора мозга собак, развивающихся в

обычных условиях светового режима, а также в условиях световой депривации, и сопоставить результаты с ранее полученными в отношении возрастной динамики активности ГАМК-Т-азы в ткани этих же образований зрительного анализатора. Таким образом, предполагалось выявить роль отдельных форм ГАМК-Т-азы в становлении биохимических процессов, обеспечивающих осуществление функции зрения.

Материалы и методы

Применялся онтогенетический метод исследования, позволяющий проследить закономерности изменений активности ГАМК-Т-азы на отдельных этапах созревания зрительной системы в постнатальном онтогенезе. Опыты проведены на собаках в возрасте 12—16 (прозревание), 21, 45 и 90 дней. Часть животных содержалась с момента рождения до 3-месячного возраста в специальных темновых камерах [1].

Фракции митохондрий выделялись из ткани зрительной коры (поле 17), ПД и НКТ. При этом использовали метод дифференциального центрифугирования в 0,32 М сахарозе [4].

В выделенных фракциях митохондрий определяли активность ГАМК-Т-азы по методу, описанному Ниловой [5]. Инкубационная смесь состояла из 0,5 мл 0,005 М α -кетоглутаровой кислоты, 0,5 мл 0,05 М ГАМК и митохондрий. Инкубация длилась 30 мин в атмосфере азота. Количество ГК и формирующейся при этом АК определяли, используя высоковольтный электрофорез [6].

Активность ГАМК-Т-азы выражали в мкмоль ГК, образующейся в митохондриях, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч.

В процессе течения ГАМК-Т-азной реакции из образующейся ГК формируется АК, что имеет место и в условиях используемой инкубационной среды [7, 8], поэтому в каждом опыте определяли интенсивность образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции. Результаты их выражали в мкмоль соответствующей аминокислоты, образующейся в течение 30 мин в митохондриях, выделенных из 1 г свежей ткани. Содержание белка во всех случаях определяли по методу Lowry и соавт. [9].

Результаты и обсуждение

Эксперименты показали, что в норме активность ГАМК-Т-азы (табл. 1) в митохондриальных фракциях отдельных образований анализатора неодинакова и имеет своеобразную возрастную динамику.

Удельная активность ГАМК-Т-азы в митохондриях в процессе постнатального онтогенеза меняется. В период созревания уровень активности фермента наименьший в митохондриях ПД. После 21-го дня к 45-му активность резко уменьшалась в митохондриях всех исследуемых структур. К 3-месячному возрасту активность фермента в митохондриях зрительной коры (поле 17) уменьшалась и увеличивалась в митохондриях ПД, оставаясь неизменной в митохондриях НКТ.

Таким образом, в митохондриях изучавшихся образований зрительного анализатора формирование ГАМК-Т-азной активности в постнатальном онтогенезе происходит в определенном соответствии с накоплением фондов соответствующих белков.

Сопоставление приведенных данных с результатами, зарегистрированными на тканевом уровне (табл. 1), позволяет отметить определенные отличия в возрастной динамике тканевого и митохондриального фондов ГАМК-Т-азы.

Таблица 1
Удельная активность ГАМК-Т-азы во фракциях митохондрий структур зрительного анализатора мозга собаки в постнатальном онтогенезе (в мкмоль ГК /мг белка/ч, n = 5—10).

Возраст животных в днях	Зрительная кора (поле 17)		ПД		НКТ	
	митохон- дрии	ткань	митохон- дрии	ткань	митохон- дрии	ткань
12—16	12,4±0,9	5,26±0,25	10,7±0,6	4,35±0,15	14,70±0,96	4,71±0,21
21	15,40±0,95	3,84±0,17	10,40±0,75	2,85±0,12	14,9±1,0	4,63±0,19
p	<0,05	<0,001	>0,5	<0,001	>0,5	>0,5
45	3,80±0,45	4,81±0,25	2,70±0,25	6,50±0,27	5,00±0,40	5,43±0,18
p	<0,001	>0,1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
90	2,55±0,20	3,43±0,22	3,60±0,40	4,33±0,10	5,20±0,28	4,57±0,25
p	<0,001	<0,001	<0,001	>0,5	<0,001	>0,5

Примечание. p—достоверность различий по сравнению с данными для группы 12—16-дневных животных

Так, в период с 12—16 и 21-го дней на фоне некоторого увеличения удельной активности фермента в митохондриях зрительной коры и стабильности ее в митохондриях ПД и НКТ в ткани зрительной коры и ПД она резко снижалась, но не изменялась в ткани НКТ. К 45-дневному возрасту, в период значительного уменьшения удельной активности в митохондриях всех структур, в ткани этих структур она нарастала. К 90-суточному возрасту активность в ткани всех структур уменьшалась. Этому соответствовало снижение удельной активности только в митохондриях зрительной коры, в митохондриях ПД активность увеличивалась и оставалась неизменной в митохондриях НКТ.

Приведенные данные позволяют полагать, что в период 45—90 дней постнатального онтогенеза в изучавшихся структурах мозга собак формируются митохондрии, отличающиеся меньшей активностью ГАМК-Т-азы, чем на более ранних этапах развития (12—16 и 21-й дни). В то же время в ткани поддерживается относительно стабильный и высокий уровень активности ГАМК-Т-азы, видимо, в большей мере за счет немитохондриальных форм фермента.

В табл. 2 обобщены результаты определения интенсивности образования ГК и сопутствующего формирования АК в ходе ГАМК-Т-азной реакции в изучавшихся митохондриях. Эти данные сопоставлены с результатами, полученными на тканевом уровне.

Интенсивность образования ГК в митохондриях структур зритель-

ного анализатора на отдельных этапах постнатального онтогенеза неодинакова. Она наибольшая в митохондриях зрительной коры в 45-дневном возрасте, а в митохондриях ПД и НКТ—в возрасте 12—16 дней, у 3-месячных собак образование ГК во всех митохондриях происходило менее интенсивно, чем на более ранних этапах развития; причем оно было выше в митохондриях НКТ, меньше и практически одинаково в митохондриях зрительной коры и ПД.

Таблица 2

Интенсивность образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции во фракциях митохондриальной структуры зрительного анализатора мозга собак в постнатальном онтогенезе (в мкмоль ГК и АК на массу митохондрий, выделенных из 1 г свежей ткани за 30 мин инкубации; n = 5—10)

Возраст животных в днях	Зрительная кора (поле 17)		ПД		НКТ	
	митохондрии	ткань*	митохондрии	ткань*	митохондрии	ткань*
ГК						
12—16	1,21±0,01	1,27±0,02	1,15±0,02	1,29±0,05	1,45±0,03	1,84±0,06
21	1,47±0,04	1,86±0,04	0,92±0,01	0,97±0,04	1,24±0,08	2,44±0,07
р	<0,05	<0,01	<0,001	<0,01	<0,05	<0,001
45	1,65±0,05	2,27±0,08	0,96±0,03	2,00±0,09	0,81±0,01	2,40±0,12
р	<0,01	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001
90	0,73±0,04	2,20±0,14	0,77±0,04	2,30±0,13	0,90±0,05	2,32±0,08
р	<0,01	<0,01	<0,001	<0,01	<0,01	<0,05
АК						
12—16	0,28±0,02	0,37±0,02	0,30±0,01	0,37±0,02	0,32±0,01	0,28±0,01
21	0,23±0,01	0,62±0,05	0,25±0,01	0,41±0,05	0,290±0,004	0,60±0,05
р	<0,05	<0,01	>0,5	>0,5	<0,05	<0,01
45	0,45±0,01	0,65±0,07	0,43±0,03	0,77±0,39	0,37±0,01	0,86±0,03
р	<0,01	<0,01	>0,5	<0,01	<0,05	<0,01
90	0,33±0,08	0,98±0,09	0,23±0,04	0,92±0,06	0,31±0,01	0,88±0,05
р	>0,1	<0,01	>0,1	<0,001	>0,5	<0,001

Примечание. р—достоверность различий по сравнению с данными для группы 12—16-дневных щенков; * расчет произведен в мкмоль ГК и АК /г ткани/ мин инкубации

Образование АК в 12—21-дневном возрасте практически было одинаково во всех митохондриях. Оно нарастало к 45-дневному возрасту и несколько снижалось к 3-м месяцам, особенно в митохондриях ПД.

Характер ГАМК-Т-азной реакции (по показателю интенсивности образования ГК) в митохондриях изучавшихся структур анализатора несколько отличался от такового в ткани. В ткани зрительной коры при сходстве возрастной динамики этого процесса не наблюдалось столь резкого падения его активности к 90-му дню, как в митохондриях. В ткани ПД в период 45—90 дней и в ткани НКТ с 21-го дня регистрировалось резкое повышение образования ГК с сохранением довольно стабильного уровня.

Формирование АК из ГК в процессе ГАМК-Т-азной реакции в ткани зрительной коры увеличивалось с 21-го дня, поддерживалось ста-

бильным в возрасте 45 дней и вновь нарастало к 90-му дню. В ПД резкое нарастание образования АК отмечалось с 45 до 90 дней. В НКТ «выход» АК увеличился с 21- до 45-го дня.

Расчеты показывают (табл. 3), что соотношения между величинами интенсивности образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции в процессе развития меняются с характерными для каждого типа митохондрий особенностями.

В период от 12—16 до 21 дня величины этих соотношений в митохондриях зрительной коры и ПД численно выше, чем в ткани этих же образований анализатора.

Таблица 3
Соотношение между интенсивностью образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции в тканях и митохондриальных фракциях структур зрительного анализатора мозга собаки в постнатальном онтогенезе

Возраст животных в днях	Структуры анализатора					
	Зрительная кора (поле 17)		ПД		НКТ	
	митохон- дрии	ткань	митохон- дрии	ткань	митохон- дрии	ткань
12—16	4,32	3,43	3,83	3,49	4,53	6,57
21	6,39	3,00	3,68	2,35	4,28	4,66
45	3,67	3,50	2,23	2,60	2,19	2,80
90	2,21	2,29	3,34	2,37	2,90	2,63

В то же время в митохондриях НКТ, напротив, соответствующие параметры несколько значительнее в ткани. В период 45 и 90 дней эти величины сравнимы в митохондриях ткани зрительной коры и НКТ, но остаются более высокими в митохондриях ПД.

В условиях световой депривации (возраст 90 дней) активность ГАМК-Т-азы во фракциях митохондрий изучавшихся структур мозга была ниже, чем в норме (табл. 4), и составляла в зрительной коре (поле 17), ПД и НКТ соответственно 63, 81 и 30% от контроля, в большей мере изменяясь в НКТ. Снижение активности ГАМК-Т-азы в этих условиях в митохондриях в зрительной коре и особенно ПД было выражено слабее, чем в ткани. Однако в митохондриях НКТ оно было значительнее (соответственно в митохондриях—70%, в ткани—56%).

При световой депривации отмечается снижение интенсивности образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции во фракциях митохондрий всех изучавшихся образований зрительного анализатора (табл. 4). В митохондриях зрительной коры (поле 17), ПД и НКТ оно составляло по ГК 27, 30 и 24% от контроля. Снижение интенсивности образования ГК в митохондриях зрительной коры (поле 17) и НКТ выражено в большей мере, чем в ткани этих структур. В ПД отмечается практически одинаковая картина как на ткани, так и в митохондриях.

В отношении образования АК в ГАМК-Т-азной реакции имеются особенности. Интенсивность его в митохондриях зрительной коры (по-

ле 17) и НКТ уменьшалась менее значительно, чем в ткани (на 37% и 45% по сравнению с контролем), а в ткани соответственно на 59 и 64%. В ПД на фоне стабильности в митохондриях в ткани «выход» АК резко тормозился (71% по сравнению с контролем). В условиях световой депривации меняются соотношения между величинами интенсивности образования ГК и АК. Эти изменения в основном касаются митохондрий.

Таблица 4

Активность ГАМК-Т-азы и образование ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции в тканях и фракциях митохондрий структур зрительного анализатора мозга собак в возрасте 90 дней в норме и в условиях световой депривации (n=6—10)

Условия опыта	Зрительная кора (поле 17)		ПД		НКТ	
	митохондрии	ткань	митохондрии	ткань	митохондрии	ткань
Активность ГАМК-Т-азы						
Норма	106,0±6,2	346,0±11,6	148,0±10,5	421,0±9,6	209,0±22,4	434,0±13,5
Депривация	67,00±0,75	169,0±8,5	120,0±3,6	170,0±9,6	64,0±2,5	190,0±2,5
p	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001
Образование ГК в ГАМК-Т-азной реакции						
Норма	0,73±0,01	2,20±0,14	0,77±0,04	2,30±0,13	0,90±0,05	2,32±0,08
Депривация	0,20±0,01	1,18±0,12	0,23±0,01	0,60±0,07	0,22±0,04	0,80±0,09
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
Образование АК в ходе ГАМК-Т-азной реакции						
Норма	0,33±0,08	0,98±0,09	0,23±0,04	0,92±0,06	0,31±0,01	0,88±0,05
Депривация	0,21±0,05	0,45±0,04	0,25±0,02	0,27±0,02	0,17±0,05	0,32±0,02
p	<0,01	<0,001	>0,5	<0,01	<0,001	<0,001
Соотношение между интенсивностью образования ГК и АК (ГК/АК)						
Норма	2,21	2,24	3,24	2,50	2,90	2,80
Депривация	1,00	2,62	0,92	2,20	1,30	2,50

Примечание. p—достоверность различий между данными контроля и опыта

Таким образом, исключение потока световой импульсации в период созревания вызывает существенные сдвиги уровня активности ГАМК-Т-азы и образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции. Эти изменения проявляются с некоторыми отличиями на тканевом и митохондриальном уровне в каждом образовании анализатора. При этом уменьшение активности ГАМК-Т-азы в зрительной коре и ПД в большей мере выражены в ткани, а в НКТ—в митохондриях. Снижение скорости образования ГК в митохондриях зрительной коры и НКТ значительнее,

чем в ткани, а в ПД практически одинаково на обоих уровнях. Уменьшение «выхода» АК во всех структурах заметнее в ткани, чем в митохондриях.

Данные проведенного исследования позволяют заключить о различиях в свойствах и реактивности ГАМК-Т-азы, локализованной в митохондриях и других структурах клеток мозговой ткани. Каждая из форм ГАМК-Т-азы, видимо, отличается по возрастным закономерностям их формирования. В частности, можно отметить значительные отличия в уровне активности митохондриальной ГАМК-Т-азы в первые 45 дней постнатального онтогенеза по сравнению с более поздними этапами развития. Поскольку, по данным нейроморфологов [10, 11], в период 1—45 дней постнатального онтогенеза образуются в основном пирамидные нейроны, можно полагать, что нейроны ассоциативного и других типов, развитие которых начинается и завершается позднее, чем пирамидных, обладают меньшей активностью ГАМК-Т-азы в митохондриях.

При развитии животных в условиях световой депривации отмечают значительные морфологические и биохимические перестройки в зрительном и других анализаторах мозга [12, 13]. В этих условиях снижается интенсивность дыхательной и фосфорилирующей активности с ГК в качестве субстрата в митохондриях различных образований мозга [14], а также уменьшается активность глутаматдегидрогеназы [15].

Содержание ГАМК в структурах зрительного анализатора повышается [16]. Эти данные свидетельствуют о том, что нарушение условий деятельности зрительного анализатора вызывает существенные перестройки в системе ГАМК.

Приведенные результаты показывают, что при депривации обнаруживаются отличия в характере и выраженности изменений отдельных форм ГАМК-Т-азы в различных образованиях зрительного анализатора. Видимо, эти изменения связаны и отражают состояние обмена ГАМК в митохондриях нервных окончаний по сравнению с митохондриями других клеточных структур [17]. ГК и АК рассматриваются как нейромедиаторы в центральных структурах мозга [18, 19], показаны особенности возрастных сдвигов в фонде этих аминокислот в отдельных образованиях зрительного анализатора мозга контрольных и зрительно-депривированных собак [16]. Полученные нами данные позволяют считать, что в условиях световой депривации образование ГК в ГАМК-Т-азной реакции снижается в митохондриях в большей мере, чем в ткани. Изменение соотношений интенсивности образования ГК/АК в митохондриях за счет более выраженного уменьшения «выхода» ГК, по-видимому, является указанием на особое значение ГК как нейромедиатора для зрительной функции intactных животных.

Результаты настоящего исследования позволяют заключить, что сдвиги активности ГАМК-Т-азы при световой депривации касаются митохондриальной и других ее форм. Это указывает на важную роль ГАМК-Т-азы шунта не только в нервных окончаниях, но и в клетке в целом. О функциональной обусловленности онтогенетических измене-

ний отдельных форм ГАМК-Т-азы свидетельствуют отличия соответствующих сдвигов в норме и при световой депривации в каждом из изучавшихся образований анализатора, с их большей выраженностью в НТК—структуре, тесно связанной с восприятием и проведением световых импульсов.

MITOCHONDRIAL GABA-TRANSAMINASE OF DOG VISUAL ANALYZER IN POSTNATAL ONTOGENESIS

AGAEV T. M., PIGAREVA Z. D.

Institute of Physiology, Azerbaijan SSR Academy of Sciences, Baku
Institute of Brain, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The mitochondrial GABA-transaminase (GABA—T) activity and the rates of glutamic and aspartic acids formation have been studied in some regions of dog visual analyzer in postnatal ontogenesis. In 45-days old animals activity of mitochondrial GABA—T in these tissues diminishes, at the same time increasing in corpora quadrigemina anterior and corpora geniculata lateralis (CGL). In 90-days old animals activity of GABA—T in CGL increases in mitochondria but decreases in the whole tissue. The rate of glutamic acid formation in mitochondria varies in different regions of visual analyzer in the course of postnatal ontogenesis, that of aspartic acid doesn't change essentially.

In light deprived animals GABA—T loses activity both in the whole tissue and in mitochondria (being the lowest in CGL); the rates of glutamic and aspartic acids formation is lower than in control animals.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаев Т. М. Укр. биохим. ж., 51, 31—34, 1979.
2. Агаев Т. М., Пигарева З. Д., Ибраимова З. Н. Вопросы мед. химии, 26, 611—615, 1981.
3. Waksman A., Bloch M. J. Neurochem., 34, 609—613, 1968.
4. De Robertis E., Sellinger O. Z., Rodriguez H. et al. J. Neurochem., 14, 81—89, 1967.
5. Нилюва Н. С. ДАН СССР, 2, 483—486, 1966.
6. Козлов Э. А., Алиев Т. В. Укр. биохим. ж., 44, 263—267, 1972.
7. Бунятян Г. Х., Нерсисян Р. Р.—В кн.: Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1, с. 5—13, 1964.
8. Krebs H. A., Bellamy D. Biochem. J., 75, 523—529, 1960.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
10. Поляков Г. Н.—В кн.: Проблемы динамической локализации функций мозга, М., Медицина, с. 86—94, 1968.
11. Боголепов Н. Н. Ультраструктуры синапсов в норме и патологии, М., Медицина, с. 96, 1975.
12. Пигарева З. Д. Успехи совр. биол., 79, 1, 48—63, 1975.
13. Пигарева З. Д. и др.—В кн.: Развивающийся мозг и среда (под ред. А. А. Волохова), М., Наука, с. 142—192, 1980.
14. Кимышева А. С.—В кн.: Функционально-структурные основы системной деятельности и пластичности мозга, М., Ин-т мозга АМН СССР, 4, с. 403—407, 1974.

15. Буснюк М. М. Ж. высш. нерв. деят., 8, 2, 402—407, 1978.
16. Агаев Т. М., Пигарева З. Д.— В сб.: Структурно-функциональные основы организации мозга, М., Ин-т мозга АМН СССР, 7, с. 106—109, 1978.
17. Кунерт Э., Доведова Е. Л. Вопросы мед. химии, 24, 460—466, 1979.
18. Bondy S. C., Purdy J. L. Brain Res. 119, 403—416, 1977.
19. Curtts D. R. Proc. Austral Physiol and Pharmacol. Soc., 9, 2, 99—105, 1978.

Институт физиологии АН АзербССР, Баку
Институт мозга АМН СССР, Москва

Поступила 8. IV 1982

УДК 577.17:612.26:612.45:612.826

ИНТЕНСИВНОСТЬ ГЛИКОЛИЗА И ДЫХАНИЯ В ТКАНЯХ КОРЫ, ГИППОКАМПА И ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

ПОДВИГИНА Т. Т., БОГДАНОВА Т. С., МИТЮШОВ М. И.

Изучено действие кортикостероидных гормонов на показатели интенсивности гликолиза, дыхания и окислительного фосфорилирования в срезах и гомогенатах коры, гиппокампа и гипоталамуса крыс. Добавление в инкубационную среду кортикостерона, гидрокортизона и дезоксикортикостерона оказало одностороннее действие в трех исследованных структурах мозга: усиление интенсивности гликолиза в срезах и торможение скорости дыхания срезов и гомогенатов этих структур. Введение гидрокортизона крысам вызвало аналогичный эффект. По совокупности данных ткань гиппокампа оказалась наиболее чувствительной к действию исследованных гормонов, ткань коры проявила наименьшую чувствительность. Самым эффективным гормоном в стимуляции гликолиза был кортикостерон, наименее эффективным—дезоксикортикостерон, в торможении дыхания он оказался наиболее активным.

В настоящее время интенсивно исследуется вопрос о связывании кортикостероидов различными структурами мозга [1—3]. Однако работы, посвященные действию этих гормонов на метаболические процессы в различных отделах мозга, малочисленны. Нами было изучено в опытах *in vivo* и *in vitro* влияние кортикостероидов на некоторые показатели интенсивности гликолиза, дыхания и окислительного фосфорилирования в нервной ткани крыс. Сравнивались три структуры мозга: гиппокамп как структура, наиболее интенсивно поглощающая кортикостероидные гормоны [4, 5], гипоталамус—структура, играющая центральную роль в регуляции кортикостероидов [6—8], и кора, не отличающаяся высоким избирательным поглощением кортикостероидов и не имеющая специализированных центров регуляции гипоталамической системы.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 150—200 г. Интенсивность гликолиза изучали на срезах коры, гиппокампа и гипоталамуса. Техника получения и инкубации срезов была описана ранее [9]. Срезы инкубировали в атмосфере кислорода в течение 3 ч. Об интенсивности гликолиза судили по образованию молочной кислоты, которую определяли методом Barker, Summerson [10] и по расходу глюкозы, определяемой в инкубационной среде ортотолуидиновым методом с помощью набора Бю-ЛА-Тест (Прага, ЧССР). В инкубацион-

ной среде определяли также содержание пировиноградной кислоты энзиматическим методом с лактатдегидрогеназой по уменьшению количества NADH (UV—Test, Boehringer). Из-за невозможности определить на срезах мозга интенсивность фосфорилирования опыты по измерению дыхания и фосфорилирования были проведены на гомогенатах трех исследованных отделов мозга. В нескольких сериях опытов интенсивность дыхания определяли на срезах. Скорость потребления кислорода измеряли полярографическим методом с закрытым платиновым электродом при 27°. Состав инкубационной среды выражен в мМ: сахароза—170; трис-буфер—15, (рН—7,4); KH_2PO_4 —10; KCl —40 и мкМ: ADP—150; ДНФ—10; субстратом служил глутамат—3 мМ.

В опытах *in vitro* в инкубационную среду добавляли спиртовые растворы дезоксикортикостерона (ДОК), кортикостерона (КС), гидрокортизона (ГК) в концентрациях 10^{-7} — 10^{-4} г/мл. В контрольные пробы добавляли этиловый спирт соответствующей концентрации. Наибольшая концентрация спирта—0,96%, создаваемая при добавлении гормонов в дозе 10^{-4} г/мл, вызывала повышение скорости образования лактата тканью гиппокампа и гипоталамуса, остальные показатели изменялись незначительно, меньшие концентрации спирта не оказывали влияния.

В опытах *in vivo* крысам вводили внутривенно гидрокортизон-ацетат в дозе 1 мг/100 г. Интенсивность аэробного гликолиза в срезах изучали через 1 ч после введения гормона, а изменение других показателей энергетического обмена—через 3 ч, так как ранее в целом мозгу было обнаружено увеличение уровня лактата при 1-часовом действии ГК и нарастание содержания компонентов цикла Кребса—при 3-часовом [11]. Двустороннюю адреналэктомию осуществляли через люмбальный разрез под эфирным наркозом за 4 дня до опыта. Результаты опытов были обработаны статистическим методом Стьюдента.

Результаты исследований

Через час после введения ГК животным наблюдали отчетливое нарастание как потребления глюкозы, так и выделения молочной кислоты срезами гиппокампа, что могло свидетельствовать об усилении гликолиза в этой структуре мозга. В срезах гипоталамуса и коры мозга достоверных изменений не было обнаружено (табл. 1). Через 3 ч после введения гормона получали снижение величины дыхательного контроля (ДК_I и ДК_{II}) и увеличение времени фосфорилирования в гомогенатах всех 3-х исследованных структур мозга, однако в коре эти изменения были наименее выражены (табл. 1).

Известно, что адреналэктомия усиливает поглощение КС структурами мозга, особенно гиппокампа [3, 12]. В этих условиях можно было ожидать и усиления биохимического эффекта под действием вводимого гормона, поэтому в опытах на адреналэктомированных крысах, кроме обычно применяемой дозы ГК—1 мг/100 г, были использованы меньшие дозы—0,5 и 0,1 мг/100 г массы тела. Изменения, наблюдаемые в

Таблица 1

Влияние введения гидрокортизона (1 мг/100 г веса тела) intactным крысам на интенсивность гликолиза (через 1 ч после введения) и дыхания (через 3 ч) в срезах и гомогенатах коры, гиппокампа и гипоталамуса

Показатель	О т д е л м о з г а					
	к о р а		гиппокамп		гипоталамус	
	контроль	гидрокортизон	контроль	гидрокортизон	контроль	гидрокортизон
Потребление глюкозы (мкМ/г/ч)	29,5±2,3	30,00±2,50	28,80±3,04	39,10±2,62 $p<0,02$	31,30±3,21	35,00±3,52
Образование лактата (мкМ/г/ч)	33,3±3,2	31,7±3,3	39,50±3,70	49,10±3,40 $p<0,05$	43,30±3,28	53,10±3,70
V_{ADP} (натом O_2 /мг белка/мин)	23,30±1,87	20,40±1,46	15,50±1,25	14,00±1,60	13,00±0,85	11,20±0,70
$DK_I \left(\frac{V_{ADP}}{V_0} \right)$	2,90±0,17	2,60±0,17	2,40±0,12	1,90±0,07 $p<0,01$	2,90±0,16	2,30±0,13 $p<0,02$
$DK_{II} \left(\frac{V_{ADP}}{V_{ATP}} \right)$	4,60±0,16	4,00±0,24 $p<0,05$	3,90±0,22	3,30±0,18 $p<0,05$	4,50±0,26	3,80±0,18 $p<0,05$
t (мин)	1,40±0,12	1,70±0,13 $p<0,05$	1,90±0,13	2,40±0,18 $p<0,05$	2,20±0,10	2,80±0,21 $p<0,02$

Таблица 2

Влияние введения гидрокортизона адреналэктомированным (а/э) крысам на интенсивность гликолиза и дыхания в срезах и гомогенатах гиппокампа

	Потребление глюкозы (мкмоль/г/ч)	Образование лактата (мкмоль/г/ч)	V_{ADP} (натом O_2 /мг белка/мин)	$\left(\frac{V_{ADP}}{V_0}\right)$	$\left(\frac{V_{ADP}}{K_{ATP}}\right)$	t(мин)
а/э+Рингер	$35,90 \pm 1,69$	$45,80 \pm 2,75$	$18,3 \pm 1,2$	$2,30 \pm 0,11$	$3,80 \pm 0,19$	$2,00 \pm 0,12$
а/э+ГК 1,0 мг/100 г	$44,30 \pm 1,00$ $p < 0,01$	$53,10 \pm 1,33$ $p < 0,05$	$16,6 \pm 1,1$	$2,00 \pm 0,10$ $p < 0,05$	$3,50 \pm 0,18$	$2,40 \pm 0,14$ $p < 0,05$
а/э+ГК 0,5 мг/100 г	$33,40 \pm 1,27$	$48,80 \pm 1,64$	$17,5 \pm 2,2$	$2,20 \pm 0,11$	$3,70 \pm 0,18$	$2,20 \pm 0,13$
а/э+ГК 0,1 мг/100 г	$38,70 \pm 2,45$	$48,30 \pm 2,13$	$17,8 \pm 1,2$	$2,40 \pm 0,13$	$4,00 \pm 0,20$	$1,90 \pm 0,11$

Таблица 3

Потребление глюкозы и образование лактата срезами коры, гиппокампа и гипоталамуса при добавлении кортикостероидных гормонов в инкубационную среду
(в мкмоль/г/ч)

	К о р а		Гиппокамп		Гипоталамус	
	потребление глюкозы	образование лактата	потребление глюкозы	образование лактата	потребление глюкозы	образование лактата
Контроль (спирт 0,96%)	40,9±2,5	35,50±2,75	41,60±2,82	58,50±4,61	36,70±2,63	60,6±4,4
Гидрокортизон 10 ⁻⁴ г/мл	49,8±6,9 p<0,01	49,5±2,1 p<0,01	54,40±3,31 p<0,01	93,40±6,79 p<0,01	44,21±2,62 p<0,05	93,60±5,08 p<0,01
Кортикостерон 10 ⁻⁴ г/мл	53,8±3,93 p<0,02	54,70±4,61 p<0,02	56,90±2,93 p<0,01	110,60±4,61 p<0,01	48,80±3,84 p<0,05	92,90±4,20 p<0,01
Дезоксикортико- стерон 10 ⁻⁴ г/мл	47,90±3,65	63,90±5,63	51,60±3,20 p<0,05	84,90±5,10 p<0,01	42,80±2,82	78,80±5,88 p<0,05
Контроль (спирт 0,0096%)	39,30±2,10	34,3±2,9	37,30±2,25	45,90±2,01	35,60±2,74	41,00±2,85
Гидрокортизон 10 ⁻⁶ г/мл	36,40±2,00	33,3±3,0	41,60±1,50	53,30±2,07 p<0,05	—	—
Кортикостерон 10 ⁻⁶ г/мл	39,90±3,61	36,30±3,12	35,40±1,40	63,20±3,41 p<0,01	35,80±3,13	53,40±4,30 p<0,05
Дезоксикортико- стерон 10 ⁻⁶ г/мл	42,70±2,49	35,70±3,13	36,20±3,44	51,00±4,00	32,60±2,91	50,6±5,4
Кортикостерон 10 ⁻⁷ г/мл	—	—	37,20±2,53	56,90±3,36 p<0,02	36,20±2,85	50,9±4,5

ткани гиппокампа после однократного введения ГК в дозе 1 мг/100 г массы тела (табл. 2), по своей направленности были такие же, как и у интактных животных (табл. 1), хотя и менее выраженные. Количественное различие эффекта гормона у интактных и адrenaлэктомированных крыс статистически недостоверно. Введение меньших доз гормона никакого действия не оказало. По нашим данным, содержание КС в крови интактных животных составляет 17—20 мкг%, в то время как у адrenaлэктомированных крыс оно падает до 2—4 мкг%. Подобное снижение уровня гормона не повлияло на чувствительность нервной ткани к вводимому ГК. Это свидетельствует об отсутствии прямой связи между поглощением стероидов и их биохимическим действием на изученные показатели.

В опытах *in vitro* применяли спирторастворимые формы ГК, КС и ДОК. Добавление гормонов в инкубационную среду в концентрации 10^{-4} г/мл вызывало значительный прирост лактата и менее выраженное увеличение расхода глюкозы в срезах исследованных структур мозга (табл. 3). Судя по величине этих изменений, КС оказался наиболее эффективным. При уменьшении дозы КС до 10^{-6} г/мл наблюдалось повышение образования лактата только в срезах гиппокампа и гипоталамуса. В гиппокампе обнаружили достоверные изменения при применении КС в концентрации 10^{-7} г/мл.

Образование пирувата срезами гиппокампа определяли после инкубации их с КС и ДОК в концентрации 10^{-4} г/мл (табл. 4). КС вызывал увеличение содержания пирувата в инкубационной среде на 24%, а ДОК снижал его на 37%, то есть в данном случае гормоны оказывали противоположный эффект на обмен этого компонента. В этих же опытах определяли интенсивность дыхания срезов гиппокампа, которые после инкубации с гормонами быстро переносили в полярографическую ячейку с такой же по составу средой. В срезах, предварительно на 70% инкубация с КС в той же концентрации снижала скорость дыхания срезов на 24% (табл. 4).

Дальнейший анализ влияния кортикостероидных гормонов на интенсивность дыхания проводили на гомогенатах коры, гиппокампа и гипоталамуса. Применение гормонов в дозе 10^{-4} г/мл вызывало торможение дыхания гомогенатов трех исследованных структур мозга, близкое по степени выраженности (табл. 5). В действии ДОК, КС и ГК были обнаружены как количественные, так и качественные различия, независимые от исследуемого отдела мозга. ДОК значительно тормозил скорость дыхания гомогенатов как до добавки ADP (V_0), так и после нее (V_{ADP}). КС в этой дозе в меньшей степени снижал V_0 и существенно тормозил V_{ADP} . При действии ГК уменьшалась только скорость фосфорилирующего дыхания (V_{ADP}). Во всех случаях наблюдали снижение величины дыхательного контроля (V_{ADP}/V_0) и увеличение времени фосфорилирования. КС был применен в меньших дозах— 10^{-5} — 10^{-6} г/мл. Влияние гормона в этом случае проявилось

только на гомогенатах гиппокампа и гипоталамуса, где обнаружено снижение V_{ADP} , величины дыхательного контроля и удлинение времени фосфорилирования (табл. 5). Эти результаты подтверждают данные, полученные на митохондриях коры мозга ранее [13], о том, что ДОК ингибирует транспорт электронов по дыхательной цепи, в то время как влияние КС и ГК связано главным образом с энергетической регуляцией дыхания фосфорилированием.

Таким образом, как введение ГК животным, так и добавление кортикостероидных гормонов в инкубационную среду приводит к торможению скорости дыхания гомогенатов и усилению интенсивности глико-

Таблица 4

Влияние кортикостерона и дезоксикортикостерона в концентрации 10^{-4} г/мл на интенсивность дыхания срезов гиппокампа и на выделение ими лактата и пирувата

	Выделение пирувата мкмоль/г·ч	Выделение лактата мкмоль/г·ч	Лактат пируват	Потребление O_2 (натом, мг ткань/мин)
Контроль	$4,10 \pm 0,16$	$38,50 \pm 4,60$	$14,2 \pm 1,1$	$1,45 \pm 0,13$
Кортикостерон	$5,10 \pm 0,25$ $p < 0,01$	$110,60 \pm 4,61$ $p < 0,01$	$21,5 \pm 1,3$ $p < 0,01$	$1,10 \pm 0,10$ $p < 0,05$
Дезоксикортикостерон	$2,60 \pm 0,27$ $p < 0,01$	$81,90 \pm 5,10$ $p < 0,01$	$31,5 \pm 2,5$ $p < 0,01$	$0,45 \pm 0,05$ $p < 0,01$

лиза в срезах исследованных структур мозга. Наблюдаемое увеличение скорости гликолиза является, вероятно, специфичным для мозга, так как в периферических тканях было показано снижение интенсивности гликолиза под действием глюкокортикоидов [14—16]. Возникает вопрос, направлено ли это действие гормонов прямо на процесс гликолиза или опосредовано, например, их ингибирующим действием на интенсивность дыхания, обнаруженным в наших опытах. При применении ДОК в опытах *in vitro* в дозе 10^{-4} г/мл усиление образования лактата на 40% могло быть следствием торможения дыхания, которое наблюдалось на тех же самых срезах и достигало 70% (табл. 4). Ранее на митохондриях мозга было показано [13], что ДОК тормозит транспорт электронов на NAD-зависимом участке дыхательной цепи, в результате чего можно было ожидать накопления NADH. Это привело к значительному сдвигу лактатдегидрогеназной реакции в сторону образования лактата, о чем свидетельствует наблюдаемое нами увеличение отношения лактат/пируват на 120% (табл. 4).

Добавление КС в концентрации 10^{-4} г/мл вызывало усиление образования лактата в срезах гиппокампа на 90%, в то время как торможение дыхания срезов в этих условиях составляло всего 24%. На этом основании можно предположить, что глюкокортикоиды усиливают гликолиз не только вследствие торможения дыхания, но и другими путями, о чем свидетельствуют и некоторые косвенные данные: а) изменения показателей гликолиза в опытах *in vivo* наблюдались через 1 ч после введения ГК животным, а сдвиги в показателях окислительного обмена—только через 3 ч [11]; б) сдвиги показателей интенсивности

гликолиза в ответ на добавку КС и особенно ГК в дозе 10^{-4} г/мл были значительно более выражены, чем изменения показателей интенсивности дыхания (табл. 3, 5).

Таблица 5

Интенсивность поглощения кислорода и окислительного фосфорилирования в гомогенатах коры, гиппокампа и гипоталамуса при добавлении в инкубационную среду гидрокортизона, кортикостерона и дезоксикортикостерона ADP (в нате O_2 /мг белка/мин)

Условия опыта	V_o	V_{ADP}	$DK_1 \left(\frac{V_{ADP}}{V_o} \right)$	Время фосфорилирования в мин
Кора				
Контроль 1 (спирт—0,96%)	$17,7 \pm 1,1$	$38,0 \pm 1,7$	$2,20 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,06$
Гидрокортизон 10^{-4} г/мл	$15,8 \pm 1,0$	$30,2 \pm 1,5$ $p < 0,01$	$1,90 \pm 0,07$ $p < 0,02$	$1,30 \pm 0,07$ $p < 0,01$
Кортикостерон 10^{-4} г/мл	$13,8 \pm 1,0$ $p < 0,01$	$21,0 \pm 1,3$ $p < 0,01$	$1,50 \pm 0,06$ $p < 0,01$	$1,40 \pm 0,07$ $p < 0,01$
Дезоксикортикостерон 10^{-4} г/мл	$10,6 \pm 0,9$ $p < 0,01$	$15,4 \pm 1,0$ $p < 0,01$	$1,40 \pm 0,05$ $p < 0,01$	$3,20 \pm 0,12$ $p < 0,01$
Контроль 2 (спирт—0,096%)	$14,0 \pm 1,2$	$36,5 \pm 1,6$	$2,6 \pm 0,1$	$1,00 \pm 0,06$
Кортикостерон 10^{-5} г/мл	$13,7 \pm 1,1$	$34,2 \pm 1,3$	$2,46 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,07$
10^{-6} г/мл	$13,7 \pm 1,1$	$33,6 \pm 1,5$	$2,50 \pm 0,10$	$1,10 \pm 0,05$
Гиппокамп				
Контроль 1	$18,6 \pm 1,2$	$32,9 \pm 1,4$	$1,80 \pm 0,07$	$1,40 \pm 0,06$
Гидрокортизон 10^{-4} г/мл	$16,5 \pm 1,1$	$23,6 \pm 1,3$ $p < 0,01$	$1,40 \pm 0,05$ $p < 0,01$	$2,20 \pm 0,15$ $p < 0,01$
Кортикостерон 10^{-4} г/мл	$15,0 \pm 1,2$ $p < 0,05$	$17,8 \pm 1,3$ $p < 0,01$	$1,20 \pm 0,06$ $p < 0,01$	$2,40 \pm 0,09$ $p < 0,01$
Дезоксикортикостерон 10^{-4} г/мл	$10,8 \pm 1,1$ $p < 0,01$	$12,4 \pm 1,0$ $p < 0,01$	$1,10 \pm 0,05$ $p < 0,01$	$3,60 \pm 0,12$ $p < 0,01$
Контроль 2	$12,6 \pm 1,1$	$27,5 \pm 1,4$	$2,20 \pm 0,07$	$1,40 \pm 0,08$
Кортикостерон 10^{-5} г/мл	$11,8 \pm 0,9$	$23,5 \pm 1,4$ $p < 0,05$	$2,00 \pm 0,05$ $p < 0,05$	$1,90 \pm 0,11$ $p < 0,01$
10^{-6} г/мл	$11,7 \pm 1,1$	$22,1 \pm 1,3$ $p < 0,05$	$1,80 \pm 0,07$ $p < 0,01$	$1,80 \pm 0,10$ $p < 0,01$
Гипоталамус				
Контроль 1	$11,70 \pm 0,50$	$29,7 \pm 1,3$	$2,50 \pm 0,10$	$1,65 \pm 0,10$
Гидрокортизон 10^{-4} г/мл	$10,7 \pm 0,6$	$23,8 \pm 1,3$ $p < 0,01$	$2,30 \pm 0,08$ $p < 0,01$	$1,95 \pm 0,09$ $p < 0,01$
Кортикостерон 10^{-4} г/мл	$10,20 \pm 0,70$	$20,5 \pm 1,1$ $p < 0,01$	$2,00 \pm 0,10$ $p < 0,01$	$2,10 \pm 0,11$ $p < 0,02$
Контроль 2	$11,50 \pm 0,80$	$28,8 \pm 1,2$	$2,50 \pm 0,11$	$1,70 \pm 0,14$
Кортикостерон 10^{-5} г/мл	$11,00 \pm 0,85$	$23,5 \pm 1,4$ $p < 0,02$	$2,10 \pm 0,10$ $p < 0,05$	$1,85 \pm 0,15$ $p < 0,05$
10^{-6} г/мл	$10,60 \pm 0,50$	$24,3 \pm 1,6$ $p < 0,05$	$2,30 \pm 0,14$	$1,95 \pm 0,12$

В тех случаях, когда не наблюдается повышение использования глюкозы срезом или же когда образование молочной кислоты в среде инкубации изменяется сильнее, чем расходуется глюкоза, можно предположить, что избыток лактата образуется из неглюкозных источников.

Литературные данные о действии КС на этот процесс в головном мозгу отсутствуют.

Результаты, полученные в опытах *in vivo* и *in vitro*, свидетельствуют о том, что кора мозга крыс наименее чувствительна к действию кортикостероидных гормонов. Сравнивая гипоталамус и гиппокамп, можно отметить большую реактивность последнего, особенно по изменению показателей гликолиза. Повышенная чувствительность гиппокампа к КС сопоставима с его способностью связывать гормоны более интенсивно, чем другие отделы мозга.

EFFECT OF CORTICOSTEROID HORMONES ON THE RATE OF GLYCOLYSIS, RESPIRATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION PROCESSES IN RAT BRAIN

PODVIGINA T. T., BOGDANOVA T. S., MITYUSHOV M. I.

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

This paper deals with the effect of corticosteroids on the parameters of glycolysis, respiration and oxidative phosphorylation processes in rat cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus. Corticosterone, hydrocortisone and desoxycorticosterone intensify glycolysis in the slices and inhibit respiration both in the slices and homogenate of all three regions tested (in vitro experiments). Treatment with hydrocortisone (in vivo) had a similar effect. Hippocampus proved to be the most corticosteroid-sensitive tissue, while cortex was the least sensitive one. Corticosterone was the most effective hormone in stimulating glycolysis while desoxycorticosterone—the least effective one. Respiration was most potently inhibited by desoxycorticosterone.

ЛИТЕРАТУРА

1. McEwen B. S., Pfaff D. W.—In: Frontiers in neuroendocrinology (Eds. Ganong W. F., Martini L.), N. Y., p. 267—299, 1973.
2. Rhee R. W., Grosser R. I., Stevens W. Brain Res., 83, 293—300, 1975.
3. Stith R. D., Person R. I., Gana R. C. Brain Res., 117, 115—124, 1976.
4. McEwen B. S., Weiss M., Schwartz L. S. Brain Res., 16, 227—241, 1969.
5. McEwen B. S. Progr. in Brain Res., 39, 87—97, 1973.
6. Harris G. W. Physiol. Rev., 28, 139—179, 1948.
7. Mangili G., Motta M., Martini L.—In: Neuroendocrinology (Eds. Martini L., Ganong W. F.) Acad Press, N. Y.—London, p. 297—370, 1966.
8. Филаретов А. А. Нервная регуляция гипофизарно-адренокортикальной системы, Л., Наука, 1979.
9. Емельянов Н. И., Богданова Т. С., Гарина И. С., Подвикина Т. Т.—В кн.: Гипофизарно-адреналовая система и мозг (ред. Митюшов М. И.), Л., Наука, с. 155—171, 1976.
10. Barker J. B., Summerson W. H. J. Biol. Chem., 138, 535—554, 1941.
11. Митюшов М. И., Богданова Т. С., Гарина И. А., Емельянов Н. А., Ноздрачев А. Д., Подвикина Т. Т., Ракицкая В. В., Соколова Е. В., Федорова Л. Д., Шалини-

на В. Г. Гормоны коры надпочечников и центральная нервная система, Л., Наука, с. 89—111, 1970.

12. *McEwen B. S.*—In: The chemistry of mood, motivation and memory (Ed. Megawh I. L.), N. Y.—London, p. 41—55, 1972.
13. *Подвикина Т. Т.* Укр. биохим. ж., 52, 1, 36—39, 1980.
14. *Fain I. N. J.* Biol. Chem., 239, 958—962, 1964.
15. *Munck A. S.* Endocrinol., 77, 356—360, 1965.
16. *Munck A.* Perspect. Biol. Med., 14, 265—289, 1971.

Институт физиологии

им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Поступила 1. II 1982

УДК 612.82—577.15

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА И ГИДРОКОРТИЗОНА НА ДИСУЛЬФИДРЕДУКТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

КОШОРИДЗЕ Н. И., АЛЕКСИДЗЕ Н. Г.

Установлено, что введение адреналина (внутрижелудочковое) и гидрокортизона (интубрюшинное) вызывало повышение дисульфидредуктазной активности в головном мозгу как молодых, так и старых крыс. Одновременно имело место увеличение количества свободных сульфгидрильных групп белков. На основе результатов опытов с пуромидином сделано заключение, что активирующее действие адреналина и гидрокортизона на дисульфидредуктазу является результатом ее индуктивного синтеза, который опосредуется сАМР.

Проведенными ранее исследованиями было показано, что старение сопровождается понижением активности дисульфидредуктазы (ДСР) в головном мозгу белых крыс. Исходя из важной роли SH-групп в функциональной активности нервной ткани [1—3], можно сделать вывод, что одной из возможных причин снижения активности головного мозга в связи со старением является нарушение отношения SH- и -S-S-групп белков [4].

В связи с этим в настоящей работе была предпринята попытка активации ДСР головного мозга белых крыс с целью улучшения его функционального состояния, исходя из данных литературы о стимулирующем влиянии биогенных аминов [5], сАМР [6], простагландинов и инсулина [7] на активность NADPH-зависимой ДСР селезенки и печени крыс.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали молодых (2—4-месячных) и старых (24—30-месячных) крыс.

Активность NADPH-зависимой ДСР определяли в водных экстрактах гомогената различных отделов головного мозга по методу Tietze [8].

Инкубационная среда была следующего состава: 2,5 мл трис-HCl буфер (pH—7,4), 0,5 мг водорастворимых белков, 100 мкМ NADPH и 50 мкМ дисульфидного субстрата 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензоата). Активность ДСР измеряли спектрофотометрически по увеличению оптической плотности (ΔE_{412}). Предварительно было установлено, что при

ферментативная активность сохраняла линейную зависимость в течение 20 мин, поэтому в основных опытах время инкубации было ограничено 10 мин. Белок определяли по Lowry и соавт. [9]. Полученные данные были обработаны статистически по Стьуденту [10].

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов было изучено влияние внутрижелудочкового введения адреналина в дозе 100 мкг/100 г живого веса животных на ДСР-активность в водных экстрактах гомогенатов коры больших полушарий, продолговатого мозга и гиппокампа. Выяснилось, что адреналин достоверно усиливал активность фермента во всех изученных структу-

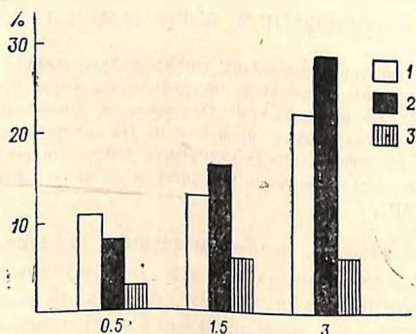


Рис. 1. Влияние адреналина на активность NADPH-зависимой дисульфид-редуктазы в водных экстрактах гомогенатов коры больших полушарий (1), продолговатого мозга (2) и гиппокампа (3) белых крыс. По оси ординат—активность фермента в процентах по сравнению с контролем. По оси абсцисс—время экспозиции

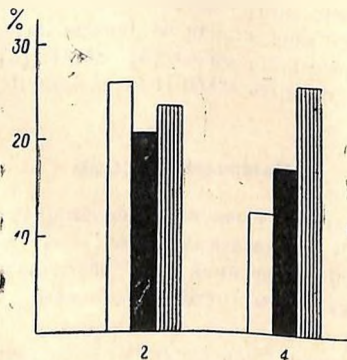


Рис. 2. Влияние АМР на активность NADPH-зависимой дисульфидредуктазы в водных экстрактах гомогенатов коры больших полушарий, продолговатого мозга и гиппокампа белых крыс. Обозначения те же, что и на рис. 1

рах с постепенным нарастанием ее в зависимости от времени экспозиции животных (рис. 1). Особенно четко эти сдвиги были обнаружены в коре больших полушарий и продолговатом мозгу. Аналогичная закономерность была установлена и в опытах с введением сАМР, однако эффекты циклического нуклеотида в большой степени проявлялись уже после 2-часовой экспозиции (рис. 2). В отличие от опытов с адреналином высокая активность ДСР сохранялась более длительно, и на 4-м часу после введения сАМР она была на 25% больше по сравнению с контролем. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, использовавших в своих опытах ферментные препараты из селезенки и печени крыс [6].

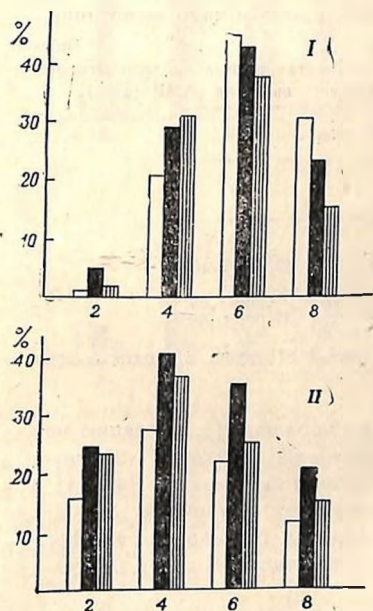


Рис. 3. Влияние внутрибрюшинного введения гидрокортизона на активность NADPH-зависимой дисульфид-редуктазы водорастворимых белков коры больших полушарий, продолговатого мозга и гиппокампа молодых (I) и старых (II) белых крыс. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Повышение активности ДСР отразилось на содержании SH-групп белков головного мозга. Как видно из таблицы, через 2 ч после введения сАМР содержание SH-групп возрастало в коре больших полушарий, продолговатом мозгу и гиппокампе соответственно на 14, 20 и 18% с дальнейшим повышением, спустя 4 ч—до 30, 29 и 37% соответственно. Следовательно, не исключено, что эффекты введения сАМР на функциональное состояние животных могут реализоваться, кроме всего прочего, и в результате повышения содержания SH-групп белков.

В опытах с внутрибрюшинным введением гидрокортизона было обнаружено и его стимулирующее влияние на активность ДСР (рис. 3). Предварительно было установлено, что максимально стимулирующей ДСР дозой данного кортикостероида является введение 2,5 мг/100 г

массы животного. Далее установлено, что активность ДСР коры больших полушарий, продолговатого мозга и гиппокампа закономерно изменялась в зависимости от времени экспозиции (рис. 3). Максимальное стимулирование активности фермента во всех изученных структурах мозга молодых крыс наблюдали после 6-часовой экспозиции; на 8-м часу экспозиции активность ДСР все еще оставалась повышенной (от 15 до 30%). В отличие от молодых крыс активирование ДСР гидрокортизоном в разных областях мозга старых крыс проявлялось за более короткий период времени. Например, если после 2-часовой экспозиции увеличение активности фермента в мозгу молодых крыс не превышало 5%, то в мозгу старых крыс оно составляло уже 15—25%. При этом максимума активность ДСР у последних достигала не спустя 6 ч, как это было отмечено в мозгу молодых крыс, а на 4-м часу экспозиции.

Таблица

Увеличение содержания SH-групп в водных экстрактах разных областей головного мозга молодых крыс после внутрибрюшинного введения сАМР (в %)

Область головного мозга	Время экспозиции	
	2 ч	4 ч
Кора больших полушарий	13,90±1,01	35,80±2,15
Продолговатый мозг	20,70±0,97	29,30±1,85
Гиппокамп	18,50±1,05	37,00±0,63

Примечание. Содержание количества свободных SH-групп в контроле принято за 100%

При введении гидрокортизона также наблюдали корреляцию между активацией ДСР и увеличением содержания белковых SH-групп в разных структурах мозга как молодых, так и старых крыс (рис. 4). Исходя из этих данных, можно предположить, что улучшение условнорефлекторной памяти старых крыс под влиянием гидрокортизона [11] может быть опосредовано повышением содержания SH-групп водорастворимых белков мозга.

С целью выявления причин положительного эффекта адреналина и гидрокортизона на активность ДСР мы исходили из положения, что они могут действовать путем стимуляции продукции сАМР, которая индуцирует новообразование фермента [12]. Для решения этого вопроса были поставлены опыты *in vitro* и *in vivo*, в которых изучали влияние ингибитора синтеза белков пуромидина на стимулирующие эффекты гидрокортизона. Предварительное внутрибрюшинное введение пуромидина в дозе 15 мкг/100 г массы животного (опыты *in vivo*) полностью элиминировало положительные эффекты гидрокортизона на активность ДСР. Аналогичная картина наблюдалась при введении животным пуромидина и адреналина. В опытах *in vitro* ни пуромидин, ни гидрокортизон в течение 60-минутного инкубирования с водными экст-

рактами мозга не оказывали достоверного влияния на активность фермента. Учитывая медленное нарастание во времени активности фермента при введении адреналина, гидрокортизона и сАМР, а также результаты опытов *in vitro* и *in vivo* с пурамицином и гидрокортизоном, можно предположить наличие двух возможных механизмов активации ДСР. Первый может основываться на активации аденилатциклазной системы и усилении продукции сАМР, посредством которой через глюкозо-6-фос-

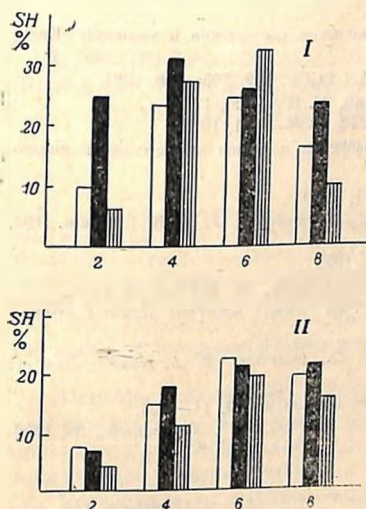


Рис. 4. Изменение содержания сульфгидрильных групп в водорастворимых белках коры больших полушарий, продолговатого мозга и гиппокампа молодых (I) и старых (II) белых крыс во времени после внутрибрюшинного введения гидрокортизона. По оси ординат—прирост свободных SH-групп в процентах по отношению к контролю, принятому за 100%. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

фатный цикл будет стимулировать синтез кофактора ДСР-NADPH, а второй механизм может быть связан с усилением синтеза информационной РНК [13] и транскрипции специфических генов, которые кодируют фермент—ДСР. Посредством именно таких механизмов происходит индуктивный синтез триптофанпиролазы, тирозин- α -кето-глутарат-трансаминазы, глутаминсинтазы и других ферментов [13—15].

Итак, активность NADPH-зависимой ДСР в головном мозгу можно регулировать как на уровне генетического аппарата, так и фермент-субстратных взаимоотношений. В результате мы получаем одну из возможностей направленного улучшения функции головного мозга при старении животных—путем изменения соотношения SH/S-S-групп.

EFFECT OF EPINEPHRINE AND HYDROCORTISONE ON RAT BRAIN DISULPHUREDUCTASE ACTIVITY

KOSHORIDZE N. J., ALEKSIDZE N. G.

Chair of Biochemistry, State University, Tbilisi

The effect of epinephrine and hydrocortisone on disulphureductase activity (intraventricular or intraperitoneal injection) has been studied in

different brain areas of aged and young rats. Administration of these compounds increases enzyme activity and the amount of free SH-groups. The experiments with puromycin indicate that epinephrine and hydrocortisone induce synthesis of disulphureductase via cAMP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Турпаев Т. М. Биохимия, 16, 611—614, 1951.
2. Турпаев Т. М. Биохимия, 20, 456—462, 1955.
3. Турпаев Т. М., Нистратова С. М.—В кн.: Тноловые соединения в медицине, Киев, с. 65, 1952.
4. Кошоридзе Н. И., Алексидзе Н. Г. Сообщ. АН ГССР, 102, 705—708, 1981.
5. Кулинский В. И., Иванов В. В. Радиобиология, 24, 833—836, 1974.
6. Кулинский В. И., Иванов В. В. ДАН СССР, 213, 1439—1441, 1973.
7. Колесниченко Л. С.—В кн.: Регуляторные эффекты и обмен моноаминов и циклонуклеотидов, Красноярск, с. 11—15, 1979.
8. Tietze F. Arch. of Biochem. Biophys., 138, 1, 1970.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
10. Лакин Г. Ф. Биометрия, М., Высшая школа, 1980.
11. Митюшов М. И., Соколова Е. В. Ж. выш. нерв. деят., 24, 1222—1226, 1974.
12. Кометиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. А. Нейрохимические аспекты памяти, Тбилиси, Мецниереба, 1980.
13. Kenney F. T., Greenman W. D., Wicks W. D., Albritton W. L. Adv. in Enzyme Regulation, 3, 1, 1964.
14. Feigelson M., Feigelson P. Adv. in Enzyme Regulation, 3, 11, 1964.
15. Juurlink B. H., Shousboe A., Jourgansen O. S., Hertz L. J. Neurochem., 36, 138—142, 1981.

Кафедра биохимии Тбилисского
государственного университета

Поступила 7. VII 1982

УДК 616.831—005—091.8

ЦИТОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ РНК В СИСТЕМЕ НЕЙРОН—НЕЙРОГЛИЯ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕМАТОМЕ

ПОЛЯКОВ Н. Ф.

Представлены результаты цитоспектрофотометрического исследования содержания количества РНК в нейронах и глиоцитах сенсомоторной коры и гиппокампа 64 белых крыс в различные сроки после моделирования внутримозговой гематомы (от 2 ч до 28 суток). Отмечено снижение содержания РНК в системе нейрон—нейроглия в первые 3 дня после развития гематомы. В последующем отмечается повышение количества РНК, в первую очередь, в нейроглии, а затем в нейронах, что рассматривается как включение компенсаторно-приспособительных механизмов.

Цереброваскулярные заболевания представляют важную медико-социальную проблему, так как являются одной из наиболее частых причин тяжелой инвалидности и смертности среди взрослого населения многих экономически развитых стран [1—5].

Кровоизлияние в головной мозг—одна из самых тяжелых форм сосудистых поражений мозга—является причиной высокой смертности, которая при консервативной терапии составляет 70—90%, а при некоторых локализациях достигает 96—100% [6—8].

Изучение метаболических процессов, протекающих в ткани головного мозга при геморрагических инсультах, имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Материалы и методы

Изучено содержание РНК в единой метаболической системе нейрон—нейроглия новой и старой (висцеральной) коры головного мозга (сенсомоторная и гиппокамп) 64 белых крыс линии Вистар массой 140—220 г в различные сроки после моделирования экспериментальной внутримозговой гематомы (2 ч, 3, 7, 14, 21, 28 дней). Первоначально у животных воспроизводилась почечно-солевая гипертония, вызываемая стенозом левой почечной артерии. В дальнейшем оперированные крысы вместо воды получали 1,5%-ный раствор хлористого натрия. Артериальное давление у них повышалось до 140—160 мм рт. ст. Спустя 1 месяц после операции (к этому времени уже развивалась гипертония) животным при помощи стереотаксического прибора МВ-4101 в область внутренней капсулы левого полушария головного мозга вводили 0,15 мл

аутокрови, взятой из бедренной артерии. Животных декапитировали в различные сроки после моделирования внутримозговой гематомы. Операции и забой животных проводили под нембуталовым обезболиванием (35—40 мг нембутала на 1 кг массы). В качестве контроля использовали два вида животных: интактных крыс и животных с почечно-сосудистой гипертензией.

Для гистохимического исследования ткань мозга фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин по общепринятой методике. Серийные срезы толщиной 5 мкм после депарафинирования инкубировали в растворе дезоксирибонуклеазы (1000 ед/мл) на 0,025 М вероналовом буфере (рН 7,5), содержащем 0,003 $MgSO_4$, в течение 24 ч при температуре 37° с последующей окраской галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону [9]. Среди серийных срезов визуально отбирались срезы одинаковой толщины, которые фотометрировали на цитоспектрофотометре МУФ-5 методом сканирования при длине волны 570 нм. Фотометрии подвергались нейроны и нейроглия сенсомоторной коры и гиппокампа как в пораженном, так и в интактном полушарии головного мозга. В каждом участке мозга животного фотометрировали по 50 клеток. Среднюю оптическую плотность умножали на объем клетки и получали количество РНК в условных единицах (усл. ед.).

Результаты и обсуждение

Результаты анализа количественного содержания РНК в нейронах и глиальных клетках сенсомоторной коры мозга представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1
Содержание РНК в нейронах сенсомоторной коры крыс в разные сроки после моделирования экспериментальной гематомы

Сроки забоя	Полушарие	Нейроны		
		Д	V	К
Контроль		0,116±0,012	179,300±20,117	20,346±2,799
Контроль гипертензия		0,167±0,019	142,386±16,714	23,778±2,820
2 ч	на стороне очага	0,140±0,016	158,057±17,485	21,848±1,062
	интактное	0,145±0,016	209,291±23,071	30,347±3,5,7
3 дня	на стороне очага	0,103±0,017	254,685±36,911	26,232±4,055
	интактное	0,110±0,017	226,546±37,175	24,920±3,817
7 "	на стороне очага	0,135±0,020	227,845±35,461	30,759±4,647
	интактное	0,164±0,029	300,506±47,157	49,223±7,034
14 "	на стороне очага	0,144±0,021	184,753±27,844	26,604±4,083
	интактное	0,151±0,025	270,307±30,284	40,816±6,138
21 "	на стороне очага	0,136±0,021	196,278±31,114	26,694±3,983
	интактное	0,116±0,019	206,624±37,053	23,968±4,192
28 "	на стороне очага	0,145±0,026	209,318±37,728	30,351±5,700
	интактное	0,155±0,023	189,075±27,551	29,874±4,319

Примечание. Д—оптическая плотность в опт. ед.; V—объем клеток в усл. ед.; К—количество РНК в усл. ед.

У интактных животных средняя оптическая плотность РНК в нейронах сенсомоторной коры составляла $0,116 \pm 0,012$ опт. ед., в клетках нейроглии— $0,179 \pm 0,024$ опт. ед. У крыс с почечно-солевой гипертонией отмечалось увеличение оптической плотности РНК как в нейронах ($0,167 \pm 0,019$ опт. ед.), так и в нейроглиальных клетках ($0,291 \pm 0,039$ опт. ед.) ($p < 0,01$).

Таблица 2
Содержание РНК в сателлитной глии нейронов сенсомоторной коры крыс в различные сроки после моделирования экспериментальной гематомы

Сроки забоя	Полушарие	Нейроглия		
		Д	V	К
Контроль		$0,179 \pm 0,024$	$23,744 \pm 3,277$	$4,250 \pm 0,596$
Контроль гипертония		$0,291 \pm 0,039$	$19,657 \pm 2,854$	$5,720 \pm 0,854$
2 ч	на стороне очага	$0,209 \pm 0,043$	$22,858 \pm 4,851$	$4,777 \pm 1,407$
	интактное	$0,237 \pm 0,037$	$29,613 \pm 4,758$	$7,019 \pm 1,074$
3 дня	на стороне очага	$0,209 \pm 0,038$	$27,638 \pm 5,599$	$5,776 \pm 1,074$
	интактное	$0,244 \pm 0,045$	$27,129 \pm 5,184$	$6,619 \pm 1,291$
7 "	на стороне очага	$0,284 \pm 0,063$	$25,870 \pm 6,056$	$7,347 \pm 1,682$
	интактное	$0,302 \pm 0,066$	$28,722 \pm 6,528$	$8,674 \pm 1,937$
14 "	на стороне очага	$0,222 \pm 0,045$	$30,502 \pm 5,913$	$6,771 \pm 1,108$
	интактное	$0,280 \pm 0,051$	$33,410 \pm 5,652$	$9,354 \pm 1,586$
21 "	на стороне очага	$0,202 \pm 0,043$	$26,368 \pm 5,493$	$5,323 \pm 1,241$
	интактное	$0,241 \pm 0,021$	$31,803 \pm 6,104$	$7,664 \pm 1,638$
28 "	на стороне очага	$0,270 \pm 0,040$	$28,303 \pm 4,056$	$7,642 \pm 1,181$
	интактное	$0,282 \pm 0,053$	$29,637 \pm 5,643$	$8,358 \pm 1,565$

Примечание. Д—оптическая плотность в опт. ед.; V—объем клеток в усл. ед.; К—количество РНК в усл. ед.

Через 2 ч после моделирования интрацеребральной гематомы оптическая плотность РНК уменьшалась в нейронах и глиальных клетках пораженного и смежного полушарий головного мозга.

Параллельно с понижением оптической плотности РНК наблюдалось увеличение объема нейронов интактной гемисферы до $209,291 \pm 23,071$ усл. ед., что свидетельствует о включении компенсаторных механизмов уже в первые часы после развития кровоизлияния в первую очередь в нейронах непораженного полушария. При этом общее количество РНК на один нейрон увеличивается до $30,347 \pm 3,547$ усл. ед. за счет увеличения объема нервной клетки.

На третьи сутки в нейронах сенсомоторной коры происходило дальнейшее снижение оптической плотности РНК, которая в пораженном полушарии составляла $0,103 \pm 0,017$ опт. ед., а в противоположном— $0,110 \pm 0,017$ опт. ед. В клетках нейроглии направленность метаболических процессов РНК имела обратную зависимость, то есть оптическая плотность РНК возрастала раньше всего в непораженном полушарии (с $0,237 \pm 0,037$ опт. ед. до $0,244 \pm 0,045$ опт. ед.).

Спустя 7 дней после кровоизлияния в нейронах и глиальных клетках повышалось количество РНК, при этом наблюдалось увеличение

оптической плотности и объема клеток в пораженном и интактном полушариях. В последующие сроки метаболизм РНК в нейронах коры стабилизировался, однако количество РНК на одну клетку оставалось выше по сравнению с контролем. Скорость восстановления исходного уровня содержания РНК в нейроглии отчетливо выше, чем в нейронах.

Распределение РНК в нейронах и нейроглии гиппокампа в контроле и при экспериментальной внутримозговой гематоме в разные сроки после ее моделирования представлено в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Содержание РНК в нейронах гиппокампа крыс в различные сроки после моделирования экспериментальной гематомы

Сроки забоя	Полушарие	Нейроны		
		Д	V	K
Контроль		$0,183 \pm 0,018$	$248,499 \pm 27,499$	$45,475 \pm 5,062$
Контроль		$0,185 \pm 0,023$	$408,237 \pm 52,548$	$75,524 \pm 9,367$
гипертензия		$0,110 \pm 0,011$	$319,890 \pm 30,074$	$35,187 \pm 5,184$
2 ч	на стороне очага	$0,121 \pm 0,012$	$491,465 \pm 55,465$	$59,467 \pm 5,973$
	интактное	$0,133 \pm 0,024$	$242,206 \pm 47,147$	$29,791 \pm 5,924$
3 дня	на стороне очага	$0,138 \pm 0,020$	$255,522 \pm 36,997$	$35,262 \pm 5,232$
	интактное	$0,186 \pm 0,026$	$372,616 \pm 51,970$	$69,306 \pm 9,895$
7 "	на стороне очага	$0,192 \pm 0,027$	$376,635 \pm 53,190$	$72,314 \pm 10,635$
	интактное	$0,134 \pm 0,020$	$524,734 \pm 80,936$	$70,313 \pm 10,650$
14 "	на стороне очага	$0,155 \pm 0,030$	$642,111 \pm 122,214$	$99,524 \pm 17,833$
	интактное	$0,096 \pm 0,015$	$600,083 \pm 92,840$	$57,608 \pm 16,178$
21 "	на стороне очага	$0,180 \pm 0,029$	$580,281 \pm 100,770$	$104,450 \pm 18,671$
	интактное	$0,187 \pm 0,034$	$426,051 \pm 81,630$	$79,672 \pm 16,185$
28 "	на стороне очага	$0,168 \pm 0,030$	$367,324 \pm 66,851$	$61,710 \pm 10,929$
	интактное			

Примечание. Д—оптическая плотность в опт. ед.; V—объем клеток в усл. ед.; K—количество РНК в усл. ед.

Оптическая плотность РНК в нейронах гиппокампа через 2 ч после кровоизлияния уменьшалась в пораженном и интактном полушариях. У контрольных животных с экспериментальной гипертензией оптическая плотность РНК равна $0,185 \pm 0,023$ опт. ед., через 2 ч после развития кровоизлияния она уменьшалась на стороне поражения до $0,110 \pm 0,011$ опт. ед., а в противоположном полушарии—до $0,121 \pm 0,012$ опт. ед. Количество РНК на один нейрон гиппокампа снижается с $75,524 \pm 9,367$ усл. ед. в контроле до $35,187 \pm 5,184$ усл. ед. на стороне поражения и $59,467 \pm 5,973$ усл. ед. в противоположном полушарии. Со стороны нейроглии в первые 2 ч после развития кровоизлияния отмечалось, с одной стороны, уменьшение оптической плотности РНК (с $0,243 \pm 0,035$ опт. ед. в контроле до $0,183 \pm 0,033$ опт. ед. на стороне очага и $0,194 \pm 0,027$ опт. ед. в противоположном полушарии), а с другой стороны—увеличение объема глиальных клеток, так что общее количество РНК на глиоцит не изменилось.

Через три дня после кровоизлияния в головной мозг в нейронах гиппокампа наблюдалась тенденция к дальнейшему снижению количества

РНК, хотя оно и не носило статистически достоверный характер ($p > 0.05$). В клетках нейроглии пораженного полушария происходило прогрессирующее уменьшение оптической плотности РНК до $0,129 \pm 0,034$ опт. ед., а в противоположной гемисфере оптическая плотность РНК глиоцитов резко возрастала до $0,293 \pm 0,089$ опт. ед. и достигала своего максимума к концу первой недели— $0,341 \pm 0,129$ опт. ед.

Таблица 4

Содержание РНК в сателлитной глии нейронов гиппокампа крыс в различные сроки после моделирования экспериментальной гематомы

Сроки забоя	Полушарие	Нейроглия		
		Д	V	К
Контроль		$0,198 \pm 0,027$	$22,457 \pm 3,153$	$4,446 \pm 0,682$
Контроль гипертония		$0,243 \pm 0,035$	$27,729 \pm 4,234$	$6,738 \pm 1,062$
2 ч	на стороне очага	$0,183 \pm 0,033$	$36,725 \pm 7,057$	$6,728 \pm 1,145$
	интактное	$0,194 \pm 0,027$	$34,926 \pm 5,444$	$6,776 \pm 1,619$
3 дня	на стороне очага	$0,129 \pm 0,034$	$38,860 \pm 9,820$	$5,013 \pm 1,295$
	интактное	$0,293 \pm 0,089$	$13,866 \pm 4,323$	$4,063 \pm 1,251$
7 "	на стороне очага	$0,270 \pm 0,086$	$37,391 \pm 11,391$	$10,096 \pm 2,518$
	интактное	$0,341 \pm 0,129$	$32,249 \pm 12,212$	$10,997 \pm 4,144$
14 "	на стороне очага	$0,155 \pm 0,041$	$51,136 \pm 13,040$	$7,926 \pm 1,969$
	интактное	$0,219 \pm 0,046$	$30,385 \pm 6,357$	$6,654 \pm 1,437$
21 "	на стороне очага	$0,263 \pm 0,052$	$37,715 \pm 7,845$	$9,191 \pm 1,814$
	интактное	$0,250 \pm 0,047$	$36,142 \pm 6,759$	$9,036 \pm 1,608$
28 "	на стороне очага	$0,246 \pm 0,055$	$27,365 \pm 6,196$	$6,732 \pm 1,539$
	интактное	$0,254 \pm 0,046$	$24,482 \pm 4,647$	$6,218 \pm 1,130$

Примечание. Д—оптическая плотность в опт. ед.; V—объем клеток в усл. ед.; К—количество РНК в усл. ед.

К концу первой недели имело место увеличение количества РНК в нейронах гиппокампа и глиоцитах интактного и пораженного полушарий. На стороне очага кровоизлияния количество РНК в нейронах увеличивалось с $29,791 \pm 5,924$ усл. ед. до $69,306 \pm 9,895$ усл. ед., в интактном—с $35,262 \pm 5,232$ усл. ед. до $72,314 \pm 10,635$ усл. ед., в нейроглии—соответственно с $5,013 \pm 1,295$ усл. ед. до $10,096 \pm 2,518$ усл. ед. и с $4,063 \pm 1,251$ усл. ед. до $10,997 \pm 4,144$ усл. ед. При этом имело место повышение оптической плотности РНК в нейронах и нейроглии, в нейронах пораженного полушария она равна $0,186 \pm 0,026$ опт. ед., противоположного— $0,192 \pm 0,027$ опт. ед., в нейроглии соответственно $0,270 \pm 0,086$ опт. ед. и $0,341 \pm 0,129$ опт. ед.

Через 21 день вновь отмечалось снижение количества РНК в нейронах гиппокампа пораженного полушария ($57,608 \pm 16,173$ усл. ед.), которое сопровождалось резким падением оптической плотности и увеличением объема нервных клеток. В нейронах интактного полушария количество РНК компенсаторно возрастало до $104,450 \pm 18,671$ усл. ед. Природа указанных процессов остается невыясненной.

Спустя 28 дней оптическая плотность и количество РНК на один нейрон и глиоцит приближались к уровню контрольных животных.

Таким образом, полученные данные цитоспектрофотометрического исследования количества РНК в системе нейрон—нейроглия коры головного мозга крыс с экспериментальной внутримозговой гематомой свидетельствуют о том, что кровоизлияние в головной мозг является чрезмерным раздражителем, который вызывает выраженный катаболизм РНК в первые три дня после развития инсульта, в результате чего количество РНК прогрессивно уменьшается во всей системе нейрон—нейроглия коры головного мозга. Этот процесс носит диффузный характер, нарушается обмен РНК во всех отделах коры головного мозга пораженного и интактного полушарий. Изменения метаболизма РНК имеют место и в старой коре, в так называемом висцеральном мозгу, что, по-видимому, влечет за собой развитие нервнотрофических изменений со стороны внутренних органов с нарушением их функции [1, 10—13].

Компенсаторно-приспособительные процессы при кровоизлияниях в головной мозг включаются очень рано, становление их происходит за счет интенсификации синтетических процессов РНК, в первую очередь, в структурах противоположного очагу кровоизлияния полушария, речь идет об индукционных взаимоотношениях и о внутриклеточной регенерации по Саркисову [14—17].

Увеличению содержания РНК в нейронах предшествует повышение количества её в нейроглии, что можно объяснить существованием единой функциональной и метаболической системы нейрон—нейроглия, в которой глия играет важную роль в энергетическом и пластическом обеспечении нейронов [18—22].

Первые три дня после развития геморрагического инсульта являются критическими в метаболизме РНК структур коры головного мозга с выраженным преобладанием катаболических процессов, проявляющихся прогрессирующим уменьшением ее количества в нейронах и глиальных клетках, чем можно частично объяснить высокую летальность больных в эти сроки при консервативной терапии кровоизлияний в головной мозг.

BRAIN RNA AND EXPERIMENTAL INTRACEREBRAL HEMATOMA

POLYAKOV N. F.

State Medical School, Zaporozhe

The amount of RNA has been determined cytospectrophotometrically in hippocampus and brain sensorimotor cortex in rats with experimental intracerebral hematoma (from 2h to 28 days of lesion). A decrease in RNA content in the neuron-neuroglia system in the first 3 days of hematoma has been followed by increase in RNA content first of all in glia and then in neurons and is considered to be a sign of adaptation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Боголенов Н. К.— В кн.: Церебральные кризы и инсульт, М., Медицина, с. 392, 1971.
2. Котенева В. М., Лисицын Ю. Н., Петелин Л. С. Современные направления научных исследований в области сосудистой патологии мозга в США и других странах М., ВНИИМИ, 134 с., 1976.
3. Сосудистые заболевания нервной системы (под ред. Шмидта Е. В.), М., Медицина, 662 с., 1975.
4. Ishii T. J. Tok. Women's med. coll., 47, 2, 174—181, 1977.
5. Lambert R., Audlginer J.-C., Meyer F. Nouv. Presse med., 6, 16, 1397—1398, 1977.
6. Ромоданов А. П., Педаченко Г. А. Мозговой геморрагический инсульт, Киев, Здоров'я, 228 с., 1971.
7. Лебедева Н. В. Паренхиматозные кровоизлияния в большие полушария головного мозга, докт. дис., М., 1969.
8. Лебедева Н. В. Геморрагический инсульт, М., Медицина, 158 с., 1978.
9. Пирс Э. Гистохимия, М., ИЛ, 962 с., 1962.
10. Вейн А. М., Соловьева А. Д. Лимбико-ретикулярный комплекс и вегетативная регуляция, М., Наука, 268 с., 1973.
11. Мартынов Ю. С., Бурдов А. А., Пушкарь Ю. Т., Ильина Л. Н. Ж. невропат. и психиатр., 1, 3—17, 1977.
12. Мартынов Ю. С., Кайдина О. И. Ж. невропат. и психиатр., 11, 1628—1634, 1980.
13. Левин Г. Э. Ж. невропат. и психиатр., 9, 1306—1310, 1979.
14. Саркисов Д. С. Регенерация и ее клиническое значение, М., Медицина, 284 с., 1970.
15. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза, М., Медицина, 350 с., 1977.
16. Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Втюрин Б. В. Приспособительная перестройка биоритмов, М., Медицина, 182 с., 1975.
17. Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Втюрин Б. В. Электронномикроскопическая радиоавтография клетки, М., Медицина, 262 с., 1980.
18. Певзнер Л. Э. Нуклеиновые кислоты в системе нейрон—нейроглия при различных условиях функционирования нервной системы, докт. дис., Л., 1969.
19. Певзнер Л. Э. Функциональная биохимия нейроглии, Л., Наука, 302 с., 1972.
20. Певзнер Л. Э.—В кн.: Успехи нейрохирургии, Л., Наука, с. 140—153, 1974.
21. Hyden H. The Neuron, Elsevier, Amsterdam, 1967.
22. Лабори Г. Метаболические и фармакологические основы нейрофизиологии, М., Медицина, 168 с., 1974.

Запорожский медицинский
институт

Поступила 9. IV 1982

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.159+547.1'128

ТОРМОЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ ЛЯГУШКИ И ТИХООКЕАНСКОГО КАЛЬМАРА КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКИМИ АММОНИЕВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

БРЕСТКИН А. П., РОЗЕНГАРТ Е. В., ВИНЯР Т. Н.,
АБРОСИМОВА А. Т., ВОРОНКОВ М. Г.

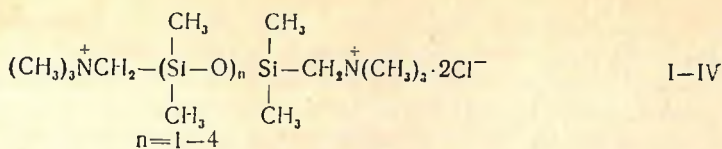
Холинэстеразы высоко чувствительны к ингибирующему действию тетраалкиламмониевых соединений, которые взаимодействуют с аннионным центром каталитической поверхности этих ферментов [1]. Среди этой группы эффекторов обнаружено большое число физиологически активных соединений и лекарственных веществ.

В большинстве случаев тетраалкиламмониевые соединения являются специфическими ингибиторами холинэстераз нервной ткани разных животных. Однако, как показали проведенные нами исследования [2—4], холинэстеразы мозга лягушки и зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара обладают более низкой и качественно иной чувствительностью к некоторым аммониевым соединениям, что, видимо, связано с особенностями структуры каталитической поверхности этих ферментов.

Недавно проведено комплексное исследование холинэргической эффективности аммонийсодержащих кремнийорганических соединений, оказавшихся специфическими ингибиторами бутирилхолинэстеразы слюенной крови лошади [5].

Представляло интерес изучить группу кремнийорганических соединений—триметиламмонийметилтриметилсилан- и α , ω -бис (триметиламмонийметил) олигодиметилсилоксангалогенидов—в качестве обратимых ингибиторов холинэстераз мозга лягушки и зрительного ганглия тихоокеанского кальмара, что может дать дополнительную информацию о свойствах ферментов нервной ткани этих животных. Источником холинэстераз служили центрифугаты водного гомогената (45 мг/мл) ткани мозга лягушки [3] и водного гомогената (3 мг/мл) ткани зрительного ганглия тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus* [4].

В качестве ингибиторов изучены α , ω -бис (триметиламмонийметил) олигодиметилсилоксандихлориды (I—IV), синтезированные по Данилову и соавт. [5], триметил (триметилсилилметил) аммониййодид (V), полученный по [6], α , ω -бис (триметиламмонийметил) алкандиййодиды (VI—VIII) [7] и тетраметиламмониййодид (IX) («Chemapol», ЧССР).



Активность холинэстераз определяли методом Элмана. Реакционная смесь объемом 2,0 мл содержала $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) («Koch-Light», Англия) в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,5, а также растворы субстрата, йодида ацетилтихолина («Chetapol», СССР), ингибитора и ферментного препарата. Изменение экстинкции наблюдали в кювете фотоэлектроколориметра ФЭКН-57 при 413 нм при 25°. Измерение количества подвергшегося гидролизу субстрата проводили по калибровочной кривой [3].

Эффективность обратимых ингибиторов оценивали по величине обобщенной ингибиторной константы $\bar{K}_i$ [3]. При конкурентном типе торможения $\bar{K}_i = K_i$, при смешанном типе $1/\bar{K}_i = 1/K_i + 1/K'_i$, где K_i и K'_i ингибиторные константы конкурентного и неконкурентного типов торможения, которые определяли графически методом [3].

Кинетические параметры процесса торможения холинэстеразной активности кремнийорганическими соединениями приведены в таблице, где также представлены данные по ингибированию этих ферментов соединениями ряда α , ω -бис (триметиламмонно) алкандийодидов (VI—VIII) и тетраметиламмониййодидом (IX). Так как длина олигомерной цепи силоксанов (I—IV) возрастала у следующего члена по сравнению с предыдущим на 2 звена, то в полиметиленовом ряду рассмотрены соединения с $m=5, 7$ и 9 (соединение с $m=11$ нами не исследовалось). Сравнение этих двух рядов может быть только формальным, так как неизвестны роль структурных различий при замене в межаммониевой цепи метиленовых групп на силоксановые и эффект обрамления олигосилоксановой цепи метильными группами при взаимодействии этих ингибиторов с активным центром различных холинэстераз.

Для холинэстеразы мозга лягушки все силоксановые производные (I—IV) оказались близкими по силе обратимыми ингибиторами конкурентного и конкурентно-смешанного типов действия (величины K_i значительно ниже величины K'_i), тогда как эффективность их углеродных аналогов (VI—VIII) существенно возрастала при удлинении межаммониевой цепи. Из сравнения ингибиторной активности этих двух рядов следует, что при минимальной длине цепи силоксановые производные

Таблица

Антихолинэстеразная эффективность ($pK_i = -\lg K_i$) α , ω -бис (триметиламмонно-метил) олигодиметилсилоксанхлоридов (I—IV) и α , ω -бис (триметиламмонно) алкан-дигидридов (VI—VIII), триметил (триметилсилилметил) аммонийиодида (V) и тетраметиламмонийиодида (IX)

Соед.	п или m	Холинэстераза лягушки				Холинэстераза кальмара			
		тип торм.	$K_i \cdot M$	$K'_i \cdot M$	pK_i	тип торм.	$K_i \cdot M$	$K'_i \cdot M$	pK_i
I	1	C	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-4}$	4,03	C	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$3,6 \cdot 10^{-4}$	3,99
II	2	K	$2,0 \cdot 10^{-4}$	—	3,70	C	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$	4,93
III	3	K	$1,2 \cdot 10^{-4}$	—	3,92	C	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^{-5}$	4,92
IV	4	C	$5,8 \cdot 10^{-5}$	$7,7 \cdot 10^{-4}$	4,26	C	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	4,85
V		K	$5 \cdot 10^{-4}$	—	3,23	K	$4,8 \cdot 10^{-4}$	—	3,32
VI	5	C	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-3}$	2,82	K	$1,8 \cdot 10^{-3}$	—	2,74
VII	7	C	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	3,96	C	$3,2 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	2,33
VIII	9	C	$4,5 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	5,45	K	$2,6 \cdot 10^{-4}$	—	3,58
IX		K	$8,9 \cdot 10^{-4}$	—	3,05	K	$5,8 \cdot 10^{-3}$	—	2,25

Примечание. Тип торможения—конкурентный (K), смешанный (C).

оказываются значительно более эффективными (преимущество I перед VI в 16 раз). При большем же числе звеньев цепи активными оказываются соединения полиметилового ряда (III оказалось в 34 раза слабее, чем VIII). Эффективность моноаммониевого соединения V была в 3—10 раз ниже, чем у бис-аммониевых соединений I—IV. Интересно, что V и IX оказались практически равноэффективными, хотя объем молекулы V значительно больше: она является С-триметилсилильным производным IX.

Чувствительность холинэстеразы мозга лягушки к I—IV значительно ниже, чем у ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади [5]. Эти различия не только количественные, но и качественные, что, несомненно, связано с особенностями структуры активного центра фермента лягушки.

Иные результаты получены при исследовании эффективности изученных соединений по отношению к холинэстеразе тихоокеанского кальмара. Во-первых, в ряду α , ω -бис (триметиламмонийметил) олигодиметилсилоксандихлоридов наблюдалось 10-кратное увеличение эффективности при переходе от $n=1$ к $n=2$. Аналогичный эффект в полиметиловом ряду отмечался при переходе от $m=7$ к $m=9$. Во-вторых, в отличие от других аммониевых соединений [4] высшие члены силоксанового ряда являются более сильными ингибиторами холинэстеразы кальмара, чем фермента лягушки. В-третьих, изученные кремнийорганические соединения являются обратимыми ингибиторами смешанного типа действия с существенным вкладом неконкурентной составляющей (соизмеримые величины K_i и K_r). В-четвертых, введение триметилсилильной группы в молекулу тетраметиламмония (V и IX) повысило эффективность в 10 раз, а производные силоксанового ряда (I—IV) оказались в 15—20 раз более сильными ингибиторами, чем полиметилового (VI—VIII).

Все это является еще одним подтверждением своеобразия свойств холинэстеразы тихоокеанского кальмара [4]. Кремнийорганические ингибиторы, проявившие высокую специфичность к бутирилхолинэстеразе лошадиной сыворотки [5], оказались среди изученных аммониевых соединений наиболее эффективными обратимыми ингибиторами фермента этого вида кальмара.

INTERACTION OF NERVOUS TISSUE CHOLINESTERASES OF FROG AND PACIFIC SQUID WITH SILICORGANIC AMMONIUM COMPOUNDS

BRESTKIN A. P., VINIAR T. N., ROZENGART E. V., ABROSIMOVA A. T.,
VORONKOV M. G.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Leningrad
Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the USSR
Academy of Sciences, Irkutsk

The interaction of α , ω -bis (trimethylammoniummethyl) oligodimethylsiloxandichlorides (I—IV) and trimethyl (trimethylsilylmethyl) ammonium

iodid (V) with frog brain cholinesterase and optic ganglia cholinesterase of the squid, *Todarodes pacificus*, has been studied. The short chain silicorganic compound I proved to be 16 times more potent inhibitor of frog cholinesterase than its carbonic analog VI. In contrast, the longer chain silicorganic compound III was 34 times less potent than the corresponding carbonic analog VIII. All silicorganic compounds (I—V) were 10—20 times more potent inhibitors of squid cholinesterase than their carbonic analogs (VI—VIII).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Фан, Ташкент, с. 206, 1976.
2. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В., Данилов А. Ф. Тез. докл. III Всесоюзн. конф. «Физиология и биохимия медиаторных процессов», М., с. 32, 1980.
3. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В. Биохимия, 46, 6, 1042—1048, 1981.
4. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В. Нейрохимия, 1, 1, 28—35, 1982.
5. Данилов А. Ф., Лукомская Н. Я., Першина Л. И., Магазаник Л. Г., Потапьева Н. Н., Розенгарт Е. В., Виняр Т. Н., Кирпиченко С. В., Абросимова А. Т., Кузнецова Э. Э., Воронков М. Г. ДАН СССР, 265, 1, 228—232, 1982.
6. Гуркова С. Н., Гусев А. И., Абросимова А. Т., Алексеев Н. В., Воронков М. Г. ДАН СССР, 260, 5, 1115—1117, 1981.
7. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В. Укр. биохим. ж., 54, 6, 1982.

Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова
АН СССР, Ленинград
Иркутский институт органической
химии СО АН СССР

Поступила 11. VI 1982

УДК 547.95+577.1

ГАНГЛИОЗИДЫ МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПЕРБАРООКСИГЕНАЦИИ

СУЛЕЙМАНОВ А. К., БРОНОВИЦКАЯ З. Г.

Функциональные изменения, возникающие в организме животных при острой кислородной интоксикации, проявляются наиболее ярко в виде приступов судорог центрального происхождения, что связано, по-видимому, с нарушением функции нейрональных мембран [1]. Обязательными компонентами мембран нейронов позвоночных являются ганглиозиды. Их содержание в нервных клетках на 2—3 порядка превышает уровень в других тканях. Однако сведений о состоянии ганглиозидов в условиях гипербарооксигенации (ГБО) в литературе мы не встретили.

Было исследовано общее содержание ганглиозидов и их отдельных фракций в больших полушариях и среднем мозгу крыс при действии на животных разных режимов ГБО.

Использовали беспородных белых крыс массой 120—140 г. Одну группу животных подвергали действию кислорода под давлением 0,3 МПа в течение 2 ч, вторую—действию 0,7 МПа до наступления судорог. Режим компрессии и декомпрессии—0,3 МПа O_2 /мин. Контрольная группа находилась в условиях вивария.

Ганглиозиды выделяли по методу Folch в модификации Suzuki [2]. Содержание ганглиозидов определяли по количеству сialовых кислот [3]. В качестве стандарта использовали синтетическую N-ацетилнейраминную кислоту («Koch-Light», LTD, Великобритания). Разделяли ганглиозиды методом тонкослойной хроматографии на силикагеле ЛС («Lachema», ЧССР) в системе растворителей хлороформ: метанол: вода: концентрированный аммиак (60:35:7:1, об/об). Хроматограммы проявляли парами йода, фракции ганглиозидов элюировали водой.

Результаты исследований представлены в таблице и на рисунке. Содержание ганглиозидов в больших полушариях головного мозга выше по сравнению со средним мозгом на 27,7% ($p < 0,05$), что согласуется с литературными данными, полученными и на других видах млекопитающих [4].

Указанные условия гипероксии не вызывают резких изменений в общем содержании ганглиозидов в обоих отделах мозга. Это связано, по-видимому, с тем, что в состав ганглиозидов входят сфингозин и, в основном, насыщенные жирные кислоты, устойчивые к перекисному

окислению. Считают, что сфингозин обладает свойствами антиоксиданта [5], способного защищать ганглиозиды от атаки свободнорадикальными формами кислорода, которые являются основной причиной развития кислородной интоксикации.

При разделении ганглиозидов количественно охарактеризовано 6 фракций (номенклатура Svennerholm: G_{Q_1} , G_T , $G_{D,b}$, G_{D_1} , G_{D_2} , G_M). Набор индивидуальных ганглиозидов в обоих отделах мозга контрольных животных одинаков, но содержание отдельных фракций разное: в среднем мозгу выше количество трисналоганглиозида G_T , дисналоганглиозида $G_{D,b}$ и моносналоганглиозида G_M , но значительно меньше дисналоганглиозида G_{D_1} .

Таблица

Содержание ганглиозидов в больших полушариях и среднем мозгу крыс при разных режимах гипероксии (в мкг сналовых кислот/г влажной ткани)

Большие полушария			Средний мозг		
норма	0,3 МПа O_2 2 ч	0,7 МПа O_2 судороги	норма	0,3 МПа O_2 2 ч	0,7 МПа O_2 судороги
818,0 $\pm$ 20,9	863,3 $\pm$ 16,3*	831,2 $\pm$ 20,2*	672,6 $\pm$ 28,8	709,9 $\pm$ 19,5*	630,5 $\pm$ 30,5*

* $p > 0,1$ по сравнению с нормой

Гипероксия не оказывает существенного влияния на состав индивидуальных ганглиозидов в больших полушариях. В среднем мозгу, однако, уже при действии 0,3 МПа O_2 /2 ч, когда поведение животных внешне мало отличается от контроля, наблюдаются существенные изменения в содержании моносналоганглиозида G_M и дисналоганглиозида G_{D_1} , количество первого снижается на 55, второго возрастает на 56% (рисунок). При действии на крыс 0,7 МПа O_2 развивается острое кислородное отравление, проявляющееся через 20—30 мин в виде судорог. Спектр индивидуальных ганглиозидов в этих условиях практически не отличается от такового при действии O_2 в 0,3 МПа в течение 2 ч. Таким образом, высокое давление кислорода при короткой экспозиции и относительно низкое давление с более длительной экспозицией оказывают близкий по величине и направленности эффект. Следует отметить, что именно ганглиозиды G_M и G_{D_1} обладают наиболее высоким уровнем обменяемости [6], и их содержание подвергается существенным изменениям в ходе формирования ЦНС в онтогенезе [7].

Представляет интерес факт, что средний мозг по электрофизиологическим данным является центром формирования эпилептического приступа при ГБО [8], в нем же обнаружены наиболее существенные изменения активности ряда мембранных ферментов [9, 10]. Какова может быть связь указанных явлений с изменением индивидуального спектра ганглиозидов среднего мозга при ГБО? Ганглиозиды обладают рядом важнейших функций: участвуют в связывании Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , в регуляции активности аденилатциклазы и Na^+ , K^+ -АТФазы, являются

рецепторами нейромедиаторов, токсинов, вирусов, в частности G_D , специфически связывает серотонин, G_{M1} —специфический акцептор холерного токсина, ему также присуща наибольшая антигенная активность [11] и др. Изменение соотношения моно- и дисialogанглиозидов

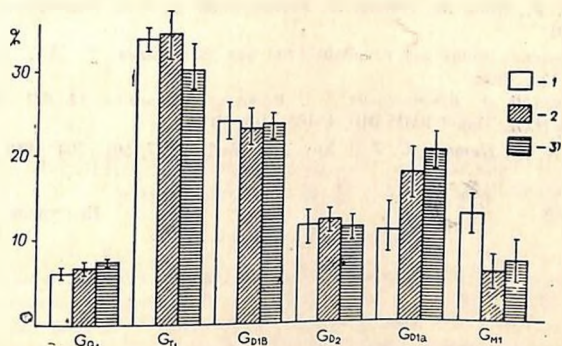


Рис. Содержание отдельных фракций ганглиозидов в среднем мозгу крыс при разных режимах гипербарооксигенации (в % от общего количества): 1—норма; 2—0,3 МПа O_2 , 2 ч; 3—0,7 МПа O_2 , судороги

при ГБО должно повлечь локальное перераспределение зарядов, модификацию рецепторных и антигенных свойств мембран, изменение транспорта ионов и в конечном итоге привести к изменению процессов поляризации и деполяризации синаптических мембран.

EFFECT OF HYPERBARIC OXYGENATION ON RAT BRAIN GANGLIOSIDES

SULEIMANOV A. K., BRONOVITSKAYA Z. G.

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

The total content of gangliosides has not essentially changed in cerebral hemispheres and midbrain of rats exposed to hyperbaric oxygenation conditions (either 0,3 MPa during 2 hours or 0,7 MPa to induce convulsions). However, certain changes have been detected in the amount of individual gangliosides in midbrain—the quantity of monosialoganglioside G_{M1} increased 2-fold, while that of disialoganglioside G_{D1a} decreased 1,5-fold. Data obtained point to a charge redistribution in neuronal membranes as a result of hyperbaric oxygenation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Броницкая З. Г. Биохимические механизмы кислородной интоксикации. Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, 1980.
2. Suzuki K. J. *of Neurochem.*, 12, 629—639, 1965.
3. Svennerholm L. *Biochem. Biophys. Acta*, 24, 604—615, 1957.

4. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, с. 164, 1981.
5. Аристархова С. А., Архипова Г. В., Бурлакова Е. В., Гвахария В. О., Глущенко Н. Н., Храпова Н. Г. ДАН СССР, 228, 215—218, 1976.
6. Прохорова М. И., Беспалова М. А., Мухина А. П., Туманова С. Ю. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 10, 182—187, 1975.
7. Vanier M. T., Holm M., Öhman R., Svennerholm L. J. of Neurochem., 18, 581—592, 1971.
8. Гипербарическая эпилепсия и наркоз (под ред. Зальцмана Г. А.), Л., Наука, с. 129—136, 1968.
9. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г. Вопросы мед. химии, 22, 621—625, 1976.
10. Шерстнева И. Я. Изв. СКНЦ ВШ, 4, 105—107, 1978.
11. Gregson N. A., Hammer C. T. J. Roy. Soc. Med., 73, 7, 501—504, 1980.

Кафедра биохимии РГУ,
Ростов-на-Дону

Поступила 18. II 1982

ОБЗОРЫ

УДК 612.8.015+612.1.12.+547.96+578.087.9

МЕЖТКАНЕВЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ БЕЛКОВ В СИСТЕМЕ
ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИХ БАРЬЕРОВ

СИНИЧКИН А. А.

В обзоре обобщаются экспериментальные исследования о межтканевых взаимоотношениях разных по тканевой специфичности белков в системе энцефалических барьеров: мозг $\rightleftharpoons$ кровь $\rightleftharpoons$ спинномозговая жидкость $\rightleftharpoons$ мозг при различных функциональных состояниях, стрессорных воздействиях и некоторых патологиях организма. Проницаемость энцефалических барьеров для белков—альбумина, РНКазы, инсулина и др.—находится в тесной зависимости от функционального состояния организма. При стрессовых воздействиях и патологиях межтканевые переходы белков изменяют биохимические и иммунологические параметры, определяя специфику физиологического состояния организма. В виде гипотезы выдвигается «тканевоспецифичный принцип функционирования белков», рассмотренный на примере межтканевых взаимоотношений белков в системе энцефалических барьеров.

Одним из новых направлений в области функциональной и патологической нейрохимии является изучение динамических межтканевых взаимоотношений белков в системе мозг—кровь—спинномозговая жидкость (СМЖ). Эти взаимоотношения белков определяются их проницаемостью через энцефалические барьеры, которые состоят из гемато-энцефалического барьера (ГЭБ), кровь $\rightleftharpoons$ мозг; гемато-ликворного, СМЖ $\rightleftharpoons$ мозг [1]. Системы—мозг, кровь, СМЖ—характеризуются наличием определенных белков, обладающих специфической структурой, свойствами, функциями, внутриклеточной локализацией, динамикой, а также видовой и тканевой специфичностью. В ткани мозга различают нейроспецифические белки, характерные для мозга в целом или его отдельных структур; общетканевые белки, содержащиеся и в других тканях (печени, почках, мышцах и т. д.), но отсутствующие в крови; белки крови в сосудах и капиллярах мозга. Учитывая тканевую специфичность белков, можно заключить, что белковый метаболизм мозга определяется как функционированием нейроспецифических и общетканевых белков, так и их взаимоотношениями с белками крови и СМЖ [2]. Белки СМЖ также различают по тканевой специфичности [3].

Целью обзора является обобщение данных литературы по межтканевым взаимоотношениям белков в системе энцефалических барьеров при различных функциональных состояниях, стрессорных воздействиях и некоторых формах патологии. Исследования в этой области можно

разделить на три группы, включающие взаимоотношения между белками в системах кровь—мозг, кровь—СМЖ, СМЖ—мозг. В части исследований изучены взаимоотношения между белками в нескольких вышеперечисленных системах.

Проницаемость энцефалических барьеров для белков в норме. Экспериментально наличие энцефалического барьера было открыто в конце XIX—начале XX вв. Термин «гемато-энцефалический барьер» и теоретическое обоснование этого феномена были даны Л. С. Штерн [1, 4]. Было показано, что после внутривенного введения красителей, например трипановой сини, большинство структур мозга не окрашивалось. Окрашенными были периферические нервные узлы, твердая мозговая оболочка, сосудистые сплетения, гипофиз, серый бугор, area postrema, эпифиз. При введении очень больших доз красителя слабо окрашивалась мягкая мозговая оболочка, СМЖ. При введении трипановой сини в СМЖ краситель проникал в ткань мозга и распространялся преимущественно в те участки, которые соприкасались с цистернами ткани мозга и СМЖ. В 1940—50 гг. было установлено, что при изучении проницаемости ГЭБ методом красителей исследователи изучают проницаемость не чистых красителей, а их комплексов с белками сыворотки крови, в основном с молекулами альбумина (М 69 кД) [5].

В настоящее время нет единой точки зрения о механизмах и степени проницаемости белковых молекул через энцефалические барьеры в нормальных физиологических условиях организма. Доказана проницаемость ГЭБ для молекул фермента рибонуклеазы (М 12 кД) [6]. При этом показано участие ГЭБ в процессе воспроизведения временных связей—хорошо упроченных условных рефлексов у крыс [7]. ГЭБ повышает проницаемость биологических мембран, в том числе ГЭБ. В частности, показано, что гиалуронидаза повышает низкую в норме проницаемость ГЭБ для инсулина [8].

Проницаемость ГЭБ для инсулина находится в зависимости от функционального состояния организма, в частности обратно пропорциональной зависимости от уровня сахара в крови. Так, при гипогликемии повышается проницаемость ГЭБ для инсулина, который, проникая через барьер, действует на вегетативные центры и вызывает гипергликемию. Такая реакция имеет важное значение для нейрогуморальной регуляции [9].

Проведено сравнительное изучение проницаемости гисто-гематических барьеров, в том числе ГЭБ, для нативных сывороточных белков—альбуминов и глобулинов—в органах и тканях морских свинок методом флуоресцирующих антител [10]. По классификации авторов, ГЭБ в отношении проницаемости для белков относят к I типу изолирующих барьеров. При этом паренхиматозные клетки органа или ткани не контактируют с сывороточными белками. Барьеры данного типа, в свою очередь, разделяют на два подтипа. А-подтип включает изолирующие барьеры на уровне сосудистой стенки, при этом сывороточные белки не

проникают через нее. Сюда относятся ткани серого и белого вещества головного и спинного мозга. Б-подтип включает изолирующие барьеры на уровне вспомогательных элементов органа или ткани (эпендимы). В этом случае сосуды проницаемы для сывороточных белков, но вспомогательные клетки органа (ткани) или иные структуры на путях внесосудистого транспорта сывороточных белков образуют барьер, изолирующий паренхиматозные клетки. Сюда относятся эпителий сосудистых сплетений головного мозга, гемато-ликворный барьер, области мягких мозговых оболочек, краевая глиальная мембрана головного мозга, периферическая НС, гемато-нейрональный барьер. Сосудистые сплетения головного мозга по отношению к эпителию сплетений относят ко II типу частично изолирующих барьеров, к подтипу функционально-постоянных. При этом сывороточные белки проникают из сосудов в ткань и по путям внесосудистого транспорта достигают паренхиматозных клеток. Последние с зоной распространения сывороточных белков имеют только односторонний контакт, образуя барьер, ограждающий определенные зоны от проникновения сывороточных белков [10].

Высокая активность альбумина в связывании и транспорте многочисленных органических и неорганических соединений определяет важную функциональную значимость его проницаемости через энцефалические барьеры [5]. Так, стероидные [11], тиреоидные [12, 13] гормоны, пальмитиновая кислота, холестерол [14], триптофан [15], триптофол [16] легко связываются с альбумином и транспортируются в таком виде из крови через стенку капилляров в ткань мозга. В крови 70% циркулирующего мелатонина находится в связанной с альбумином форме. Мелатонин проникает из ткани эпифиза в кровь и СМЖ в виде связанных с альбумином комплексов [13]. Глобулины также участвуют в связывании таких высокоактивных соединений, как гормоны тестостерон, эстрадиол, кортикостерониды, и, возможно, в переносе их через мембраны [5, 13].

Для установления механизма и степени проницаемости белков через энцефалические барьеры проведены многочисленные модельные исследования с использованием чистых препаратов пероксидазы (М 43 кД), микропероксидазы (М 2 кД), ферритина (М 445 кД) [5, 17]. При внутривенном введении пероксидазы или микропероксидазы молекулы белков не проходят через эндотелий. Этому препятствуют плотные контакты эндотелия сосудов паренхимы, закрывающие межклеточные щели. Внутри самих клеток эндотелия обнаруживается незначительное число микроинноцитозных пузырьков, содержащих пероксидазу. Но при этом не были обнаружены пузырьки, секретирующие свое содержимое в базальную мембрану на наружной стороне капилляров. Авторы заключают, что барьерный эффект для пероксидазы осуществляется на уровне эндотелия. Перенос же белковых молекул через эндотелий сосудов посредством везикуляций (микроинноцитоза) здесь минимальный [17]. Вышесказанный эффект выявлен при исследовании млекопитающих. На рыбах была показана возможность проникновения молекул пероксидазы из кровяного русла в ткань мозга [18, 19].

Изучено проникновение пероксидазы хрена и ферритина через стенку капилляра в нейросекреторные аксоны ткани задней доли гипофиза интактных крыс через 1 и 10 мин после введения их в вену [20]. Белковые маркеры проникают из капилляров в перикапиллярное пространство, главным образом через фенестры, и в меньшей степени — в пиноцитозные пузырьки. В нейросекреторные аксоны белки проникают в секреторные гранулы и микротрубочки.

Если молекулы пероксидазы или ферритина вводить внутрь желудочков мозга, то они проходят между клетками эпендимы, продвигаются по внеклеточным пространствам нейропилия, в том числе и по щелям между сосудистыми концевыми ножками астроцитов, доходя до периваскулярной базальной мембраны. Эти результаты позволяют полагать, что концевые ножки астроцитов не являются эффективным барьером в том случае, если какие-то вещества (белки) прошли через эндотелий кровеносных сосудов [5, 17]. Введенная в СМЖ желудочков пероксидаза проникает в паренхиму через межклеточные щели быстрее, чем со стороны внешней поверхности мозга. Там, где стенка желудочков находится на границе с серым веществом (гипоталамус, *septum pellucidum*, гиппокамп, центральное серое вещество), проникновение пероксидазы, альбумина и глобулина значительно облегчено по сравнению с местами, где прилегает белое вещество (*corpus callosum*, *fimbria* и др.). Из межклеточной щели нейропилия пероксидаза пиноцитируется элементами глии, дендритами, нервными окончаниями [5, 17].

Паутинная оболочка мозга является одним из существенных структурных элементов ГЭБ. Она обладает высокой проницаемостью для многих веществ, в том числе и для высокомолекулярных, в направлении СМЖ → кровь. Даже крупные клетки эритроцитов, введенные субокципитально, выводятся главным образом в кровяное русло твердой оболочки мозга [21].

Обмен белков между кровью и СМЖ возможен в областях *plexus chorioideus*, где барьер лежит на уровне клеточных мембран глии, а также эпендимальной выстилки, секретирующих ликвор. В капиллярах *plexus chorioideus* имеется фенестрация эндотелия. Фенестрированные капиллярные сосуды создают возможность свободного обмена между сосудистым руслом и паренхимой для целого ряда веществ, в том числе белков, которые легко проникают в *interstitium* [22].

Фенестрированные капиллярные сосуды имеются в таких областях мозга, как синусная железа ракообразных, *corpus cardiacum* насекомых, фронтальные железы головоногих, урогипофиз рыб (каудальная нейросекреторная спинномозговая система), нейрогипофиз. Так как эти сосуды не обладают или обладают слабым энцефалическим барьером и служат в качестве нейрогемальных органов, синтезирующийся в них нейросекрет проникает непосредственно в кровяное русло. Среди компонентов нейросекретов выявлены и белковые молекулы [23].

Известно несколько типов клеток в НС, требующих для своего развития и функционирования внеклеточных, а возможно, и внеканальных

белков. Примером может служить зависимость сенсорных и симпатических нейронов от фактора роста нервной ткани [24], который является белковым гормоном роста нервной ткани (М 19 кД). В большом количестве этот белок синтезируется в подчелюстных железах. Предполагается, что в НС фактор роста нервной ткани продуцируется клетками глии [25]. Известно влияние на созревание глиобластов специфического внешнего белка [26]. Эти наблюдения указывают на возможность регулирования функционального развития НС экзогенными белковыми макромолекулами. Правомерность этих представлений подтверждается исследованиями по выявлению быстромеченных и секретируемых белков ткани мозга во внеклеточной жидкости и СМЖ [27].

Можно заключить, что в нормальных физиологических условиях организма имеются эволюционно выработанные механизмы проницаемости энцефалических барьеров для белковых молекул. Межтканевые взаимоотношения белков в системе кровь—мозг—СМЖ должны являться важными механизмами для выполнения ряда биологических функций.

Проницаемость энцефалических барьеров для белков при функциональных состояниях и патологии. При функциональных состояниях, вызванных различными факторами, и при патологии энцефалические барьеры становятся более проницаемы для белков. При ряде нервно-психических заболеваний у людей—шизофрении, психозах, эпилепсии, экспериментальном аллергическом энцефаломиелите, коклюшном экспериментальном энцефаломиелите, травматических повреждениях мозга и др.—в крови и СМЖ появляются нейроспецифические и общетканевые белки, аутоантитела к которым обнаруживают в крови, СМЖ и непосредственно в ткани мозга [28—30]. При сосудистых поражениях мозга, воспалениях мозговых оболочек, инфекционной лихорадке наблюдается двусторонний переход белков в системе мозг—кровь [29], а также поступление белков из плазмы крови в СМЖ [31]. При травме мозга [32] и эпилептической активности [33] усиливается трансэндотелиальный транспорт белков в мозг посредством пиноцитоза.

Возникновение шизофрении связывают с появлением в плазме крови больных α -глобулина, стимулирующего поступление некоторых аминокислот (триптофана) в эритроциты и клетки головного мозга [34]. Рассеянный склероз может быть связан с факторами, индуцирующими автономный синтез белка непосредственно тканью мозга. У больных острыми энцефалитами и рассеянным склерозом обнаружены высокие титры интерферона в сыворотке крови и СМЖ. У людей с расстройствами функций центральной и периферической нервной системы, не связанными с воспалительным процессом, титры интерферона были низкими [35].

Еще в 1930 г. Freund показал возможность проникновения небольших количеств антител из крови в ткань мозга и СМЖ, что в дальнейшем и было подтверждено [36]. В нормальной СМЖ отсутствуют гемолизины, агглютинины, преципитины и комплемент. При патологических процессах—прогрессивном параличе, острых инфекционных ме-

нингитах—эти вещества обнаруживаются в СМЖ [37]. Автономный синтез различных классов иммуноглобулинов тканью мозга возможен при психических заболеваниях [38]. В течение заболевания подострым индуративным энцефалитом у детей изменяется титр противокоревых антител в сыворотке крови и СМЖ. У детей с неврозами, взятых в качестве контрольных исследований, соотношение титра противокоревых антител было в 32—64 раза ниже, чем в крови. При энцефалите оно повышалось, что рассценивается авторами как доказательство синтеза противокоревых антител в ткани ЦНС и нарушении проницаемости ГЭБ для иммуноглобулинов [39]. Наличие молекул легких (М 26 кД) и тяжелых (М 50 кД) цепей иммуноглобулина обнаружено в цитоплазматической и субклеточной фракциях различных отделов мозга у больных с демиелинизированными заболеваниями—рассеянным склерозом и подострым склеротическим паненцефалитом [40].

Проведены исследования по влиянию быстрого подъема кровяного давления на проницаемость ГЭБ для альбумина у интактных крыс и у крыс с повышенным почечным кровяным давлением. У подопытных животных не обнаружено уменьшения перехода белка из крови в ткань мозга. Цереброваскулярная проницаемость была повышенной по сравнению с контрольными крысами [41]. Амфетамин увеличивает выход альбумина из сыворотки крови в ткань мозга у нормо- и спонтанно гипертензивных крыс за счет повышения системного артериального давления. Галоперидол и домперидон блокировали этот эффект. Фентоламины или его смесь с пропранолоном резко повышали проницаемость ГЭБ для альбумина при снижении артериального давления у гипертензивных крыс. Однако аденоблокаторы также устраняли эффекты амфетамина. Делается вывод о том, что проницаемость альбумина через ГЭБ повышается у гипертензивных крыс независимо от уровня артериального давления [42].

У больных с демиелинизированными заболеваниями—рассеянным склерозом и подострым склеротическим паненцефалитом—в цитоплазме и субклеточных фракциях отделов мозга обнаружено наличие сывороточного альбумина [40]. Высокое содержание сывороточного альбумина и преальбумина обнаружено в глиомах, медуллобластомах и менингеомах [38]. О нарушении проницаемости альбумина через ГЭБ ряд авторов судит по определению его количественного содержания в крови и СМЖ. По таким показателям выявлено нарушение ГЭБ для альбумина у больных с острой ишемической болезнью [43] и у детей с подострым индуративным энцефалитом [39].

Изучена проницаемость капилляров—барьера между кровью и нейронами коры больших полушарий мозга крыс—для молекул пероксидазы при ожоговом шоке. У контрольных животных в цитоплазме эндотелиальных клеток гранулы пероксидазы в пиноцитозных пузырьках, расположенных ближе к просвету капилляров, появляются только через 30 мин после ее внутривенного введения, а в начальных отделах межклеточных щелей—через 45 мин. У животных, находившихся в со-

стоянии ожогового шока, через 30 мин после введения пероксидазы пиноцитозные пузырьки располагаются вокруг ядра. Пероксидаза проникает в базальный слой капилляров. Через 45 мин после ожога пиноцитозные пузырьки локализуются по всей цитоплазме эндотелиальных клеток, а пероксидаза обнаруживается как в просвете межклеточной щели, так и в субэндотелиальном пространстве [44]. Из сыворотки крови обожженных людей выделен белковый фактор, нарушающий ГЭБ [45]. Сосудистая проницаемость мозга для молекул пероксидазы повышается при введении животным хлорида ртути или лизолецитина [46].

Ряд исследований посвящен изучению проницаемости энцефалических барьеров для индивидуальных тканевых белков. Нейроспецифический белок S-100 содержится в СМЖ здоровых людей в следовых количествах. При множественных склерозах количество белка S-100 в СМЖ резко возрастает [47]. Нейроспецифический α_2 -гликопротеид обнаружен в СМЖ больных краниофарингеомой, интраспинальной эпендимомой и менингиомой. В то же время этот белок не был найден в ликворе у больных с другими опухолями мозга [48]. Общетканевой водорастворимый белок w. e., имеющийся в мозгу и отсутствующий в крови и СМЖ здоровых людей, обнаруживали в СМЖ у больных с опухолями мозга [49].

Из тканей почек, щитовидной железы и периферических нервов больных семейной амилоидной полиневропатией выделен амилоидный кислый фибриллярный белок (M 14 кД), являющийся специфическим и функционально важным компонентом амилоидных фибрилл. В исследованных тканях в норме белок не обнаруживали. На основании факта обнаружения белка в сыворотке крови и СМЖ больных в концентрации 0,5 и 8% от общего количества белка соответственно авторы предполагают, что амилоидный фибриллярный белок может синтезироваться в пределах структурных элементов ГЭБ и играть важную роль в метаболизме ткани НС при исследуемой патологии [50].

Большое внимание исследователей привлекло изучение β -следового белка, который содержится в низких концентрациях в ряде тканей, и высоких — в тканях НС (в белом веществе мозга) и половых органов. При многих заболеваниях содержание β -следового белка резко повышается в крови, СМЖ и моче [51, 52].

Показана нейросекреция белков, играющая важную роль в межтканевых взаимоотношениях, например, секреция ацетилхолинэстеразы из нейронов во внеклеточное пространство и далее в СМЖ [53], секреция хромогранина А и дофамин- β -гидроксилазы симпатическими нейронами [54]. В секреторных гранулах гипофиза присутствуют белки нейрофизины, которые способны избирательно связывать окситоцин и вазопрессин и секретироваться вместе с ними. Нейрофизины обнаружены также в гипоталамусе, эпифизе, крови, СМЖ и в некоторых других тканях [23, 55]. Имеются данные о резком возрастании количества нейрофизинов в плазме новорожденных телят по сравнению с

таковым в плазме плодов или взрослых особей [56]. При естественном молокоотделении (сосании) и дойке у коров происходит специфическое освобождение нейрофизинов в кровь [57]. Концентрация нейрофизинов в сыворотке крови женщин увеличивалась при беременности в 4 раза, в амниотической жидкости—в 6 раз. При ряде заболеваний—галактории, акромегалии и др.—концентрация нейрофизинов в сыворотке крови увеличивалась [58]. Освобождение нейрофизинов в кровь происходит во время кормления грудью у кормящих матерей [59]. Изменение уровня нейрофизинов в плазме зависит от гормонального обмена [60]. Электростимуляция срединного возвышения гипоталамуса, паравентрикулярных или супраоптических ядер вызывает соответственно 6-, 4- и 2-кратное увеличение количества нейрофизинов в сыворотке крови [61]. При лишении животного воды наблюдается резкое уменьшение содержания нейрофизинов в задней доле гипофиза с одновременным их увеличением в плазме крови [62]. У больных сахарным диабетом, лечатых инсулином, в сыворотке крови выявлены антитела к нейрофизину [63].

Наличие белков сыворотки крови преимущественно в белом веществе мозга обнаружено при экспериментальной почечной гипертензии у крыс [64]. Показано, что путем микропункции белки сыворотки крови могут попадать в глию *in vivo* и в культуру ткани [65]. Некоторые из «собственно тканевых» белков мозга, возможно, являются продуктами деградации сывороточных белков, в частности альбумина [66]. В условиях нейропатологии β -липопротеид проникает из крови в СМЖ [67].

При действии на организм повышенного давления кислорода молекулы ферритина проникают через капиллярный эпителий в перикапиллярное пространство различных структур мозга после внутривенного введения белка кошкам и кроликам, перенесшим 5 сеансов гипербарооксигенации, (2,5 ата, 90 мин) [68]. В нашей лаборатории были проведены специальные исследования по изучению состояния ГЭБ при гипербарооксигенации и установлению перехода нейроспецифических и общетканевых белков из ткани мозга в кровь, а также белков крови в мозговую ткань при судорожной форме кислородной интоксикации, вызванной действием 5—7 ата кислорода. После проявления у крыс генерализованных судорог тонического и клонического типа, сопровождающихся резким нарушением кровообращения, в сыворотке крови подопытных животных обнаруживали появление нейроспецифического белка S-100, а также увеличение одного из общетканевых белков [69].

При этом установлено резкое увеличение содержания альбумина и внеэритроцитарного гемоглобина в ткани мозга. В то же время содержание альбумина в сыворотке крови подопытных животных снижалось в пределах 15%, а гемоглобина возрастало на 82—175% [70]. Проведены исследования по парентеральному введению гомологичного экстракта ткани головного мозга морским свинкам через 20 дней после одного и двухразовых сеансов гипербарооксигенации (7 ата) до проявления у

животных сильных судорог. Инъекции приводили к возникновению у подопытных животных симптомов анафилактической реакции, что связывается с нарушением мембранных структур ГЭБ и выходом в кровь мозговых белков-антигенов и аутоSENSИБИЛИЗАЦИЕЙ организма белками мозга при действии высоких величин повышенного давления кислорода [71, 72].

Обобщая вышележащие данные, можно заключить, что для функционирования НС важными являются сопряженные межтканевые взаимоотношения различных белков в системной триаде мозг—кровь—СМЖ. В настоящее время накопился определенный материал об особенностях проницаемости энцефалических барьеров для белков в условиях нормы, регулируемого эксперимента и патологии.

Экспериментальные исследования по изучению проницаемости энцефалических барьеров для некоторых белков—альбумина, рибонуклеазы, гиалуронидазы, инсулина, нейрофизинов и др.—свидетельствуют о тесной взаимосвязи этих процессов с функциональным состоянием организма. Попадая в «несвойственную» для них ткань, белки выполняют в ней соответствующие им функции. Проницаемость энцефалических барьеров для таких белков и возможность их функционирования в «чужеродной» ткани должна быть генетически детерминирована и обусловлена специфическими биохимическими и иммунологическими механизмами, выработанными в процессе эволюции организмов.

При сдвигах функционального состояния, стрессовых воздействиях и патологии изменяется структурная целостность энцефалических барьеров. Это приводит к нарушению их регуляторной и защитной функций. Возникает физиологически неадекватная проницаемость тканей [4] для «собственных» и «чужеродных» низко-, олиго- и высокомолекулярных соединений, в том числе и для белковых молекул. Экспериментально показана возможность межтканевого перераспределения белков в системе энцефалических барьеров. Каковы возможные последствия нарушения белковых внутри- и межтканевых взаимоотношений? Нейроспецифические белки, являясь «забарьерными» и попадая в кровь, ведут к сдвигу биохимических и иммунологических систем организма. В то же время белки сыворотки крови, проникая в ткань мозга или СМЖ, также вызывают изменение метаболизма в соответствующих тканях. Например, гемоглобин, проникая в ткань мозга при гипербарооксигенации, является специфическим фактором, усиливающим эффект путем действия на перекисное окисление липидов мембран ткани мозга [70].

Необходимо отметить, что при ряде заболеваний появление тех или иных белков может отражать не только изменения в системе энцефалических барьеров, но быть также результатом далеко зашедших изменений, например, в результате некроза ткани. Нарушения межтканевого обмена белков являются важными метаболическими факторами в механизмах патогенеза и адекватными молекулярными показателями функционального состояния организма, используемыми в диагностических и терапевтических целях.

INTERTISSUE RELATIONS OF PROTEINS IN THE SYSTEM OF ENCEPHALIC BARRIERS

SINICHKIN A. A.

Department of Biochemistry, Rostov-on-Don State University

Experimental data on intertissue relations of proteins varying in their tissue specificity in the system of encephalic barriers: brain-blood-CSF-brain, under normal conditions, functional ones and in pathology are summed up. Permeability of encephalic barriers for proteins—albumin, RNA-ase, Insulin etc.—depends on the functional state of the organism. Under stress conditions and pathology the intertissue crossings of proteins change the biochemical and immunological parameters determining the specificity of physiological state of the organism. These results point to a possible "tissue-specific principle of proteins function".

ЛИТЕРАТУРА

1. Росин Я. А.—В кн.: Физиология гисто-гематических барьеров (под ред. Росина Я. А.), М., Наука, с. 119—283, 1977.
2. Синишкин А. А. Укр. биохим. ж., 53, 113—122, 1981.
3. Heitmann R., Uhlenbruck G. Z. Nervenheilkunde, 188, 187—199, 1966.
4. Росин Я. А.—В кн.: Гисто-гематические барьеры и нейрогуморальная регуляция (под ред. Газенко О. Г.), М., Наука, с. 22—33, 1981.
5. Brightman M. W.—In: The Ocular and Cerebrospinal Fluids (Eds. Bito L. Z., Dawson H., Fenstermacher J. D.), p. 1—25, 1977.
6. Росин Я. Н. и др. Биофизика, 15, 920—923, 1970.
7. Казеннова И. И. Проницаемость гемато-энцефалического барьера для рибонуклеазы и состояние высшей нервной деятельности. Автореф. канд. дис., М., 1973.
8. Полянская Л. Г.—В кн.: Структура и функции гисто-гематических барьеров, М., Наука, с. 122, 1971.
9. Росин Я. А., Полянская Л. Г. Физиол. ж., СССР, 59, 10—15, 1973.
10. Горбань В. А., Зайко Н. Н.—В кн.: Гисто-гематические барьеры и нейрогуморальная регуляция, М., Наука, с. 57—67, 1981.
11. Pardridge W. M., Mietus L. J. J. Clin. Invest., 64, 145—154, 1979.
12. Pardridge W. M. Endocrinol., 105, 605—612, 1979.
13. Pardridge W. M., Mietus L. J. J. Neurochem., 34, 1761—1763, 1980.
14. Pardridge W. M., Mietus L. J. J. Neurochem., 34, 463—466, 1980.
15. Madras B. K. et al. Metabolism, 23, 1107—1116, 1974.
16. Cornford E. M., Bocash W. D. et al. J. Clin. Invest., 63, 1241—1248, 1979.
17. Brightman M. W. et al. J. Neurol. Sci., 10, 215—239, 1970.
18. Brightman M. W. et al. Progress in neuropathology, 146—161, 1970.
19. Cserr H. F. et al. Comp. Biochem. Physiol., 42A, 73—78, 1972.
20. Урюмов М. В.—В кн.: Гисто-гематические барьеры и нейрогуморальная регуляция, М., Наука, с. 180—183, 1981.
21. Майорова Н. А.—В кн.: Физиология и патология гисто-гематических барьеров, М., Наука, с. 387, 1968.
22. Katzman R.—In: Basic Neurochemistry. Little Brown, Boston, 1976.
23. Acher R. Biochimie, 5, 895—911, 1976.
24. Angeletti P. U.—In: Function. Structur. Proteins Nerv. Syst., Plenum Press, N. Y., p. 83—90, 1972.
25. Levi-Montalcini R. Science, 187, 113, 1975.
26. Lim R., Mitsunobu K. Science, 185, 63—65, 1974.

27. *Renowitz L. I., Shashoua V. E.* J. Neurochem., 32, 797—809, 1979.
28. Царегородцева Т. М. Нейроаллергия, М., Медицина, с. 182—191, 1972.
29. Ганнушкина И. В. Иммунологические аспекты травмы и сосудистых поражений головного мозга, М., Медицина, 1974.
30. Портнов А. А. Нейроиммунология в клинике и эксперименте. Труды Моск. НИИ психиатрии МЗ РСФСР, М., 69, 15—380, 1975.
31. Бургман Г. П., Лобкова Т. Н. Исследование спинномозговой жидкости, М., Медицина, 1968.
32. *Lorenzo A. V. et al.* Brain Res., 88, 136, 1975.
33. *Beggs I. L., Waggner J. D.* Lab. Invest., 34, 428, 1976.
34. *Beckett P. G. S.* Biochem. Soc. Spec. Publ., 1, 147—152, 1973.
35. *Degre M. et al.* Acta neurol. scand., 152—160, 1976.
36. *Day E. D., Lassiter S. J.* Immunol., 98, 56—61, 1967.
37. Шамбура Д. А. Спинномозговая жидкость, М., Медгиз, 1954.
38. *Monseu G., Cumings J. N. J.* Neurol. Neurosurg. Psych., 28, 55—60, 1965.
39. *Kacinski M.* Pediat. pol., 56, 281—287, 1981.
40. *Newcombe J. et al.* J. Neurochem., 38, 267—274, 1982.
41. *Johansson B. B., Linder L.-E.* Clin. and Exp. Hypertens., 2, 963—993, 1980.
42. *Sankar R. et al.* Neuropharmacology, 20, 667—673, 1981.
43. *Al-Kassab S. et al.* Acta neurol. scand., 64, 438—445, 1981.
44. Туманов В. П., Иткин С. И.—В кн.: Гисто-гематические барьеры и нейрогуморальная регуляция, М., Наука, с. 204—208, 1981.
45. *Dubois J.-M. et al.* J. Physiol (France), 76, 663—668, 1980.
46. *Olsson J., Hossmann K.-A.* Acta Neuropathol., 16, 103—116, 1970.
47. Бунятян Г. Х.—В кн.: Вопросы биохимии мозга, Ереван, 12, с. 206, 1977.
48. *Warecka K., Bauer H. J.* Neurochem., 14, 783—787, 1966.
49. *Warecka K., Bauer H. Z.* Nervenheilkunde, 189, 53—66, 1966.
50. *Costa P. P. et al.* Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 4499—4503, 1978.
51. *Olsson J.-E. et al.* J. Neurochem., 21, 1153—1154, 1973.
52. *Whitised H., Penny R.* Clin. chim. acta, 50, 111—118, 1974.
53. *Chab I. W. et al.* Neurosci., 1, 57—62, 1976.
54. *Smith A. D.* Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., 261, 363—370, 1971.
55. Neurophysins: carriers of peptide hormones, (Walter R. ed.) Ann. N. Y. Acad. Sci. 248, 1—512, 1975.
56. *Robinson A. G. et al.* Metabolism, 20, 1148—1155, 1971.
57. *Legros J. J. et al.* J. Endocrinol., 60, 327—332, 1974.
58. *Cheng K. W., Friesen H. G. J.* Clin. Endocrinol. and Metabol., 36, 553—560.
59. *Legros J. J. et al.* Proc. Roy. Soc. Ser. B., 169, 1648—1650, 1975 (1976).
60. *Robinson A. G. et al.* Endocrinol., 98, 468—475, 1976.
61. *Cheng K. W. et al.* Endocrinol., 91, 177—184, 1972.
62. *Legros J. J., Drelfuss J. J.* Experientia, 31, 603—605, 1975.
63. *Martin M. J. J.* Endocrinol., 49, 553—554, 1971.
64. *Onoyama K., Omae T.* Acta neurol. scand., 49, 339—344, 1973.
65. *Klatzo I., Miquel J.* Neuropath., exp. Neurol., 19, 475, 1960.
66. *Karcher D. et al.* Brain Res., 10, 307—314, 1970.
67. *Dencer S. J. et al.* Neurology, 11, 441—444, 1961.
68. *Lange S. B. et al.*—In: VI Intern. Hyperbaric Congress, Aberdeen, p. 50, 1977.
69. Синишкин А. А., Прокофьев В. Н. Бюл. exper. биол. и мед., 87, 417—419, 1979.
70. Лукаш А. И., Внуков В. В., Шерстнева И. Я. Космическая биол., 2, 47—51, 1979.
71. Синишкин А. А. и др.—В сб.: Тезисы VII Межд. конгресса по гипербарической медицине, М., с. 188, 1981.
72. Прилико Л. А., Лидемян Р. Р. Вестн. АМН СССР, 1, 33—36, 1982.

Кафедра биохимии РГУ.
Ростов-на-Дону

Поступила 15. II 1982

ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ «МЕХАНИЗМЫ ПЛАСТИЧНОСТИ МОЗГА ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ»

С 29 сентября по 1 октября 1982 г. в Махачкале на базе проблемной лаборатории нейрохимии Дагестанского ордена Дружбы народов государственного университета имени В. И. Ленина был проведен всесоюзный симпозиум «Механизмы пластичности мозга при функциональных и патологических воздействиях», организованный Отделением физиологии АН СССР, Всесоюзным физиологическим обществом им. И. П. Павлова, Дагестанским госуниверситетом им. В. И. Ленина, Институтом мозга ВНИЦПЗ АМН СССР и Институтом физиологии им. А. И. Караева АН АзербССР.

В работе симпозиума приняли участие около 90 ученых из Москвы, Ленинграда, Баку, Еревана, Тбилиси, Минска, Горького, Ростова-на-Дону и других городов Советского Союза. К его открытию были изданы два тома материалов симпозиума «Механизмы пластичности мозга» под общей редакцией чл.-кор. АМН СССР О. С. Адрианова и проф. Э. З. Эмирбекова. Руководили симпозиумом заведующий проблемной лабораторией нейрохимии Дагестанского университета проф. Э. З. Эмирбеков (председатель Оргкомитета), директор Института мозга ВНИЦПЗ АМН СССР чл.-кор. АМН СССР О. С. Адрианов и директор Института физиологии им. А. И. Караева АН АзербССР акад. АН АзербССР Г. Г. Гасанов (заместители председателя).

За три дня интенсивной работы было проведено два пленарных, два секционных и шесть стендовых заседаний, на которых было представлено и обсуждено около 70 сообщений, касавшихся физиологических, морфологических и нейрохимических аспектов пластичности головного мозга.

Симпозиум открыл чл.-кор. АМН СССР О. С. Адрианов. Затем его участников тепло приветствовал проректор по научной работе Дагестанского университета проф. П. И. Тананакин.

С докладом «Механизмы пластичности мозга и поведение» выступил О. С. Адрианов (Москва), изложивший современные представления о пластичности мозга, возможные подходы к изучению этого вопроса. Докладчик проанализировал работы возглавляемого им Института мозга и определил направление дальнейших исследований.

Г. Г. Гасанов (Баку) в докладе «Роль серотонин-реактивной системы миндалевидного комплекса в формировании и осуществлении условных пищевых рефлексов» остановился на вопросе влияния микронейронной серотонины в ядра миндалевидного комплекса на процесс формирования и осуществления условных рефлексов. Автором найдено, что на стадии выработки условного инструментального рефлекса активация серотонин-реактивной системы облегчала формирование временной связи, тогда как при упроченном условном рефлексе вела к торможению условного ответа.

Нейрохимии выступали как на пленарных, так и на секционных заседаниях. Круг затрагиваемых проблем был весьма широк; в основном их объединяло рассмотрение механизмов адаптивного изменения метаболизма в головном мозгу в ответ на внешние воздействия. Эти воздействия были очень различны: от снижения температуры тела и селективного лишения парадоксальной фазы сна до алкогольной интоксикации и действия антигенов. Столь же широким был и диапазон исследуемых нейрохимических показателей: азотистый метаболизм в головном мозгу и некоторые аспекты энергетического метаболизма, медиаторы, рецепторы нейропептидов и др.

В докладе Э. З. Эмирбекова (Махачкала) «Механизмы пластичности азотистого метаболизма мозга при низких температурах тела» были подытожены результаты исследований руководимой им проблемной лаборатории нейрохимии по изучению превращений азотистых веществ мозга при гипотермии и зимней спячке; была раскрыта возможность адаптации биохимических процессов в мозгу в этих условиях вследствие наличия изоферментов, обладающих отрицательной температурной зависимостью, то есть имеющих более высокую активность при низких температурах. На примере глутаминазы показано, что состояние зимней спячки сусликов оказывало на активность этого фермента иное воздействие, чем гипотермия крыс: последняя вызывала изменение физико-химической структуры молекул фермента, приводившее к увеличению его активности в области низких температур, а у зимоспящих эволюционно выработанный набор изоферментов глутаминазы, обеспечивающий высокую активность при низкой температуре. Отрицательная температурная зависимость активности обнаружена и для аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) цитоплазматической фракции мозга гипотермических крыс. Сущность приспособительных модификаций метаболизма связана с обеспечением синтаптических структур охлажденного мозга необходимым количеством медиаторов.

В докладе Н. Н. Демина (Ленинград) «Некоторые биохимические сдвиги в головном мозгу при действии стрессорных факторов и после его прекращения» были сопоставлены эффекты: а) лишения парадоксальной фазы сна и б) факторов космического полета у крыс на содержание белков и РНК в отдельных нейронах и их глиальных клетках-сателлитах, а также тиоловых групп в мембранных белках некоторых структур головного мозга. Как критерий пластичности этих нейрохимических параметров в докладе была рассмотрена скорость их нормализации после прекращения действия исследованных стрессорных факторов. Оказалось, что последние влияли противоположно, причем значительно отличались и сроки нормализации изученных метаболических показателей. Так, небольшие сдвиги в результате космических полетов были более стабильны, чем существенные изменения в результате селективной бессонницы, а в последнем случае значительно более устойчивыми были сдвиги содержания тиоловых групп (его повышение), чем содержание белков и РНК (его выраженное уменьшение). Таким образом, было показано, что механизмы пластичности метаболизма в мозгу при нарушении разных биохимических процессов в различных экстремальных состояниях могут отличаться по эффективности. Далее было сообщено, что возбуждение холинергических структур, предохраняя при бессоннице от снижения содержания белков и РНК, не препятствовало повышению содержания тиоловых групп, тогда как некоторые фармакологические агенты оказались действенными в обоих этих случаях.

Характеристика адаптивных возможностей мозга при недостатке кислорода наша ла отражение в докладе Е. М. Хватовой (Горький) «Метаболические основы адаптивной реакции». После короткой гипобарической тренировки дыхательная активность митохондрий головного мозга при разрежении атмосферы до 310—260 мм рт. ст. возрастала, что приводило к восстановлению фонда фосфатных макроэргов. Существенным фактором является достаточно высокий уровень транспорта восстановительных эквивалентов в этих условиях из цитоплазмы в митохондрии, обеспечиваемой значительным увеличением активности одного из изоферментов NAD-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ), сродство митохондриальной МДГ к субстрату возрастало, увеличивалась степень кооперативности в действии изоферментов, повышалась и чувствительность к малым концентрациям малата; редокс-потенциал оставался близким к норме.

В докладе Т. Х. Шортановой (Пальник) «Метаболические процессы в мозгу, сопряженные с функциональным состоянием» были освещены механизмы пластичности азотистого метаболизма мозга при различных режимах гипербарической оксигенации (ГБО). Это повреждающее воздействие приводило к выраженным морфологическим и цитологическим изменениям, сопровождавшимся стойкими сдвигами активности АсАТ. Если после 5 сеансов ГБО активность АсАТ изменялась (уменьшалась) только в

мозжечке, то через 10 сеансов наблюдали ее увеличение как в мозжечке, так и в продолговатом мозгу, тогда как активность АсАТ не менялась. В то же время в сыворотке крови активность АсАТ увеличивалась уже после одного сеанса ГБО и в дальнейшем продолжала нарастать. Был сделан вывод, что адаптационные возможности организма к действию ГБО крайне ограничены.

В докладе *А. Т. Пикuleва* (Минск) «Обмен глутаминовой кислоты в головном мозгу белых крыс при различных воздействиях» продемонстрировано влияние катехоламинов на активность АсАТ, причем их регуляторная функция осуществлялась главным образом через β -адренорецепторы. Установлено, что сАМР активировал митохондриальную АсАТ, тогда как в изолированной системе адренергические вещества непосредственно на молекулу изофермента влияния не оказывали. Увеличение содержания катехоламинов в организме приводило к изменению кинетических параметров изоферментов АсАТ и повышению их термостабильности. Катехоламины могут повышать и активность цитоплазматической АсАТ, увеличивая долю более активной β -формы.

Анализ влияния АТР на мембраны субклеточных структур, проведенный с использованием методов определения волнового экспонента спектра мутности и синиозного зонда, был приведен в докладе *Г. А. Абиловой* (Махачкала) «Роль и место внеклеточного АТР в обеспечении пластических возможностей центральной нервной системы». Было сообщено, что при действии АТР, Ca^{2+} и Mg^{2+} в различных концентрациях менялись объемы легких и тяжелых синантосом и митохондрий, а также увеличивалась структурированность мембран тяжелых синантосом и митохондрий. Указанные изменения могут возникать и *in vivo* при выделении медиаторов, сопряженном с высвобождением пропорциональных количеств АТР, в результате чего может наблюдаться модуляция эффектов медиаторов на уровне синаптической передачи.

В докладе *И. А. Сытинского* (Ленинград) «Нейрохимические и фармакологические показатели пластичности ГАМКергических синантосов при алкогольной интоксикации» было показано, что при длительном введении крысам этанола система ГАМК претерпевала адаптивные изменения, приводившие к снижению содержания ГАМК. Этот эффект способствовал усилению функционирования структур холин-, дофамин- и норадренергической природы в противовес тормозно-седативному действию алкоголя. Однако при отмене алкоголя, на фоне взрывной активации всех возбуждающих систем головного мозга, характерной для синдрома абстиненции, снижение количества ГАМК играло отрицательную роль. В связи с этим автором предложено при лечении алкоголизма применять различные препараты производных ГАМК—фенибут, пантогам, оксibuтират натрия и другие.

Доклад «К изучению механизмов гипералгезирующего влияния иммобилизационного стресса», сделанный от имени *Н. Н. Каркищенко* (Ростов-на-Дону), также имел фармакобиохимический характер. В нем было продемонстрировано, что порог болевой чувствительности у крыс при иммобилизационном стрессе увеличивался, тогда как анальгезическая активность фентанила, вводимого после такого стресса, резко снижалась. Эти результаты были обсуждены с точки зрения участия опиатных рецепторов в указанных функциональных сдвигах в ЦНС.

Стеновые сообщения *Е. Л. Доведовой*, *Н. С. Поповой* и *А. С. Камышевой* (Москва) были посвящены влиянию пептида дельта-сна на различные стороны метаболизма медиаторов в головном мозгу. Этот пептид изменял активность холинэстераз, оказывая в зависимости от дозы активирующий или ингибиторный эффект, а также стимулировал активность МАО типа А и подавлял активность МАО типа Б.

В стеновом сообщении *И. А. Горошинской*, *Л. А. Алафиренко* и *З. Г. Броницкой* (Ростов-на-Дону) было показано, что в различных органах (мозг, печень, сердце, легкие, почки) изменения активности МАО типа А, связанной с метаболизмом серотонина и норадреналина, сопровождали действие таких факторов, как гипероксия, гипоксия, холодный стресс и адаптация к холоду. В то же время активность МАО типа Б, непосредственно не связанная с метаболизмом медиаторов, существенно не менялась.

Количественные цитохимические методы были применены рядом авторов докладов с целью выявления специфического ответа клеток отдельных структур головного мозга на экстремальные воздействия. Так, Л. М. Герштейн и Г. Л. Беляевой (Москва) было продемонстрировано, что через две недели после клинической смерти продолжительностью 12 мин у собак содержание и концентрация белков в связанных с двигательной функцией нейронах коры больших полушарий и подкорковых образований значительно снижались. В сообщениях Н. Е. Кривенко, У. М. Маликова и А. Н. Павлова (Ленинград) был охарактеризован метаболический ответ нейронов и глиоцитов ряда ядер стволовой части мозга на длительное полное лишение сна (во вращающемся тротбане). При этом выявлено истощение количества белков и /или РНК в тех ядрах, которые в большей степени связаны с регуляцией процесса сна, а именно, в серотонинергическом дорсальном ядре шва и норадренергическом синем пятне.

В. Н. Клециновым, Н. С. Коломеец и Д. Д. Орловской (Москва) была выявлена строгая последовательность изменений гиперхромных нейронов при обратимых (после введения амниазина) и необратимых (в результате деструкции коры, аутолиза) воздействиях. Необратимые изменения сочетались с диссоциацией полисом и накоплением глыбок конденсированного хроматина в ядрах этих нейронов.

Всего на симпозиуме было представлено и всесторонне обсуждено 43 стендовых сообщения. Кураторы тематических разделов на заключительном заседании проанализировали представленные стендовые доклады. В решении симпозиума была отмечена необходимость дальнейшего развития этой формы научных сообщений.

Симпозиум продемонстрировал несомненные достижения в анализе одной из ключевых проблем соотношения между макро- и микросистемами и уровнями церебральной организации и интегральной деятельности головного мозга. В решении симпозиума было отмечено, что существенные данные в этом отношении были получены в работах физиологов, морфологов и особенно в последних исследованиях нейрохимиков. Было подчеркнуто, что важной задачей следует считать дальнейшее развитие комплексных исследований проблем пластических перестроек мозга в норме и при патологических состояниях.

ПАНОВ А. Н.,
ЭМИРБЕКОВ Э. З.

С О Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Громова Е. А., Бобкова Н. В., Плакхинас Л. А., Токарева А. Е.</i> О роли моноаминов мозга в механизмах алкогольного влечения	119
<i>Хайдарлиу С. Х., Годухин О. В., Буданцев А. Ю.</i> Влияние глюкокортикоида дексаметазона на высвобождение и катаболизм 3Н-дофамина в хвостатом ядре крысы	130
<i>Доведова Е. Л., Попова Н. С., Качалова Л. М.</i> Действие пептида дельта-сна на активность моноаминоксидаз, ацетилхолинэстеразы и биоэлектрическую активность двигательных структур головного мозга	138
<i>Войтенко Н. Н., Попова Н. К.</i> Кинетические характеристики реакции дезаминирования серотонина и бензиламина в митохондриях головного мозга у зимоспящих сусликов	148
<i>Бархударян Н. А., Азарян А. В.</i> Очистка и некоторые свойства катепсина S из головного мозга крупного рогатого скота	156
<i>Терпиловская О. И., Иванов В. А., Абрамова З. И., Белова М. М.</i> Белки клеточных ядер головного мозга крыс в онтогенезе	164
<i>Назарян К. Б., Каранетян Н. Г., Казарян Б. А.</i> Очистка нейроспецифического белка 14-3-2	174
<i>Агаев Т. М., Пигарева З. Д.</i> Особенности митохондриальных форм ГАМК-трансаминазы зрительного анализатора собак в постнатальном онтогенезе	180
<i>Подвигина Т. Т., Богдинова Т. С., Митюшов М. И.</i> Интенсивность гликолиза и дыхания в тканях коры, гиппокампа и гипоталамуса крыс под действием кортикостероидных гормонов	189
<i>Котхоридзе Н. И., Алексидзе Н. Г.</i> Влияние адреналина и гидрокортизона на дисульфидредуктазную активность головного мозга крыс	199
<i>Поляков Н. Ф.</i> Цитоспектрофотометрический анализ содержания РНК в системе нейрон—нейроглия структур головного мозга при экспериментальной гематоме	205

Краткие сообщения

<i>Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Виняр Т. Н., Абросимова А. Т., Воронков М. Г.</i> Торможение активности холинэстераз нервной ткани лягушки и тихоокеанского кальмара кремнийорганическими аммониевыми соединениями	212
<i>Судейманов А. К., Броновицкая З. Г.</i> Ганглюозиды мозга крыс при гипербаро-оксигенации	217

Обзоры

<i>Синицкий А. А.</i> Межтканевые взаимоотношения белков в системе энцефалических барьеров	221
--	-----

Хроника

<i>Панов А. Н., Эмирбеков Э. З.</i> Всесоюзный симпозиум «Механизмы пластичности мозга при функциональных и патологических воздействиях»	232
--	-----

CONTENTS

<i>Gromova E. A., Bobkova N. V., Plakhinas L. A., Tokareva A. E.</i> Brain monoamines and the effect of alcohol on rat behaviour	119
<i>Haldarliu S. H., Godukhin O. V., Budantsev A. Ju.</i> Effects of dexamethasone on ^3H -dopamine release and catabolism in rat n. caudatus	130
<i>Dowedova E. L., Popova N. S., Kachalova L. M.</i> Effect of DSIP on the monoaminooxydase and acetylcholinesterase activity and on the bioelectric activity of brain motor structures	138
<i>Voitenko N. N., Popova N. K.</i> Kinetic characteristics of serotonin and benzylamine deamination in hybernation	148
<i>Barkhudaryan N. A., Azaryan A. V.</i> Purification and properties of brain cathepsin S	156
<i>Terptlovskaja O. N., Ivanov V. A., Abramova Z. I., Belova M. M.</i> Nuclear proteins from rat brain in postnatal ontogenesis	164
<i>Nazaryan K. B., Karapetyan N. H., Kazaryan B. A.</i> Purification of neurospecific protein 14-3-2	174
<i>Agaeu T. M., Pigareva Z. D.</i> Mitochondrial GABA-transaminase of dog visual analyzer in postnatal ontogenesis	180
<i>Podvigina T. T., Bogdanova T. S., Mityushov M. I.</i> Effect of corticosteroid hormones on the rate of glycolysis, respiration and oxidative phosphorylation processes in rat brain	189
<i>Koshoridze N. J., Aleksidze N. G.</i> Effect of epinephrine and hydrocortisone on rat brain disulphurreductase activity	199
<i>Polyakov N. F.</i> Brain RNA and experimental intracerebral hematoma	205

Short communications

<i>Brestkin A. P., Vinjar T. N., Rozengart E. V., Abroslmova A. T., Voronkov M. G.</i> Interaction of nervous tissue cholinesterases of frog and pacific squid with silicorganic ammonium compounds	212
<i>Suleimanov A. K., Bronovltskaya Z. G.</i> Effect of hyperbaric oxygenation on rat brain gangliosides	217

Reviews

<i>Sinichkin A. A.</i> Intertissue relations of proteins in the system of encephalic barriers	221
---	-----

Chronicles

<i>Panov A. N., Emlrbekov E. Z.</i> All-Union symposium "Plastic Properties of Brain in Normal and Pathological Conditions"	232
---	-----

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 фотоиллюстраций электрофоретических исследований рисованными схемами не допускается. Количество иллюстративного материала (таблицы и рисунки) не должно превышать в статьях 8, в кратких сообщениях—2.

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

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

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